



VIJOLĖ BRADAUSKIENĖ

**GLITIMO
IMUNOGENIŠKUMO
SUMAŽINIMAS
BIOLOGINĖMIS
PRIEMONĖMIS
KVIEČIŲ (*TRITICUM
AESTIVUM*)
SĖLENOSE**

DOCTORAL DISSERTATION

K a u n a s
2 0 2 3

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

VIJOLĖ BRADAUSKIENĖ

GLITIMO IMUNOGENIŠKUMO SUMAŽINIMAS
BIOLOGINĖMIS PRIEMONĖMIS KVIEČIŲ
(*TRITICUM AESTIVUM*) SĖLENOSE

Daktaro disertacija
Technologijos mokslai, chemijos inžinerija (T 005)

2023, Kaunas

Disertacija rengta 2017–2023 metais Kauno technologijos universiteto Maisto institute.

Mokslinis vadovas

Vyresn. m. d., dr. Lina VAIČIULYTĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005).

Redagavo: anglų kalbos redaktorė Dovilė Blaudžiūnienė (leidykla „Technologija“), lietuvių kalbos redaktorė Aurelija Gražina Rukšaitė (leidykla „Technologija“)

Chemijos inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:

prof. dr. Daiva LESKAUSKAITĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005) – **pirmininkė**;

doc. dr. Loreta BAŠINSKIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005);

doc. dr. Vilma KAŠKONIENĖ (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003);

dr. Zane VINCĒVIČA-GAILE (Latvijos universitetas, Latvija, gamtos mokslai, chemija, N 003);

vyresn. m. d., dr. Daiva ŽADEIKĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005).

Disertacija bus ginama viešame chemijos inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2023 m. spalio 19 d. 13 val. Kauno technologijos universiteto Rektorato salėje.

Adresas: K. Donelaičio g. 73-402, LT-44249 Kaunas, Lietuva

Tel. (+370) 608 28 527; el. paštas doktorantura@ktu.lt

Disertacija išsiųsta 2023 m. rugsėjo 19 d.

Su disertacija galima susipažinti interneto svetainėje <http://ktu.edu> ir Kauno technologijos universiteto bibliotekoje (Gedimino g. 50, Kaunas, LT-44239, Lietuva).

© V. Bradauskienė, 2023

KAUNAS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

VIJOLĖ BRADAUSKIENĖ

REDUCTION OF GLUTEN
IMMUNOGENICITY IN WHEAT (*TRITICUM*
AESTIVUM) BRAN BY USING BIOLOGICAL
TOOLS

Doctoral dissertation
Technological Sciences, Chemical Engineering (T 005)

Kaunas, 2023

This doctoral dissertation was prepared at Kaunas University of Technology, Food Institute during the period of 2017–2023.

Scientific Supervisor

Senior Researcher Dr. Lina VAIČIULYTĖ (Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005).

Edited by: English language editor Dovilė Blaudžiūnienė (Publishing House “Technologija”), Lithuanian language editor Aurelija Gražina Rukšaitė (Publishing House “Technologija”)

Dissertation Defense Board of Chemical Engineering Science Field:

Prof. Dr. Daiva LESKAUSKAITĖ (Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005) – **chairperson**;

Assoc. Prof. Dr. Loreta BAŠINSKIENĖ (Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005);

Assoc. Prof. Dr. Vilma KAŠKONIENĖ (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Chemistry, N 003);

Dr. Zane VINCĒVIČA-GAILE (University of Latvia, Latvia, Natural Sciences, Chemistry, N 003);

Senior Researcher Dr. Daiva ŽADEIKĖ (Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005).

The public defense of the dissertation will be held at 1 p.m. on 19 October, 2023 at the public meeting of Dissertation Defense Board of Chemical Engineering Science Field in Rectorate Hall at Kaunas University of Technology.

Address: K. Donelaičio 73-402, Kaunas, LT-44249, Lithuania

Phone: (+370) 608 28 527; e-mail doktorantura@ktu.lt

The doctoral dissertation was sent out on 19 September, 2023.

The doctoral dissertation is available on the internet <http://ktu.edu> and at the library of Kaunas University of Technology (Gedimino 50, Kaunas, LT-44239, Lithuania).

© V. Bradauskienė, 2023

TURINYS

LENTELIŲ SĄRAŠAS	8
PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	9
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	11
IVADAS	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA	17
1.1. Kviečių produktų svarba, vartojimo tendencijos ir mitybinė vertė	17
1.2. Kviečių sėlenų atskyrimas, cheminė sudėtis, mitybinė ir technologinė vertė	18
1.3. Kviečių baltymų struktūra ir funkcionalumas	21
1.3.1. Glitimo baltymų sandara ir klasifikacija	21
1.3.2. Glitimo baltymų technologinės savybės ir panaudojimas	23
1.4. Su glitimo netoleravimu susijusios problemos	25
1.4.1. Glitimo sukeltos ligos	25
1.4.2. Glitimo imunogeniškumo mechanizmas	27
1.4.3. Beglitimė dieta ir jos trūkumai	29
1.5. Kviečių produktų glitimo hidrolizės priemonės	29
1.5.1. Glitimo hidrolizei naudojamų priemonių klasifikacija	29
1.5.2. Endogeninių grūdų fermentų suaktyvinimas ir panaudojimas	31
1.5.3. Bakterijų fermentai	32
1.5.4. Grybinės kilmės fermentai	36
1.5.5. Augalinės kilmės fermentai	36
1.5.6. Gyvūninės kilmės fermentai	38
1.5.7. Skirtingų biologinių priemonių derinimas skaidant kviečių baltymus ...	39
1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir darbo tikslo pagrindimas	41
2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI	43
2.1. Kviečių vartojimo ir jo dinamikos ryšio su celiakijos paplitimu nustatymas	43
2.1.1. Kviečių vartojimo ir jo dinamikos duomenų analizė	43
2.1.2. Celiakijos (CL) paplitimo duomenų analizė	43
2.2. Tyrimų objektai	43
2.2.1. Kviečių sėlenos	43
2.2.2. Pieno rūgšties bakterijos ir jų paruošimo sąlygos	44
2.2.3. Augalų permeatai	44
2.2.4. Fermentai	44
2.3. Kviečių sėlenų apdorojimas biologinėmis priemonėmis	45
2.3.1. Kviečių sėlenų fermentavimas pieno rūgšties bakterijomis	45
2.3.2. Kviečių sėlenų apdorojimas augalų permeatais	45
2.3.3. Kviečių sėlenų fermentinė hidrolizė	45
2.3.4. Kombinuoto biologinio metodo taikymas	46
2.4. Tyrimo metodai	47
2.4.1. PRB skaičiaus ir aktyvaus rūgštingumo nustatymas bandiniuose	47
2.4.2. Bendro proteazių aktyvumo nustatymas spektrofotometrinio metodu ...	47
2.4.3. Gliadinų hidrolizės vertinimas agarizuotoje terpėje įdubų metodu	47
2.4.4. Glitimo kiekio nustatymas imunofermentiniais ELISA G12 ir R5 metodais	48

2.4.5. Glitimo baltymų išskirstymas NaDS-PAGE metodu	48
2.4.6. Glitimo baltymų ekstrakcija ir gryninimas.....	50
2.4.7. Tirpių baltymų koncentracijos nustatymas.....	50
2.4.8. Suminio ir laisvųjų aminorūgščių kiekio nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) metodu.....	51
2.4.9. Kiekybinis ir kokybinis glitimo baltymų tyrimai AF-ESCh ir ESCh- Q/TOF metodais.....	52
2.4.10. Glitimo imunoreaktyvių peptidų tyrimai ESCh-Q-TOF-MS/MS metodu.....	53
2.5. Statistinė duomenų analizė	54
3. TYRIMŲ REZULTAI IR JŲ APTARIMAS	55
3.1. Kviečių vartojimo ir jo dinamikos ryšys su celiakijos paplitimu.....	55
3.2. Biotechnologinių priemonių taikymas glitimo hidrolizei kviečių sėlenų substratuose.....	60
3.2.1. Pieno rūgšties bakterijų (PRB) proteolitinis veikimas ir pokyčiai sėlenų substrate.....	60
3.2.2. Augalinės kilmės permeatų proteolitinis efektyvumas.....	63
3.2.3. Mikroorganizmų fermentų proteolitinis efektyvumas hidrolizuojant kviečių sėlenų glitimą.....	65
3.2.4. Augalinės kilmės fermentų bromelaino ir papaino efektyvumas hidrolizuojant kviečių sėlenų glitimą	67
3.3. Optimalių hidrolizės sąlygų augaliniams fermentams parinkimas	68
3.4. Kompleksinis biopriemonių veikimas ir jo efektyvumas hidrolizuojant kviečių sėlenų glitimą.....	72
3.4.1. pH pokyčiai ir proteolitinis aktyvumas substratuose fermentacijos metu	73
3.4.2. Tirpių baltymų koncentracijos pokytis hidrolizatuose	74
3.4.3. Glitimo kiekio pokyčiai hidrolizatuose	75
3.4.4. Glitimo baltymų molekulinės masės pokyčiai.....	76
3.4.5. Laisvųjų aminorūgščių kiekio pokyčiai sėlenose	78
3.4.6. Hidrolizės biopriemonėmis įtaka glitimo baltymų gliadinų pokyčiams kviečių sėlenose.....	81
3.4.6.1. Kiekybiniai pokyčiai	81
3.4.6.2. Kokybiniai pokyčiai	83
3.4.6.3. Gliadinų hidrolizės produktų analizė.....	86
3.4.7. Imunoreaktyvių peptidų analizė hidrolizės produktuose.....	88
3.4.8. Glitimo baltymų fermentinės hidrolizės mechanizmas	94
3.5. Biologinėmis priemonėmis apdorotų kviečių sėlenų panaudojimo mažai glitimo turinčių kepinų gamyboje rekomendacijos	97
4. IŠVADOS	101
5. SUMMARY	102
LITERATŪROS SĄRAŠAS	121
GYVENIMO APRAŠYMAS (CV)	141
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS	141
PADĖKA	143

PRIEDAI	144
1 priedas. Imunoreaktyvios kviečių glitimo peptidų aminorūgščių sekos	144
2 priedas. Celiakijos paplitimo tyrimų atrankos proceso struktūrinė schema	145
3 priedas. Kalibracinė tiesė bendram proteazių aktyvumui nustatyti.....	146
4 priedas. Kalibracinės kreivės glitimo koncentracijai nustatyti pagal ELISA glitimo standartus.....	147
5 priedas. Susisteminta informacija apie celiakijos paplitimo duomenis.....	148
6 priedas. Kviečių sėlenų baltymų pokyčiai substratuose taikant skirtingas fermentinės hidrolizės sąlygas	151
7 priedas. Kalibracinė tiesė gliadinų kiekiams nustatyti remiantis AF-ESCh rezultatais	152
8 priedas. Duonos kepinio su kviečių sėlenomis gamybos technologija	153

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1.1 lentelė. Pagrindiniai sveikatos sutrikimus sukeliantys gliadinų peptidai ir jų aminorūgščių sekos	28
2.1 lentelė. Kviečių sėlenų baltymų sudėtis	44
2.2 lentelė. Kviečių sėlenų bandinių paruošimas su skirtingomis PRB kultūromis..	45
2.3 lentelė. Kviečių sėlenų bandinių paruošimas su augaliniais fermentais ir PRB .	46
2.4 lentelė. Elektroforezės geliai baltymams frakcionuoti	49
2.5 lentelė. Kietafazės ekstrakcijos protokolas	50
3.1 lentelė. Kviečių vartojimas ir bendras CL paplitimas įvairiose šalyse.....	58
3.2 lentelė. Kviečių vartojimas ir bendras CL paplitimas pagal žemynus	59
3.3 lentelė. Pieno rūgšties bakterijų (PRB) parametrų kitimas fermentuojamose kviečių sėlenose	61
3.4 lentelė. Glitimo kiekio sumažėjimas kviečių sėlenose po fermentacijos skirtingomis PRB kultūromis.....	62
3.5 lentelė. pH ir proteolitinis aktyvumas kviečių sėlenų substratuose po apdorojimo augalų permeatais	64
3.6 lentelė. Glitimo kiekio pokyčiai kviečių sėlenose po apdorojimo augalų permeatais	64
3.7 lentelė. Glitimo kiekio pokyčiai kviečių sėlenų hidrolizatuose po 2 ir 4 val. apdorojimo mikroorganizmų fermentais.....	66
3.8 lentelė. Glitimo kiekio pokyčiai kviečių sėlenų hidrolizatuose po 2 ir 4 val. apdorojimo augalų fermentais.....	68
3.9 lentelė. pH pokyčiai kviečių sėlenų substratuose nuoseklaus kompleksinio apdorojimo skirtingomis biopriemonėmis metu	73
3.10 lentelė. Glitimo kiekis ir jo pokyčiai kviečių sėlenų hidrolizatuose po fermentacijos skirtingomis biopriemonėmis bei jų deriniais	75
3.11 lentelė. Aminorūgščių kiekiai kviečių sėlenose ir jų hidrolizės produktuose po apdorojimo skirtingomis biopriemonėmis, g/100g	79
3.12 lentelė. Santykinis kviečių gliadinų kiekis, nustatytas AF-ESCh, ir glitimo kiekis, nustatytas ELISA R5 metodu, kviečių sėlenų hidrolizės produktuose po apdorojimo skirtingomis biopriemonėmis	82
3.13 lentelė. Peptidai kviečių sėlenų mėginiuose, identifikuoti <i>Spectrum Mill</i> programa	88
3.14 lentelė. CL sukeliantys glitimo peptidai kviečių sėlenų hidrolizės produktuose.....	91

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1.1 pav. Kviečių sėlenų cheminė sudėtis	19
1.2 pav. Arabinoksilanų struktūros elementai	19
1.3 pav. Sėlenose esančių biologiškai aktyvių medžiagų struktūrinės formulės	20
1.4 pav. Kviečių glitimo baltymų klasifikacija.....	22
1.5 pav. Glitimo schematinis vaizdas	22
1.6 pav. Glitimo baltymų struktūros elementas – gliadino peptidas.....	22
1.7 pav. Glitimo baltymų ryšiai	24
1.8 pav. Kviečių baltymuose nustatyti alergenai ir jų sąsajos su glitimo netoleravimo ligomis	26
1.9 pav. Biotechnologinių priemonių įvairovė glitimo imunogeniškumui sumažinti	30
1.10 pav. Papaino ir bromelaino erdvinė struktūra.....	38
3.1 pav. Vidutinis kviečių suvartojimas vienam gyventojui pagal šalis 2004–2018 m.	55
3.2 pav. Kviečių vartojimo pokyčiai pagal žemynus 1961–2018 m.....	56
3.3 pav. Celiakijos paplitimas pasaulyje	57
3.4. pav. Koreliacija tarp kviečių vartojimo ir CL paplitimo pagal žemynus ir šalis	59
3.5 pav. Bendras proteazių aktyvumas sėlenų substratuose po 4 val. hidrolizės mikroorganizmų fermentais.....	65
3.6. pav. Bendras proteazių aktyvumas sėlenų substratuose po 4 val. hidrolizės augalų fermentais.....	67
3.7 pav. Tirpių baltymų koncentracijos pokytis kviečių sėlenų substratuose priklausomai nuo fermento	69
3.8 pav. Glitimo kiekio procentinis sumažėjimas sėlenų substratuose priklausomai nuo fermento.....	70
3.9 pav. Glitimo kiekio sėlenose procentinio sumažėjimo priklausomybė nuo fermentų koncentracijos	70
3.10 pav. Glitimo kiekio sumažėjimas kviečių sėlenų hidrolizatuose esant skirtingai temperatūrai.....	71
3.11 pav. Bendras proteolitinis aktyvumas kviečių sėlenų substratuose po fermentacijos kombinuotu biopriemonių metodu.....	74
3.12 pav. Proteolitinis aktyvumas agarizuotuose gliadinų substratuose įdubų metodu esant 37°C po apdorojimo biopriemonėmis	74
3.13 pav. Tirpių baltymų koncentracija kviečių sėlenų hidrolizatuose po apdorojimo biopriemonėmis	75
3.14 pav. Kviečių sėlenų glitimo baltymų frakcijos hidrolizatuose (UVITEC 1D gelių dokumentavimo sistema).....	76
3.15 pav. Kviečių sėlenų glitimo baltymų juostų intensyvumo palyginimas	77
3.16 pav. Ryšys tarp laisvų aminorūgščių santykinės dalies kviečių sėlenų hidrolizatuose ir hidrolizuoto glitimo dalies bei bendro proteolitinio aktyvumo	80
3.17 pav. Palyginamosios smailių chromatogramos, rodančios skirtingas nesuskaidytų gliadinų bei standartinės gliadinų medžiagos koncentracijas	81
3.18 pav. Priklausomybė tarp gliadinų ir glitimo kiekio, nustatyto ESCh ir ELISA R5 metodais.....	83

3.19 pav. Kviečių sėlenų, apdorotų bromelainu, gliadinų AF-ESCh chromatograma.....	83
3.20 pav. Kviečių sėlenų gliadinų, apdorotų augaliniais fermentais, AF-ESCh 3D chromatogramos.....	84
3.21 pav. Kviečių sėlenų gliadinų kokybiniai pokyčiai substratuose, užfiksuoti AF-ESCh metodu po fermentinės hidrolizės skirtingais fermentais esant 45°C	85
3.22 pav. α -/ β -gliadinų ir γ -gliadinų smailių intensyvumo palyginimas.....	86
3.23 pav. Kviečių sėlenų hidrolizės produktų chromatogramos, gautos ESCh/MS..	87
3.24 pav. Kviečių sėlenų kontrolinio mėginio ir mėginių, apdorotų skirtingomis biopriemonėmis, hidrolizės produktų signalų intensyvumų palyginimas	87
3.25 pav. γ -prolamino MS fragmentas PFPEPQQPEL kviečių sėlenų bandinyje, apdorotame bromelainu ir PRB.....	92
3.26 pav. α / β gliadino MM1 (UniProtKB-P18573) aminorūgščių seka.	92
3.27 pav. α -gliadino fragmentas LQLQFPQPQLPYPQPQPF kontroliniame kviečių sėlenų bandinyje.....	93
3.28 pav. ω -gliadinų UniProtKB-A2F452 ir UniProtKB-C0KEI8 aminorūgščių sekos.....	93
3.29 pav. γ -gliadino UniProtKB-P08453 aminorūgščių seka	94
3.30 pav. Glitimo antrinę struktūrą palaikančių jungčių nutraukimas	94
3.31 pav. Principinė peptidinių ryšių hidrolizės schema.....	94
3.32 pav. Cys proteinazių veikimo mechanizmas	95
3.33 pav. α -gliadino fragmentas LPYPQPQPF sėlenų bandinyje, apdorotame PRB	96
3.34 pav. Kepinių su kviečių sėlenomis gamybos schema	99

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

Santrumpos:

AF-ESCh – atvirkštinių fazių efektyvioji skysčių chromatografija
AK – arabinoksilanai
AN-PEP – prolinendopeptidazė iš *Aspergillus niger*
APS – amonio persulfatas
AV – aktyvumo vienetas
CL – celiakija
Da – daltonas
EMA – endomiziumo antikūnas
ESCh – efektyvioji skysčių chromatografija
ESCh-MS – efektyvioji skysčių chromatografija su masių spektrometru
ESCh-Q/TOF – efektyvioji skysčių chromatografija su kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru
FAO – Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacija
HL – hidrolizės laipsnis
IgA – imunoglobulinas A
kDa – kilodaltonas
KFE – kietafazė ekstrakcija
KFV – kolonijas formuojantys vienetai
MM – molekulinė masė
MRS – de Man, Rogosa ir Sharpe mitybinė terpė
MS – masių spektrometrija
MS/MS – tandeminė masių spektrometrija
m/z – masės ir krūvio santykis
NaDS – natrio dodecilsulfatas
NaDS-PAGE – natrio dodecilsulfato – poliakrilamido gelio elektroforezė
NCJG – neceliakinis jautrumas glitimui
NKP – ne krakmolo polisacharidai
OPA – o-ftalaldehidas
PEP – prolinendopeptidazė
PepC – karboksipeptidazė
PepN – aminopeptidazė
PepO – prolindipeptidazė
POP – prolinoligopeptidazė
PRB – pieno rūgšties bakterija
 R^2 – determinacijos koeficientas
SCh/MS – skysčių chromatografija su masių spektrometrija
ST – sulaikymo trukmė
TCA – trichloracto rūgštis
TCEP – tris(2-karboksietil)fosfinas
TEMED – tetrametiletilendiaminas
TFA – trifluoracto rūgštis
Tris – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiolis

tTG – audinių transglutaminazė
ŽLA – žmogaus leukocitų antigenas

Mikroorganizmų genčių sąrašas

A. – *Aspergillus*
B. – *Bacillus*
E. – *Escherichia*
F. – *Fusarium*
L. – *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lactobacillus*, *Levilactobacillus*
P. – *Pediococcus*
Penic. – *Penicillium*
S. – *Saccharomyce*

Sutrumpinti aminorūgščių žymėjimai

Ala – A – alaninas
Arg – R – argininas
Asn – N – asparaginas
Asp – D – asparto rūgštis
Cys – C – cisteinas
Phe – F – fenilalaninas
Gly – G – glicinas
Gln – Q – glutaminas
Glu – E – glutamo rūgštis
His – H – histidinas
Ile – I – izoleucinas
Leu – L – leucinas
Lys – K – lizinas
Met – M – metioninas
Pro – P – prolinas
Ser – S – serinas
Tyr – Y – tirozinas
Thr – T – treoninas
Trp – W – triptofanas
Val – V – valinas

IVADAS

Kviečiai yra viena iš plačiausiai pasaulyje maistui naudojamų grūdinių kultūrų, tačiau kai kuriems vartotojams, kurie yra jautrūs kviečių baltymams, kvietiniuose produktuose esantis glitimas sukelia su maisto netoleravimu susijusias organizmo reakcijas arba ligas. Viena iš dažniausiai sutinkamų glitimo sukelių ligų yra celiakija (CL). Šiuo metu vienintelė veiksminga CL gydymo priemonė yra griežta beglitimė dieta. Pasaulyje sparčiai plintant su maisto alergijomis ir netoleravimu susijusioms ligoms, CL paplitimas taip pat sparčiai auga, todėl didėja ir vartotojų, kuriems reikalinga tokia dieta, skaičius. Laikantis beglitimės dietos, negalima vartoti kviečių, rugių, miežių, daliai vartotojų – ir avižų produktų, todėl maistui gaminti pasirenkamos alternatyvios žaliavos – ryžiai, griekiai, soros, sorgai, burnočiai, bolivinės balandos. Nors visuomenėje vyrauja nuomonė, kad ši alternatyvių grūdinių kultūrų dieta yra palankesnė sveikatai, tačiau moksliniais tyrimais jos pranašumas nėra įrodytas. Palyginti su tradiciniais kvietiniais gaminiais, beglitimiuose produktuose dažnai būna daugiau cukraus, riebalų ir mažiau B grupės vitaminų, mineralų bei skaidulinių medžiagų, todėl visiškas grūdinių kultūrų atsisakymas gali būti organizmui ne tik nenaudingas, bet net ir žalingas. Toleruojantiems glitimą vartotojams atsisakyti grūdinių kultūrų tikrai nerekomenduojama, tik reikėtų dažniau rinktis visadalius grūdų gaminius, kurie, turėdami didesnę maistinę ir biologinę vertę, yra palankesni sveikatai.

Vartotojai, netoleruojantys glitimo, dažnai susiduria su problema, kad rinkoje trūksta beglitimių gaminių, kurie juslinėmis savybėmis, kaina ir maistine verte būtų panašūs į tradicinius duonos, konditerijos bei kitus kviečių gaminius. Didėjanti tokių gaminių paklausa skatina ieškoti naujų kviečių produktų gamybos būdų ir strategijų, kaip pašalinti arba sumažinti kviečių glitimo alergizuojantį poveikį. Nepaisant to, kad pastaraisiais metais atlikta nemažai tyrimų glitimo hidrolizei naudojant fizines ir biologines priemones, tokių produktų rinkoje beveik nėra, todėl reikėtų plėsti visaverčių glitimo neturinčių produktų, kuriuos saugiai galėtų vartoti CL sergantys asmenys, asortimentą. Dėl šių priežasčių labai svarbu ištirti kviečių imunogeniškumo pašalinimo / sumažinimo priemones, pritaikyti jas duonos, makaronų ir konditerijos gaminių technologijoje ir pateikti gamintojams rekomendacines tokių beglitimių ar mažiau glitimo turinčių maisto produktų kūrimo nuostatas.

Mokslinėje literatūroje galima rasti nemažai tyrimų, susijusių su glitimo pašalinimu iš kviečių žaliavos, tačiau kaip tyrimų objektas juose dažniausiai naudojami kviečių miltai, kuriuose yra daug krakmolo ir glitimo, tačiau mažai biologiškai vertingų medžiagų. Dėl didelio miltuose esančio glitimo kiekio dažniausiai būna sunku pasiekti norimą hidrolizės efektą: tam reikalingos didelės fermentų koncentracijos, ilgas apdorojimo laikas ir pan.

Siekiant sutrumpinti apdorojimo biopriemonėmis procesą ir plėsti didesnės maistinės vertės beglitimių kviečių produktų gamybą, vertėtų ištirti kviečių antrinių produktų, gautų po kviečių frakcionavimo, glitimo sumažinimo galimybes. Kviečių perdirbimo metu gaunamoje sėlenų frakcijoje gausu biologiškai vertingų maisto medžiagų, daugiausia ne krakmolo polisacharidų, B grupės vitaminų, svarbių organizmui mikroelementų, tačiau kol kas tik labai nedidelė sėlenų dalis panaudojama

maisto produktų gamyboje. Mažai tirtos ir jose esančių imunoreaktyvių baltymų suskaidymo galimybės. Siekiant darnaus ūkio vystymosi ir tvarių technologijų įdiegimo į pramonę, tikslinga būtų kviečių sėlenas panaudoti beglitimių produktų gamybai, tačiau iškyla glitimo likučių efektyvaus pašalinimo problema.

Maisto baltymų imunoreaktyvumą galima sumažinti pašalinant arba suardant imunines reakcijas sukeliančius baltymų fragmentus. Kviečių glitimo baltymų hidrolizę gali sukelti stiprių rūgščių ar šarmų poveikis, kai kurie fiziniai metodai, bet perspektyviausios saugaus maisto kontekste yra biologinės / biotechnologinės priemonės, leidžiančios natūraliai pasiekti geresnį rezultatą bei turinčios mažiausią neigiamą poveikį kitoms biologiškai aktyvioms medžiagoms, o tam tikrais atvejais jas net aktyvinančios.

Įvertinus biologinių priemonių potencialą kviečių sėlenų imunoreaktyvumui pašalinti arba sumažinti, didžiausią dėmesį būtų tikslinga skirti šių priemonių efektyvumo tyrimams. KTU Maisto institute vykdant mokslinius tyrimus, jau anksčiau buvo nustatyta, kad kai kurios pieno rūgšties bakterijų (PRB) kultūros iš KTU MI mikroorganizmų kolekcijos turi aktyvių proteolitinių fermentų, tačiau nebuvo tirtos jų galimybės glitimo hidrolizei. Kadangi naudojant vien tik PRB fermentaciją iki šiol kitų mokslininkų atliktuose tyrimuose buvo suardoma tik dalis kviečių glitimo, būtų tikslinga PRB poveikį derinti su kitomis biologinėmis priemonėmis, pvz., augalų ar mikroorganizmų fermentų hidrolize.

Tikėtina, kad kompleksinis biologinių priemonių poveikis būtų pakankamai efektyvus siekiant pašalinti kviečių sėlenų glitimo imunogeniškumą arba leistų bent jau reikšmingai jį sumažinti. Tokios biopriemonėmis apdorotos kviečių sėlenos galėtų būti naudojamos kepinuose arba kituose gaminiuose su mažesniu glitimo kiekiu, turinčiuose didesnę maistinę vertę ir geras technologines bei juslines savybes. Šiuos produktus galėtų vartoti ne tik žmonės, netoleruojantys glitimo, sergantys CL, bet ir kitos personalizuotos vartotojų grupės.

Disertacinio darbo tikslas – ištirti glitimo imunogeniškumo sumažinimo galimybes kviečių sėlenose, parenkant bei kompleksiškai pritaikant biotechnologines priemones.

Disertacinio darbo uždaviniai:

1. Įvertinti kviečių vartojimo ir jo dinamikos ryšį su celiakijos paplitimu;
2. Ištirti skirtingų biologinių priemonių (pieno rūgšties bakterijų (PRB), augalų permatų, išgrynintų mikroorganizmų ir augalų fermentų) efektyvumą kviečių sėlenų glitimo hidrolizei;
3. Nustatyti optimalias bromelaino ir papaino veikimo sąlygas (temperatūrą, pH, trukmę, fermento koncentraciją) ir įvertinti šių parametų įtaką fermentinės hidrolizės efektyvumui kviečių sėlenų substratuose;
4. Kompleksiškai panaudoti atrinktas biologines priemones siekiant efektyviai sumažinti bendrą glitimo ir jo imunoreaktyvių peptidų kiekį kviečių sėlenose;
5. Įvertinti fermentacijos biopriemonėmis įtaką glitimo baltymų kiekybiniam ir kokybiniam pasikeitimui;

6. Pateikti rekomendacijas mažiau glitimo turinčių produktų, papildytų biologinėmis priemonėmis apdorotomis kviečių sėlenomis, gamybos technologijai.

Tyrimo mokslinis naujumas

1. Įvertinus skirtingais lygiais ryšį tarp kviečių vartojimo ir celiakijos paplitimo, nustatyta stipri teigiama koreliacija ($r = 0,88$, $p < 0,05$) tarp suvartojamo kviečių kiekio ir celiakijos paplitimo pagal žemynus.
2. Ištirtas augalinių fermentų (bromelaino, papaino bei jų derinio) efektyvumas kviečių sėlenų glitimo hidrolizei neutralioje terpėje ir nustatytas net 95,23% glitimo kiekio sumažėjimas naudojant papainą. Nustatyta optimali hidrolizei augalinių fermentų koncentracija (0,5%) bei temperatūra (45°C).
3. Pirmą kartą pritaikytas ir ištirtas kompleksinis biopriemonių poveikis glitimo kiekio sumažinimui kviečių sėlenose, nuosekliai derinant fermentinę hidrolizę bromelainu / papainu / jų deriniu bei fermentaciją atrinktų PRB (*L. plantarum* P-1, *L. brevis* R-1 ir *L. acidophilus* 308) mišiniu, 98,94% sumažino glitimo kiekį ir veiksmingai skaidė imunoreaktyvius peptidus.

Tyrimo praktinė reikšmė

Remiantis bendro ir specifinio proteazių aktyvumo tyrimo rezultatais atrinktos PRB kultūros (*L. plantarum* P-1, *L. brevis* R-1 ir *L. acidophilus* 308), turinčios didžiausią potencialą kviečių glitimo hidrolizei. Įrodytas augalinių proteazių (bromelaino ir papaino) potencialas sumažinti glitimo kiekį kviečių sėlenose ir nustatytos optimalios jų hidrolizės sąlygos (fermento koncentracija, temperatūra, trukmė) jiems taikyti maisto produktų gamybos procesuose.

Praktiniam kviečių sėlenų apdorojimui pasiūlytas veiksmingas ir saugus biotechnologinis glitimo bei jame esančių imunoreaktyvių peptidų skaidymo metodas (hidrolizė bromelaino bei atrinktų PRB padermių mišiniu), kurio taikymas gali teigiamai veikti glitimo netoleruojančių ar CL sergančių žmonių mitybą. Pateiktos rekomendacijos didesnės mitybinės vertės bei mažiau glitimo turinčios duonos, papildytos biopriemonių kompleksu apdorotomis kviečių sėlenomis, gamybos technologijai.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Išgrynintų augalų proteazių bromelaino ir papaino poveikį nuosekliai derinant su PRB fermentacija, pasiekiamas didesnis kviečių sėlenų glitimo hidrolizės efektyvumas negu naudojant atskiras biologines priemones.
2. Bromelaino ir atrinktų PRB mišinio kompleksinis poveikis pasižymi dideliu kviečių sėlenų glitimo hidrolizės efektyvumu (98,94%), tarp hidrolizės produktų nelieta imunoreaktyvių peptidų.
3. Kviečių sėlenų apdorojimą bromelaino bei PRB mišinio kompleksu galima pritaikyti duonos gamybos procese ir gauti mažiau glitimo turinčius specialios mitybinės paskirties produktus.

Tyrimo rezultatų aprobavimas

Doktorantūros studijų metu *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazėje indeksuotuose leidiniuose su cituojamumo rodikliu disertacijos tema buvo paskelbtos trys publikacijos. Pristatyti du pranešimai tarptautinėse konferencijose užsienio šalyse, keturi pranešimai tarptautinėse konferencijose, vykusiose Lietuvoje, ir vienas pranešimas respublikinėje konferencijoje.

Pasiūlyta produkto gamybos technologija, pagal rekomendacijas laboratorijoje pagamintas prototipas.

Disertacijos struktūra

Disertacija parašyta lietuvių kalba. Ją sudaro santrumpų sąrašas, įvadas, trys skyriai (literatūros apžvalga, tyrimų medžiagos ir metodai, tyrimų rezultatai ir jų aptarimas), išvados, literatūros sąrašas (290 literatūros šaltinių), gyvenimo aprašymas, disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas, priedai. Darbe pateikta 20 lentelių ir 44 paveikslai. Disertacijos bendra apimtis – 154 puslapiai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kviečių produktų svarba, vartojimo tendencijos ir mitybinė vertė

Javai yra laikomi svarbiausiu žmonių maisto šaltiniu pasaulyje, iš jų daugiausia suvartojama kviečių ir ryžių. Kviečių produktai vidutiniškai sudaro iki 20% pasaulio gyventojų suvartojamos energijos [1]. Europos šalyse iš jų gaunama apie 30% [2], o kai kuriose Azijos ir Šiaurės Afrikos šalyse – net iki 55% visos maisto energinės vertės [3]. Iš kviečių gaunama energijos dalis labai skiriasi besivystančiose ir išsivysčiusiose šalyse [3]. Nors tradiciškai kviečių daugiausia vartojama Europoje, čia pastaraisiais metais matoma vartojimo mažėjimo tendencija. Šie pokyčiai gali būti susiję su tuo, kad pastarąjį dešimtmetį kviečiai įgijo sąlyginai neigiamą reputaciją, todėl vis daugiau Vakarų šalių gyventojų nusprendžia laikytis dietos be kviečių glitimo [4]. Pasaulinis kviečių vartojimas auga dėl gyventojų skaičiaus didėjimo ir dėl didėjančio jų vartojimo Azijos ir Afrikos šalyse. Dėl urbanizacijos ir didėjančių pajamų kviečių produktai tampa vis populiarešni Azijos gyventojų racione, kur anksčiau tradiciškai buvo vartojami tik ryžiai [5]. Kviečių paklausai pasaulyje didžiausią įtaką turi Kinija, kur kviečių suvartojimas išaugo net 6 kartus [6].

Pasaulyje žinoma apie 25000 skirtingų kviečių veislių, iš kurių dauguma priklauso paprastųjų kviečių (*Triticum aestivum* L.) rūšiai. Didžioji rinkos dalis (apie 95%) taip pat tenka paprastiesiems kviečiams [1, 7]. Kitos kviečių rūšys, tokios kaip kietieji kviečiai (*T. durum* L.), spelta (*T. spelta* L.), vienagrūdžiai (*T. monococcum* L.), dvigrūdžiai kviečiai (*T. dicoccum* L.), sudaro tik nedidelę rinkos dalį. Skiriasi ir šių kviečių genotipų cheminė sudėtis bei technologinės savybės. Paprastieji kviečiai (*T. aestivum* L.) turi daugiausia angliavandenių bei skaidulinių medžiagų [8], o pagal baltymų kiekį nusileidžia tik kietiesiems kviečiams, todėl puikiai tinka duonos gamybai ir dar vadinami „duoniniais“ [9]. Šie kviečiai taip pat yra pagrindinė daugelio pagrindinių maisto produktų (pusryčių dribsnių, pyragų ir kitų kepinų) žaliava [10]. Kietieji kviečiai išsiskiria didžiausiu baltymų kiekiu, todėl naudojami makaronų gamyboje. Vienagrūdžiai, dvigrūdžiai ir spelta kviečiai auginami rečiau dėl mažesnio derlingumo ir prastesnių technologinių savybių, bet pasižymi didesne mitybine verte, pvz., riebalų bei mineralinių medžiagų kiekiu [8]. Nors kuriant ir atrenkant kviečių veisles istoriškai daugiausia dėmesio skirta jų derlingumui ir atsparumui stresams auginimo metu, pastaruoju metu daug nuveikta gerinant jų maistines ir technologines savybes: sukurtos daugiau krakmolo sintetinančios, daugiau mineralinių medžiagų kaupiančios, daugiau arba mažiau glitimo turinčios kviečių veislės [11], labiau tinkamos spirito, krakmolo ar duonos pramonei bei specialios mitybinės paskirties produktų gamybai.

Paprastųjų kviečių didžiausią grūdo dalį sudaro endospermas, kuriame yra daugiausia krakmolo (apie 65–70%), 9–12% baltymų (glitimo, albuminų, globulinų) ir nedaug riebalų bei skaidulinių medžiagų. Kviečio grūde yra apie 2% lipidų, daugiausia jų yra gemale, tačiau yra ir endosperme (iki 1,7%). Jie skirstomi į krakmolo lipidus ir laisvuosius bei susijusius ne krakmolo lipidus. Ne krakmolo lipidai sudaro apytiksliai 2/3 kvietinių miltų lipidų ir daugiausia tai – trigliceridai. Lizofosfolipidai, ypač lizolecitinas, yra pagrindinė krakmolo lipidų sudedamoji dalis. Kviečių

endospermo riebaluose dominuoja linolo riebalų rūgštys, mažiau yra palmitino ir oleino riebalų rūgščių [12].

Daug biologiškai vertingų medžiagų yra gemale. Šioje grūdo dalyje susikaupusi didžiausia dalis lipidų (apie 28,5%): dauguma jų yra fosfolipidai, tačiau yra ir glikolipidų, gausu polinesočiųjų riebalų rūgščių (linolo, linoleno). Gemale yra mineralinių medžiagų (kalio, fosforo, magnio, geležies) bei didžiausia dalis fermentų [13].

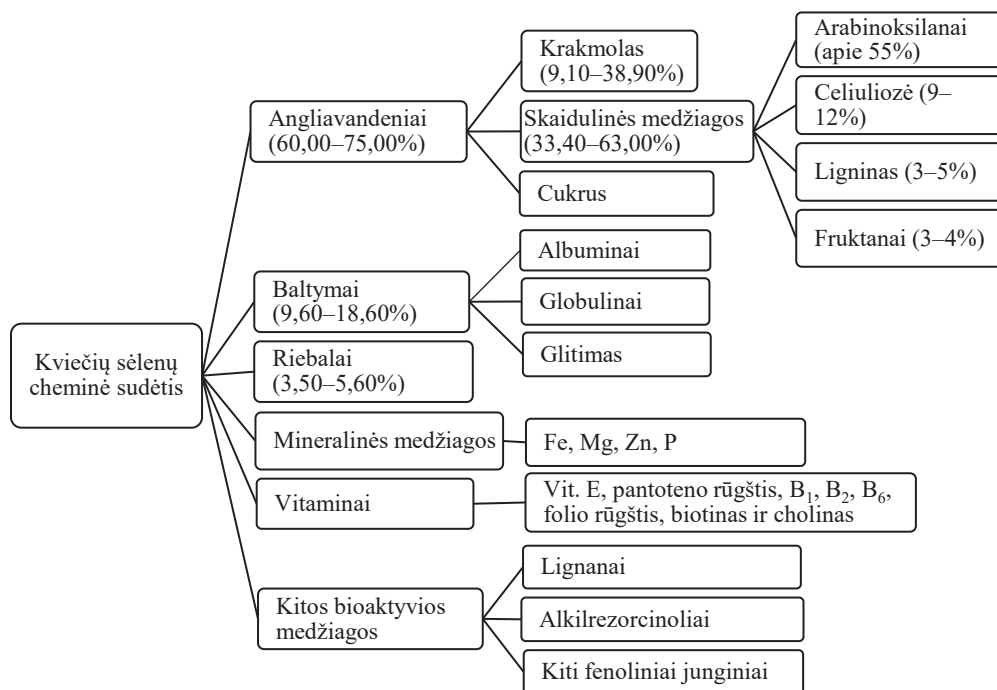
Kviečiai užima svarbią vietą žmonių mityboje dėl B grupės vitaminų ir mineralinių medžiagų. Jie yra geras cinko (2,0–3,0 mg/100 g) ir geležies (3,0–3,6 mg/100 g) šaltinis. Kviečiuose taip pat yra seleno, kurio kiekis labai skirtingas: nuo maždaug 1,0 µg/100 g iki daugiau kaip 200 µg/100 g [14]. Seleno koncentracija kviečiuose daugiausia priklauso nuo šio elemento prieinamumo dirvožemyje, todėl Vakarų Europoje užauginti kviečiai paprastai jo turi 10 kartų mažiau negu užauginti Šiaurės Amerikoje [15].

1.2. Kviečių sėlenų atskyrimas, cheminė sudėtis, mitybinė ir technologinė vertė

Sėlenas sudaro keli sluoksniai: perikarpis, testa ir aleuronas. Aleurono sluoksnyje koncentruojasi ląsteliena, vitaminai ir mineralinės medžiagos, todėl perdirbtų grūdų produktuose šių medžiagų kiekiai lieka mažesni. Sėlenos nuo kviečių grūdų dažniausiai atskiriamos taikant tradicinę malimo technologiją, kai sėlenos ir gemalai atskiriami nuo endospermo, kuris toliau sumalamas į smulkius miltus, kurių didžiausią dalį sudaro krakmolai, baltymai ir labai nedidelis kiekis skaidulinių medžiagų [13]. Sėlenos nuo kviečių grūdų atskiriamos naudojant valcinius malūnus. Prieš malimą kviečių grūdai pirmiausia drėkinami purškiant vandeniu iki maždaug 15% drėgmės [16]. Šio proceso metu grūdų perikarpio sluoksnis sugeria vandenį, o endospermas suminkštėja, todėl atskiriant nuo endospermo sėlenos mažiau sulūžinėja. Galimi, bet rečiau naudojami kiti sėlenų atskyrimo būdai: lupimas ir šlifavimas, kada gaunamos geresnės kokybės sėlenos. Šie procesai dažniau naudojami malant kietuosius kviečius, tačiau retai naudojami paprastiems kviečiams [16].

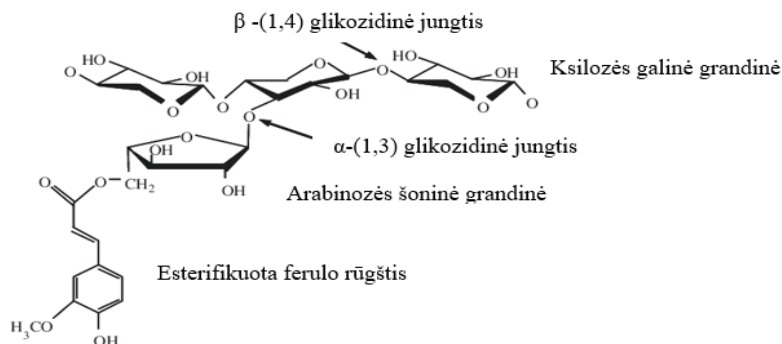
Taigi, sėlenos gali sudaryti nuo 12 iki 19% viso kviečių grūdų svorio, priklausomai nuo veislės ir malimo proceso (šlapio ar sauso), naudojamo joms išgauti [17]. Sėlenos laikomos pagrindiniu miltų malimo šalutiniu produktu, tačiau tradiciškai tik apie 10% jų panaudojama maisto pramonėje, o didžioji jų dalis sunaudojama gyvulių pašarams [17]. Tik paskutiniaisiais metais matoma gaminių su sėlenomis (pvz., kepinų ar pusryčių dribsnių) asortimento plėtos tendencija [18]. Jos taip pat gali būti sumalamos kartu su likusiais kviečių grūdų komponentais gaminant visadalius miltus. Dėl sėlenose esančių medžiagų teigiamos įtakos žmonių sveikatai skatinama didesnė viso grūdo žaliavų ir skaidulinių medžiagų naudojimo tendencija grūdų produktų rinkoje, tačiau Europoje dauguma kvietinių maisto produktų vis dar yra pagaminti iš rafinuoto endospermo, į kurį neįeina išoriniai grūdo sluoksniai (sėlenos) [19].

Didžiausią kviečių sėlenų dalį sudaro angliavandeniai, tačiau jose yra nemažai baltymų, riebalų ir biologiškai aktyvių medžiagų (1.1 pav.).



1.1 pav. Kviečių sėlenų cheminė sudėtis. Sudaryta remiantis Babu ir kt. [18], Ordaz-Ortiz ir Saulnier [20], Shah ir kt. [21]

Mitybiniu požiūriu itin svarbūs yra grūduose esantys ne krakmolo polisacharidai arabinoksilanai (AK) [22]. AK kartu su β -gliukanu, celiulioze ir arabinogalaktano peptidais įeina į ląstelių sienelių sudėtį. Nors pagal mokslinius tyrimus AK skirstomi į vandenyje tirpius ir netirpius, visų jų sandara panaši. AK frakcijos pagrindinė dalis yra ksilozės ir arabinozės polimerai (75–90%), svarbus parametras yra arabinozės ir ksilozės santykis, kurio vidutinė skaitinė vertė yra 0,5–0,6 [20, 21]. AK sudaro linijinės β -(1,4)-d-ksilopiranozilo liekanų struktūros, kurios O-2 ir / arba O-3 padėtyje gali būti pakeistos α -l-arabinofuranoze. Nedidelę AK sudedamąją dalį sudaro ferulo rūgštis, kuri O-5 padėtimi susijusi su arabinoze (1.2 pav.).



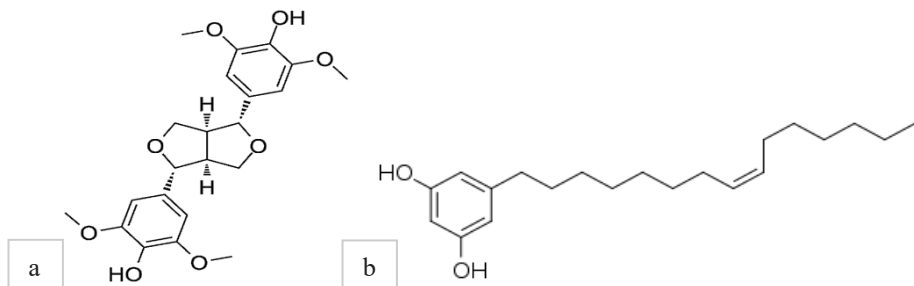
1.2 pav. Arabinoksilanų struktūros elementai [23]

AK struktūra lemia jų unikalias fizikines ir chemines savybes bei funkcionalumą duonos gamyboje [23]. Yra daug mokslinių tyrimų, kurie parodo AK mitybinę vertę. Įrodyta, kad AK ir jų hidrolizės produktai turi teigiamą įtaką sveikatai: geba veikti kaip prebiotikai, pasižymi imunomoduliuojamuoju poveikiu [24, 25], mažina cholesterolio kiekį, sustiprina tam tikrų mineralų absorbciją, padidina išmatų tūrį ir t. t. Skaidulinių medžiagų vandenyje tirpūs komponentai (AK bei jų skilimo produktai, β -gliukanai) turi apsauginį poveikį nuo kraujagyslių demencijos sukeltos žalos [26], mažina tam tikrų vėžio rūšių riziką [27], turi teigiamą poveikį žarnyno mikrobiotos ekologijai, fiziologijai ir sveikatai [28]. AK gali būti naudojami maisto ir pašarų pramonėje, taip pat galėtų būti naudojami tam tikrose dietose, pvz., turint antsvorio, nes yra duomenų, kad jie sumažina kitų medžiagų pasisavinimą [29].

Kviečių sėlenų baltymai turi aukštą biologinę vertę, nes į jų sudėtį įeina visos esminės aminorūgštys, ypač išsiskiria dideliu Lys kiekiu [18]. Kviečių sėlenų lipiduose vyrauja polinesočiosios riebalų rūgštys [18]. Iš šalutinių kviečių malimo produktų galima išgauti aukštos kokybės aliejų ir vitaminą E [30].

Visos mineralinės medžiagos bei vitaminai taip pat kaupiasi daugiausia kviečių sėlenų aleurono sluoksnyje [13]. 100 g sėlenų randama net apie 11 mg geležies, 12 mg magnio, 7,3 mg cinko, taip pat yra daug fosforo, kurio didžioji dalis įeina į fito rūgšties sudėtį. Sėlenose yra daug vitamino E (apie 1,4 mg), B grupės vitaminų: iki 3,9 mg pantoteno rūgšties, iki 0,75 mg vitamino B₂, 0,54 mg vitamino B₁, iki 1,3 mg vitamino B₆, taip pat yra folio rūgšties, biotino ir cholino [18].

Moksliniuose tyrimuose daug dėmesio skiriama kitoms sėlenose esančioms biologiškai svarbioms medžiagoms: lignanamams, alkilrezorcinoliams ir kitiems fenoliniams junginiams. Priklausomai nuo kviečių veislės, sėlenose randama nuo 5 iki 20 mg/100g lignanų [31]. Visadaliuose miltuose jų lieka vidutiniškai 0,52 mg/100g, o tradiciniuose miltuose – iki 0,2 mg/100 g. Lignanai (1.3 pav., a) – tai polifenolių grupė, turinti fitoestrogenų poveikį [32] ir pasižyminti sveikatą stiprinančiomis savybėmis. Maistas, kuriame gausu lignanų, gali užkirsti kelią tam tikrų rūšių vėžiui (pvz., krūties vėžiui moterims po menopauzės, gaubtinės žarnos vėžiui) bei lėtinėms ligoms, susijusioms su gyvenimo būdu (pvz., širdies ir kraujagyslių ligoms, 2 tipo diabetui ir pan.) [31, 33].



1.3 pav. Sėlenose esančių biologiškai aktyvių medžiagų struktūrinė formules: a – lignanų, b – alkilrezorcinolio [32]

Alkilrezorcinoliai (1.3 pav., b), dar vadinami fenoliniais lipidais, yra žinomi kaip viso grūdo kviečių vartojimo biožymenys. Alkilrezorcinoliai gali veikti kaip

antioksidantai, apsaugantys mažo tankio lipoproteinus nuo oksidacinės pažeidimo, turi slopinamąjį poveikį vėžinėms ląstelėms [13]. Fenolinės rūgštys, kurių kviečiuose yra beveik 120 mg/100 g, taip pat turi didelę naudą sveikatai dėl jų antioksidacinio poveikio [34]. Hemdane ir kt. [35] įrodė, kad mikronizuotų sėlenų panaudojimas duonos gamyboje padidina laisvųjų aminorūgščių, bendrojo fenolio, maistinių skaidulų koncentraciją, tešlos fitazės aktyvumą ir antioksidacinį poveikį. Taigi, visos šios sėlenose esančios medžiagos padidina gaminių mitybinę vertę.

Sėlenos taip pat pagerina ir gaminių technologines savybes. Ne krakmolo polisacharidų AK vandeninių tirpalų būdingoji klampa, jų vandens prijungimo ir emulsinimo pajėgumai, kurie tiesiogiai susiję su jų molekuline mase, turi teigiamą įtaką duonos kokybei [23]. Nepaisant to, kad vandenyje tirpūs AK sudaro santykinai mažą dalį (apie 1/3), nustatyta, kad jie turi įtakos kepinų kokybės parametrams. Nuo ne krakmolo polisacharidų kiekio labai priklauso tešlos vandens surišimas ir kvietinės duonos šviežumas. Tęstiniuose Hemdane ir kt. [36] tyrimuose buvo įrodyta, kad PRB fermentacija dar padidina funkcinių junginių koncentraciją, sustiprina teigiamą mitybinį poveikį ir pagerina duonos, papildytos sėlenomis, tekstūrą, tačiau autoriai pripažįsta, kad reiktų atlikti daugiau tyrimų naudojant sėlenas duonos gamyboje, siekiant išlaikyti reikiamą balansą tarp duonos juslinių savybių ir maistinės vertės.

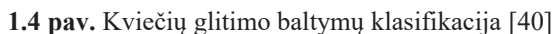
1.3. Kviečių baltymų struktūra ir funkcionalumas

Kviečių baltymai skirstomi į glitimą (netirpų vandenyje) ir ne glitimo baltymus (albuminą ir globuliną), kurie yra tirpūs vandenyje arba druskų tirpaluose. Ne glitimo baltymai, kurie sudaro 15–20% visų kviečių baltymų, daugiausia randami išoriniuose kviečių grūdų sluoksniuose, tačiau jų yra ir endosperme. Jie turi emulsinimo ir putų sudarymo savybių [37], todėl turi įtakos gaminių reologiniams bei tekstūros rodikliams. Glitimo baltymai dar vadinami rezerviniais ir sudaro 75–80% visų kviečių baltymų [38].

1.3.1. Glitimo baltymų sandara ir klasifikacija

Glitimas (angl. *gluten*) yra pagrindinis kviečių grūdų baltymas. Panašūs baltymai egzistuoja ir rugiuose (*Secale cereale*) (sekalinas), miežiuose (*Hordeum vulgare*) (hordeinas) ir avižose (*Avena sativa*) (aveninas). Jie kartu yra vadinami „glitimu“. Glitimas yra vienas iš sudėtingiausių baltymų. Jo polimerinių baltymų tinklinė struktūra priklauso nuo genotipo, auginimo sąlygų ir technologinių procesų [39].

Moksliniais tyrimais nustatyta, kad glitimą sudaro keletas skirtingos sandaros ir molekulinės masės tarpusavyje susijusių baltymų, kurie skirstomi į dvi pagrindines frakcijas pagal tirpumą alkoholio ir vandens tirpaluose: tirpių gliadinų ir netirpių gliuteninų (1.4 pav.).



1.5 pav. Glitimo schematinis vaizdas [43]

NC(=O)CC[C@@H](NC(=O)C1CCCN1)C(=O)C2CCCN2[C@@H](NC(=O)C3CCCN3)C(=O)C[C@H](N)C(=O)C4CCCN4[C@@H](NC(=O)C5CCCN5)C(=O)C6CCCN6C(=O)Cc7ccccc7

1.6 pav. Glitimo baltymų struktūros elementas – gliadino peptidas

22

gliadinuose ir gliuteninuose yra panašios ar tokios pačios, mokslinėje literatūroje visi prolaminai dar skirstomi į tris grupes: turinčius mažai sieros, turinčius daug sieros ir didelės molekulinės masės gliuteninų subvienetus [42, 44]. Mažiausiai sieros turi ω -gliadinai, β , γ -gliadinai jos turi šiek tiek daugiau, o didžiausiu sieros kiekiu pasižymi didelės molekulinės masės gliuteninai.

α , β ir γ gliadinai tarp grandinių turi disulfidinius ryšius, o ω -gliadinai neturi Cys ir šių ryšių nesudaro [39]. ω -gliadinams būdingas didžiausias Gln, Pro ir Phe kiekis, jie kartu sudaro apie 80% visos aminorūgščių sudėties. Wieser [42] ω gliadinus dar suskirstė į $\omega 5$, $\omega 1$ ir $\omega 2$ klases. $\omega 5$ -gliadinų molekulinė masė (apie 50,00 kDa) yra didesnė nei $\omega 1,2$ -gliadinų (apie 40,00 kDa). Jų pagrindą sudaro pasikartojančios sekos, kuriose vyrauja Gln ir Pro (pvz., PQQPFPQQQ). α/β - ir γ -gliadinų molekulinės masės panašios (28,00–35,00 kDa), o Gln ir Pro procentinė dalis yra daug mažesnė nei ω -gliadinų. Jie skiriasi tarpusavyje keletu aminorūgščių, pvz., Tyr, kiekiu. Kiekvienas iš šių tipų turi skirtingus N ir C galų domenų. N-galo domeną (40–50% visų baltymų) daugiausia sudaro pasikartojančios sekos, kuriose gausu Gln, Pro, Phe ir Tyr, ir jis yra unikalus kiekvienam tipui. α/β -gliadinų dažniausiai pasikartojančios sekos yra QPQPFPQQPYP. Tipiškas γ -gliadinų sekos fragmentas yra QPQPFP, jis gali kartotis net iki 16 kartų. Šių baltymų C-galo sekos nesikartoja, turi mažiau Gln ir Pro, būtent šiose sekose skiriasi Cys kiekiai [41]. α -gliadinų centrinis domenų sudarytas iš 113–134 aminorūgščių, o γ -gliadinų – iš apytiksliai 150 aminorūgščių.

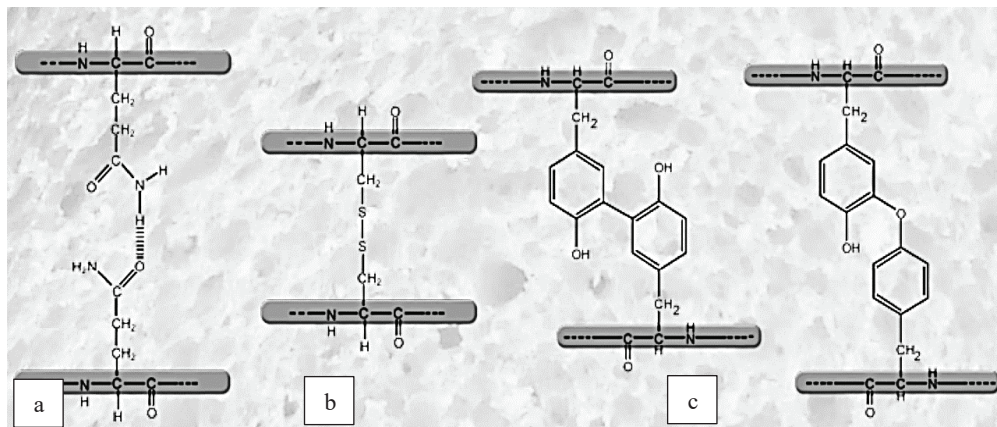
Tyrimais nustatyta, kad ω -gliadinams ir α/β - bei γ -gliadinų N-galų domenams būdinga β -spiralinė konfigūracija, o C-galo domenai dažniausiai sudaro α -spirales ir β -klostytas struktūras [44].

Gliuteninų frakciją sudaro agreguoti baltymai, kurių grandinės sujungtos disulfidiniais ryšiais. Jų dydis yra įvairus – nuo maždaug 500,00 iki daugiau nei milijono kDa, taip jie gali sudaryti didžiausius ir sudėtingiausius gamtoje esančius baltymų polimerus. Gliuteninai yra išskiriami skaidant disulfidinius ryšius redukuojančiais agentais ir identifikuojami elektroforezės metodu. Redukavus disulfidinius ryšius, susidarę gliutenino subvienetai tirpsta vandens ir alkoholio tirpaluose, panašiai kaip gliadinai. Remiantis molekulių elektroforetiniu judriu, gliutenino subvienetai dar skirstomi į keturis pogrupius, t. y. A, B, C ir D (1.4 pav.). A pogrupis yra didelės molekulinės masės gliuteninų subvienetai (67,00–88,00 kDa), o B, C ir D pogrupiai vadinami mažos masės gliuteninų subvienetais (32,00–35,00 kDa) [41]. Mažos molekulinės masės gliuteninų aminorūgščių sekos yra panašios į γ - ir α -gliadinų sekas. Didelės molekulinės masės gliuteninai turi ypač didelį Gln, didelį Pro ir Gly bei mažą Lys kiekį, taip pat iš kitų glitimo baltymų išsiskiria didesniu Cys kiekiu [40].

1.3.2. Glitimo baltymų technologinės savybės ir panaudojimas

Glitimo baltymai tešlai suteikia vandens surišimo savybes, klampumą ir elastingumą [39, 45]. Yra nemažai mokslinių tyrimų, kuriuose analizuojama, kas lemia šias kviečių baltymų savybes. Nustatyta, kad joms įtakos turi abu glitimo baltymai: ir gliadinai, ir gliuteninai. Hidratuoti gliadinai turi didžiausią įtaką tešlos klampumui ir pakilimui. Gliuteninų susipynusi ir nekovalentiškai susieta struktūra suteikia atsparumą deformacijai stresinėmis sąlygomis ir padidina duonos gaminių

elastingumą [42, 46]. Kvietinių miltų tešlos savybės labai priklauso nuo gliuteninų molekulinės masės pasiskirstymo. Paprastai gliuteninai sudaryti iš didelės molekulinės masės subvienetų polimerų suformuotų stuburų ir iš mažos molekulinės masės subvienetų išsišakojusių polimerų. Unikalias glitimo savybes daugiausia lemia vandenilio ryšiai (1.7 pav., a), disulfidiniai ryšiai, kurie dar vadinami disulfidiniais tilteliais (1.7 pav., b), kovalentiniai, joniniai ir hidrofobiniai ryšiai (1.7 pav., c) [44, 47, 48].



1.7 pav. Glitimo baltymų ryšiai: a – vandeniliniai ryšiai tarp glutamino šoninių grandinių; b – disulfidiniai tilteliai, c – kryžminiai ryšiai tarp tirozino šoninių grandinių [47]

Gupta ir kt. [49] įrodė, kad glitimo baltymai turi du agregacijos lygius: iš pradžių gliutenino didelės ir mažos molekulinės masės subvienetai sudaro kovalentinius polimerus, o antrasis lygis – suformuojamas ir stabilizuojamas užpildas veikiant vandenilio ir disulfidiniams ryšiams [50, 51]. Baltymus, kurie dalinai yra adsorbavęsi ant krakmolo, hidratuoja vanduo. Taip glitimas, sąveikaudamas su vandeniu, maišant suformuoja elastingą baltyminę struktūrą. Minkant kvietinę tešlą, gliutenino molekulės susijungia tinkliškai, prie šio tinklo jungiasi gliadino molekulės, suteikdamos mišiniui klampumo ir stangrumo. Tokią tešlą kildinant mielėmis, rūgimo metu išsiskiriantis CO₂ sudaro akytą struktūrą, kurią išlaiko glitimo tinklas, todėl tešla iškyla. Kepimo metu tešlos baltymai koaguliuoja, krakmolai dalinai kleisterizuojasi, ir susiformuoja duonos struktūra. Kepimo pabaigoje glitimo baltymai denatūruojasi, todėl iškeptas produktas išlaiko pastovią formą ir dydį. Glitimo pokyčiai laikant gaminius siejasi su duonos žiedėjimu, kai glitimas absorbuoja vandens molekules [45, 52].

Žinant mokslinius kvietinės tešlos formavimo principus, paremtus fizikine chemija ir polimerų teorija, galima tiksliai reguliuoti glitimo ir tešlos savybes [53]. Tešlos minkymas spartina glitimo gijų ir tinklo susidarymą, tad ilgiau minkytas kepinys būna stangresnis. Ilgai maišant glitimo ryšių padaugėja iki kritinio lygio. Esant tokiam ribiniam polimero dydžiui, ilgesnis maišymas sukelia glitimo tinklo struktūros irimą. Didelis vandens kiekis tešloje taip pat skatina glitimo tinklo susidarymą. Kadangi įrodyta, kad disulfidiniai ryšiai yra pagrindinis glitimo reologinių savybių faktorius [38], glitimo tinklo stiprumą galima reguliuoti specialiais

priedais – oksiduojančiais ir redukuojančiais agentais, kurie tiesiogiai veikia disulfidinius ryšius tarp glitimo baltymų. Į tešlą dedami riebalai slopina glitimo molekulių tinklo susidarymą, todėl mažina tešlos elastingumą ir didina kepinio trapumą. Tad, norint gauti trapesnius kepinius, į tešlą dedama riebalų, mažinamas vandens kiekis, trumpiau minkoma.

Kviečių glitimo baltymų unikalios technologinės savybės lemia kvietinių produktų populiarumą. Kviečių glitimo baltymai sudaro itin stiprų tešlos karkasą, kuris gerai sulaiko CO₂ dujas gaminant porėtus kepinius. Dėl šių savybių kviečiai geriausiai tinka duonos, pyragų ir kitų kepinių gamybai. Duonai reikalingi miltai, kurie turi daug glitimo, o pyragams ir sausainiams jo gali būti mažiau. Naujausioje mokslinėje literatūroje galima rasti nemažai duomenų apie atskirto vitalinio kviečių glitimo panaudojimą maisto pramonėje [54]. Džiovinto ir smulkiai sumalto glitimo gali būti dedama į tešlą, norint padidinti jos tamprumą, duonos struktūros stabilumą bei stangrumą. Glitimo baltymai turi aukštą mitybinę vertę dėl juose esančių visų esminių aminorūgščių, todėl glitimas kartu yra ir papildomas baltymų šaltinis, padidinantis produktų maistinę vertę [55]. Glitimo gali būti dedama ir į gyvūnų maistą, taip padidinant baltymingumą. Glitimas yra atsparus šilumos poveikiui, gali veikti kaip rišamoji medžiaga, todėl jis naudojamas ir kaip priedas perdirbtuose maisto produktuose, siekiant geresnės tekstūros, drėgmės sulaikymo ir geresnio skonio [43]. Kadangi glitimas gerai sugeria skysčius, o kartu su juo – ir skonines medžiagas, naudojant ekstruziją, jam galima suteikti pluoštinę struktūrą, todėl jis tinka mėsos analogų gamybai [56].

Platesnes glitimo panaudojimo galimybes riboja mažas jo tirpumas vandenyje, todėl vis dažniau naudojamas įvairiais būdais modifikuotas glitimas. Vienas iš glitimo modifikavimo metodų – fermentinis baltymų skaidymas gaminant hidrolizatus. Hidrolizatai yra vertinami dėl funkcinių ir juslinių savybių [55]. Įrodyta, kad kviečių glitimo hidrolizatai pasižymi įvairiu biologiniu aktyvumu, pvz., antioksidaciniu aktyvumu, į opioidus panašiu aktyvumu, imunologiniu aktyvumu ir kt. [57, 58], dėl atsilaisvinusių Gln ir Asp aminorūgščių hidrolizatai įgauna *umami* skonį, todėl gali būti naudojami gėrimų, padažų ir kt. produktų gamybai [54]. Reikia paminėti, kad gaminant hidrolizatus susiduriama su problema, kad tam tikri peptidai jiems suteikia nepageidaujamą kartų skonį, todėl pastaruoju metu nemažai dėmesio skiriama šios problemos sprendimui [59].

1.4. Su glitimo netoleravimu susijusios problemos

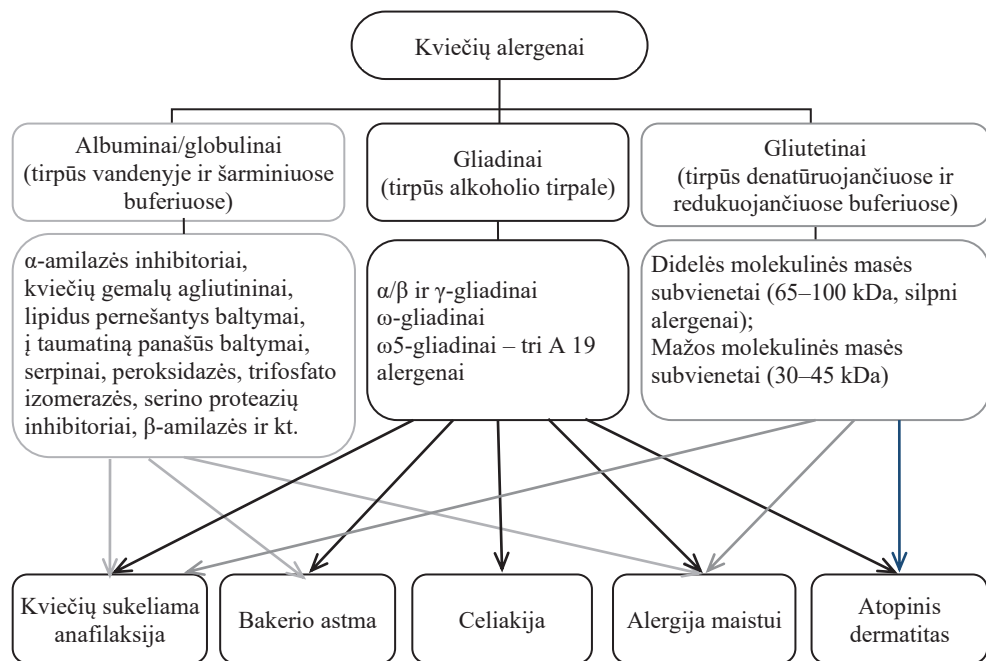
Nors kviečių produktai tampa vis svarbesni gyventojų racione pasauliniu mastu, per paskutinius dešimtmečius išryškėjo kviečių ir kitų panašių grūdinių kultūrų netoleravimo sukeltos problemos.

1.4.1. Glitimo sukeltos ligos

Iš mokslinės literatūros žinoma, kad grūdinių kultūrų glitimo baltymai yra sunkiai virškinami ir vartotojams gali sukelti stiprų netoleravimą, alergiją kviečiams, o kai kuriems žmonėms – celiakiją (CL) (lot. *Coeliacus*) [60]. Tyrimai rodo, kad pasaulyje su glitimo netoleravimo problemomis susiduria iki 13% gyventojų [61], tarp jų 0,1–3,0% žmonių Europoje yra alergiški kviečiams [62]. CL paplitimas pasaulyje auga ir šiuo metu jau viršija 1% populiacijos [63, 64, 65]. Nustatyta, kad CL yra

plonosios žarnos uždegiminė liga, atsirandanti genetinę polinkį (ŽLA DQ2/8 genų grupes) turintiems asmenims [66]. Skirtingą šios ligos paplitimą įvairiose šalyse lemia ir aplinkos faktoriai: ankstyvas kūdikių maitinimas dirbtiniais mašiniais, stresas, gretutinės ligos ir per didelis suvartojamo glitimo kiekis, kuris vakarietiškoje mityboje sudaro 5–20 g per parą. Tipiški CL klinikiniai požymiai yra plokščia žarnyno gleivinė ir malabsorbcija, todėl pacientus vargina diarėja, svorio kritimas bei anemija [67, 68]. Taip pat vis didėja neceliakinio jautrumo glitimui (NCJG) atvejų [63, 69]. Jie nustatomi pacientams, kuriems nėra CL ar alergijos kviečiams, bet po glitimo turinčių maisto produktų vartojimo jie patiria žarnyno suerzinimą, pilvo pūtimą ir kitus nemalonius simptomus [70, 71].

Alergija kviečiams apibrėžiama kaip padidėjusio jautrumo reakcija į kviečių baltymus [72]. Įvairius alergijos simptomus sukelia antigeniniai epitopai, priklausantys gliadinams [73, 74] ir mažos molekulinės masės gliuteninams [75]. Moksliniais tyrimais nustatyta, kad už skirtingas kviečių netoleravimo formas yra atsakingos skirtingos kviečių glitimo struktūrinės dalys (1.8 pav.). Gliadinai yra atsakingi už CL vystymąsi, be to, jie gali sukelti visų rūšių glitimo netoleravimo formas [76]. Dauguma ekspertų [72, 77, 78] laikosi nuomonės, kad pagrindiniai nuo kviečių priklausomos anafilaksijos sukėlėjai yra ω 5-gliadinai ir mažos molekulinės masės gliuteninai, o ω 1/2-gliadinai yra mažiau imunotoksiški.



1.8 pav. Kviečių baltymuose nustatyti alergenai ir jų sąsajos su glitimo netoleravimo ligomis. Sudaryta remiantis Mamone ir kt. [2] bei Uvackova ir kt. [79]

Nustatyta, kad alergenų yra ir tirpiose baltymų frakcijose. Tokios baltyminės medžiagos, kaip α -amilazės/tripsino inhibitoriai, β -amilazė, peroksidazės, serpinai ir α -purotioninas, taip pat sukelia su kviečių vartojimu susijusią IgE alergiją [80, 81]. Su

NCJG susiję ne tik kviečių baltymai (amilazės-tripsino inhibitoriai, kviečių gemalų aglutininai ir kt.), bet ir kiti kviečių komponentai, tokie kaip fermentuojami mono-, di- ir oligosacharidai ir kt. [82].

Mokslo pažanga taikant klinikinius, imunologinius, genomo ir proteomo tyrimus leido identifikuoti didžiąją dalį kviečių alergenų [83], taip pat daug dėmesio skiriama šių alergenų, dažniausiai peptidų, alergizuojančio poveikio mechanizmo tyrimams.

1.4.2. Glitimo imunogeniškumo mechanizmas

Moksliniais tyrimais nustatyta, kad alergines reakcijas ir celiakiją (CL) sukelia nevisiškai virškinamojo trakto fermentų suskaidomi glitimo peptidai. Kaip buvo minėta, kviečių glitimo sudėtyje yra daug aminorūgščių Gln (26–53%) ir Pro (10–29%), kurios sudaro specifines sunkiai skaidomas sekas, atsparias žmogaus virškinamojo trakto fermentams (pepsinui, chimotripsinui, tripsinui) bei žarnyno sienelių fermentiniam poveikiui [84, 85]. Didelis Gln likučių kiekis pasikartojančia seka ypač padidina intramolekulinių ir tarpmolekulinių vandenilio ryšių susidarymo tikimybę. Šie baltymų fragmentai (epitopai), kurių ilgis dažnai yra 9 ar daugiau aminorūgščių, lieka nesuskaidyti: lieka nenutraukti peptidiniais ryšiais prieš ir po Pro ar Gln. Šie peptidai prasiskverbia per plonosios žarnos gleivinę, pasiekia jungiamąjį audinį, esantį po epiteliu (*Lamina Propria*), stimuliuoja žarnyno T-ląsteles ir kartu su audinių transglutaminazės receptoriais bei ŽLA-DQ2 ir ŽLA-DQ8 antigenais inicijuoja imuninių ląstelių atsaką [60, 86].

Per paskutinius dešimtmečius atlikta nemažai tyrimų, siekiant identifikuoti šiuos kliniškai svarbius epitopus (1.1 lent.). Nustatyta, kad ne visuose virškinimui atspariuose glitimo fragmentuose yra CL sukeliančių epitopų. Peptidų reaktyvumui turi įtakos ne tik aminorūgščių skaičius Pro ir Gln pozicijos sekose, bet ir N- ir C-galo šoninės liekanos. Kai peptiduose yra šių epitopų, jie laikomi imunogeniniais peptidais [87]. Specialiomis bioinformatikos priemonėmis nustatyta, kad dažniausiai tokiuose peptiduose pasikartojančios aminorūgščių sekos yra QQQP, QQPY, PSQQ, QPYP [88] o vertinant tripeptidus – QPF, QPQ, PYP [89].

Nustatyta, kad šie imunogeniniai peptidai dažniausiai priklauso gliadinams. Rocher ir kt. [90] tyrimų duomenimis, kaip CL sukeliantys baltymai daugiausia identifikuoti α - ir γ - tipo gliadinai. Jų molekulinės masės pagal N-galo aminorūgščių seką: 31,00, 35,00, 38,00, 45,00 kDa α -gliadinai ir 31,00, 40,00, 50,00 kDa γ -gliadinai. Dauguma mokslininkų [83, 85] yra tos nuomonės, kad tarp nustatytų glitimo fragmentų α -gliadinų epitopai yra labiausiai imunogeniški, o α -gliadino peptidas, kurio seka sudaryta iš 33 aminorūgščių (1.1 lent.), yra vienas iš labiausiai žinomų virškinimui atsparių glitimo peptidų [91]. Jis laikomas labiausiai imunogenišku, nes turi net šešis epitopus. Būtent dėl šio baltymo atsiranda histologiniai pokyčiai plonosios žarnos gleivinėje, kurie dar kitaip vadinami malabsorbcijos sindromu. Kitas žinomas α -gliadino baltymas, susidedantis iš 19 aminorūgščių, sukelia žarnų gaurelių atrofiją.

1.1 lentelė. Pagrindiniai sveikatos sutrikimus sukeliantys gliadinų peptidai ir jų aminorūgščių sekos [91]

Gliadino peptido aminorūgščių seka (ilgis)	Gliadino baltymo tipas
QLQFPQPQLPY (12)	α -gliadinai
QLQFPQPQLPYQPQPF (18)	
LQLQFPQPQLPY (13)	
LQLQFPQPQLPYQPQPF (19)	
LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (33)	
VRFPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL (24)	
VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL (24)	
QNPSQQQPQEQVPLVQQQ (18)	
LPFPQQPQQPFPQPQ (15)	γ -gliadinai
NMQVDPSPGVQWPQQQPF (18)	

Imunotoksiškų peptidų, nors mažesniais kiekiais, yra randama ir gliuteninuose. Juose nustatytos dažniausiai pasikartojančios sekos yra GQQ, PGQGGQ ir GYYPTSL(P)QQ [92]. Remiantis moksliniais tyrimais, yra sukurta sveikatos sutrikimus sukeliančių kviečių oligopeptidų duomenų bazė, kuri vis papildoma. Pavyzdžiui, 2005 metais joje buvo apie 60 imunogeninių oligopeptidų iš *Triticum* rūšių glitimo [91], ir jų ilgis skyrėsi nuo 7 iki 91 aminorūgščių [93]. Šiuo metu išsamios kviečių sudedamųjų dalių, sukeliančių sveikatos sutrikimus, duomenų bazės yra laisvai prieinamos internete, jose yra 37914 peptidų ir 833 epitopai. Sollid ir kt. [83] išskyrė pagrindinius šiuo metu žinomus kviečių glitimo epitopus (1 priedas), kurie sukelia antigeninių ląstelių atsaką. Imunoreaktyvių epitopų minimalus ilgis yra 9 aminorūgštys, o epitopo pavadinime užkoduota informacija apie sužadinaimą žmogaus leukocitų antigeną (ŽLA) ir glitimo baltymą, kuriam priskiriamas peptidas (pvz.: DQ2.5-glia- α 1a, DQ2.5-glia- γ , DQ2.2-glut-L1 ir kt.).

Klinikiniais tyrimais nustatyta, kad T-ląstelių rinkiniai, atpažįstantys skirtingus epitopus, priklauso nuo CL paciento genotipo (DQ2.5, DQ2.2 ir DQ8.5), tačiau kai kurie kviečių baltymų epitopai sukelia reakcijas daugumai pacientų [94]. Šie epitopai dar vadinami imunodominantiniais. Didžioji dalis CL sergančių pacientų, turinčių genetiškai išreikštą antigeną DQ2.5, reaguoja į epitopus DQ2.5-glia- α 1a, DQ2.5-glia- α 2, DQ2.5-glia- ω 1 ir DQ2.5-glia- ω 2, o dauguma pacientų, turinčių išreikštą antigeną DQ8, reaguoja į epitopą DQ8-glia- α 1 [95].

Glitimo imunogeniškumo priežasčių analizė parodė, kad, norint pašalinti imunoreaktyvių epitopų poveikį žmogaus sveikatai, reikia glitimo peptidus suardyti. Nustatyta, kad, glitimo baltymus suskaidžius į mažesnes nei 9 aminorūgščių liekanas, jie nebesukelia imuninio atsako bet kurio haplotipo pacientams [84, 94]. Taigi, bet kuri priemonė, galinti suskaidyti glitimą į kuo mažesnius peptidus, teoriškai yra tinkama glitimo imunoreaktyvumui sumažinti / pašalinti iš grūdinių kultūrų (kviečių, rugių ir miežių).

Kryptinga augalų selekcija pasitelkiant biotechnologines priemones yra kita glitimo imunogeniškumo sumažinimo galimybė. Naujos kartos javų veislės, turinčios mažiau glitimo, yra kuriamos jau keletą dešimtmečių [11]. Be to, taikant genų inžinerijos metodus ir žinant imunotoksiškų baltymų sekų taikinius kviečio DNR grandinėje, atsirado galimybės išvesti kviečių ar kitų javų veisles, neturinčias

imunoreaktyvių sekų [83]. Ši strategija jau yra taikoma kviečių su mažesniu imunogeninių epitopų kiekiu veislių selekcijoje [96, 97], tačiau rinkoje dar nėra kviečių, kurių produktai būtų visiškai saugūs CL pacientams [95].

1.4.3. Beglitimė dieta ir jos trūkumai

Medikai sutaria, kad šiuo metu vienintelė galima ir veiksminga CL prevencijos priemonė yra griežta beglitimė dieta [98]. Ši dieta tapo populiari ir tarp asmenų, kurie nejaučia simptomų, bet ieško sveikos mitybos alternatyvų [99]. Laikantis beglitimės dietos, negalima vartoti kviečių, rugių, miežių, daliai asmenų – ir avižų produktų, todėl maistui gaminti pasirenkami alternatyvūs mažiau glitimo turintys arba beglitimiai produktai – ryžiai, griekiai, soros ir kt.

Beglitimės dietos iššūkiai susiję su kryžminiu užterštumu ir aiškos maisto produktų ženklinimo politikos stoka [100]. Pacientai, sergantys CL, dėl produktų užterštumo ir „paslėpto“ glitimo (pvz., sutirštintuose padažuose ir sriubose) dažnai per dieną suvartoja didesnę nei leistina glitimo kiekį [101]. Produktai be glitimo taip pat yra brangesni [100, 102]. Nors vyrauja nuomonė, kad tokia dieta yra sveikesnė, moksliniai tyrimai atskleidė, kad šių pacientų mityba yra nesubalansuota, joje didesnę procentinę dalį sudaro kalorijos iš riebalų, o mažesnę – iš angliavandenių, taip pat beglitimėje dietoje buvo nustatytas mažas ne krakmolo polisacharidų kiekis [103]. Įrodyta, kad rinkoje esantys beglitimiai kepiniai gali sukelti įvairių maistinių medžiagų trūkumą [104]. Nustatyta, kad CL sergantys pacientai, su maistu gaudami tokį patį energijos kiekį, gauna mažiau skaidulų, niacino, folio rūgšties, ti amino, vitamino A, vitamino B₁₂, kalcio, fosforo, magnio, geležies [105, 106, 107], cinko [108] ir seleno [109]. Dėl aukšto beglitimės dietos glikemijos indekso padidėja nutukimo rizika [106, 110].

Didėjanti aukštos kokybės beglitimių duonos gaminių paklausa tapo svarbia socialine ir ekonomine problema [98]. Duonos gaminiai, pagaminti iš natūraliai glitimo neturinčių žaliavų: grikių, ryžių, kukurūzų, sorgo, burnočių miltų, dažnai pasižymi prastesnėmis tekstūros ir juslinėmis savybėmis, palyginti su atitinkamais glitimo turinčiais produktais [111]. Dėl šių priežasčių yra ieškoma naujų beglitimių kepinų gamybos būdų. Vienas iš jų galėtų būti kenksmingo glitimo alerginio poveikio eliminavimas biotechnologinėmis priemonėmis grūdinių kultūrų produktų gamybos procese. Maisto produktai, pagaminti iš hidrolizuotų kviečių produktų, būtų gera alternatyva beglitimėje dietoje. Tačiau, nepaisant mokslo ir technologinės pažangos, kol kas rinkoje nėra kvietinių produktų, kurie turėtų tokią pačią mitybinę vertę ir nesukeltų alerginių reakcijų glitimui jautriems vartotojams.

1.5. Kviečių produktų glitimo hidrolizės priemonės

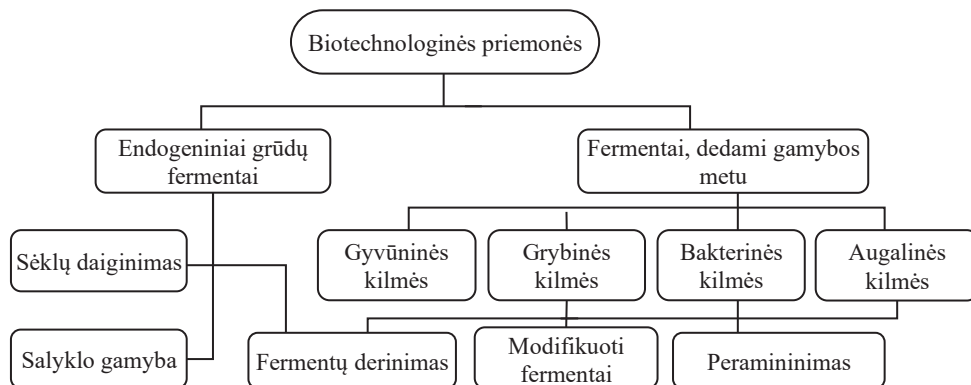
1.5.1. Glitimo hidrolizei naudojamų priemonių klasifikacija

Siekiant praplėsti beglitimių gaminių rinką, paskutinius du dešimtmečius buvo aktyviai vykdomi tyrimai bandant pašalinti grūdų produktų, o ypač kviečių, imunotoksinį poveikį [104]. Kviečių glitimo, kaip ir kitų maisto baltymų, imunoreaktyvumo sumažėjimas gali būti pasiektas vykstant jų proteolizei, kurios metu pasikeičia alergenų struktūra arba suardomi imunotoksiški baltymų fragmentai. Baltymų proteolizę galima vykdyti naudojant chemines priemones bei fizinio ir

biologinio poveikio metodus [112]. *Codex Alimentarius* [113] nurodo beglitimių produktų ribą 20 mg glitimo/kg produkto. 100 mg/kg riba taikoma produktams, turintiems mažai glitimo. Todėl, taikant glitimo hidrolizės priemones, reikia pasiekti tokį efektyvumą, kad būtų pasiektos šios ribos.

Atlikta nemažai mokslinių tyrimų, skirtų glitimo imunotoksiniams junginiams skaidyti visais minėtais būdais. Bassi [114] tyrė rūgščių, šarmų bei mikroorganizmų fermentų efektyvumą siekiant pašalinti glitimo likučius iš kviečių krakmolo ir nustatė, kad fermentai veikia efektyviau negu cheminės medžiagos. Buvo tirtas įvairių fizinių priemonių poveikis glitimo hidrolizei. Daugiausia tyrimų [115, 116, 117, 118] buvo skirta mikrobangų poveikio įvertinimui, buvo pastebėti reikšmingi glitimo antrinės struktūros pokyčiai, tačiau mikrobangos nebuvo veiksmingos mažinant CL sukeliančių epitopų kiekį kviečių produktuose. Buvo bandymų kviečių baltymų imunogeniškumą sumažinti įvairiais terminio apdorojimo būdais, naudojant aukštą slėgį, ekstruziją ir džiovinimą purškiant [119, 120, 121], tačiau visais atvejais didelė dalis peptidinių ryšių liko nesuardyta. Kitas tirtas fizinis metodas – poveikis ultragarsu – taip pat sumažino glitimo baltymų molekulinę masę, tačiau poveikis kviečių glitimo alergenams nustatytas nereikšmingas [122]. Kita vertus, yra įrodyta, kad ultragarsas gali būti naudojamas fermentinei hidrolizei suaktyvinti [123, 124]. Kombinuota fermentų / ultragarso technologija sukelia kavitacijos efektą, kuris sustiprina fermentų makromolekulių pernešimą iki substrato paviršiaus ir taip aktyvina fermentų poveikį [125, 126]. Tokio apdorojimo metu reikia tiksliai įvertinti ir valdyti ultragarso proceso parametrus, nes per didelis dažnis ir / ar trukmė gali fermentus inaktyvuoti [127]. Apibendrinant galima teigti, kad didelės fizinių metodų energetinės ir technologinės sąnaudos bei mažas efektyvumas, nepageidaujamos cheminės medžiagos maisto produktuose riboja fizinių bei cheminių priemonių taikymą maisto pramonėje. Todėl, daugumos mokslininkų nuomone, biotechnologinės priemonės, pagrįstos fermentų naudojimu, yra efektyvi alternatyva atverianti naujas galimybes beglitimių produktų gamyboje [128, 129]. Galimybė derinti fizines ir biotechnologines priemones taip pat aktuali, bet reikalauja papildomų mokslinių tyrimų [130].

Mokslinėje literatūroje galima rasti platų spektrą glitimo hidrolizės tyrimuose naudojamų biologinių priemonių (1.9 pav.).



1.9 pav. Biotechnologinių priemonių įvairovė glitimo imunogeniškumui sumažinti [131]

Šiam tikslui gali būti suaktyvinami grūduose esantys fermentai arba panaudojami pridėtiniai įvairios kilmės fermentai: bakterijų, grybų, augalų ir gyvūnų [130, 131, 132]. Glitimą galima hidrolizuoti naudojant vienkomentę hidrolizę fermentais arba derinant skirtingas biologines priemones. Glitimo skaidymas fermentais gali būti laikomas natūraliu, saugiu ir neinvaziniu būdu gliadinų ir gliuteninų imunotoksiškumui sumažinti. Biopriemonės gali būti taikomos tiek kviečių žaliavos pirminio perdirbimo metu, tiek integruojamos į glitimui jautriems vartotojams skirtų kviečių produktų gamybą [133, 134].

1.5.2. Endogeninių grūdų fermentų suaktyvinimas ir panaudojimas

Mokslinių duomenų analizė parodė, kad glitimui suskaidyti žaliavose ir maisto produktuose gali būti naudojamos skirtingos grūdų egzo- ir endoproteazės [66]. Egzoproteazės (peptidazės) atskelia po vieną ar keletą aminorūgščių nuo N-galo (aminopeptidazės) arba C-galo (karboksipeptidazės) ir pagal tai, kiek aminorūgščių atskelia, dar skirstomos į di-, tri- ir oligopeptidazes. Endoproteazės gali skaidyti vidinius peptidinius ryšius. Egzo- ir endoproteazės dar klasifikuojamos pagal chemines struktūras, esančias jų aktyviuose centruose, į 4 pagrindines klases: asparto (Asp), serino (Ser), metalo ir cisteino (Cys) proteazes. Asp proteinazė ir Ser karboksipeptidazė yra aktyvios net ir sausuose grūduose, o kitoms proteazėms suaktyvinti reikia specifinių sąlygų [135]. Proteazės dažnai susintetinamos kaip neaktyvios pro-proteazės, kurios aktyvuojamos esant tinkamoms temperatūros, drėgmės ir kt. sąlygoms [136], todėl vienas iš būdų aktyvuoti endogenines proteazes yra grūdų daiginimas. Nors ši priemonė dažniausiai taikoma miežiams – ruošiant slyklą ir gaminant alų [137, 138, 139], tokiu būdu galima sumažinti ir kviečių imunogeniškumą. Didžiausią vaidmenį skaidant baltymus daigintuose kviečiuose vaidina Cys ir metalo proteinazės, nes jos aktyvuojasi jau pirmąjį daiginimo dieną ir skaido gliuteninus bei gliadinus. Kitą daiginimo dieną aktyvuojasi Ser proteinazės, skaidančios gliadinus. Pagal skaidomus ryšius glitimo imunoreaktyvumui pašalinti svarbiausios yra specifinės greta Pro esančius ryšius skaidančios prolinendoproteazės (PEP), Pro oligopeptidazės (POP), Pro karboksipeptidazės (PepC) ir aminopeptidazės (PepN) [136].

Natūraliai kviečių glitimo hidrolizė vyksta grūdams dygstant. Kviečių proteazių potencialą skaidant glitimą tyrė Michalcová ir kt. [140]. Kviečių grūdai buvo daiginami iki 7 parų esant skirtingai 15–30°C temperatūrai. Glitimo skilimas prasidėjo po 3 dienų, o mažiausia jo koncentracija buvo nustatyta 7-tą dieną (20°C ir pH 5,5). Kad ilgiau nei 8 dienas daiginti kviečiai neturi glitimo ir gali būti naudojami beglitimiams produktams papildyti, įrodė ir Adrianos ir kt. [141]. 8–10 dienų daigintų kviečių želmenyse glitimo kiekis buvo mažesnis už ELISA metodo nustatymo ribą.

Biologine priemone glitimo hidrolizei gali būti daigintų grūdų ekstraktai, sultys arba išgryninti fermentai. Eksperimentai, kuriuose buvo naudojami substratai su gliadinais ir gliuteniniais, parodė, kad daigintų grūdų (rugių, kviečių, emerų) proteazės gali suskaidyti glitimo baltymus [142, 143, 144]. Grūdai buvo daiginti, liofilizuoti, sumalti, o juos ekstrahavus, gauti peptidazių tirpalai. Šiomis peptidazėmis apdorojant gliadino peptidus, per 90 min. jų sumažėjo apie 70%. Nors daigintų kviečių fermentų aktyvumas pasirodė esąs mažesnis nei daigintų rugių fermentų, substratuose nebuvo rasta peptidų, ilgesnių kaip 8 aminorūgštys. Daiginamuose miežiuose (*Hordeum*

vulgare) aktyviausias fermentas yra Cys proteazė, kuri skaido kviečių glitimo analogą miežiuose – hordeiną. Ši peptidazė, vadinama EP-B2, efektyviai hidrolizuoja ir imunotoksiškas kviečių glitimo aminorūgščių sekas [145].

Taigi, moksliniais tyrimais įrodyta, kad daigintų grūdų proteazės gali reikšmingai sumažinti imunotoksiškų glitimo peptidų kiekį, todėl jas galima panaudoti įvairių beglitimių produktų gamyboje [141]. Kita vertus, reikia pastebėti, kad grūdų daiginimas pakeičia iš jų technologines savybes. Trumpas daiginimo procesas gali pagerinti kviečių produktų kokybę ir maistinę vertę [146], tad, daiginant kviečių grūdus iki 48 val., iš jų galima iškepti geros kokybės duoną su mažiau glitimo [147, 148]. Ilgesnis daiginimas siekiant pašalinti glitimą padidina α -amilazės, skaidančios krakmolą, aktyvumą, o tai neigiamai veikia duonos gaminių kokybę [149]. Taigi, natūralus kviečių daiginimas yra komplikotas metodas glitimo kiekiui mažinti gamyboje. Tokie daiginti kviečiai gali būti naudojami tik beglitimiams produktams papildyti biologiškai vertingais komponentais, o gamybos procese geriau pasiteisina grūdinių kultūrų ekstraktai arba išgrynintos proteazės.

1.5.3. Bakterijų fermentai

Fermentacija pieno rūgšties bakterijų (PRB) kultūromis. Plačiausiai moksliniuose tyrimuose analizuojamas mikroorganizmų fermentų panaudojimo glitimo skaidymui būdas – fermentacija PRB. Visos PRB, fermentuodamos cukrus, sintetina pieno rūgštį, tačiau pagal tai, kokie kiti metabolitai fermentacijos metu išsiskiria, PRB skirstomos į homofermentines ($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CHOHCOOH$) ir heterofermentines ($C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + C_2H_5OH + CO_2$) [150]. Nuo šių PRB savybių priklauso fermentuojamų terpių pH rūgštingumas, dujų sudarymo pajėgumas, kvapo junginių susidarymas ir kiti procesai, turintys įtakos fermentuojamo gaminio kokybei. Susidariusios organinės rūgštys ir kiti metabolitai gali veikti baktericidiškai bei suaktyvinti grūdų endogeninius fermentus. PRB fermentacija, tradiciškai naudojama duonos produktų gamyboje, padidina grūdų produktų mitybinę vertę: pagerina visagrūdžių gaminių, skaidulomis papildytų ar glitimo neturinčių produktų tekstūrą ir skonį, stabilizuoja arba padidina įvairių bioaktyvių junginių kiekį, stabdo krakmolo pasisavinimą ir pagerina mineralinių medžiagų pasisavinimą [151]. Žinoma, kad PRB fermentacija idealiai tinka kvietinės duonos tekstūrai, skoniui, aromatui ir maistinei vertei pagerinti bei tinkamumo vartoti terminui pailginti [152, 153].

Naujas tyrimų aspektas yra PRB kultūrų galimybės sumažinti kvietinių gaminių imunotoksiškumą. Pagrindinė šių tyrimų idėja – panaudoti PRB kultūras maisto perdirbimo metu, kad būtų suardyti imunoreaktyvūs peptidai. Fermentacijos metu visų pirma suardoma dalis glitimo disulfidinių ryšių [154]. Kai kurios PRB rūšys, gaminančios specifines peptidazes, gali suskaidyti ir CL sukeliančius epitopus [155]. Joms identifikuoti atliekami PRB padermių genetiniai ir genų raiškos tyrimai [156]. Moksliniai tyrimai, kuriuose PRB fermentacija naudojama siekiant pašalinti glitimo žalingą poveikį kviečių produktuose, pradėti vykdyti dar XXI a. pradžioje [128]. Di Cagno ir kt. [157] įrodė, kad pasirinktos PRB, turinčios proteolitinį aktyvumą, gali efektyviai hidrolizuoti imunotoksiškus gliadino peptidus kviečių rauguose, PRB kultūrų *L. alimentarius* 15M, *L. brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A ir *L. hilgardii* 51B derinys turi specifinių peptidazių, skaidančių skirtingus prolaminų peptidinius ryšius

[158]. Tolesni Di Cagno ir kt. [159] tyrimai įrodė pasirinktų PRB kultūrų veiksmingumą siekiant pašalinti glitimo likučius ir padidinti beglitimės duonos maistinę vertę. Ištyrus 46 PRB kultūras pagal proteolitinį aktyvumą, atrinktos efektyviausiai veikusios *L. sanfranciscensis* LS40 ir LS41 bei *L. plantarum* CF1. Šios kultūros panaudotos nedideliame glitimo kiekiui suardyti gaminant beglitimę duoną iš alternatyvių grūdinių kultūrų ir pasiektas glitimo kiekio sumažėjimas nuo 400 iki mažiau nei 20 mg/kg.

Dalyje tyrimų buvo vertintas PRB monokultūrų glitimo hidrolizės efektyvumas. Fermentuojant su *L. sanfranciscensis* [160, 161] arba *L. plantarum* [162] pasiektas kviečių baltymų skilimas ir jų tirpumo padidėjimas. Įrodytas padermių *Lactococcus lactis* LLGKC18 [163] ir *Levilactobacillus brevis* KT16-2 [164] proteolitinis poveikis. Kita vertus, šiuose tyrimuose buvo nustatyta, kad baltymų hidrolizė fermentuojamose terpėse buvo ribota ir dalinai susijusi su nuo pH priklausomu grūdų endogeninių fermentų aktyvumu [165, 166].

Daugumos tyrimų autorių nuomone, monokultūrų proteolitinis poveikis siekiant sumažinti glitimo imunogeniškumą nėra didelis, todėl tyrimuose dažnai naudojami deriniai iš 2–18 skirtingų PRB padermių. Keletas autorių [167, 168] įrodė, kad dvi PRB padermės kartu veikia efektyviau negu monokultūros. De Angelis ir kt. [169] įrodė mišinio iš 9 PRB kultūrų VSL#3, sudaryto iš *Streptococcus thermophilus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *B. breve*, *B. longum* ir *B. infantis*, gebėjimą hidrolizuoti kviečių gliadinus ir sumažinti imunotoksiškų fragmentų kiekį fermentuojant kvietinių miltų teslą. Stefańska ir kt. [156] įrodė 11 PRB kultūrų, Francavilla ir kt. [170] – 18 PRB kultūrų mišinio efektyvumą hidrolizuojant gliadiną kepinuose. Fu ir kt. [171] įrodė 12 PRB padermių, išskirtų iš tradicinio kinų duonos raugo, efektyvumą glitimo hidrolizei. De Almeida ir kt. [172] naudojo glitimo baltymų proteolizei 4 *Bifidobacterium* padermes ir įrodė jų glitimo skaidymo galimybes. Reikia pastebėti, kad visuose minėtuose tyrimuose glitimo hidrolizės laipsnis buvo vertintas skirtingais tyrimo metodais: buvo įrodyta, kad fermentacija sumažina glitimo baltymų molekulinę masę ir hidrolizuoja gliadinus, substratuose padidėja tirpių baltymų, laisvų amino grupių ir laisvųjų aminorūgščių koncentracija, sumažėja imunoreaktyvių fragmentų, nustatomų ELISA metodais. Visgi šių tyrimų rezultatai parodė, kad, atlikus hidrolizės produktų MS analizę, substratuose randami peptidai su imunoreaktyviais epitopais.

Apibendrinant tyrimus galima pastebėti, kad per tipinę 12–18 val. fermentacijos trukmę PRB kultūros nepajėgios pašalinti kviečių imunogeniškumo, o ilgas fermentacijos laikas turi neigiamos įtakos kvietinės duonos technologinėms savybėms [151]. Nepaisant to, PRB fermentacija gali būti gera išeitis gerinant mažiau glitimo turinčios duonos technologines savybes bei kuriant naują tokių produktų koncepciją su geresnėmis maistinėmis charakteristikomis [98, 173].

Kitų bakterijų produkuojamos proteazės. Palyginti nauja mokslo tendencija yra hidrolizuoti glitimą skaidant peptidines jungtis prolinendoproteazėmis (PEP), išskirtomis iš kitų mikroorganizmų. Šie fermentai suskaido daug Pro turintį glitimą į peptidus, kuriuos gali suvirškinti žarnyno fermentai [174]. PEP gali būti vartojamos kaip papildai glitimo hidrolizei skrandyje, jos naudojamos glitimo hidrolizatams

gaminti, taip pat yra tiriamos jų galimybės suardyti glitimą gaminant beglitimius produktus iš grūdinių žaliavų [66].

Mokslinėje literatūroje galima rasti nemažai tyrimų, kur įvairiais tikslais buvo vertinamas PEP efektyvumas. Matysiak-Budnik ir kt. [175] tyrė PEP iš *Flavobacterium meningosepticum* efektyvumą pritaikant kaip virškinimo papildą CL terapijai ir nustatė, kad šios proteazės suskaido dalį glitimo peptidinių ryšių. Socha ir kt. [176] lygino skirtingų bakterijų proteazių *Bacillus licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. thermoproteolyticus*, *Streptomyces griseus* proteolitinį poveikį hidrolizuojant gryną glitimą ir nustatė, kad efektyviausiai veikė PEP iš *B. licheniformis* bei *B. thermoproteolyticus*. Iš aktyviausių proteolitinių fermentų, turinčių bakterijų *B. licheniformis* ir *B. amyloliquifaciens*, yra išskiriamos pramoninės proteazės alkalazė ir neutrazė. Plačiausiai yra ištirta alkalazė iš *B. licheniformis*, kuri efektyviai skaido glitimą iki peptidų, todėl naudojama kviečių glitimo hidrolizatų gamyboje [57]. Bassi [114] alkalazę panaudojo kviečių krakmolo, kuriame po frakcionavimo lieka iki 470 mg/kg glitimo, apdorojimui, ir glitimo kiekį sumažino iki mažiau nei 20 mg/kg. Apibendrinant reikėtų pastebėti, kad bakterijų proteazės efektyviai skaido prolaminus, tačiau dalis imunoreaktyvių metabolitų lieka nesuskilę. Norint pasiekti visišką peptidų hidrolizę, reikalinga didelė PEP koncentracija ir ilga poveikio trukmė (bent 0,50 AV/ml, 3 val.) [175]. Be to, jos aktyviai veikia neutralioje arba šarminėje aplinkoje, todėl nėra tinkamos glitimo virškinimui skrandyje. Siekiant pritaikyti PEP imunoreaktyvių baltymų hidrolizei beglitimių produktų gamyboje, reikėtų pasirinkti aktyviausius fermentus sudarant jiems palankias veikimo sąlygas [177].

Pastaraisiais metais plačiai tyrinėtas ir įvairių gedimo mikroorganizmų bei žmogaus žarnyno mikrofloros proteazių efektyvumas glitimo hidrolizei: PEP iš *Sphaerobacter thermophiles* [178], *Enterococcus mundtii* [179], *Cellulomonas* spp. [180], *Flavobacterium meningosepticum*, *Sphingomonas capsulate*, *Myxococcus xanthus*, *Escherichia coli* [181], *Chryseobacterium taeanense* [182], *Actinoballomurus A8* [183], *Bacillus subtilis* [184], *Burkholderia gladioli* [185]. Visuose tyrimuose buvo įrodytas šių proteazių didesnis ar mažesnis glitimo skaidymo potencialas, nes buvo suskaidyta dalis imunotoksiškų glitimo peptidų, tačiau didžioji dalis šių bakterijų negali būti saugiai naudojamos maisto produktų gamybos procese dėl fekalinės kilmės ir patogeninio poveikio [186].

Genetiškai modifikuoti fermentai glitimo hidrolizei. Mokslininkai [187, 188] yra tos nuomonės, kad nė vienas natūraliai randamas fermentas nėra „ideali“ peptidazė. Problemai spręsti buvo pasitelkta kompiuterinio projektavimo programa fermentinei terapijai modeliuoti „Rosetta Molecular Modeling Suite“ [187]. Šis įrankis leido reikšmingai pagerinti fermentų funkcines savybes. Naujai pagaminti fermentai, tarp jų glitimo hidrolazės, pasižymėjo didesniu specifiškumu, aktyvumu, tirpumu ir geresnėmis savybėmis. Pirmuosius tyrimus atliko Ehren ir kt. [189], siekdami sukurti PEP su didesniu aktyvumu ir stabilumu skrandžio sąlygomis, modifikuojant PEP iš *Sphingomonas capsulate*. Buvo pagamintas fermentas, turintis net 20% daugiau specifinio aktyvumo esant pH 4,5 ir 200 kartų didesnę atsparumą pepsinui. Buvo nustatyta, kad ši peptidazė turi žemą katalitinio aktyvumo lygį esant žemam pH, todėl

ji gali būti sėkmingai naudojama produktų gamybos metu, tačiau netinkama glitimui skaidyti skrandyje.

Geriausiai ištirti ir aprašyti su CL problemų sprendimais susiję fermentai yra peptidazės KumaMax ir Kuma030 [187]. KumaMax buvo sukurta kaip Kumamolisin-As – rūgštinė Ser endopeptidazė, gauta modifikavus acidofilinę bakteriją *Alicyclobacillus sendaiensis*. Jos katalitinis aktyvumas buvo nukreiptas į CL aktyvius peptidus. KumaMax turi daugiau nei 100 kartų didesnę aktyvumą skaidant glitimo tetrapeptidus ir yra atsparus proteolizei virškinimo metu. Tolesnis Kumamolisin-As patobulinimas, atliktas naudojant kompiuterinę programą, leido perprojektuoti aktyvią KumaMax vietą [188] ir pasiekti didesnę fermento aktyvumą. Naujasis fermentas, pavadintas Kuma030, net 44 kartus aktyviau skaido PQQ sekas ir 11 kartų aktyviau veikia PQL sekas peptiduose nei KumaMax. Nustatyta, kad per 30 min. jis suskaido 99,97% gryno kviečių glitimo, o tai prilygsta glitimo sumažinimui duonoje nuo 60000 iki 20 mg/kg. Šio fermento efektyvumas taip pat buvo patikrintas imituojant viso grūdo duonos ir kvietinio alaus virškinimo procesą dirbtiniame skrandyje ir gautas toks pats aukštas 99,97% glitimo skaidymo efektas [188].

Kiyosaki ir kt. [190] bei Savvateeva ir kt. [191] tyrė rekombinantinės kviečių cisteino proteazės α -tritikaino aktyvumą ir nustatė, kad jis pasižymi ryškiu gliutenazių aktyvumu 37°C temperatūroje ir efektyviai skaido imunotoksiškus glitimo peptidus. Šis fermentas galėtų būti naudojamas ir glitimui suardyti maisto gamybos metu. Nors tokiu būdu sukurti fermentai vis dar laukia klinikinių tyrimų, atrodo, kad tai daug žadanti priemonė kovojant su CL. Net jei vien fermentų terapija negalėtų visiškai išspręsti glitimo netoleravimo problemos, būtų galima šiuos fermentus naudoti kaip kompleksinę priemonę beglitimėje dietoje.

Imunoreaktyvių fragmentų blokavimas su transglutaminaze

Vienas iš būdų užblokuoti glitimo baltymų imunoreaktyvumą yra amino grupių sujungimas naudojant fermentus [192]. Šio metodo esmė – specifinis toksiškų glitimo fragmentų užblokavimas naudojant transglutaminazę iš *Streptomyces mobaraensis* ir lizino metilo esterį kaip amino donorą. Metodo privalumas tas, kad, blokuojant T ląstelių epitopų imunogeniškumą, nepažeidžiamas glitimo tinklas ir išsaugomos kvietinių miltų technologinės savybės. Be to, ši procedūra naudoja fermentą, plačiai naudojamą maisto pramonėje produktų tekstūrai pagerinti [15]. Yra atlikta keletas mokslinių tyrimų, įrodančių, kad gliadino peptidų modifikavimas naudojant transglutaminazę slopina jų sukeliamą imuninį atsaką *in vitro*. Zhou ir kt. [193] įrodė, kad ši modifikacija gali sumažinti specifinį glitimo imunoreaktyvumą kaip substratą naudojant imunotoksiškus gliadinų peptidus. Glitimo detoksikacija transglutaminaze surišant glitimo peptidus izopeptidiniais ryšiais ir juos pašalinant filtravimo būdu buvo išbandyta gėrimų gamyboje [66]. Panaudojus tokį peramininimą kvietinių miltų duonos gamybos procese, nustatytas 42% imunoreaktyvaus glitimo sumažėjimas [173]. Nustatyta, kad tokia duona turi nedidelių kepimo charakteristikų pokyčių [194]. Vartojant tokią duoną CL pacientams iki 70% sumažėjo klinikinių ligų skaičius [195], tačiau reikėtų didesnės apimties klinikinių tyrimų, patvirtinančių tokio fermentinio kviečių miltų apdorojimo saugumą sergantiems CL.

Kita vertus, kelia abejonių pačios transglutaminazės platesnio naudojimo sauga [196]. Galima rasti tyrimų, parodančių, kad transglutaminazė sukelia kai kurias

neurodegeneracines ligas [197]. Be to, manoma, kad pramoninis maisto perdirbimas naudojant transglutaminazę gali daryti neigiamą poveikį glitimui jautriai populiacijai: gali sukurti naujus imunogeninius glitimo peptidus arba autoantigenus [198].

1.5.4. Grybinės kilmės fermentai

Moksliniais tyrimais įrodyta, jog grybinės kilmės proteazės, įprastai naudojamos kaip kepinų pagerinimo priemonės, gali skaidyti glitimą. Stepniak ir kt. [199] nustatė, kad *A. niger* prolinendoproteazė (AN-PEP) efektyviai skaido glitimo molekules ir visus žinomus imunoreaktyvius epitopus vidutiniškai 60 kartų efektyviau nei kitos PEP. Toft-Hansen ir kt. [200] ištyrė 25 proteazių potencialą *in vitro* ir nustatė, kad tik AN-PEP visiškai suskaido glitimą. Socha ir kt. [176] tyrė proteazių, išskirtų iš mikroskopinių grybų *A. oryzae* ir *A. niger*, proteolitinį aktyvumą. Efektyviausias proteolitinis aktyvumas taip pat buvo stebimas naudojant rūgštinę AN-PEP, nustatyta, kad kviečių gliadinai ir mažos molekulinės masės peptidai buvo visiškai suskaidyti. Taip pat nustatyta, kad mažos AN-PEP dozės taip pat veiksmingai sumažina glitimo baltymų kiekį [201, 202]. Ši endoproteazė taip pat gali būti naudojama kaip maisto papildas glitimui virškinti, nes optimaliai veikia esant pH 4–5, bet išlieka stabili ir esant pH 2 [199]. AN-PEP vartojimas kartu su glitimo turinčiu maistu gali sumažinti žalingą glitimo poveikį ir suteikti pacientams galimybę pailsėti nuo griežtos beglitimės dietos [203, 204, 205].

Moksliniais tyrimais įrodytas ir fermento flavorzimo (*A. oryzae*) didelis efektyvumas hidrolizuojant kviečių prolaminus [206]. Ehren ir kt. [189] įrodė, kad daugiakomponentis kelių grybinių proteazių veikimas yra efektyvesnis dėl gebėjimo specifiskai skaidyti skirtingus baltymų ryšius.

Aktyvių proteazių yra ne tik mikroskopiniuose grybuose, bet ir kituose, tarp jų ir valgomuosiuose grybuose. Schulz ir kt. [207] ištyrė PEP, išskirtos iš kelmučio (*Flammulina velutipes*), potencialą hidrolizuoti glitimą. Šis fermentas hidrolizavo α -gliadiną į mažus peptidus per 20 val., gerai veikė esant skirtingam pH, nustatytas vidutinis temperatūrinis stabilumas ir lengvas šiluminis inaktyvavimas po naudojimo.

Taigi, grybinės kilmės proteazės dėl žemo veikimo pH gali būti laikomos tikrai veiksminga glitimo skaidymo priemone skrandyje arba maisto pramonėje. Kita vertus, trūksta žinių ir tyrimų apie ilgalaikio jų vartojimo saugumą [208].

1.5.5. Augalinės kilmės fermentai

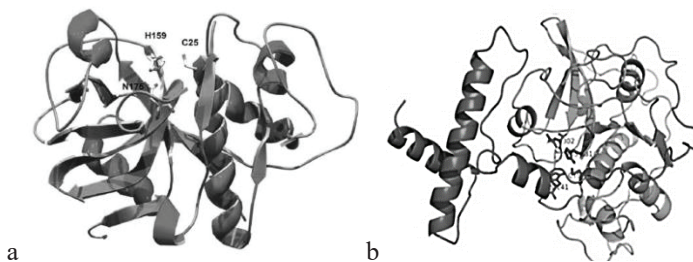
Augalų fermentų naudojimas maisto pramonėje nėra nauja koncepcija. Šie fermentai atlieka svarbų vaidmenį kai kurių maisto produktų: sirupų, alkoholinių gėrimų, pieno produktų, kepinų ir kt. gamyboje [209]. Proteazių, aktyviai skaidančių baltymus, turi vaisiai, daržovės bei prieskoniniai augalai. Sun ir kt. [210] įvertino proteazių aktyvumą 90-yje vaisių ir daržovių rūšių. 10-yje vaisių ir 13-oje daržovių rūšių buvo nustatytas proteazių aktyvumas, didesnis kaip 10 AV/g. Ananasų (*Ananas comosus*), figų (*Ficus carica*) ir papajų (*Carica papaya*) proteazės, pasižyminčios didžiausiu aktyvumu, yra gryninamos pramoninėje gamyboje. Be to, didelio aktyvumo proteazių yra kiviuose (*Actinidia deliciosa*), brokoliuose (*Brassica oleracea italica*), imbieruose (*Zingiber officinale*), poruose (*Allium porrum*) ir raudonuosiuose pipiruose (*Capsicum annuum*), taigi šie vaisiai ir daržovės yra potenciali žaliava augalinės kilmės proteazių gamybai.

Augalų proteazės yra naudotos ir glitimui skaidyti. Bromelainas, išskirtas iš ananasų kamienų, buvo naudojamas gaminant hipoalerginius miltus. Nustatyta, kad bromelainas gali hidrolizuoti peptidinius ryšius prolaminuose ir sumažinti kvietinių gaminių alergizuojantį poveikį [211]. Wang ir kt. [57] panaudojo papaino iš papajų vaisių fermentinę hidrolizę kviečių glitimo hidrolizatams gaminti ir įrodė, kad po apdorojimo papainu sumažėja baltymų molekulinė masė. Xue ir kt. [212] taip pat atliko gryno kviečių glitimo fermentinę hidrolizę papainu ir nustatė, kad papainas suskaido glitimą iki trumpesnių peptidų.

Kiviai taip pat turi proteolitinių fermentų, priklausančių Cys proteazių šeimai, iš kurių žinomiausias yra aktinidinas [213]. Kaur ir kt. [214] įrodė, kad kivių aktinidinas turi teigiamos įtakos baltymų (taip pat glitimo) virškinimui plonojoje žarnoje, naudojant *in vitro* virškinimo sistemą [215]. Jayawardana ir kt. autorių [208] nuomone, vartojant su glitimo turinčiu maistu vaisius, kurių sudėtyje yra proteolitinių fermentų: papajos (papaino ir karikaino), ananasų (bromelaino) arba žalių kivių (aktinidino), galima sumažinti neigiamą glitimo poveikį. Taga ir kt. [216] įrodė, kad imbiero proteazės taip pat gali hidrolizuoti glitimą silpnai rūgštinėmis sąlygomis iki peptidų, kurių vidutinė molekulinė masė yra mažesnė nei 600 Da. Glitimo baltymų hidrolizei taip pat buvo naudota proteazė iš egzotiško augalo *Nepenthes carnivoros* skysčio [217] ir nustatytas labai didelė hidrolizės efektyvumas, kuris gali būti siejamas su naujos kartos PEP sukūrimu.

Glitimą skaido ir prieskoninių augalų sėklose esančios proteazės. Bellir ir kt. [218] ir Gabr [219] tyrimai patvirtino, kad juodgrūdės (*Nigella sativa*) sėklos turi proteazių, kurios hidrolizuoja glitimo baltymus ir gali būti naudojamos maisto pramonėje. Kuminų (*Cuminum cyminum L.*) vandeniniai ekstraktai taip pat pasižymi proteolitiniu poveikiu ir vaidina svarbų vaidmenį didinant žmogaus virškinimo fermentų (pepsino) aktyvumą [220]. Taip jie gali padidinti baltymų suskaidymą skrandyje iki 5 kartų [221], tačiau eksperimentai su glitimu nebuvo atlikti.

Išgryninti augaliniai fermentai gali būti puiki alternatyva šiuo metu plačiai naudojamiems mikroorganizmų ir grybų fermentams, tad reikėtų išsamiau paanalizuoti komercializuotų fermentų, bromelaino ir papaino, glitimo hidrolizės teorines prielaidas ir mechanizmą. Papainas ir bromelainas (1.10 pav.) priklauso Cys proteazių šeimai ir jų fermentinės hidrolizės mechanizmai yra panašūs, tačiau jie skaido skirtingus peptidinius ryšius [209]. **Papainas** yra monotiolio Cys endoproteazė, pagal fermentinio veikimo pobūdį jis panašus į pepsiną, tačiau veikia ne tik rūgštinėje, bet ir neutralioje bei šarminėje terpėje. Papaino katalitiniame centre yra ditioacilo grupė (1.10 pav., a), per kurią fermentas jungiasi prie substrato disulfidinių jungčių lokalizacijos vietose, pirmenybę teikdamas tolesnės aminorūgšties liekanoms [222]. Papainas hidrolizuoja didelę dalį peptidinių ryšių, aktyviai skaido peptidinius ryšius po Arg ir Lys, pasižymi endopeptidazių, aminopeptidazių, dipeptidilpeptidazių, tiol esterazių ir kt. aktyvumu [209, 222].



1.10 pav. Papaino (a) ir bromelaino (b) erdvinė struktūra [209]

Bromelainas (1.10 pav., b) yra įvairių proteazių mišinys [209]. Jis aktyviai skaido peptidines jungtis po Ala, Lys ir Tyr. Kita vertus, ankstesniuose tyrimuose nustatyta, jog abu fermentai turi ribotas galimybes skaidyti glitimą, nes neturi specifinių PEP, peptidinės jungties greta Pro (P-X) nesuskaidomos, todėl tarp skilimo produktų išlieka imunoreaktyvūs epitopai. Pastebėta, kad papainas turi didesnę gebėjimą skaidyti baltymus nei dauguma gyvūninės ir bakterinės kilmės proteazių [223], todėl jis naudojamas gaminant kviečių glitimo hidrolizatus [57, 212]. Pahlavan ir kt. [224] tyrė įvairios kilmės fermentų gebėjimą hidrolizuoti glitimą ir nustatė, kad iš jų aktyviausias papainas. Bromelaino aktyvumas šiame tyrime nustatytas mažiausias, nors ankstesniais tyrimais įrodyta, kad jis gali hidrolizuoti peptidinius ryšius gaminant hipoalerginius miltus [211]. Reikia pastebėti, kad, atlikus šiais fermentais hidrolizuotų kvietinių miltų ir gryno glitimo skilimo produktų analizę, rasta imunoreaktyvių glitimo fragmentų. Žinoma, kad abu šie fermentai yra tinkami naudoti kepimo pramonėje, nes neturi amilazių ir pentozanazių aktyvumo [225] ir yra stabilūs platesniame temperatūrų diapazone, palyginti su kitomis augalų proteazėmis [223].

1.5.6. Gyvūninės kilmės fermentai

Kviečių glitimo hidrolizei galima naudoti ir įvairius gyvūninės kilmės fermentus, kuriuos išskiria gyvūnų kasa ir žarnynas. Skirtingai nuo augalinių fermentų, dauguma jų (išskyrus pepsiną) veikia tik esant neutraliam arba šarminiam pH. Atlikti tyrimai glitimo hidrolizei kviečių produktų gamybos metu naudojant komercines gyvūninės kilmės proteazes (pepsiną, pankreatiną, tripsiną, chimotripsiną ir Protamex™). Nustatyta, kad substratuose susidarę mažesnės molekulinės masės (10–15 kDa) polipeptidai, didžiausiu efektyvumu skaidant glitimą pasižymėjo chimotripsinas, tačiau visų šių fermentų poveikis buvo ribotas [226, 227]. Chimotripsiną galima naudoti ne tik glitimo hidrolizei, bet ir lizino arba valino prijungimui prie glitimo baltymų vietoje transglutaminazės siekiant blokuoti alergizuojantį glitimo poveikį [173].

Nustatyta, kad itin aktyviais proteolitiniais fermentais virškinamajame trakte pasižymi vabzdžiai ir jų lervos [228]. Įrodyta, kad efektyviai kviečių baltymus skaido tripsino ir chimotripsino analogai, būdingi smėlio muselėms (*Phlebotomus papatasi*) [229]. Kadangi glitimas yra pagrindinis grūdų baltymas, sandėlių kenkėjų ir kt. grūdais mintančių vabzdžių virškinamajame trakte evoliuciškai išsivystė aktyvių Cys peptidazių, leidžiančių jiems misti augalais, turinčiais Ser peptidazės inhibitorių, ir efektyviai virškinti glitimo baltymus [230, 231]. Mika ir kt. [232] ištyrė įvairių vabzdžių peptidazių aktyvumą ir nustatė, kad *Rhizopertha dominica* turi didžiausią

prolaminų skaidymo efektyvumą – dvi iš išgrynintų peptidazių, priklausančių tripsino ir chimotripsino tipo fermentams, hidrolizavo glitimą iki CL nesukeliančių peptidų. Kito kenkėjo, geltonojo milčiaus (*Tenebrio molitor*), žarnyne buvo nustatytos kelios glutamino peptidazės. Tarp jų buvo rasta itin efektyvi specifinė prolinui Ser peptidazė – dipeptidilpeptidazė 4 [233]. Šie fermentai yra intensyviai tyrinėjami, siekiant sukurti efektyvias priemones glitimo virškinimui skrandyje skatinti.

Vabzdžiams ir jų lervoms yra būdinga virškinamojo trakto mikroflora, pasižyminti proteolitinėmis savybėmis [234]. Yra ištirtos proteolitinio aktyvumu pasižyminčios bakterijos, rastos aksominio vikšro (*Anticarsia gemmatilis*) žarnyne [228].

Žmogaus virškinamajame trakte taip pat yra proteazių, galinčių hidrolizuoti glitimą. Mūsų organizme šias funkcijas atlieka pepsinas, tripsinas, chimotripsinas ir žarnyno sienelių fermentai. Šių fermentų proteolitinis pajėgumas buvo tirtas *in vitro*, imituojant organizme susidarancias virškinimo sąlygas, ir nustatyta, kad jie sumažina maiste esančių imunoreaktyvių peptidų kiekį apie 50% [235]. Efektyviausiai veikia chimotripsinas, kuris glitimo imunogeniškumą gali sumažinti iki 71% [236]. Gutiérrez ir kt. [237] nustatė, kad virškinamojo trakto elastazė 3B, elastazė 2A ir karboksipeptidazė A1 taip pat skaido glitimą. Tiriant potencialą skaidyti imunoreaktyvius glitimo peptidus, nustatyta, kad šie fermentai gali visiškai hidrolizuoti gliadino peptidus iš 13-os ir 19-os aminorūgščių ir dalinai iš 33-ų aminorūgščių, tačiau lieka imunoreaktyvių epitopų [238], todėl šių proteazių panaudojimas maisto pramonėje glitimui detoksikuoti nėra iki galo efektyvus.

1.5.7. Skirtingų biologinių priemonių derinimas skaidant kviečių baltymus

Kadangi skirtingi fermentai specifiškai skaido baltymų ryšius, o daugumos jų aktyvumas yra ribotas dėl aplinkos sąlygų, tikėtina, kad, derinant skirtingas biologines priemones ir taip sudarant daugiakomponentį fermentų mišinį, galima padidinti glitimo hidrolizės efektyvumą ir visiškai pašalinti kviečių imunogeniškumą.

Salyklo gamybos arba daiginimo proceso derinimas su PRB fermentacija. Anksčiau (1.5.2., 1.5.3. skyriuose) buvo aptarta, kad kviečių daiginimo arba PRB fermentacijos metu vyksta dalinė baltymų hidrolizė. Derinant abi šias priemones pasiektas geresnis rezultatas. Buvo lygintas prolaminų hidrolizės efektyvumas daigintų ir nedaigintų kviečių rauguose. Beveik visi kviečių prolaminai (gliadinai ir gliuteninai) buvo suskaidyti daigintų kviečių fermentuojamuose substratuose, kuriuose prolaminų hidrolizė vyko intensyviau, galimai dėl didesnio daigintų kviečių Cys proteinazės aktyvumo [239].

Salyklo gamybos arba daiginimo procesų derinimas su mikroskopinių grybų proteazėmis. Grybų proteazės dažnai naudojamos gaminant beglitimes alaus rūšis. Salyklą, kuriame yra aktyvių endoproteazių, hidrolizuojant su AN-PEP, likusios prolaminų koncentracijos labai sumažinamos. Nustatyta, kad likutiniai glitimo kiekiai kviečių ir rugių salyklų AN-PEP hidrolizatuose buvo mažesni nei 100 mg/kg [240]. Arte ir kt. [241] įrodė skirtingų biologinio apdorojimo metodų – endogeninių sėlenų fermentų poveikio ir hidrolizės grybiniais fermentais įtaką kviečių sėlenų baltymų modifikacijai. Kombinuotas biologinis apdorojimas padidino kviečių sėlenų baltymų tirpumą bei laisvųjų aminorūgščių koncentraciją.

Atrinktų PRB kultūrų derinimas su mikroskopinių grybų proteazėmis. Tirtas PRB kultūrų ir grybinių proteazių derinys, kaip priemonė imunotoksiniam glitimo poveikiui pašalinti. Pirmiausia buvo įrodyta, kad, naudojant pasirinktas PRB kartu su grybinėmis proteazėmis, galima sumažinti likutinę glitimo imunogeninių sekų koncentraciją taikant ilgą fermentacijos laiką (48 val.) [94, 242]. Vėlesni Giuliani ir kt. [243] tyrimai parodė, kad, naudojant dvi atrinktas PRB (*L. sanfranciscensis* DPPMA12 ir *L. plantarum* DPPMA125) kartu su grybų proteazėmis (*A. oryzae*, *A. niger* arba jų deriniu), kvietinių miltų glitimas suskaidomas per trumpesnę laiką (12–20 val.). Nustatyta, kad PRB ir grybinės proteazės, veikdamos kartu, efektyviai skaido įvairių kviečių veislių glitimą (pasiektas didesnis nei 99% efektyvumas) [244]. Šis kol kas vienintelis patentuotas metodas leidžia naudoti detoksikuotus kviečių miltus beglitimių kepinų gamyboje, tačiau kviečių produktų į tokius gaminius dedama tik iki 20%, likusios žaliavos – alternatyvių grūdinių kultūrų (ryžių, kukurūzų, grikių) miltai. Šiame gamybos procese reikalingi tekstūros pagerintojai. Tokia duona pasižymi panašiomis fizinėmis-cheminėmis savybėmis, kaip ir kontrolinė, pagaminta iš įprastų kvietinių miltų [245]. Moksliniais tyrimais [242, 246] įrodyta, kad tokiu būdu hidrolizuoti kviečių miltai, išdžiovinti puršktuvinėje džiovyklėje, tinka beglitimių makaronų ir saldžių kepinų gamybai. Klinikiniais tyrimais įrodyta, kad tokius saldžius kepinus saugu vartoti CL pacientams [247, 248], tačiau atliktų tyrimų apimtis nėra didelė ir netirtos ilgalaikio vartojimo pasekmės.

Skirtingos kilmės fermentų derinimas. Yra paskelbta nemažai mokslinių tyrimų, kuriuose glitimo hidrolizei naudojant skirtingos biologinės kilmės fermentų derinius buvo pasiektas didesnis hidrolizės efektyvumas [244]. Ehren ir kt. [189] tyrime miežių endoproteazės EP-B2 ir AN-PEP derinys leido greičiau sumažinti fragmentų QPQLPY koncentraciją nei naudojant atskiras proteazes; fragmentų kiekis sumažėjo 22% naudojant *A. niger* proteazę ir nebuvo aptinkamas (sumažėjo $\geq 98\%$) panaudojus EP-B2 ir *A. niger* proteazių derinį. Fermentų deriniai gali būti naudojami ir maisto gamybos metu, ir kaip maisto papildai [201, 249]. Xiao ir kt. [250] ištyrė naują fermentų derinį ir nustatė, kad specifinės miežių glutamino endoproteazės (EP-B2) ir PEP iš *Sphingomonas capsulata* padeda efektyviau skaidyti glitimą virškinamajame trakte.

Li ir kt. [251] įrodė, kad nuosekli kviečių miltų hidrolizė, derinant fermentus (alkalazę, chimotripsiną, flavorzimą, tripsiną arba pepsiną) su papainu, efektyviau skaido gliadinus nei atskiri fermentai optimaliomis sąlygomis. *In vitro* tyrimai parodė, kad kompleksinis kviečių miltų fermentinis apdorojimas alkalaze ir papainu ypač veiksmingai suskaidė gliadiną, todėl šis būdas yra perspektyvus gaminant beglitimei dietai tinkamus produktus.

Taigi, kviečių glitimą galima hidrolizuoti naudojant įvairius fermentus arba juos derinant, tačiau visais atvejais reikia kruopščiai valdyti hidrolizės procesą norint pasiekti teigiamą efektą [238, 245, 252]. Kita vertus, kai kurie beglitimiai maisto priedai gali sukelti neigiamą poveikį pacientams, sergantiems su kviečių netoleravimu susijusiomis ligomis, nes nėra įrodytas ilgalaikio tokių proteazių vartojimo saugumas [253].

1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir darbo tikslo pagrindimas

Mokslo šaltinių rezultatų analizė parodė, kad daug dėmesio yra skirta įvairių biologinių priemonių tyrimams siekiant pašalinti kviečių produktų glitimo imunotoksišką poveikį ir padėti jų netoleruojantiems vartotojams. Didelė dalis tyrimų skirta glitimo hidrolizei naudojant mikroorganizmus bei išgrynintus jų fermentus. Nustatyta, kad šios priemonės gali hidrolizuoti glitimą arba blokuoti alergizuojančių baltymų poveikį, tačiau jų hidrolizės efektyvumas nepakankamas, kad būtų suardyti visi CL imunoreaktyvūs epitopai. Šiandien visiškai glitimo imunogeniškumo pašalinimas pasiektas tik naudojant rūgštines mikroskopinių grybų proteazes, genetiškai modifikuotų mikroorganizmų proteazes arba derinant skirtingas priemones, pvz., naudojant fermentaciją PRB kultūromis arba daiginimą kartu su grybinėmis proteazėmis.

Didžioji dalis tyrimų susiję su glitimo hidrolizės efektyvumo analize gryno kviečių glitimo, kvietinių miltų arba sintetinių gliadinų substratuose. Mokslo literatūroje yra tik keletas tyrimų apie glitimo imunoreaktyvumo pašalinimo galimybes iš kviečių antrinių produktų – sėlenų. Kvietiniai miltai turi didelį (74590–110127 mg/kg) glitimo kiekį, todėl net ir po ilgo bei sudėtingo apdorojimo proceso galutiniam hidrolizuotame produkte lieka imunines reakcijas sukeliančių glitimo fragmentų. Be to, visiškai suardžius kviečių glitimą, prarandamos jo technologinės savybės. Iš tokių detoksikuotų kviečių miltų negalima paruošti geromis elastingumo savybėmis pasižyminčios tešlos be papildomų tekstūrą pagerinančių priedų. Todėl gamintojams kyla abejonių, ar tokie hidrolizuoti miltai yra pranašesni už beglitimių produktų gamybai naudojamus krakmolus. Reikia pabrėžti, kad dauguma publikuotų rezultatų yra gauti laboratorinėmis sąlygomis, todėl fermentinės hidrolizės metodikos yra mažai pritaikomos gamybinėje praktikoje. Pagrindiniai kvietinių miltų hidrolizės metodų trūkumai – jų sudėtingumas, išbaigtas proteolizės procesas reikalauja ilgos fermentacijos trukmės, taip pat nėra įrodytas ir / ar reglamentuotas saugus ilgalaikis grybinių bei genetiškai modifikuotų mikroorganizmų proteazių naudojimas.

Kadangi dauguma tirtų biotechnologinių priemonių hidrolizuoja ribotą glitimo kiekį, tikėtina, kad, tyrimams naudojant kviečių perdirbimo produktą – sėlenas, turinčias mažiau glitimo (apie 50000 mg/kg), ir jas fermentuojant, glitimą būtų galima suskaidyti per trumpesnę laiką tam pritaikius vartotojams saugesnes ir priimtinesnes biologines priemones. Viena iš tokių biologinių priemonių glitimo hidrolizei sėlenose gali būti fermentacija PRB. Kviečių baltymų hidrolizės procesas miltuose ir krakmole naudojant PRB yra pakankamai gerai ištirtas. Mokslinėje literatūroje yra pateikiami rezultatai apie fermentacijai naudotų skirtingų pieno rūgšties monokultūrų bei daugiakomponenčio fermentavimo efektyvumą. Rezultatai rodo, kad dalis gliadinų gali būti visiškai hidrolizuoti, tačiau yra neįautrių PRB fermentų poveikiui gliadinų peptidų, todėl vien tik PRB fermentais visiškai glitimo suskaidyti negalima.

Pagrindinė riboto PRB fermentų poveikio priežastis yra ta, kad jų proteolitiniai fermentai yra intralasteliniai ir prisitaikę skaidyti tik nedidelės molekulinės masės peptidus. Taigi, kad PRB di-, tri- ir oligopeptidazės galėtų veikti, reikalingas pirminis didelės molekulinės masės baltymų suskaidymas iki mažesnių peptidų. Tam tikslui gali būti panaudojamos endoproteazės, kurios būdingos kitiems mikroorganizmams ir augalams. Dalinai šią funkciją atlieka ir pačių grūdų endogeniniai fermentai. Kol kas

glitimui skaidyti geriausiai yra ištirti mikroorganizmų fermentai. Nustatyta, kad didžiausiu efektyvumu pasižymi grybinės kilmės proteazės. Viena iš mažiausiai ištirtinėtų sričių, kuri gali turėti glitimo hidrolizės potencialą, yra augalinių proteazių panaudojimas pirminei glitimo hidrolizei. Augalų fermentai turi endoproteazių, tačiau neturi specifinių PEP, kurios suskaido tam tikrus imunoreaktyvius peptidus. Todėl yra tikslinga ištirti jų efektyvumą ir galimybes pirminei glitimo hidrolizei ir suderinti šį metodą su PRB fermentų aktyvumu, siekiant iki minimumo sumažinti ar visai suskaidyti glitimo imunoreaktyvius peptidus kviečių sėlenose.

Kadangi KTU Maisto institute plačiai tyrinėjamos įvairių PRB padermių savybės: optimizuotos auginimo ir dauginimo sąlygos, ištirti jų metabolitai (gaminamos organinės rūgštys ir antimikrobinės medžiagos) bei jų fermentinis aktyvumas, šia gerąja patirtimi bus pasinaudota pasirenkant kultūras antrinei glitimo peptidų hidrolizei bei užtikrinant palankias jų veikimo sąlygas. Tikėtina, kad atrinktų keleto biologinių priemonių kompleksinis pritaikymas leis pasiekti maksimalų kviečių sėlenų glitimo hidrolizės efektą, jį pritaikyti sėlenų apdorojimui gamybos procese, o mažiau glitimo turinčias sėlenas bus galima naudoti produktų, skirtų glitimui jautriems vartotojams, gamybai.

2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

2.1. Kviečių vartojimo ir jo dinamikos ryšio su celiakijos paplitimu nustatymas

2.1.1. Kviečių vartojimo ir jo dinamikos duomenų analizė

Duomenys apie kviečių suvartojimą nuo 1961 iki 2018 m. pagal žemynus ir šalis buvo imti iš Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacijos (FAO) duomenų bazės [254] 2021 m. vasario mėn. Kviečių vartojimo duomenims analizuojamu laikotarpiu pagal šalis ir žemynus palyginti, kviečių vartojimo geografiniam žemėlapiui sudaryti bei ryšiui tarp kviečių suvartojimo ir CL paplitimo įvertinti buvo apskaičiuotas vidutinis suvartojamas kviečių kiekis gyventojui per metus (kg) nuo 2004 iki 2018 metų.

Ilgalaikės kviečių suvartojimo dinamikai (mažėjimui ar didėjimui) įvertinti apskaičiuotas santykis tarp 10 paskutinių metų (2008–2018 m.) vidutinio kviečių suvartojimo ir seniausių FAO skelbiamų 10 metų (1961–1971 m.) vidutinio kviečių suvartojimo duomenų. Kviečių vartojimo dinamikai (sumažėjimui arba padidėjimui) analizuojamu CL paplitimo laikotarpiu (2004–2018 m.) įvertinti apskaičiuotas santykis tarp 5 paskutinių metų (2014–2018 m.) ir 5 pirmų metų (2004–2008 m.) vidutinio kviečių suvartojimo pagal žemynus ir šalis.

2.1.2. Celiakijos (CL) paplitimo duomenų analizė

Duomenys apie CL paplitimą surinkti iš klinikinių tyrimų, paskelbtų 2005–2020 m. *PubMed*, *Taylor & Francis* ir *Google Scholar* duomenų bazėse, paieškai naudojant raktinius žodžius: „celiakija“ („celiac disease“/„celiac“) arba „celiakija“+„paplitimas“ („prevalence“/„incidence“) arba „dažnumas“ („frequency“/„screening“). Analizuoti tik tyrimai, kuriuose skelbiamas paplitimas tarp sveikų suaugusiųjų bei vaikų. Ryšiui tarp kviečių vartojimo ir CL paplitimo įvertinti ir statistinei analizei naudoti tik tyrimai, kuriuose CL patvirtinta remiantis histologiniais dvylikapirštės žarnos biopsijos tyrimų rezultatais. Serologiniam CL paplitimui apskaičiuoti analizuoti tyrimai, kuriuose CL nustatyti buvo naudoti audinių transglutaminazės (tTG) antikūnų ir endomiziumo (EMA) antikūnų testai. Jei toje pačioje šalyje tyrimuose buvo naudoti abu testai, rezultatai analizei buvo imami tokia tvarka: pagal teigiamus abiejų testų rezultatus (tTG+EMA), pagal teigiamus EMA testų rezultatus, pagal teigiamus tik tTG testų rezultatus.

Detali literatūros paieškos strategija ir straipsnių įtraukimo / neįtraukimo kriterijai aptariami publikacijoje [255], duomenys apie tyrimų atrankos procesą pateikti struktūrinėje schemoje (2 priedas), o susisteminti rezultatai apie CL paplitimą – 5 priede. Remiantis gautais duomenimis, naudojant interaktyvią priemonę mapchart.net [256] buvo sudaryti kviečių vartojimo bei CL paplitimo geografiniai žemėlapiai.

2.2. Tyrimų objektai

2.2.1. Kviečių sėlenos

Kviečių (*Triticum aestivum*) sėlenos, susidariusios kaip šalutinis produktas sauso malimo metu, buvo gautos iš biotechnologijų įmonės, veikiančios Lietuvoje. Kviečių sėlenų cheminės charakteristikos: drėgmės kiekis – $13,43 \pm 0,21\%$ (AACC

metodas 44-5A, LST ISO 712:2000), bendras baltymų kiekis – $13,88 \pm 0,22$, (ISO 20483:2006 ICC standartinis metodas Nr. 105/2:1994), kitų medžiagų sudėtis, deklaruojama gamintojo: 63,00–65,00 g/100 g angliavandenių, iš kurių: 2,50–2,70 g cukraus, 42,00–44,00 g skaidulinių medžiagų, 3,50–4,40 g/100 g riebalų, pH 6,0–7,0. Kviečių sėlenų baltymų frakcijų sudėtis pateikiama 2.1 lent.

2.1 lentelė. Kviečių sėlenų baltymų sudėtis

Baltymų frakcija	Baltymų kiekis, g/100g	Baltymų santykinė dalis, %
Albuminai	$5,28 \pm 0,11$	38,01
Globulinai	$3,27 \pm 0,14$	23,60
Gliadinai	$2,38 \pm 0,09$	17,10
Gliuteninai	$2,52 \pm 0,06$	18,16

Kviečių krakmolo cheminės charakteristikos: drėgmės kiekis – $10,78 \pm 0,20$, bendras baltymų kiekis $0,32 \pm 0,02\%$, angliavandenių kiekis – 86,30 g/100 g, iš jų 0,48 g cukraus, 0,005 g skaidulinių medžiagų, riebalų – 1 g/100g, didžiausias pelenų kiekis sausose medžiagose – 0,25% (ISO 3593:2015), pH 6,0–7,0.

Sėlenos buvo sumaltos Perten 3303 laboratoriniu malūnu (*Perten Instruments*, Vokietija) naudojant 1 mm diametro akučių sieta, krakmolas naudotas duonos gamybos tyrimams be papildomo apdorojimo.

2.2.2. Pieno rūgšties bakterijos ir jų paruošimo sąlygos

Eksperimentui naudotos pieno rūgšties bakterijos (PRB) iš KTU Maisto instituto mikroorganizmų kolekcijos. Remiantis bakterijų proteolitinio aktyvumo charakteristikomis glitimo hidrolizei pasirinktos PRB padermės: *L. plantarum* P-1, *L. brevis* R-1, *L. acidophilus* 308, *L. acidophilus* 336, *L. casei* g ir *L. casei* 12. Iki tyrimo PRB kultūros buvo laikomos -72 – 74°C temperatūroje VIABANK (MWE, Jungtinė karalystė) sistemoje. Kultūros atgaivintos ant agarizuotos MRS mitybinės terpės (*Biolife*, Italija). Pradinė PRB suspensija buvo inokuliuota į MRS skystą mitybinę terpę (*Biolife*, Italija) ir inkubuota 30°C (*L. plantarum* P-1, *L. brevis* R-1) arba 37°C temperatūroje (*L. acidophilus* 308, *L. acidophilus* 336, *L. casei* g ir *L. casei* 12) anaerobinėmis sąlygomis. Po 24 val. kiekviena PRB kultūra du kartus nuplauta dejonizuotu vandeniu ir gauta suspensija naudota eksperimentams.

2.2.3. Augalų permeatai

Tyrimui naudoti kivių (*Actinidia deliciosa*), ananasų (*Ananas comosus*), papajos (*Carica papaya*) vaisiai bei juodgrūdės (*Nigella sativa*) sėklos. Permeatams paruošti švieži vaisiai sutrinti stypiniu maišytuvu, išspaus tos sultys ir perfiltruota per plastikinį sietelį su 0,5 mm akučių diametru. Juodgrūdės ekstraktas paruoštas iš 5 g sėklų, jos sumaltos rotaciniu smulkintuvu (apsisukimų skaičius – 1500 aps./min., trukmė 2 min.) ir užpiltos 45 g dejonizuoto vandens 40°C temperatūros, ekstrahuota 0,5 val., po to masė homogenizuota ir perfiltruota per plastikinį sietelį su 0,5 mm akučių diametru.

2.2.4. Fermentai

Mikroorganizmų fermentai: flavorzimas (Flavourzyme®) – fermentų kompleksas iš mikroskopinio grybo *A. oryzae* ir bakterijų fermentai: neutrazė (Neutrase®) iš *B. amyloliquefaciens* 0,8 L bei alkalazė (Alcalase®) iš *B. licheniformis* 2.4 L (Novozymes, Danija).

Augalinės kilmės fermentai. Eksperimentui buvo naudoti augalų fermentai – papainas ir bromelainas. Papainas (EC 3.4.22.2) iš *Carica papaya* – liofilizuoti milteliai, fermentinis aktyvumas 3000 AV/g ir bromelainas (EC 3.4.22.32) iš *Ananas comosus* – liofilizuoti milteliai, kurių fermentinis aktyvumas 3000 AV/g (*Sigma-Aldrich*, Vokietija).

2.3. Kviečių sėlenų apdorojimas biologinėmis priemonėmis

2.3.1. Kviečių sėlenų fermentavimas pieno rūgšties bakterijomis

Kviečių sėlenų bandiniai ruošti pagal schemą, pateiktą 2.2 lent.: sėlenos (1 g) pasvertos ir kiekybiškai perkeltos į stiklinius mėgintuvėlius (15 ml), kontroliniai sėlenų bandiniai (K) suspenduoti dejonizuotame vandenyje (10 ml), kiti – inokuliuoti skirtingomis 10 ml PRB suspensijomis $(1,6-2,7) \times 10^8$ KfV/ml. PRB KfV nustatyti pagal 2.3.2. skyriuje pateiktą metodiką.

2.2 lentelė. Kviečių sėlenų bandinių paruošimas su skirtingomis PRB kultūromis

PRB kultūros	Kviečių sėlenos, g	PRB kultūros	Aktyvi koncentracija KfV/g	Fermentacijos temperatūra °C
K	1	Dejonizuotas vanduo	-	37
LA308	1	<i>L. acidophilus</i> 308	$1,7 \pm 0,22 \times 10^8$	37
LA336	1	<i>L. acidophilus</i> 336	$1,9 \pm 0,17 \times 10^8$	37
LBR-1	1	<i>L. brevis</i> R-1	$1,6 \pm 0,13 \times 10^8$	30
LPP-1	1	<i>L. plantarum</i> P-1	$2,7 \pm 0,28 \times 10^8$	30
LCg	1	<i>L. casei</i> g	$2,5 \pm 0,23 \times 10^8$	37
LC12	1	<i>L. casei</i> 12	$2,3 \pm 0,68 \times 10^8$	37

Mėginiai buvo inkubuoti atitinkamai 30 ir 37°C temperatūroje (priklausomai nuo PRB kultūros) anaerostate. Po 12, 24 ir 48 val. mėginiuose buvo fiksuoti pH pokyčiai, bendras bakterijų skaičius, proteazių aktyvumas ir glitimo kiekis substratuose imunofermentiniu ELISA G12 metodu. Analizės atliktos trimis pakartojimais. Mėginiai bendram bakterijų skaičiui ir bendram proteolitiniam aktyvumui buvo paimti po fermentacijos proceso, hidrolizės reakcijai sustabdyti mėginiai pakaitinti 10 min. 90°C temperatūroje, glitimo tyrimams bandiniai buvo užšaldyti ir saugoti ne aukštesnėje nei -18°C temperatūroje.

2.3.2. Kviečių sėlenų apdorojimas augalų permeatais

Eksperimentui po 1 g sėlenų įdėta į 15 ml stiklo mėgintuvėlius, įpilta po 5 ml augalų permeatų ir 5 ml dejonizuoto vandens. Mėgintuvėlių turinys 2 min. maišytas sukurine Vortex V-1 maišykle, po to mėgintuvėliai dėti į termostatą, kuriame inkubuoti 37 °C temperatūroje 24 val., hidrolizės reakcijai sustabdyti bandiniai pakaitinti 10 min. 90°C temperatūroje. Eksperimentai atlikti trimis pakartojimais.

2.3.3. Kviečių sėlenų fermentinė hidrolizė

Eksperimentui po 1 g sėlenų įdėta į stiklinius 15 ml talpos mėgintuvėlius, kontroliniai sėlenų bandiniai (K) suspenduoti dejonizuotame vandenyje 10 ml, kiti – 10 ml fermentų suspensijose, gerai išmaišyti maišykle Vortex V-1 2 min., po to inkubuoti iki 4 val.

Pradiniams fermentų hidrolizės efektyvumo tyrimams naudotos 0,5% koncentracijos komercinių fermentų (augalų ir mikroorganizmų) suspensijos dejonizuotame vandenyje, paruošti sėlenų bandiniai inkubuoti 45°C temperatūroje 4 val.

Fermentų aktyvumams nustatyti esant skirtingam pH komercinių fermentų (augalų ir mikroorganizmų) hidrolizė 45°C temperatūroje 4 val. vykdyta fermentus suspendavus 10 ml citratiname–fosfatiname buferyje (pH 4, pH 5) bei kalio fosfatiname (K_2HPO_4 ir KH_2PO_4) buferyje (pH 6, pH 7, pH 8).

Optimalioms fermentinės hidrolizės sąlygoms nustatyti ruoštos skirtingų koncentracijų (0,25, 0,5 ir 0,75%) komercinių augalų fermentų suspensijos dejonizuotame vandenyje (10 ml), fermento / substrato santykis [F / S] 7,50, 15 ir 22,50 AV/g. Kviečių sėlenų fermentinė hidrolizė vykdyta skirtingose 37, 40, 45°C temperatūrose 4 val. Kas 1 val. buvo vertintas pH pokytis, po 2 ir 4 val. hidrolizės paimti mėginiai nesuskaidyto likutinio glitimo kiekiui nustatyti.

Bendras proteazių aktyvumas bandiniuose buvo tirtas po hidrolizės proceso visuose variantuose su komerciniais fermentais, po tyrimo hidrolizės reakcijai sustabdyti mėginiai pakaitinti 10 min. 90°C temperatūroje, glitimo baltymams frakcionuoti ir analizei mėginiai staigiai užšaldyti ir laikyti ne aukštesnėje nei -18 °C temperatūroje.

2.3.4. Kombinuoto biologinio metodo taikymas

Kviečių sėlenų bandiniai fermentacijai ruošti pagal sąlygas, nurodytas 2.3 lent. Eksperimentas atliktas dviem etapais su trimis pakartojimais.

2.3 lentelė. Kviečių sėlenų bandinių paruošimas su augaliniais fermentais ir PRB

Bandiniai	Kviečių sėlenos, g	I etapas	II etapas	
		Fermentų tirpalai, 5 ml	Vanduo, ml	PRB* mišinys, ml
K (kontrolė)	1	dejonizuotas vanduo	5	-
B	1	bromelainas	5	-
P	1	papainas	5	-
B+P	1	bromelainas+papainas	5	-
PRB	1	dejonizuotas vanduo		5
B+PRB	1	bromelainas		5
P+PRB	1	papainas		5
B+P+PRB	1	bromelainas+papainas		5

*PRB sudarytas iš *L. plantarum* P-1 ($5,9 \times 10^8$ KfV), *L. brevis* R-1 ($4,4 \times 10^8$ KfV) ir *L. acidophilus* 308 ($3,1 \times 10^8$ KfV)

Pirmame etape vykdyta kviečių sėlenų hidrolizė su bromelainu ir papainu bei jų deriniu 1:1 (fermento koncentracija – 0,5%) 2 val. 45°C temperatūroje.

Antrame etape bandiniai papildyti 5 ml atrinktų PRB kultūrų (kultivuotų 72 val.) mišinio arba dejonizuotu vandeniu. Toliau bandiniai fermentuoti tokiu režimu: 2 val. – 30°C temperatūroje ir 8 val. – 37°C temperatūroje, taip sudarant palankias kultivavimo sąlygas visoms PRB kultūroms. Pabaigus hidrolizę nustatytas proteolitinių fermentų aktyvumas, tirpūs kviečių sėlenų baltymai, o glitimo tyrimams baltymai buvo užšaldyti ir iki tyrimo saugoti ne aukštesnėje nei -18°C temperatūroje.

2.4. Tyrimo metodai

2.4.1. PRB skaičiaus ir aktyvaus rūgštingumo nustatymas bandiniuose

PRB skaičius nustatytas pagal LST ISO 15214:2009. Petri lėkštelės su 0,9% NaCl tirpalu skiestais bandiniais, pasėtais ant MRS agaro terpės, inkubuotos 30 arba 37°C temperatūroje (priklausomai nuo bakterijų kultūros) 72 val. anaerobinėmis sąlygomis. Po inkubavimo buvo suskaičiuotos išaugusios kolonijos ir apskaičiuota PRB KfV/1g tiriamojo mėginio.

Aktyvusis rūgštingumas (pH). Fermentuojamų terpių pH vertės išmatuotos naudojant pH-metrą Sartorius PP-15 (*Sartorius*, Vokietija).

2.4.2. Bendro proteazių aktyvumo nustatymas spektrofotometrinio metodu

Proteazių aktyvumui nustatyti taikytas *Sigma-Aldrich* SSCASE01.001 protokolas [257].

Metodo esmė: veikiant proteazei, kazeinas suskaidytas iki aminorūgščių, tarp jų tirozino, kuris reaguoja su Folin-Ciocalteu fenoliniu reagentu, sudarydamas mėlynos spalvos junginius. Susidaręs laisvo tirozino kiekis, kurį parodo mėlynos spalvos intensyvumas, nustatytas kolorimetriniu metodu – išmatavus 660 nm spindulio absorbciją tiriamame tirpale UV-VIS spektrofotometru UV3100PC (*VWR International*, Belgija). Proteazių aktyvumas išreikštas AV (μmol tirozino ekvivalento, kuris išlaisvinamas iš kazeino substrato per 1 min., kai terpės pH 6,5 ir temperatūra 37°C) nustatytas naudojantis kalibracine tiese, sudaryta pagal žinomos koncentracijos tirozino tirpalų spalvinės reakcijos su Folin-Ciocalteu fenoliniu reagentu rezultatus (3 priedas).

Proteolitinis aktyvumas apskaičiuotas pagal 2.1 ir 2.2 formules:

$$\Delta A_{660\text{nm}} = A_{660\text{nm}} \text{ testas} - A_{660\text{nm}} \text{ blankas}; \quad (2.1)$$

$$U \text{ (AV/ml)} = \frac{a \times V}{V_f \times t \times v}; \quad (2.2)$$

čia: *a* – tirozino tirpalo koncentracija iš kalibracinės tiesės, μmol;

V – visas tirpalo tūris;

V_f – pradinis fermento tūris, ml;

t – bandymo trukmė, min;

v – filtrato tūris, ml, naudotas kolorimetrinėje analizėje.

2.4.3. Gliadinų hidrolizės vertinimas agarizuotoje terpėje įdubų metodu

Gliadinų hidrolizė tirta gliadinų ir agaro terpėje pagal Kunduhoglu ir Hacıoglu [164] naudotą metodiką. Terpei ruošti kaip azoto šaltinis buvo naudotas kviečių gliadinas (G3375) (*Sigma-Aldrich*, Vokietija). Pradinis gliadino tirpalas, kurio koncentracija 2 mg/ml, paruoštas ištirpinant gliadiną 60% etanolio ir vandens tirpale. Gliadinų ir agaro terpės sudėtis: 1% gliadino, 2% gliukozės, 1% KH₂PO₄, 1% K₂HPO₄, 1,5% agaro, terpės pH 6,5.

Petri lėkštelėse agare suformuoti keturi 6 mm diametro šulinėliai, jie užpildyti 20 μL tiriamo sėlenų substrato ir mėginiai inkubuoti 48 val. 37°C temperatūroje. Dejonizuotas vanduo šulinėlyje naudotas kaip neigiama kontrolė. Po inkubacijos agaras nudažytas *Coomassie* mėlynųjų R-250 dažų tirpalu (5 g/l *Coomassie Blue Brilliant* R-250 (*Sigma-Aldrich*, Vokietija), 500 ml/l metanolio, 92 ml/l acto rūgšties).

Po dažymo lėkštelės išplautos plovimo tirpalu (250 ml/l etanolio, 50 ml/l acto rūgšties). Aplinkui šulinėlius vertinti nenudažytų – hidrolizuotų baltymų plotai, kurie proporcingi glitimo hidrolizės efektyvumui.

2.4.4. Glitimo kiekio nustatymas imunofermentiniais ELISA G12 ir R5 metodais

Glitimo likučiams kviečių produktuose išmatuoti naudoti du ELISA metodai (ELISA G12 ir ELISA R5), pagrįsti imunofermentiniais antikūnų tyrimais.

Mėginiams po PRB fermentacijos naudotas ELISA G12 metodas (AACCI 38-52.01), pagrįstas AgraQuant® Gluten G12 antikūniais (*Romer Labs*, Jungtinė Karalystė), kurie specifiskai atpažįsta peptidą QPQLPY. Glitimui nustatyti kituose etapuose taikytas ELISA R5 metodas, naudotas rinkinys RIDASCREEN Gliadin, (r-Biopharm, Vokietija). Šis metodas (AACCI 38-50.01) atpažįsta peptidą QQPFP kviečių, miežių ir rugių produktuose.

Mėginių paruošimas ELISA analizei. 0,25 g homogenizuoto mėginio įdėta į 15 ml centrifugavimo mėgintuvėlius, pridėjus 2,5 ml specialaus buferio, mėginiai inkubuoti 40 min. 50°C temperatūroje ir 1 val. tirpinti 7,5 ml etilo alkoholio 80% tirpale maišant Biosan Multi Bio 3D (*Biosan*, Latvija) purtyklėje. Po išsodinimo 3000 aps./min. centrifuga Centurion Scientific K241 (*Centurion Scientific*, Jungtinė Karalystė) supernatantas praskiestas ir naudotas glitimo kiekio analizei.

Analizės eiga. Mėginiai bei standartai įlašinti į mikrošulinėlius, kurių vidinės sienelės padengtos monokloniniais antikūnais, ir inkubuota 30 min. 20–25°C. Po praplovimo etapo į mikrošulinėlius įlašinta konjugato, po 30 min. plokštelės vėl perplautos. Užlašinus fermento substrato ir chromogeno, po 30 min. laikymo tamsoje išryškėjo mėlyna spalva, kuri, užlašinus „stop“ tirpalo, per 30 min. pasikeitė į geltoną. Mėginių spalvos intensyvumas šulinėliuose įvertintas naudojant mikroplokštelių skaitytuvą Multiscan EX (*Thermo Fisher Scientific*, JAV) su 450 nm (OD450) absorbcijos filtru. Gliadinų koncentracijos mėginiuose nustatytos pagal kalibravimo kreives (4 priedas), pateiktas gamintojų ir pakoreguotas pagal standartų reikšmes po analizės. Kadangi kviečių glitimo gliadinai ir gliuteninai randami santykiu 1:1, t. y. gliadinai sudaro apytiksliai pusę jo masės, glitimo koncentracija apskaičiuota gliadinų kiekį dauginant iš dviejų.

2.4.5. Glitimo baltymų išskirstymas NaDS-PAGE metodu

Glitimo baltymams išskirstyti pagal molekulinę masę naudota natrio dodecilsulfato ir poliakrilamido gelio elektroforezė (NaDS-PAGE) remiantis Laemmli [258] pasiūlyta metodika. Baltymų molekulinei masei nustatyti naudotas 12 juostų 6,5–200 kDa *SigmaMarkers* baltymų standartas (*Sigma-Aldrich*, Vokietija). Baltymų žymenys (aprotininas iš galvijų plaučių (6,50 kDa), α-laktoalbuminas iš galvijų pieno (14,20 kDa), tripsino inhibitorius iš sojų pupelių (20,00 kDa), tripsinogenas iš galvijų kasos (24,00 kDa), anglies anhidrazė iš galvijų eritrocitų (29,00 kDa), gliceraldehid-3-fosfato dehidrogenazė iš triušio raumenų (36,00 kDa), ovalbuminas iš vištų kiaušinių (45,00 kDa), glutamo dehidrogenazė iš galvijų kepenų (55,00 kDa), albuminas iš galvijų serumo (66,00 kDa), fosforilazė B iš triušio raumens (97,00 kDa), β-galaktozidazė iš *E. coli* (116,00 kDa) ir miozinas iš kiaulių širdies (200,00 kDa)) liofilizuoti su mėginio paruošimo buferiu ir paruošti naudoti ištirpinus dejonizuotame

vandenyje. Atskiedus 100 µl dejonizuoto vandens, gautas tirpalas, kuriame baltymų koncentracija 2–3,5 mg/ml, 62 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 mM etilendiamino-tetraacetato (EDTA), 4% sacharozės, 10 mM TCEP, 2% NaDS ir 0,01% bromfenolio mėlynojo dažo.

Medžiagos, tirpalai ir jų ruošimas vertikaliam gelių elektroforezės sistemai. Medžiagos ir tirpalai įsigyti iš *Bio-Rad* (Austrija): 30% akrilamido tirpalas, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) buferinis tirpalas, 0,5M Tris-HCl (pH 6,8) buferinis tirpalas, 10% NaDS, tetrametiletilendiaminas (TEMED), elektroforezės Tris-glicino buferinis tirpalas, 2xLaemmli mėginio paruošimo buferis (65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8, 26,3% glicerolio, 2,1% NaDS, 0,01% bromfenolio mėlynojo dažo), 2-merkaptetanolis, dažo *Coomassie* mėlio tirpalas. 10% amonio persulfato (APS) tirpalas ruoštas prieš pat naudojimą: 0,1 g APS ištirpinta 1 ml vandens.

Sistema. 2 gelių vertikalios elektroforezės sistema Mini-PROTEAN (*Bio-Rad*, JAV), 0,75 mm storio stiklinės plokštelės, 0,75 mm storio politetrafluoretileno šukos, turinčios 10 dantų, pastoviosios elektros srovės šaltinis PowerPac Basic (*Bio-Rad*, JAV), 10 µl švirkštas su tiesiai nupjauta adata, 0,45 µm porų filtrai.

Frakcionuojančio ir koncentruojančio poliakrilamido gelių ruošimas. Cheminės medžiagos poliakrilamido geliams nurodytos 2.4 lent. Pirmiausia supiltas frakcionuojantis gelis, jo viršus padengtas distiliuoto vandens sluoksniu taip išvengiant oksidacijos. Pasibaigus polimerizacijos reakcijai (60 min., 22°C), vanduo pašalintas, ant frakcionuojančio gelio užpiltas koncentruojantis gelis, į jį įstatytos šukos. Po polimerizacijos reakcijos (45 min., 22°C) šukos atsargiai išimtos.

2.4 lentelė. Elektroforezės geliai baltymams frakcionuoti

Cheminės medžiagos	Frakcionuojantis 12% gelis	Koncentruojantis 4% gelis
30% akrilamido tirpalas	6,0 ml	1,98 ml
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	3,75 ml	-
0,5M Tris-HCl (pH 6,8)	-	3,78 ml
10 % NDS	150 µl	150 µl
dH ₂ O	5,03 ml	9 ml
TEMED	7,5 µl	15 µl
10 % APS	75 µl	75 µl
Bendras tūris	15 ml	15 ml

Bandinių paruošimas elektroforezei. Plastikiniame 1,5 ml mėgintuvėlyje 5 µl tiriamojo baltymo tirpalo praskiesti 4,75 µl Laemmli baltymo denatūravimo buferiniu tirpalu ir 0,25 µl 2-merkaptetanoliu. Mėginys 5 min. kaitintas verdančio vandens vonioje. Po 10 µl paruošto bandinio įpilta į šulinėlių dugną, o į kraštinius šulinėlius įpilta etaloninio baltymo mišinio. Gardelė įdėta į elektroforezės aparatą, kurio talpykla pripildyta elektroforezės Tris-glicino buferinio tirpalo.

Analizės eiga. Elektroforezė vykdyta 1 val. kambario temperatūroje 40–60 mA stiprumo srovėje ir esant 200 V įtampai, kol migruojantis gelyje mėlynojo bromfenolio tirpalas pasiekė skiriamąjį gelio apačią. Po elektroforezės poliakrilamido gelis atskirtas nuo stiklo plokštelių, praplautas vandeniu ir 2 val. dažytas *Coomassie* mėlio dažais. Po dažymo gelis išplautas 10% acto rūgšties tirpalu. Geliai saugoti distiliuotame vandenyje 4°C temperatūroje.

Duomenims vizualizuoti ir baltymų molekulinėms masėms nustatyti naudota UVITEC 1D (*Uvitec*, Jungtinė Karalystė) gelių dokumentavimo įranga.

2.4.6. Glitimo baltymų ekstrakcija ir gryninimas

Glitimo baltymų ekstrakcija atlikta pagal Dhaka ir Khatkar [259] aprašytą metodiką. Kviečių sėlenų substratai kiekybiškai perkelti į 15 ml centrifugavimo mėgintuvėlius, centrifuguoti (5000 aps./min., 15 min., kambario temp.), nupiltas supernatantas su vandenyje tirpiaais albuminais, nuosėdos 2 kartus ekstrahuotos su fosfatinu buferiu (5 ml, 66 mmol/l, pH 7,6) purtant 30 min., naudojant purtyklę Biosan Multi Bio 3D (*Biosan*, Latvija), mišinys centrifuguotas (5000 aps./min, 15 min.). Supernatantas, kurio sudėtyje vyrauja globulinai, nupiltas. Abiejuose supernatantuose įvertintas tirpių baltymų kiekis. Gautos nuosėdos plautos maišant 15 min. su 5 ml dejonizuoto vandens ir po centrifugavimo naudotos prolaminų ekstrakcijai.

Glidinių frakcijos išskyrimas. Nuosėdos užpiltos 5 ml 70% etanolio vandeninio tirpalo ir 1 val. ekstrahuotos purtant. Gautas tirpalas centrifuguotas (5000 aps./min, 15 min.) supernatantas nupiltas ir išsaugotas. Procedūra kartota du kartus, supernatantas naudotas tolimesnei analizei, o nuosėdos – gliuteninų ekstrakcijai.

Gliuteninų frakcijos išskyrimas. Ankstesniame etape gautos nuosėdos užpiltos 5 ml 50% 1-propanolio + 1% DTT ir maišytos 30 min. Bandiniai kaitinti vandens vonioje 60°C 90 min., supurtant kas 15 min., centrifuguoti, supernatantas nupiltas ir nusodinti gliuteninai ištirpinti 5 ml 50% 2-propanolio + 0,08 M Tris-HCl (pH 7,5) + 1% DTT + 2 M karbamido tirpale, tirpalas centrifuguotas tomis pačiomis sąlygomis. Gauta frakcija naudota tirpių baltymų ir AF-ESCh tyrimams.

Mėginių gryninimui naudota kietafazė ekstrakcija (KFE) su Chromabond C18 minikolonėlėmis, skirtomis bandiniams paruošti (*Macherey-Nagel*, Vokietija), Macherey-Nagel Chromabond vakuuminės ekstrakcijos aparatu (*Macherey-Nagel*, Vokietija) pagal sąlygas, kurios pateiktos 2.5 lent. KFE buvo pasirinkta kaip mėginio paruošimo būdas dėl galimybės sumažinti matricos efektus ir sutrumpinti mėginio apdorojimo laiką, palyginti su kitais mėginio paruošimo būdais.

2.5 lentelė. Kietafazės ekstrakcijos protokolas

Žingsnio eil. Nr.	Procedūros pavadinimas	Tirpalas	Kiekis
1.	Praplovimas 1	Metanolis 100%	1 ml x 3
2.	Praplovimas 2	H ₂ O (parūgštintas TFA, pH 3)	1 ml x 2
3.	Bandinio užnešimas	Bandinys	200 µl
4.	Praplovimas 3, pradžiovinimas 2–3 min.	5% acetonitrilo tirpalas + 1% TFA	1 ml x 2
5.	Bandinio surinkimas	79,5% acetonitrilas + 1% TFA	200 µl x 5

2.4.7. Tirpių baltymų koncentracijos nustatymas

Baltymų kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu. Tirpių baltymų kiekis kviečių sėlenose ir hidrolizatuose įvertintas spektrofotometrinio metodu [260]. Šio metodo principas remiasi baltyminių tirpalų savybe absorbuoti šviesą esant 280 nm. Aminorūgštys, kurios turi aromatinių žiedą (triptofanas ir tirozinas), absorbuoja UV

spindulius esant bangos ilgiui 280 nm. Kadangi baltymų tirpaluose būna ir kitų medžiagų (pvz., nukleorūgščių), kurios absorbuoja šviesą esant 280 nm ir neleidžia tiksliai nustatyti baltymų kiekį tirpale, matuojant baltymų tirpalų absorbciją esant 260 nm ir 280 nm bangos ilgiui, baltymų koncentracija patikslinta.

Tirpalų optinis tankis matuotas UV-VIS spektrofotometru UV3100PC (*VWR International*, Belgija) esant 280 nm ir 260 nm bangos ilgiams. Baltymų koncentracija tirpale X (mg/ml) apskaičiuota pagal 2.3 formulę:

$$X \text{ (mg/ml)} = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260}); \quad (2.3)$$

čia: A_{280} – baltymų tirpalo absorbcija, esant bangos ilgiui 280 nm;

A_{260} – baltymų tirpalo absorbcija, esant bangos ilgiui 260 nm.

2.4.8. Suminio ir laisvųjų aminorūgščių kiekio nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) metodu

Metodo esmė. Metodas pritaikytas aminorūgščių kiekiui nustatyti maisto gaminiuose ESCh su fluorescencijos detektoriumi. Analizuotos aminorūgštys: Asp, Gln, Ser, His, Gly, Thr, Arg, Ala, Tyr, Cys, Val, Met, Trp, Phe, Ile, Leu, Lys, Pro. Suminiam aminorūgščių kiekiui kviečių sėlenose nustatyti aminorūgštys ekstrahuotos 6 mol/l HCl tirpalu, o laisvos aminorūgštys ekstrahuotos praskiesta 0,1 mol/l HCl. Aminorūgštys atskirtos taikant skysčių chromatografiją, matuojant fluorescencijos emisiją esant 450 nm (Pro – 305 nm).

Reagentai. Tyrimui naudoti analitinio grynumo reagentai, skirti ESCh analizei: dejonizuotas vanduo, druskos rūgštis (HCl), tankis 1,2 g/ml, 37% (*Sigma Aldrich*, Vokietija), natrio hidroksidas (NaOH) (*Eurochemicals*, ES), natrio hidroksido tirpalas 7,5 mol/l, natrio hidroksido tirpalas 1 mol/l; natrio citratas ($C_5H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (*Eurochemicals*, Slovakija), citratinis buferinis tirpalas 0,2 mol Na+/l, pH 2,20; kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4) (*Sigma-Aldrich*, Vokietija), dikalio hidrofosfatas (K_2HPO_4) (*Sigma-Aldrich*, Vokietija), acetonitrilas (*Penta*, Čekija), metanolis (*Macron*, ES), borato buferio tabletės (pH 9,2) (*Fluka Analytical*, Vokietija), 3-merkaptio propiono rūgštis ($C_3H_6O_2S$, 99,0 %) (*Sigma-Aldrich*, Vokietija), etanolis (96%) (*Stumbras*, Lietuva); orto-ftaldehidas (OPA) ($C_8H_6O_2$, 99,0 %) (*Sigma-Aldrich*, Vokietija), 9-fluorenil-metil chloroformatas ($C_{15}H_{11}ClO_2$, 99,0%) (*Sigma-Aldrich*, Vokietija), aminorūgščių analitinis standartas (AAS18-10x1ml) (*Sigma-Aldrich*, Vokietija).

Bandinio paruošimas. Į kūginę kolbą 0,2 mg tikslumu pasvertas atitinkamas bandinio kiekis (2,5 g) ir įpilta 100,0 ml ekstrahavimo mišinio. Suminiam aminorūgščių kiekiui nustatyti, bandiniui ekstrahuoti naudota 6 mol/l HCl ir kaitinta 24 val. esant 110°C, o laisvoms aminorūgštims nustatyti bandinys praskiestas 0,1 mol/l HCl, ir 60 min. maišytas magnetine maišykle. Nuosėdoms leista nusėsti ir virš nuosėdų pipete paimta 10,0 ml tirpalo, perkelta į 100 ml stiklinę, praskiesta citratinio buferiniu tirpalu ir maišyta magnetine maišykle 5 min. Tirpalas centrifuguotas, 10,0 ml gauto tirpalo perkelta į 100 ml stiklinę, nustatyta pH vertė 2,20, mėginiai filtruoti švirkštiniais 0,22 µm filtrais.

Prieš injekciją į kolonėlę mėginiai derivatizuoti – aminorūgštys paverstos į fluorescencinius junginius, kuriuos galima detektuoti su fluorescenciniu detektoriumi. Derivatizacija vykdyta automatiškai chromatografe. Chromatografo autosamplis

paėmė mėginio, tada pagal programą įmaišė OPA tirpalo, fluorenil-metil chloroformato ir 3-merkaptio propiono rūgšties, po inkubacijos 1 µl šio mišinio paimta analizei. Derivatizacijos OPA tirpalui paruošti naudota: borato buferis (0,1 mol/l) – 1 borato buferio tabletė ištirpinta 100 ml distiliuoto vandens; merkaptio propiono rūgšties-borato buferio tirpalui – 10 µl 3-merkaptio propiono rūgšties sumaišyta su 10 ml 0,1 mol/l borato buferio. Derivatizacijos OPA tirpalo paruošimui naudota: 0,3 ml etanolio užpilta ant 10 mg orto-ftaldehido ir visiškai ištirpinta, pridėta 0,7 ml borato buferio ir 4 ml dejonizuoto vandens.

Aparatūra. pH-metras (*Mettler Toledo*); vienkartiniai Ultrafree®PVDF membraniniai filtrai (0,22 µm) (*Millipore*, Airija); ESCh įrenginys SHIMADZU Prominence LC20AD (*Shimadzu*, Japonija) su fluorescenciniu detektoriumi ir integratoriumi, leidžiančiu išmatuoti smailių plotus; atvirkštinių fazių ESCh kolonėlė: YMC-Triart C18 (nejudri fazė, kurios dalelių dydis 3 µm; ilgis 150 mm; vidinis skersmuo 3 mm); prieškolonėlė RP C18.

Analizės eiga. Mobilioji fazė A (2,04 g KH₂PO₄ ir 0,87 g K₂HPO₄ ištirpinta 1000 ml distiliuoto vandens. Mobilioji fazė B (sumaišyta 225 ml acetonitrilo, 200 ml metanolio ir 75 ml distiliuoto vandens). Judančiosios fazės tekėjimo greitis – 0,5 ml/min.; injekcijos tūris – 1 µl; kolonėlės temperatūra 45°C; detektoriaus matavimo bangos ilgis – 450 nm ir 305 nm (Pro); eliuacijos režimas – gradientinis, judriosios fazės A ir B (B fazės procentinė dalis pagal tūrį: 1,46 min. – 11; 10,46 min. – 13; 16,46 min. – 31; 23,96 min. – 37; 31,46 min. – 70; 31,49 min. – 100; 40,46 min. – 100; 40,49 min. – 11).

Rezultatų apskaičiavimas. Matuoti bandinių ir etalono kiekvienos aminorūgšties smailių plotai ir pagal 2.4 formulę apskaičiuoti aminorūgščių kiekiai g/100 g bandinio:

$$\text{Aminorūgščių kiekis (g/100g produkto)} = \frac{M_{a.r.} \times \frac{(V \times C_{a.r.})}{1000000} \times 100}{m_1}; \quad (2.4)$$

čia: *V* – tūris, kuriame buvo ruoštas mėginys (l);

C_{a.r.} – aminorūgšties koncentracija (µmol/L);

M_{a.r.} – aminorūgšties molinė masė (g/mol);

m₁ – bandinio masė (g).

Kiekybiniam aminorūgščių įvertinimui buvo sudarytos aminorūgščių kalibracinės tiesės. Metodo linijiškumas įvertintas naudojant aminorūgščių etaloninio tirpalo koncentracijas nuo 10 µmol/l iki 200 µmol/l.

2.4.9. Kiekybinis ir kokybinis glitimo baltymų tyrimai AF-ESCh ir ESCh-Q/TOF metodais

Naudoti reagentai. Tyrimams buvo naudoti: acetonitrilas ir metanolis, gradientinio švarumo (*Millipore*, Vokietija); trifluoracto rūgštis (TFA), gradientinio švarumo; vanduo išgrynintas, dejonizuotas Thermo Scientific™ Barnstead™ GenPure™ Pro vandens gryninimo sistema (*Fisher Scientific*, Švedija); vienkartiniai PVDF membraniniai filtrai (0,45 µm) (*Millipore*, Airija). Etaloniniai gliadino tirpalai ruošti standartinę medžiagą – kviečių gliadiną G3375 (*Sigma-Aldrich*, Vokietija) – tirpinant 70 % alkoholio tirpale su 0,05 % TFA (10 ml). Iš standarto ruošti 10, 100, 500, 1000 ir 5000 mg/kg koncentracijų gliadino tirpalai.

Mėginių paruošimas. Chromatografinėi analizei naudotos baltymų frakcijos, išgrynintos KFE metodu. Prieš analizę mėginiai filtruoti per 0,45 µm porų filtrą.

Prietaisai. Kviečių sėlenų glitimo gliadinų frakcijų baltymų struktūra ir jos pokyčiai po apdorojimo biologinėmis priemonėmis fiksuoti „SHIMADZU LC 2040-C 3D Nexera-i Plus“ chromatografu (*Shimadzu*, Japonija). Naudota atvirkštinių fazių Inertsil WP300-C18 5µm kolonėlė 4,0×150 mm (*GL Sciences*, Japonija), UV lempa su diodų matricos detektoriumi.

Analizės parametrai. Analizei buvo taikytos sąlygos pagal Walter ir kt. [261] bei Schalk ir kt. [262], optimizuotos eksperimentiniu būdu: kolonėlės temperatūra 45°C, injekcijos tūris – 10 µl, slėgis 400 bar, srauto greitis 0,4 ml/min., eliuentas A – dejonizuotas vanduo su 0,1% TFA, eliuentas B – acetonitrilas su 0,1% TFA, elucijos gradientas nuo 5 % iki 85% acetonitrilo + 0,1 TFA per 60 min: (B fazės procentinė dalis pagal tūrį: 0 min – 5; 2,5 min. – 5,5; 50 min. – 35; 51 min. – 85; 53 min. – 85; 53,5 min. – 5; 60 min. – 5), detekcijai pasirinktas bangos ilgis – 210 nm. Nustatytos chromatografijos metodo sąlygos eksperimento metu išlaikytos pastovios. Po kiekvienos analizės taikyta 60 min. kolonėlės praplovimo procedūra (vandeniu ir acetonitrilu, acetonitrilo procentinė dalis pagal tūrį: 0 min. – 5; 2,5 min. – 5; 15 min. – 95; 20 min. – 5; 25 min. – 95; 30 min. – 5; 35 min. – 95; 40 min. – 5; 45 min. – 95; 50 min. – 5; 60 min. – 5).

2.4.10. Glitimo imunoreaktyvių peptidų tyrimai ESCh-Q-TOF-MS/MS metodu

Kokybinės imunoreaktyvių fragmentų analizės atliktos efektyviosios skysčių chromatografijos ir viengubosios bei dvigubos masių spektrometrijos (ESCh ir ESCh-Q-TOF-MS/MS) metodais.

Naudoti reagentai, analogiški ESCh metodui, nurodyti 2.4.9. skyriuje, tik vietoje TFA naudota skruzdžių rūgštis, gradientinio švarumo (≥ 96,0).

Mėginių paruošimas. Glitimo baltymų tirpalai ruošti pagal metodiką, nurodytą 2.2.10 skyriuje, tik vietoje TFA naudota skruzdžių rūgštis.

Prietaisai. Naudotas efektyviosios skysčių chromatografijos su kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru (ESChC/MS) tandemas Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF, atvirkščių fazių chromatografijos kolonėlė Inertsil WP300-C18 5µm, 4.0×150 mm (*GL Sciences*, Japonija). Sistemai valdyti ir MS duomenims stebėti buvo naudota programa MassHunter 10.0 (*Agilent Technologies*, JAV).

Analizės parametrai. Taikytos analogiškos ESCh analizei sąlygos, kaip 2.4.9 skyriuje, tik buferį A sudarė 0,1% skruzdžių rūgšties MS grynumo vandenyje, o buferį B – 0,1% skruzdžių rūgšties acetonitrile. Po ESCh atskirti peptidai buvo nukreipti į Q-TOF prietaisą MS analizei su šiais eksperimentiniais prietaiso parametrais: poliškumas – ES+, skyros režimas: kapiliaro įtampa 3500 V, džiovinimo dujų temperatūra 350°C, nešančių dujų tėkmė 600 l/val., maksimalus m/z – 3000, dviejų spektrų per sekundę MS duomenų gavimo sparta. Peptidų masės analizei automatinio MS/MS režimu buvo naudojama susidūrimo energija 0–35 V. MS/MS spektrai buvo fiksuoti 100–3000 m/z diapazone. Duomenys buvo surinkti naudojant automatinį MS/MS režimą, MS/MS gavimo dažnis – 3 spektrai per sekundę. Prietaisas buvo kalibruotas naudojant Agilent derinimo mišinį HP0321 (*Agilent Technologies*, JAV) acetonitrile; naudotas vidinis kalibravimas pagal etalonines mases 121,0509 ir 922,0098 m/z.

Duomenų analizei, automatizuotai peptidų paieškai ir peptidų identifikavimui naudota *Spectrum Mill* proteomikos programa, gautus MS/MS duomenis lyginant su Uniprot konsorciumo universalia informacine baltymų duomenų baze [263]. Paieškos parametrai buvo tokie: masės tolerancija – 20×10^{-6} Da pirmtakų jonams ir 50×10^{-6} Da dukteriniams jonams, nespecifinis skaidymas, be modifikavimo. Peptidų imunogeniškumo vertinimas atliktas lyginant aminorūgščių sekas su žinomais epitopais naudojant Nebraskos universiteto (Linkolnas, JAV) duomenų bazę ir su ja susietą rizikos vertinimo įrankį [264].

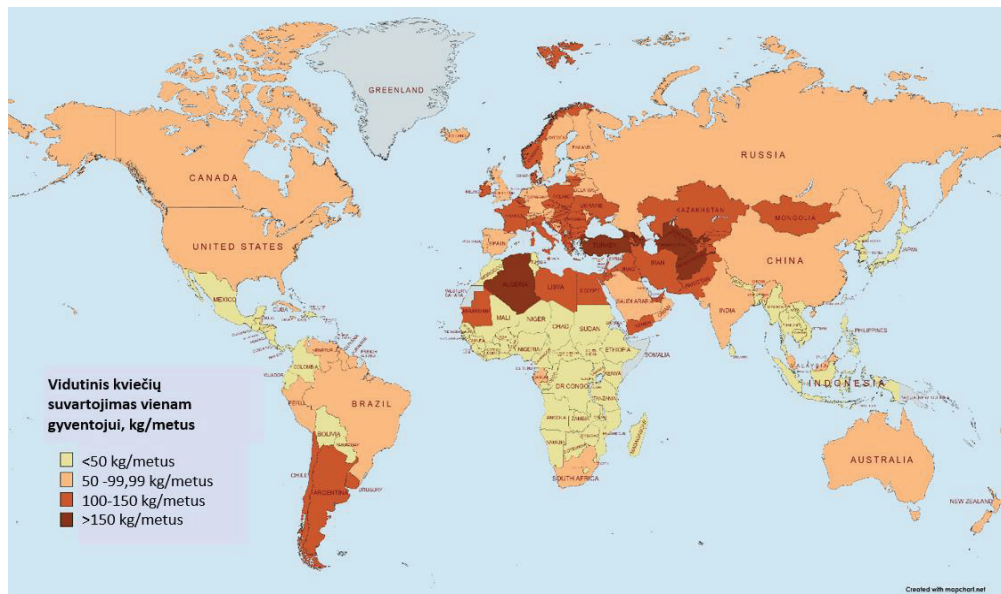
2.5. Statistinė duomenų analizė

Statistinei duomenų analizei ir duomenų vizualizavimui buvo naudotos IBM SPSS (26 versija) (IBM, JAV) ir Microsoft Excel programos. Vienaveiksnė ir daugiaveiksnė *ANOVA* analizė atlikta vertinant skirtumus tarp kontrolės ir tiriamų mėginių. Faktoriaus reikšmingumo lygis nustatytas pagal Fišerio (*F*) kriterijų, esant 95% patikimumui. Pearsono koreliacijos koeficientai apskaičiuoti ir linijinės regresijos lygtys sudarytos siekiant įvertinti koreliaciją tarp kviečių vartojimo ir CL paplitimo, fermentinės hidrolizės sąlygų ir glitimo kiekio sumažėjimo kviečių sėlenose bei ryšius tarp rezultatų, gautų skirtingais tyrimo metodais. Ryšiai ir skirtumai tarp reikšmių buvo laikomi statistiškai reikšmingi, kai reikšmė $p < 0,05$.

3. TYRIMŲ REZULTAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Kviečių vartojimo ir jo dinamikos ryšys su celiakijos paplitimu

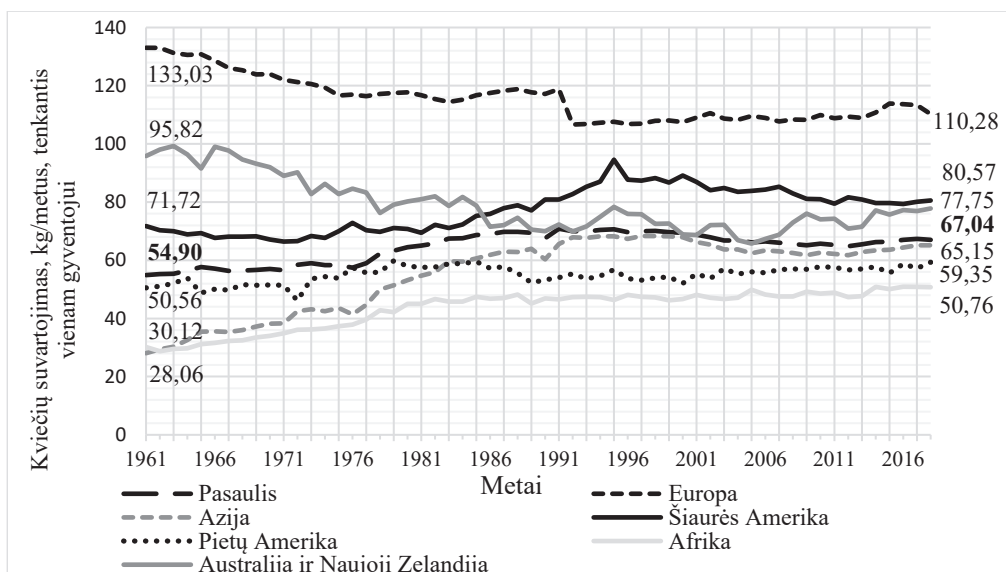
Kviečių vartojimas. Pagal surinktus statistinius duomenis, paskutinius dešimtmečius daugiausia kviečių vartojo Europos, Azijos ir Šiaurės Afrikos šalys (3.1 pav.).



3.1 pav. Vidutinis kviečių suvartojimas vienam gyventojui pagal šalis 2004–2018 m. (kg per metus) [255]

Analizuojamu 2004–2018 m. laikotarpiu vidutiniškai pasaulyje vienam gyventojui per metus teko 66,09 kg kviečių. Buvo nustatyti dideli kviečių vartojimo skirtumai tarp žemynų. Mažiausiai kviečių gyventojai per metus suvartojo Afrikoje (49,03 kg) ir Pietų Amerikoje (57,01 kg), o daugiausiai – Europoje (110,00 kg) (3.2 lent.).

Nors pasaulinis kviečių derlius didėja, 1961–2018 m. kviečių vartojimo duomenų analizė parodė, kad jų vartojimo augimo tempai lėtėja, o pasaulinis kviečių suvartojimas, tenkantis vienam gyventojui, paskutiniiais metais šiek tiek sumažėjo (3.2 pav.). Pastebėta, kad mažėja kviečių vartojimo skirtumai tarp žemynų. Palyginti su praeito amžiaus viduriu, kviečių vartojimas sumažėjo Europoje, Australijoje ir Naujojoje Zelandijoje. Pastaraisiais metais kviečių vartojimo mažėjimo tendencija matoma Europoje ir Šiaurės Amerikoje. Palyginti su praeito amžiaus viduriu, kviečių vartojimas sparčiausiai augo Azijoje (1,87 karto) ir Afrikoje (1,58 karto), šiek tiek padidėjo Šiaurės ir Pietų Amerikoje (1,12–1,17 karto).

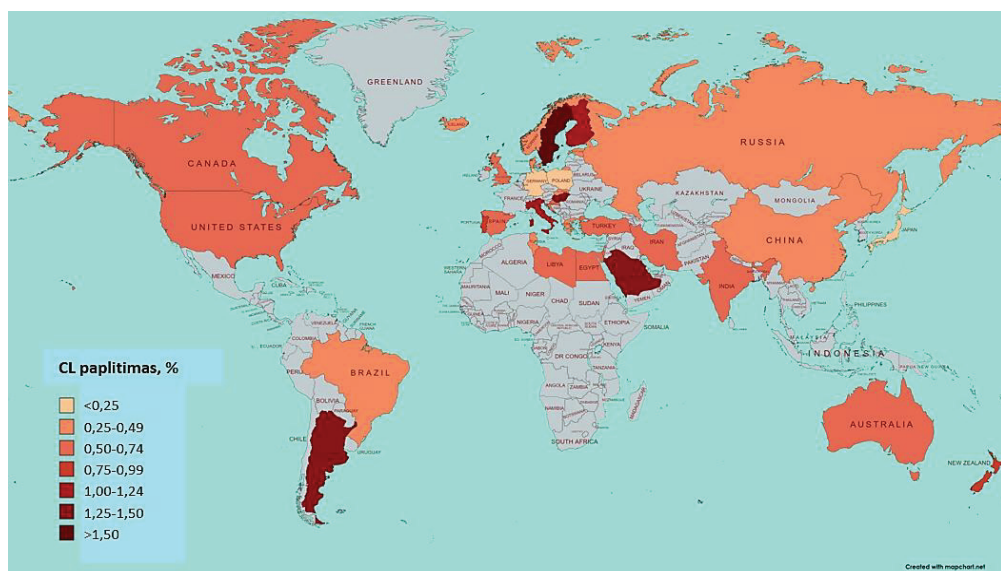


3.2 pav. Kviečių vartojimo pokyčiai pagal žemynus 1961–2018 m. [255]

Išanalizavus kviečių vartojimo duomenis 2004–2018 m. pagal šalis, nustatyta, kad šiuo laikotarpiu labiausiai kviečių vartojimas padidėjo Naujojoje Zelandijoje (1,19 karto) ir Ispanijoje (1,13 karto), o labiausiai sumažėjo Estijoje, Kanadoje, Danijoje ir Turkijoje (santykis nuo 0,6 iki 0,88). Kviečių vartojimo padidėjimas / sumažėjimas analizuojamose šalyje ir kviečių vartojimo dinamikos mini diagramos pateiktos 3.1 lent.

CL paplitimas. Atlikus išplėstinę paiešką *PubMed*, *Taylor & Francis* ir *Google Scholar* duomenų bazėse, iš viso rastas 1291 įrašas apie CL paplitimą. Po straipsnių atrankos proceso (žr. 2 priedą) CL paplitimo analizei naudoti 75 straipsniai, kuriuose publikuoti klinikinių tyrimų rezultatai: 70 klinikinių tyrimų buvo įtraukta į CL serologinio paplitimo analizę, 54 tyrimai įtraukti į CL paplitimo statistinę analizę, o papildomi penki tyrimai, pagrįsti nacionalinių duomenų bazių arba ligoninių registro analizėmis, buvo panaudoti sudarant CL paplitimo žemėlapi. Dažniausiai tyrimuose buvo vertinamas CL paplitimas tarp kraujo donorų. Didžiausia epidemiologinių tyrimų dalis ($n = 70$) buvo atlikta nustatant specifinius serologinius kraujo CL žymenis (IgA tTG ir / arba IgA EMA). 54 tyrimų autoriai įtraukė histologinius dvylikapirštės žarnos biopsijos mėginių duomenis. Genetiniai žymenys (ŽLA-DQ genotipai) buvo vertinti tik 10 tyrimų. CL paplitimo rodikliai tarp sveikų asmenų buvo rasti 40-yje šalių; 31-oje iš jų rasti biopsija pagrįsti duomenys. Bendras CL paplitimas pasaulyje parodytas 3.3 pav.

Remiantis 2005–2020 m. paskelbtais CL paplitimo tyrimais, apskaičiuota, kad biopsija įrodytas CL paplitimas pasaulyje yra 0,77%. 54 klinikinių tyrimų duomenimis (5 priedas), buvo ištirtas 197361 asmuo, iš jų 1510 buvo diagnozuota CL. Bendras apskaičiuotas CL serologinis paplitimas 1,25% (3222 iš 256936 tirtų asmenų, 70 tyrimų duomenys).



3.3 pav. Celiakijos paplitimas pasaulyje [255]

CL paplitimas Europoje. Iš viso išanalizuota 30 klinikinių CL tyrimų: 23 tyrimai pagrįsti biopsijos duomenimis, 4 tyrimai atlikti naudojant serologinius testus ir 3 tyrimai analizuoja registruotų CL sergančių pacientų duomenis (5 priedas). Duomenys surinkti iš 19 Europos šalių, 15-oje iš jų pateikti biopsijos tyrimais gauti rezultatai. Bendras CL paplitimas Europoje, apskaičiuotas remiantis 27 klinikiniais tyrimais – 1,07% (830 iš 77374 asmenų). Didžiausias CL paplitimas nustatytas Švedijoje (2,5%), šiek tiek mažesnis – Vengrijoje (1,38%), Suomijoje (1,24%) ir Italijoje (1,01%). Kitose Europos šalyse CL paplitimas, nustatytas biopsijos tyrimais, yra mažesnis nei 1%.

CL paplitimas Azijoje. Rasti 24 straipsniai, susiję su CL paplitimu 11 Azijos šalių, septyniose iš jų skelbiami biopsijos tyrimais patvirtinti duomenys. Bendras biopsija įrodytas CL paplitimas Azijoje apskaičiuotas 0,69% (349 asmenys iš 50661, 16 klinikinių tyrimų) (5 priedas). CL atvejų daugiausia nustatyta Saudo Arabijoje (1,42%), Izraelyje (0,7%), Irane (0,64%), Indijoje (0,64%) ir Turkijoje (0,53%). Kitose šalyse CL paplitimas nustatytas mažesnis nei 0,5%, o mažiausias – Kinijoje (0,35%) ir Japonijoje (0,05%).

CL paplitimas Šiaurės ir Pietų Amerikos žemynuose. 14 mokslinių straipsnių atitiko įtraukimo kriterijus apie CL paplitimą Šiaurės Amerikoje ($n = 4$) ir Pietų Amerikoje ($n = 10$). 10 iš šių straipsnių buvo tinkami statistinei analizei. Apskaičiuotas CL paplitimas Šiaurės Amerikoje – 0,53% (161 biopsija įrodytas atvejis iš 33926), panašus CL paplitimas nustatytas Jungtinėse Amerikos Valstijose (0,54%) ir Kanadoje (0,52 %) (5 priedas). CL paplitimas Pietų Amerikoje – 0,49% (84 asmenys iš 17285). Didžiausias paplitimas nustatytas Argentinoje (1,26%), šiek tiek mažesnis Brazilijoje (0,37%), kitose šalyse biopsija pagrįstų tyrimų nebuvo atlikta.

3.1 lentelė. Kviečių vartojimas ir bendras CL paplitimas įvairiose šalyse

Šalis	Kviečių suvartojimas vienam gyventojui per metus 2004–2018, kg*	Kviečių suvartojimo padidėjimas / sumažėjimas**	Kviečių vartojimo dinamikos diagrama 2004–2018***	Celiakijos paplitimas, %	Populiacija
Kroatija	104,47	⇒ 1,03		0,5	A
Danija	97,36	↓ 0,864		0,48	C
Estija	80,47	↓ 0,667		0,34	A
Suomija	78,24	↓ 0,906		1,24	C
Vokietija	84,38	↑ 1,07		0,22	B
Graikija	124,67	⇒ 1,032		0,33	B
Vengrija	108,41	⇒ 0,999		1,38	A
Islandija	70,17	⇒ 1,037		0,49	B
Italija	146,53	⇒ 1,001		1,01	C
Lenkija	107,61	⇒ 0,981		0,22	A
Portugalija	91,95	↓ 0,948		0,75	A
Ispanija	82,58	↑ 1,13		0,5	C
Švedija	81,08	⇒ 1,049		2,56	A
Jungtinė Karalystė	99,89	↑ 1,059		0,66	A
Kinija	64,61	⇒ 0,95		0,35	B
Indija	59,31	⇒ 1,037		0,64	C
Iranas	154,74	↓ 0,996		0,64	C
Izraelis	115,3	↓ 0,941		0,7	B
Japonija	43,98	⇒ 1,022		0,05	B
Rusijos Federacija	133,67	⇒ 1,047		0,35	C
Saudų Arabija	93,05	↑ 1,112		1,42	A
Turkija	180,64	↓ 0,881		0,53	C
Argentina	99,49	⇒ 1,037		1,26	A
Brazilija	52,64	⇒ 1,001		0,37	C
Kanada	81,68	↓ 0,836		0,52	B
JAV	81,54	⇒ 0,965		0,54	C
Australija	71,42	↑ 1,114		0,56	B
Naujoji Zelandija	80,39	↑ 1,187		0,98	A
Egiptas	144,63	⇒ 1,026		0,53	A
Libija	121,81	↑ 1,12		0,65	A
Tunisas	200,29	⇒ 1,026		0,34	C

A – vaikai; B – suaugusieji; C – bendra populiacija;

*Vidutinis kviečių suvartojimas šalyje vienam gyventojui 2004–2018 m. (kg per metus);

Vidutinio kviečių suvartojimo per paskutinius 5 m. (2014–2018 m.) FAO duomenų bazėje, ir pirmųjų 5 m. laikotarpio (2004–2008 m.) santykis pagal šalis. Piktogramos rodo padidėjimą / sumažėjimą, kai santykio skirtumas yra didesnis nei 5%; *Kviečių suvartojimo dinamikos 2004–2018 m. diagramoje vizualizuojamos kviečių suvartojimo tendencijos kiekvienoje šalyje per 15 m. laikotarpį

CL paplitimas Afrikoje, Australijoje ir Naujojoje Zelandijoje. Apie CL paplitimą Afrikos kontingente rasta palyginti nedaug straipsnių ($n = 5$), visais atvejais atlikti biopsija pagrįsti tyrimai. Bendras CL paplitimas Afrikoje – 0,42% (60 asmenų iš 14188) (5 priedas), nustatytas remiantis trijų šalių (Egipto, Libijos ir Tuniso) duomenimis. Duomenys apie CL paplitimą Australijoje ir Naujojoje Zelandijoje buvo pateikti dviejuose straipsniuose; apskaičiuotas bendras CL paplitimas buvo 0,66% (26 asmenys iš 3927) (5 priedas). Apibendrinti CL paplitimo pagal žemynus duomenys pateikiami 3.2 lent.

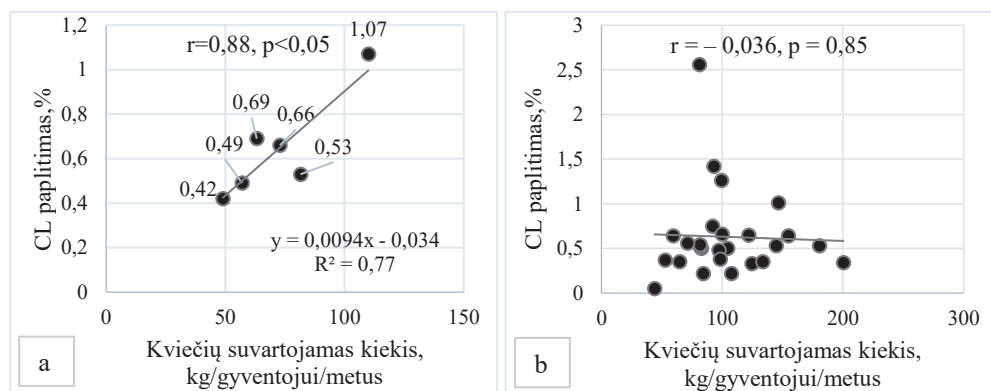
3.2 lentelė. Kviečių vartojimas ir bendras CL paplitimas pagal žemynus

Žemynai	Kviečių suvartojimas gyventojui per metus 2004– 2018 m., kg	Kviečių suvartojimo padidėjimas / sumažėjimas 2004–2018 m.*	Kviečių suvartojimo padidėjimas / sumažėjimas 1961–2018 m.**	CL paplitimas (įrodytas biopsijos tyrimais), (95%) $p < 0,05$
Europa	110,00	1,035	0,861	1,07 (0,86–1,35)
Azija	63,20	1,021	1,873	0,69 (0,56–0,85)
Šiaurės Amerika	81,54	0,952	1,165	0,53 (0,43–0,66)
Pietų Amerika	57,01	1,028	1,125	0,49 (0,40–0,61)
Afrika	49,03	1,055	1,582	0,42 (0,34–0,52)
Australija+Naujoji Zelandija	72,88	1,126	0,785	0,66 (0,53–0,82)

*Vidutinio kviečių suvartojimo per paskutinius 5 m. (2014–2018) pagal FAO duomenis ir 2004–2008 m. laikotarpį santykis pagal žemynus; **Paskutinių 10 m. (2009–2018) vidutinio kviečių suvartojimo pagal FAO ir (1961–1971 m.) duomenų vidurkio santykis pagal žemynus

Kviečių vartojimo ir CL paplitimo ryšys

Atlikus daugiapakopę analizę ryšiui tarp kviečių vartojimo ir CL paplitimo įvertinti, nustatyta stipri tiesioginė koreliacija ($r = 0,88$, $p < 0,05$) tarp kviečių suvartojimo ir CL paplitimo (įrodyto biopsijos tyrimais) vertinant duomenis pagal žemynus (3.4 pav., a), tačiau koreliacija nenustatyta ($r = -0,036$; $p > 0,50$) lyginant duomenis pagal šalis (3.4 pav., b). Nebuvo rasta patikimo ryšio ($r = 0,10$; $p > 0,5$) tarp trumpalaikio kviečių suvartojimo padidėjimo / sumažėjimo ir CL paplitimo pagal žemynus. Nustatytas silpnas neigiamas ryšys tarp ilgalaikio kviečių suvartojimo padidėjimo / sumažėjimo ($r = -0,39$), tačiau jis statistiškai nepatikimas ($p > 0,5$). Ryšys tarp kviečių suvartojimo pokyčių ir CL paplitimo pagal šalis buvo įvertintas tik trumpuoju laikotarpiu, tačiau taip pat nebuvo reikšmingas ($r = 0,10$, $p > 0,5$).



3.4. pav. Koreliacija tarp kviečių vartojimo ir CL paplitimo pagal žemynus (a) ir šalis (b) [255]

Tiesinės regresijos atveju gauta didelė R^2 reikšmė ($R^2 = 0,77$) (3.4 pav., a) rodo didelę kviečių vartojimo ir mažą kitų veiksnių įtaką CL paplitimui. Tačiau matyti, kad šis ryšys yra nevisai tiesinis. Pasirinkus daugianarę krypties liniją, CL kreivės didėjimas pastebimas iki tam tikro kviečių suvartojimo lygio (maždaug 75–80 kg / gyventojui per metus), o vėliau CL paplitimo reikšmės linkusios mažėti. Lieka

neaišku, ar tai tikra tendencija, ar CL paplitimo reikšmių sumažėjimas atsirado dėl duomenų trūkumo ir turimų duomenų išsibarstymo. Rezultatų išsibarstymui galėjo turėti įtakos CL paplitimo duomenys, pagrįsti skirtingomis amžiaus grupėmis – kai kuriose šalyse CL paplitimas tirtas tik tarp vaikų, o jis yra 2–5 kartus didesnis nei tarp suaugusiųjų [255, 265], ir patikimų duomenų trūkumas apie CL paplitimą šalyse, kuriose suvartojama daugiausia kviečių. Kita vertus, kadangi ši priklausomybė yra stipri analizuojant apibendrintus duomenis pagal žemynus, kol kas neaišku, ar priklausomybė išnyksta didėjant kviečių suvartojimui, ar jos neįmanoma nustatyti.

Koreliacijos tarp kviečių vartojimo ir CL paplitimo pagal šalis nebuvimą galėjo lemti ir kiti veiksniai: patikimų publikuotų tyrimų trūkumas, skirtingų CL nustatymo metodikų taikymas bei nevienodas jų prieinamumas gyventojams. Išlieka neaiškūs ir dideli CL paplitimo skirtumai tarp Europos šalių (pvz., Švedijos ir kaimyninių šalių). Nors Europos šalyse gyvenimo sąlygos panašios, priežastinių faktorių (glitimo suvartojimo lygio ir ŽLA-DQ genotipo dažnio) pasiskirstymas jose panašus, sergamumas CL labai skiriasi. Šių skirtumų priežastys gali būti susijusios su kūdikių maitinimo ypatumais, žarnyno infekcijų spektru, žmogaus žarnyno mikrobiomu ir kitais mitybos veiksniais [63, 69].

Surinkti duomenys parodė kad CL paplitimas yra gana didelis, todėl labai svarbu ieškoti priemonių, kurios leistų pašalinti / sumažinti glitimo imunoreaktyvumą. Tai leistų šiai visuomenės daliai, sergančiai CL arba turinčiai kitą glitimo netoleravimo formą, vartoti visaverčius grūdinius produktus.

3.2. Biotechnologinių priemonių taikymas glitimo hidrolizei kviečių sėlenų substratuose

3.2.1. Pieno rūgšties bakterijų (PRB) proteolitinis veikimas ir pokyčiai sėlenų substrate

Remiantis mokslinės literatūros analize, vienas iš būdų suskaidyti kviečių glitimą gamybos metu yra fermentacija PRB. Su 6 pasirinktomis PRB kultūromis: *L. plantarum* P-1, *L. brevis* R-1, *L. acidophilus* 308, *L. acidophilus* 336, *L. casei* g ir *L. casei* 12 buvo atlikta monokultūrinė fermentacija, siekiant atrinkti PRB, turinčias aktyvių proteazių ir galinčias hidrolizuoti sėlenų glitimą.

Vertinant mikrobiologinį užterštumą kviečių sėlenose prieš fermentaciją, buvo nustatytas pagal LST EN ISO 4833:2003 bendras bakterijų skaičius $2,1 \pm 0,60 \times 10^2$ KfV/g, o mielių ir pelėsių – $1,2 \pm 0,36 \times 10^1$ KfV/g. Mikrobiologinės saugos požiūriu šių mikroorganizmų kiekis bandiniuose rastas nedidelis, todėl prieš tolimesnius biotechnologinius tyrimus sėlenos nebuvo sterilizuojamos, kadangi terminis apdorojimas apsunkina sėlenų baltymų hidrolizės procesą. Moksliniais tyrimais [266] įrodyta, kad kviečių sėlenų, pateiktų rinkoje, endogeniniai fermentai yra deaktyvuoti, o baltymai yra sunkiai skaidomi dėl susidariusių stabilų disulfidinių ryšių tarp gliadinų ir gliuteninų bei izopeptidinių ryšių tarp atskirų gliuteninų baltymų, kurie susidaro terminio apdorojimo metu siekiant užtikrinti sėlenų stabilumą ir pailginti realizacijos terminą.

Kviečių sėlenų fermentacijos su skirtingomis PRB metu buvo stebimos terpių aktyvaus rūgštingumo, mikroorganizmų augimo bei bendro proteolitinio aktyvumo charakteristikos. Kviečių sėlenų fermentuojamuose substratuose pH pokyčiai

išryškėjo jau po 12 val. (3.3 lent.). Fermentuojamuose bandiniuose su abiem *L. acidophilus* padermėmis pH reikšmės buvo mažiausios visos fermentacijos metu: terpės su *L. acidophilus* 308 pH sumažėjo nuo $5,17 \pm 0,03$ iki $3,66 \pm 0,08$, o su *L. acidophilus* 336 – nuo $5,20 \pm 0,02$ iki $3,52 \pm 0,06$. Vidutiniai pH pokyčiai nustatyti *L. brevis* R-1, *L. plantarum* P-1 ir *L. casei* 12 fermentuojamose terpėse, o *L. casei* g terpėse buvo mažiausi pH pokyčiai. Mažiausi pH fermentuojamų sėlenų bandiniuose nustatyti po 24 val. Po 48 val. fermentacijos bandiniuose užfiksuotas pH padidėjimas. Daroma prielaida, kad pH padidėjimui galėjo turėti įtakos nuslopusi PRB veikla (dėl maisto medžiagų trūkumo ir pH pasikeitimo) bei išsilaisvinę šarminių metalų jonai.

Nustatyti PRB augimo dinamikos duomenys (3.3 lent.) parodė, kad visoms PRB kultūroms kviečių sėlenų substratas yra gera mitybinė terpė, todėl maltos sėlenos gali būti naudojamos PRB auginimui ir raugų ruošimui. Efektyviausiai sėlenų substrate dauginosi *L. plantarum* P-1 kultūra, kurios kolonijų skaičius per 48 val. padidėjo nuo $2,7 \pm 0,28 \times 10^8$ iki $1,17 \pm 0,21 \times 10^9$ KfV/g. Smarkiai padidėjo ir *L. casei* g kolonijų skaičius: nuo $2,5 \pm 0,23 \times 10^8$ iki $9,88 \pm 0,33 \times 10^8$ KfV/g). Visų tirtų PRB kultūrų eksponentinis augimas nustatytas iki 24 val., tačiau bakterijų kultūros dauginosi iki eksperimento pabaigos (48 val.).

3.3 lentelė. Pieno rūgšties bakterijų (PRB) parametrų kitimas fermentuojamose kviečių sėlenose

PRB kultūros	Prieš fermentaciją	Po 12 val.	Po 24 val.	Po 48 val.
pH				
K	$6,57 \pm 0,01$	$5,56 \pm 0,09$	$4,74 \pm 0,11$	$4,62 \pm 0,09$
LA308	$5,17 \pm 0,03$	$3,92 \pm 0,03$	$3,63 \pm 0,02$	$3,66 \pm 0,08$
LA336	$5,20 \pm 0,02$	$3,89 \pm 0,05$	$3,51 \pm 0,06$	$3,52 \pm 0,05$
LBR-1	$5,37 \pm 0,02$	$4,42 \pm 0,04$	$3,78 \pm 0,09$	$3,77 \pm 0,07$
LPP-1	$5,34 \pm 0,03$	$4,40 \pm 0,02$	$3,81 \pm 0,04$	$3,83 \pm 0,03$
LCg	$5,28 \pm 0,02$	$4,45 \pm 0,07$	$3,95 \pm 0,09$	$3,97 \pm 0,06$
LC12	$5,29 \pm 0,02$	$4,36 \pm 0,04$	$3,79 \pm 0,05$	$3,80 \pm 0,05$
PRB augimo dinamika, KfV/g				
LA308	-	$3,95 \pm 0,32 \times 10^8$	$5,88 \pm 0,62 \times 10^8$	$7,24 \pm 0,70 \times 10^8$
LA336	-	$4,51 \pm 0,20 \times 10^8$	$6,16 \pm 0,88 \times 10^8$	$8,35 \pm 0,38 \times 10^8$
LBR-1	-	$5,12 \pm 0,28 \times 10^8$	$7,24 \pm 0,18 \times 10^8$	$9,62 \pm 0,77 \times 10^8$
LPP-1	-	$6,09 \pm 0,22 \times 10^8$	$8,92 \pm 0,52 \times 10^8$	$1,17 \pm 0,21 \times 10^9$
LCg	-	$4,15 \pm 0,23 \times 10^8$	$8,06 \pm 0,48 \times 10^8$	$9,88 \pm 0,33 \times 10^8$
LC12	-	$4,08 \pm 0,13 \times 10^8$	$7,05 \pm 0,31 \times 10^8$	$8,12 \pm 0,75 \times 10^8$
Bendras proteolitinis aktyvumas, AV/ml				
K	-	$0,003 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,001$	$0,004 \pm 0,001$
LA308	$0,002 \pm 0,000$	$0,008 \pm 0,001$	$0,013 \pm 0,001$	$0,012 \pm 0,002$
LA336	$0,003 \pm 0,001$	$0,006 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,001$	$0,006 \pm 0,002$
LB R-1	$0,003 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,001$
LPP-1	$0,004 \pm 0,001$	$0,012 \pm 0,002$	$0,014 \pm 0,002$	$0,014 \pm 0,003$
LCg	$0,002 \pm 0,000$	$0,004 \pm 0,001$	$0,004 \pm 0,001$	$0,004 \pm 0,001$
LC12	$0,002 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,000$	$0,003 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,001$

K – kontroliniai sėlenų bandiniai, ruošti su dejonizuotu vandeniu, LA308 – *L. acidophilus* 308, LA336 – *L. acidophilus* 336, LBR-1 – *L. brevis* R-1, LPP-1 – *L. plantarum* P-1, LCg – *L. casei* g, LC12 – *L. casei* 12

Bendras fermentuojamų terpių proteolitinis aktyvumas (3.3 lent.) taip pat sparčiausiai augo iki 12 val., po 24 val. augimas sulėtėjo, o po 48 val. jis stabilizavosi arba truputį sumažėjo. Didžiausiu bendru proteolitinio aktyvumu taip pat pasižymėjo *L. plantarum* P-1 kultūra, kurios fermentuojamoje terpėje nustatytas $0,014 \pm 0,003$ AV/ml bei *L. acidophilus* 308 ($0,012 \pm 0,002$ AV/ml).

Siekiant įvertinti specifinį PRB proteazių gebėjimą suskaidyti glitimo baltymus, buvo ištirti glitimo kiekiai kviečių sėlenų substratuose ELISA G12 metodu po 12 ir 24 val. fermentacijos (3.4 lent.). Pasirinktose tyrimui sėlenose ELISA antikūnių tyrimais nustatytas pakankamai didelis glitimo kiekis (58650 ± 2204 mg/kg). Panašius glitimo kiekius skelbia ir kiti autoriai. Walter ir kt. [261] nustatė, kad rinkoje randamose sėlenose vidutinis glitimo kiekis yra 50000 mg/kg, tačiau atskiruose pavyzdžiuose gali siekti net iki 107285 mg/kg. Po 12 ir 24 val. fermentacijos tiek kontroliniame mėginyje, tiek naudojant skirtingas PRB kultūras glitimo kiekis visais atvejais sumažėjo (15,60–85,51% ir 42,46–88,83%, atitinkamai). Daroma prielaida, kad glitimo sumažėjimas kontroliniuose sėlenų variantuose greičiausiai vyko dėl endogeninių fermentų arba sėlenose koegzistuojančių epifitinių ir endofitinių mikroorganizmų veiklos, kurie tapo aktyvūs, susidarius palankioms veikimo ir augimo sąlygoms fermentuojamuose bandiniuose. Kad pirminę kviečių baltymų proteolizę sukelia endogeniniai kviečių fermentai esant žemesniam pH, tyrimais parodė Loponen ir kt. [135], Di Cagno ir kt. [157], Thiele ir kt. [160], Rollan ir kt. [165], Gerez ir kt. [166]. Žinoma, kad endogeninės proteazės optimaliai veikia esant 3,5–5,0 pH [267], taigi po 24 val. kontroliniuose bandiniuose (vandens sėlenų substrate) susidariusi pH $4,64 \pm 0,11$ terpė (3.4 lent.) buvo palanki endogeninių proteazių aktyvumui. Didžiausias pasiektas glitimo kiekio sumažėjimas po 12 val. (85,51%) buvo gautas fermentuojant su *L. plantarum* P-1 kultūra. Po 24 val. glitimo pokytis šiame variante padidėjo iki 88,83% nuo pradinio kiekio. Nepaisant akivaizdžių glitimo kiekio pokyčių kontroliniuose substratuose, kurių priežastis nebuvo tirta, PRB kultūromis pasiekti kiekybiniai glitimo pokyčiai patvirtino, kad intensyvesnė peptidų hidrolizė vyko dėl PRB intraląstelių peptidazių poveikio, o veikimo intensyvumas ir suskaidyto glitimo kiekis priklausė nuo fermentavimui naudotos padermės.

3.4 lentelė. Glitimo kiekio sumažėjimas* kviečių sėlenose po fermentacijos skirtingomis PRB kultūromis

PRB kultūros	Po 12 val.		Po 24 val.	
	Glitimo kiekis, mg/kg	Glitimo kiekio sumažėjimas, %	Glitimo kiekis, mg/kg	Glitimo kiekio sumažėjimas, %
K	49500±1442	15,60	33750±945	42,46
LA308	9800±318	83,29	7250±240	87,64
LA336	15850±447	72,98	9100±271	84,48
LBR-1	9250±303	84,23	6850±236	88,32
LPP-1	8500±282	85,51	6550±225	88,83
LCg	12800±327	78,18	8700±260	85,17
LC12	11950±323	79,62	7450±252	87,30

*Glitimo kiekio sumažėjimas skaičiuotas % nuo pradinio glitimo kiekio sėlenose (58650 mg/kg); K – kontroliniai sėlenų bandiniai, ruošti su dejonizuotu vandeniu, LA308 – *L.*

acidophilus 308, LA336 – *L. acidophilus* 336, LBR-1 – *L. brevis* R-1, LPP-1 – *L. plantarum* P-1, LCg – *L. casei* g, LC12 – *L. casei* 12

Analizuojant PRB charakteristikų ir glitimo pokyčių rezultatus fermentuojamuose substratuose, nustatytas vidutinio stiprumo neigiamas ryšys tarp substrato pH ir hidrolizuotos glitimo procentinės dalies ($r = -0,67$, $p < 0,01$) taip pat parodė, kad glitimo sumažėjimas substratuose iš dalies susijęs su nuo pH priklausomu kviečių endogeninių proteazių suaktyvėjimu. Fermentuojant PRB kultūromis galima iki 6550 mg/kg (88,83%) sumažinti glitimo kiekį kviečių sėlenose per 24 val., tačiau glitimo peptidų kiekis vis tiek išlieka didesnis nei leidžiama riba beglitimiams (20 mg/kg) arba mažai glitimo turintiems (100 mg/kg) produktams. Didžiausias efektyvumas pasiektas sėlenų glitimo skaidymui naudojant *L. plantarum* P-1 padermę. Panašių tyrimų su kviečių sėlenomis iki šiol nėra publikuota, tačiau pagrindinių kviečių produktų, dažniausiai miltų, fermentacija yra pakankamai ištirta. Savo tyrimuose Di Cagno ir kt. [159], Giuliani ir kt. [243] nustatė, kad viena iš efektyviausiai gliadinus skaidančių padermių yra būtent *L. plantarum*, dėl jai būdingų PEP, kurios gali efektyviai suskaidyti greta Pro esančias baltymų jungtis [160]. Taigi, šio tyrimo rezultatai patvirtino kitų autorių [156, 168] išvadas, kad atrinktų PRB padermių proteolitinis aktyvumas yra nepakankamas, norint jas taikyti beglitimės kvietinės duonos gamybos procese. Kita vertus, PRB fermentacija galėtų būti sėkmingai naudojama žaliavoms, turinčioms mažiau glitimo, o, esant didesnėms glitimo koncentracijoms, tikslinga PRB poveikį derinti su kitos biologinės kilmės fermentais.

3.2.2. Augalinės kilmės permeatų proteolitinis efektyvumas

Kaip biotechnologinė alternatyva PRB fermentacijai kviečių sėlenų baltymų hidrolizei buvo panaudoti augalų permeatai. Remiantis kitų autorių moksliniais tyrimais, permeatams ruošti buvo pasirinkta papajos, kivių, ananasų vaisiai ir juodgrūdės sėklos, kaip žaliava, turinti didžiausią fermentų proteolitinį aktyvumą. Kviečių sėlenų hidrolizei pasirinkta 37°C temperatūra, kuri yra nustatyta kaip optimali daugumos augalinių fermentų aktyviam veikimui [214, 251].

Bandiniuose stebėti pH ir bendro proteazių aktyvumo pokyčiai siekiant įvertinti augalų permeatų veikimą, o jų efektyvumas glitimo hidrolizei įvertintas nustatant likutinius glitimo kiekius substratuose ELISA R5 metodu (3.5 lent.). Įvertinus pH augalų permeatuose prieš hidrolizuojant sėlenas, didžiausias rūgštingumas nustatytas kivių ($3,56 \pm 0,02$) bei ananasų vaisių ($3,79 \pm 0,02$) permeatuose (3.5 lent.). Juodgrūdės sėklų permeato pH buvo artimiausias neutraliam ($6,15 \pm 0,01$). Hidrolizės metu sėlenų mėginiuose pH kito skirtingai. Mėginiuose su nedidelio rūgštingumo permeatais (juodgrūdės sėklų ir papajos vaisių) po 12 val. fermentacijos sėlenų mėginių terpė parūgštėjo iki pH $4,33 - 4,46 \pm 0,04$, po 24 val. – iki $4,15 - 4,27 \pm 0,02$. Bandiniuose su didelio rūgštingumo kivių ir ananasų vaisių permeatais pH vertės po 12 val. hidrolizės padidėjo, t. y. bandiniuose rūgštingumas sumažėjo, tačiau po 24 val. pH vertės vėl sumažėjo, bet nepasiekė pradiniuose vaisių substratuose nustatytų pH verčių.

3.5 lentelė. pH ir proteolitinis aktyvumas kviečių sėlenų substratuose su augalų permeatais

Permeatai	Prieš fermentaciją	Po 12 val.	Po 24 val.
	pH		
Kontrolė*	6,57±0,02	5,55±0,10	4,74±0,11
Kivių permeatas	3,56±0,02	4,16±0,05	4,11±0,04
Ananasų permeatas	3,79±0,02	4,27±0,03	3,99±0,06
Papajos permeatas	5,43±0,01	4,33±0,04	4,15±0,07
Juodgrūdės permeatas	6,15±0,01	4,46±0,03	4,27±0,04
Proteolitinis aktyvumas, AV/ml			
Kontrolė*	0,000±0,000	0,003±0,001	0,003±0,001
Kivių permeatas	0,092±0,006	0,124±0,011	0,168±0,024
Ananasų permeatas	0,135±0,008	0,160±0,014	0,175±0,019
Papajos permeatas	0,085±0,004	0,098±0,003	0,152±0,023
Juodgrūdės permeatas	0,060±0,003	0,080±0,002	0,103±0,049

*Kontroliniai sėlenų bandiniai, ruošti su dejonizuotu vandeniu

Įvertinus bendrą proteazių aktyvumą kviečių sėlenų substratuose fermentinės hidrolizės pradžioje, nustatyta, kad aktyviausiais proteolitiniais fermentais pasižymi ananasų ir kivių vaisių permeatai (atitinkamai 0,135±0,008 ir 0,092±0,006 AV/ml). Kviečių sėlenų bandinyje su papajų vaisių permeatu nustatytas vidutinis (0,085±0,004 AV/ml) proteazių aktyvumas, o mažiausias – juodgrūdės sėklų permeate (0,060±0,003 AV/ml) (3.5 lent.). Vykstant hidrolizei proteolitiniai aktyvumai tiek po 12 val., tiek po 24 val. padidėjo visuose bandinių substratuose. Didžiausiu proteolitinio aktyvumu po 12 val. pasižymėjo substratai su ananasų vaisių permeatais, tačiau po 24 val. ananasų, kivių ir papajų vaisių permeatų proteolitinio aktyvumo vertės supanašėjo. Nedidelis proteazių aktyvumas, nustatytas kontroliniame sėlenų mėginyje, parodė, kad glitimo hidrolizei galėjo turėti įtakos ir endogeninės grūdų proteazės, o mėginiuose su vaisių permeatais jų poveikis galėjo būti dar didesnis ir dėl terpėse susiformavusio joms palankaus pH. Glitimo kiekis sumažėjo visuose kviečių sėlenų mėginiuose po apdorojimo augalų permeatais (3.6 lent.).

3.6 lentelė. Glitimo kiekio pokyčiai* kviečių sėlenose po apdorojimo augalų permeatais

Permeatai	Po 12 val.		Po 24 val.	
	Glitimo kiekis, mg/kg	Glitimo kiekio sumažėjimas, %	Glitimo kiekis, mg/kg	Glitimo kiekio sumažėjimas, %
Kontrolė**	49500±1442	15,60	33750±945	42,46
Kivių permeatas	1750±49	97,02	690±19	98,82
Ananasų permeatas	980±37	98,33	530±15	99,10
Papajos permeatas	1100±31	98,12	530±19	99,10
Juodgrūdės permeatas	3500±98	94,03	780±22	98,67

*Glitimo kiekio sumažėjimas skaičiuotas % nuo pradinio glitimo kiekio sėlenose (58650 mg/kg); **kontroliniai sėlenų bandiniai ruošti su dejonizuotu vandeniu

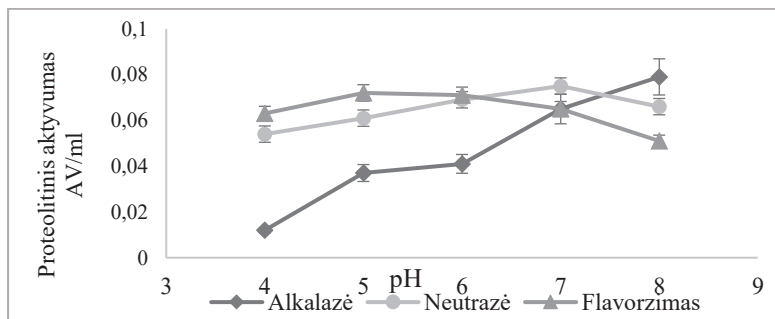
ELISA R5 metodu nustatytas 94,03–98,33% glitimo pokytis sėlenose po 12 val. ir 98,67–99,10% po 24 val. Mažiausi glitimo 530±19 mg/kg kiekiai nustatyti po 24

val. apdorojimo ananasų ir papajos vaisių permeatais, šiuose variantuose glitimo sumažėjo iki 99,10%. Taip pat nustatyta silpna neigiama priklausomybė ($r = -0,41$, $p < 0,05$) tarp substratų pH reikšmių ir augalų permeatų bendro proteolitinio aktyvumo bei silpnas neigiamas ryšys tarp substratų pH ir hidrolizuotos glitimo procentinės dalies ($r = -0,23$, $p < 0,5$) parodė, kad glitimo baltymų fermentinei hidrolizei didesnė įtaką turėjo augalų proteolitiniai fermentai negu kviečių endogeniniai fermentai. Remiantis kviečių sėlenų hidrolizės efektyvumo rezultatais naudojant augalinius vaisių ir sėklų permeatus, galima teigti, kad augalų permeatai yra efektyvesnė biotechnologinė priemonė glitimui skaidyti sėlenose nei PRB kultūros. Tačiau, prieš juos naudojant kaip biotechnologinę priemonę maisto gamybos procese, reikia atsižvelgti į vaisių ir sėklų permeatuose esančias organines rūgštis, skonines ir spalvines medžiagas, kurios turi įtakos bendroms juslinėms savybėms. Nepaisant didelio efektyvumo skaidant sėlenų glitimą bendromis visiems permeatams sąlygomis, likutinis glitimo kiekis (nuo 530 ± 19 iki 780 ± 22 mg/kg) neleidžia šia biologine priemone apdorotų kviečių sėlenų priskirti beglitimiams produktams.

3.2.3. Mikroorganizmų fermentų proteolitinis efektyvumas hidrolizuojant kviečių sėlenų glitimą

Glitimo imunoreaktyvumui pašalinti dažniausiai tyrimuose naudojami mikroorganizmų proteolitiniai fermentai. Iki šiol nebuvo tirtas rinkoje siūlomų mikroskopinių grybų ir bakterijų peptidazių – alkalazės, neutrazės ir flavorzimo – efektyvumas ardant glitimo baltymų imunoreaktyvius peptidus kviečių antriniuose produktuose. Todėl kaip viena iš alternatyvių biopriemonių kviečių sėlenų hidrolizės tyrimams pasirinkti šie mikroorganizmų fermentai.

Remiantis kitų autorių tyrimais, žinoma, kad šių fermentų efektyviam veikimui reikalingas specifinis terpės rūgštingumas. Optimaliam alkalazės, neutrazės ir flavorzimo veikimo pH nustatyti kviečių sėlenų fermentinė hidrolizė vykdyta naudojant skirtingo rūgštingumo substratus (pH 4–8) (imant fermento 0,5 % substrato masės). Nustatyta, kad po 4 val. fermentinės hidrolizės didžiausias flavorzimo aktyvumas buvo rūgštiniame kviečių sėlenų substrate (pH 5–6), neutrazė buvo aktyviausia neutraliame substrate (pH 7), o alkalazė – silpnai šarminiame (pH 8) (3.5 pav.).



3.5 pav. Bendras proteazių aktyvumas sėlenų substratuose po 4 val. hidrolizės mikroorganizmų fermentais

Nustatyta, kad tirti fermentai pakankamai aktyvūs esant neutraliam substrato rūgštingumui (pH 7). Pradiniuose kviečių sėlenų substratuose su vandeninėmis fermentų suspensijomis natūraliai gaunamas rūgštingumas, artimas neutraliam (pH 6,5–6,7). Vykdamas hidrolizę šiomis sąlygomis, t. y. be specialių pH reguliuojančių buferių, kviečių sėlenų bandinių pH svyravo 6,46–6,60±0,03. Remiantis gautais rezultatais galima teigti, jog pH, susidarantis sėlenų substrate, yra palankus neutrazei, kuri aktyviausiai veikia neutralioje aplinkoje, ir flavorzimui, kurio didžiausias aktyvumas yra silpnai rūgščioje aplinkoje, tačiau mažiau tiko alkalazei, kuri aktyviai veikia šarminėje aplinkoje. Tai nulėmė ir didesnę neutrazės bei flavorzimo specifinį proteazių aktyvumą skaidant glitimą kviečių sėlenose (3.7 lent.).

3.7 lentelė. Glitimo kiekio pokyčiai* kviečių sėlenų hidrolizatuose po 2 ir 4 val. apdorojimo mikroorganizmų fermentais

Fermentai	Po 2 val.		Po 4 val.	
	Glitimo kiekis, mg/kg	Glitimo kiekio sumažėjimas, %	Glitimo kiekis, mg/kg	Glitimo kiekio sumažėjimas, %
Kontrolė**	52700±1442	10,14	48500±1045	17,31
Alkalazė	19120±549	67,40	4350±303	92,58
Neutrazė	15950±637	72,80	2780±262	95,26
Flavorzimas	16120±831	72,51	2850±228	95,14

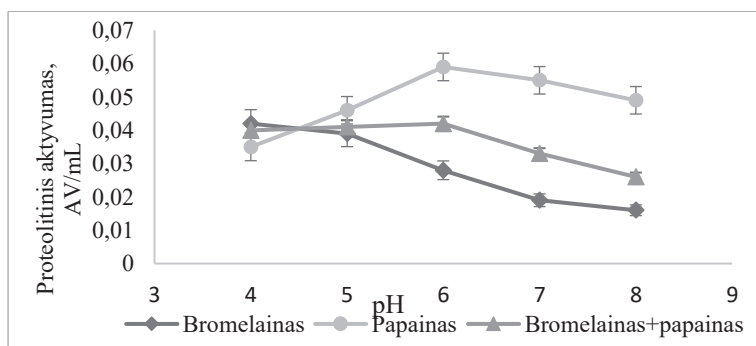
*Glitimo kiekio sumažėjimas skaičiuotas % nuo pradinio glitimo kiekio sėlenose (58650 mg/kg); ** kontroliniai sėlenų bandiniai ruošti su dejonizuotu vandeniu

Įvertinus po fermentinės hidrolizės likusio nesuskaidyto glitimo kiekius ir jo kiekių procentinį sumažėjimą, nustatyta, kad visi mikroorganizmų fermentai efektyviai hidrolizavo glitimą kviečių sėlenose. Hidrolizės efektyvumas siekė 67,40–72,51% po 2 val. ir 92,58–95,26% – po 4 val. fermentinio apdorojimo. Po 4 val. proteolizės nustatytas labai panašus glitimo kiekis substratuose su neutraze (2780±262 mg/kg) bei flavorzimu (2850±228 mg/kg), o sėlenose, apdorotose alkalaze, glitimo rasta daugiau (4350±303 mg/kg). Panašių tyrimų su šių mikroorganizmų fermentų panaudojimu kviečių sėlenų glitimo hidrolizei iki šiol nepublikuota. Mokslinių tyrimų objektas buvo kiti kviečių produktai, o glitimo hidrolizei dažniausiai buvo naudoti fermentai flavorzimas ir alkalazė. Tiriant fermentinės hidrolizės efektyvumą skaidant glitimą kviečių produktuose, rezultatai priklausė nuo naudoto substrato (kviečių miltų, glitimo ar krakmolo) ir fermentinės hidrolizės sąlygų. Mickowska ir kt. [206] naudojo flavorzimą glitimo hidrolizei kviečių miltuose ir nustatė, kad esant pH 5,0 ir 7,0, kviečių gliadinų likutinis imunoreaktyvumas buvo 2,3–5,3%. Choi ir kt. [55] nustatė, kad flavorzimas išgrynintą glitimą skaidė 89,5% efektyvumu. Paskelbta keletas tyrimų [51, 57, 114], kurie įrodė alkalazės pranašumus skaidant glitimą. Taigi, tirti mikroorganizmų fermentai alkalazė, neutrazė ir flavorzimas galėtų būti naudojami glitimo imunoreaktyvumui sumažinti kviečių sėlenų produktuose, tačiau, norint pasiekti didesnę efektyvumą, reikėtų didinti fermentų koncentraciją arba ilginti poveikio trukmę. Juos taip pat būtų galima kompleksiskai derinti su kitomis biopriemonėmis, tačiau tai gana sudėtinga dėl reikalingo specifinio pH.

3.2.4. Augalinės kilmės fermentų bromelaino ir papaino efektyvumas hidrolizuojant kviečių sėlenų glitimą

Kaip alternatyva mikroorganizmų fermentams glitimo hidrolizės efektyvumo tyrimams pasirinkti komerciniai augaliniai fermentai bromelainas ir papainas – plačiausiai žinomos iš vaisių išgrynintos proteazės, naudojamos duonos pramonėje [209]. Remiantis kitų autorių moksliniais duomenimis yra žinoma, kad šios proteazės hidrolizuoja baltymus [225], bet kol kas nebuvo tyrimų, kurie pagrįstų šių fermentų panaudojimo efektyvumą suskaidant kviečių sėlenų imunoreaktyvius peptidus.

Bromelainui ir papainui gamintojai rekomenduoja gana plačias pH veikimo ribas: bromelainui – pH 4–6, papainui – pH 4–10 [268]. Augalinius fermentus suspendavus pH 4–8 buferiuose, po 4 val. hidrolizės buvo nustatytas bendras proteazių aktyvumas kviečių sėlenų substratuose (3.6 pav.). Tyrimo rezultatai parodė, kad bromelainas aktyviausiai veikė esant pH 4 ($0,040 \pm 0,006$ AV/ml), pH didėjant, jo aktyvumas mažėjo. Papaino proteolitinis aktyvumas buvo didžiausias esant pH 6 ($0,059 \pm 0,005$ AV/ml). Abiejų fermentų derinio aktyvumas buvo šiek tiek mažesnis negu atskirų fermentų (didžiausias, kai pH 6 – $0,042 \pm 0,003$ AV/ml), jis buvo mažiau jautrus pH pokyčiams pH 4–6 intervale. Šie augalinių fermentų aktyvumo rezultatai parodė, kad jie tinkami natūraliai paruoštiems kviečių sėlenų substratams apdoroti.



3.6. pav. Bendras proteazių aktyvumas sėlenų substratuose po 4 val. hidrolizės augalų fermentais

Papaino aktyvumo duomenys gauti panašūs, kaip kitų autorių tyrimuose [224, 225], kur nurodytas optimalus jo pH 5,0–7,0, o optimalus bromelaino iš ananaso kamieno veikimo pH 4,0 nustatytas žemesnis negu skelbiamas mokslinėje literatūroje pH 6,0–8,5 [225].

Taigi, toliau buvo tirtas bromelaino ir papaino proteolitinis efektyvumas natūraliai paruoštuose sėlenų substratuose (be papildomo pH kalibravimo buferiniais tirpalais). Sėlenų substratai hidrolizuoti 4 val. su augaliniais fermentais 45°C temperatūroje. Kviečių sėlenų bandinių su augalų fermentų suspensijomis (0,50 %) pradinis pH buvo $6,67\text{--}6,69 \pm 0,02$. Fermentinės hidrolizės metu bandinių pH kito nuo 6,47 iki $6,69 \pm 0,04$. Mažiausias pH bandiniuose su fermentais buvo užfiksuotas po 3 val. fermentacijos, reikšmingų skirtumų tarp pH verčių substratuose su papainu ir bromelainu nenustatyta.

Nesuskaidyto glitimo kiekis kviečių sėlenose po 2 ir 4 val. apdorojimo, nustatytas ELISA R5 antikūnais, pateikiamas 3.8 lent. Tyrimų rezultatai parodė, kad

abu augaliniai fermentai turi glitimą skaidančių savybių. Jau po 2 val. nustatytas reikšmingas glitimo kiekio sumažėjimas kviečių sėlenų substratuose su bromelainu ir papainu (atitinkamai 89,85 ir 90,45%). Papaino proteolitinis poveikis neutralioje sėlenų substrato aplinkoje buvo efektyvesnis nei bromelaino. Po 4 val. hidrolizės papainu sėlenų bandiniuose nustatytas glitimo kiekis – 2800 ± 205 mg/kg, o po 4 val. hidrolizės bromelainu – 4100 ± 218 mg/kg, po apdorojimo abiejų fermentų deriniu – 3150 ± 221 mg/kg [269].

3.8 lentelė. Glitimo kiekio pokyčiai* kviečių sėlenų hidrolizatuose po 2 ir 4 val. apdorojimo augalų fermentais

Fermentai	Po 2 val.		Po 4 val.	
	Glitimo kiekis, mg/kg	Glitimo kiekio sumažėjimas, %	Glitimo kiekis, mg/kg	Glitimo kiekio sumažėjimas, %
Kontrolė**	52700 ± 1442	10,14	48500 ± 1045	17,31
Bromelainas	5955 ± 390	89,75	4100 ± 218	93,01
Papainas	5600 ± 420	90,45	2800 ± 205	95,23
Bromelainas+papainas	5959 ± 385	89,84	3150 ± 221	94,63

*Glitimo kiekio sumažėjimas skaičiuotas % nuo pradinio glitimo kiekio sėlenose (58650 mg/kg); **kontroliniai sėlenų bandiniai ruošti su dejonizuotu vandeniu

Eksperimento duomenys parodė, kad augalinių fermentų bromelaino ir papaino efektyvumas hidrolizės procese yra lygiavertis ar net didesnis negu mikroorganizmų fermentų – alkalazės, neutrazės ir flavorzimo, be to, augaliniai fermentai aktyvesni platesniame pH ir temperatūrų intervale.

*Lyginant visų tirtų biologinių priemonių efektyvumą kviečių sėlenų glitimo hidrolizei reikia pastebėti, kad didžiausiu efektyvumu pasižymėjo augalų permeatai (gautas mažiausias glitimo kiekis po 24 val. apdorojimo – 530 ± 19 mg/kg), taip pat aktyviai veikė mikroorganizmų ir augalų fermentai (mažiausias glitimo kiekis po 4 val. hidrolizės – 2780 ± 262 – 2800 ± 205 mg/kg), o PRB monokultūrinis poveikis buvo silpnesnis, mažiausias glitimo kiekis po 24 val. fermentacijos rastas *L. plantarum* P-1 substrate – 6550 ± 225 mg/kg.*

Įvertinus visų biopriemonių praktinio pritaikymo galimybes mažinant glitimą kviečių produktų gamybos procese, augalų permeatų atsisakyta dėl skoninių ir spalvinių savybių pokyčių apdorojamam substratui. Priimtas sprendimas tolimesniems tyrimams naudoti augalinius fermentus dėl jų didesnio aktyvumo esant rūgštiniam pH, nes jų veikimą lengviau suderinti su kitomis biopriemonėmis, tokiomis kaip PRB fermentacija, ir pritaikyti duonos gamybos procese. Siekiant maksimalaus hidrolizės efekto toliau pasirinkta plačiau tirti augalinių fermentų optimalias veikimo sąlygas ir jų suderinimo su PRB veikla galimybes.

3.3. Optimalių hidrolizės sąlygų augaliniams fermentams parinkimas

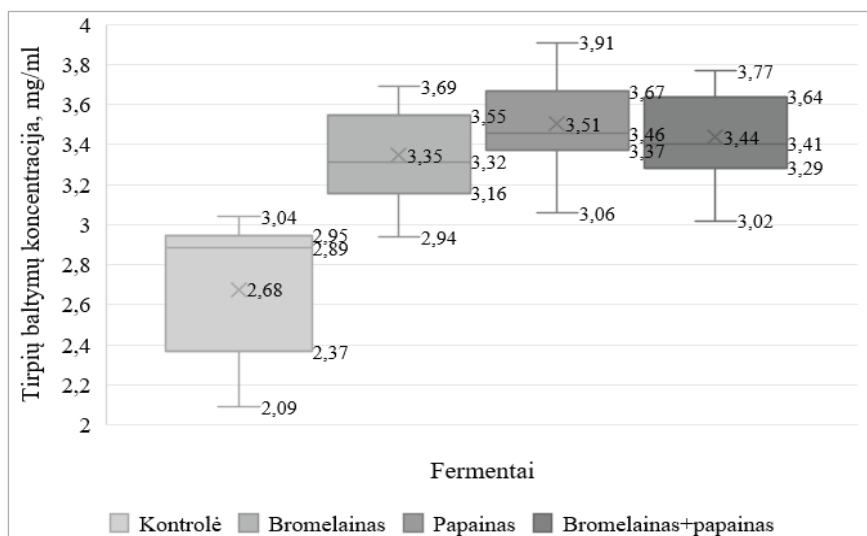
Siekiant maksimalaus hidrolizės efekto, labai svarbu optimizuoti visas fermentų naudojimo sąlygas, ne tik pH, bet ir temperatūrą, fermentų koncentraciją ir poveikio trukmę [238, 251].

Augalinių fermentų bromelaino, papaino ir jų derinio veikimo sąlygos buvo optimizuotos sėlenų substratams, vertinant temperatūros, fermentų koncentracijos ir

veikimo trukmės įtaką sėlenų baltymų hidrolizės parametrams. Sėlenų baltymų hidrolizė su augalų fermentais vykdyta natūraliuose sėlenų substratuose esant pH 6,5. Stebėti pokyčiai po 2 ir 4 val. fermentinės hidrolizės. Fermentų koncentracijos parinktos apibendrinus kitų mokslininkų tyrimus bei tiekėjų rekomendacijas – 0,25, 0,50, 0,75% nuo substrato masės. Kadangi fermentų gamintojai rekomenduoja platų temperatūrinį diapazoną (35–65°C bromelainui ir 25–70°C papainui), tirta, kokia temperatūra (37, 45 ar 50°C) yra optimaliausia glitimo hidrolizei sėlenose. Tyrimo rezultatai apibendrinti 6 priede, kur fermento ir substrato santykis, temperatūra ir apdorojimo trukmė – nepriklausomi faktoriai, o tirpių baltymų koncentracija, glitimo kiekis ir glitimo kiekio sumažėjimas procentais substratuose – priklausomi kintamieji. Reakcijos sąlygų įtaka hidrolizės efektyvumui pateikiama 3.7–3.10 paveiksluose.

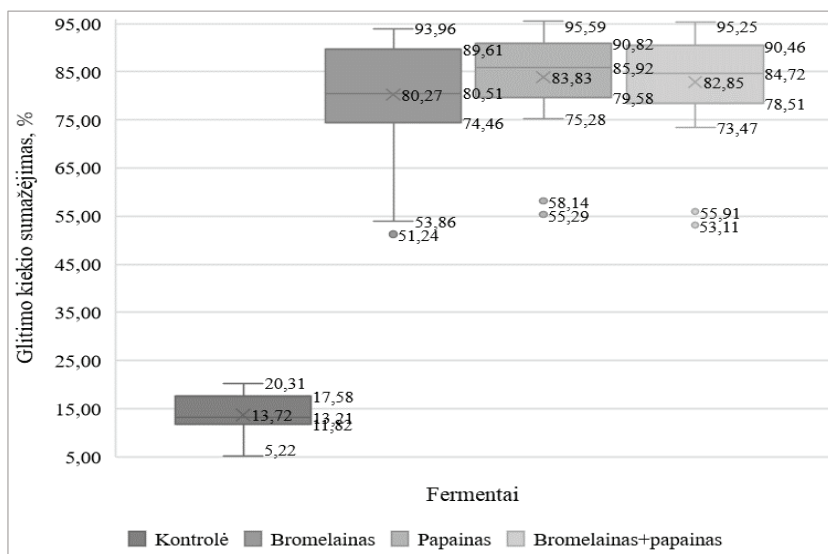
Iš tyrimų duomenų matyti, kad fermento rūšis ir fermento koncentracija turėjo reikšmingą įtaką kviečių sėlenų hidrolizės rezultatams: tirpių baltymų koncentracijai ir glitimo kiekio sumažėjimui. Geriausias rezultatas pasiektas kviečių sėlenų fermentacijai panaudojus 0,75% papaino esant 50°C.

Vienas iš būdų įvertinti fermentinės hidrolizės efektyvumą yra tirpių baltymų koncentracija fermentuojamose terpėse, nes ji dalinai parodo, kokia glitimo makropolimerų dalis suskilo, t. y. depolimerizavosi [160], taip pat kiek substrate yra kitų tirpių baltyminių medžiagų (pvz., albuminų, laisvų aminorūgščių). Analizuojant tirpių baltymų koncentracijos pokyčius kviečių sėlenų hidrolizatuose, pastebėti reikšmingi skirtumai, palyginti su kontrole ($p < 0,05$). Tirpių baltymų kiekis priklausė nuo naudoto fermento rūšies ar jų derinio (3.7 pav.). Po 2 bei 4 val. hidrolizės daugiausia tirpių baltymų buvo nustatyta bandiniuose su papainu (3,06–3,91 mg/ml). Bandiniuose su bromelainu tirpių baltymų rasta mažiau (2,94–3,69 mg/ml), o bandiniuose su abiejų fermentų deriniu nustatyta 3,02–3,77 mg/ml tirpių baltymų koncentracija.



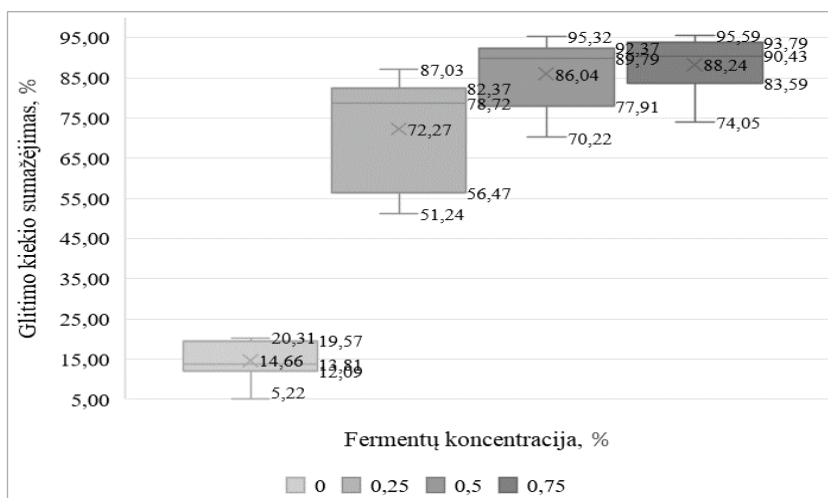
3.7 pav. Tirpių baltymų koncentracijos pokytis kviečių sėlenų substratuose priklausomai nuo fermento

Ištirus glitimo kiekį hidrolizatuose ELISA R5 metodu po 2 ir 4 val. fermentinio apdorojimo, nustatytas reikšmingas glitimo kiekio sumažėjimas kviečių sėlenose, palyginti su neapdorotomis sėlenomis bei kontroliniu bandiniu (3.8 pav.). Diagramoje parodyta, kad aktyviausiai glitimą skaidė papainas (glitimo kiekio sumažėjimas siekė net iki 95,59%) ir fermentų derinys (glitimo kiekis sumažėjo iki 95,25%).



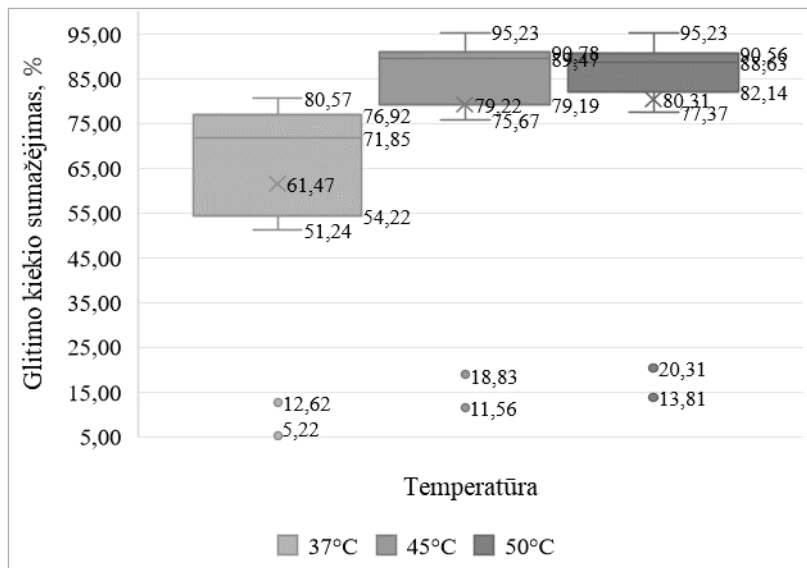
3.8 pav. Glitimo kiekio procentinis sumažėjimas sėlenų substratuose priklausomai nuo fermento (žymės „o“ rodo išskirtis, gautas esant mažoms 0,25% fermentų koncentracijoms)

Didesnės fermentų koncentracijos taip pat turėjo įtakos didesniai hidrolizės efektui, tačiau skirtumas tarp glitimo kiekio sumažėjimo naudojant 0,5 ir 0,75% fermentų koncentracijas buvo nedidelis (3.9 pav.).



3.9 pav. Glitimo kiekio sėlenose procentinio sumažėjimo priklausomybė nuo fermentų koncentracijos

Vertinant temperatūros įtaką glitimo kiekio pokyčiams veikiant augaliniiais fermentais, nustatyta, kad visų kviečių sėlenų mėginių glitimo hidrolizės efektyvumas buvo reikšmingai mažesnis esant 37°C, tačiau nebuvo patikimų skirtumų ($p > 0,5$) tarp hidrolizės rezultatų esant 45 ir 50°C (3.10 pav.).



3.10 pav. Glitimo kiekio sumažėjimas kviečių sėlenų hidrolizatuose esant skirtingai temperatūrai (žymės „ $\times$ “ rodo išskirtis (kontrolinių sėlenų bandinių vertes))

Daugiaveiksni *ANOVA* analizė nustatant Fišerio reikšmingumo kriterijų parodė, kad didžiausią įtaką tirpių baltymų kiekiui ($F = 8,97$, $p < 0,05$) ir glitimo sumažėjimui ($F = 45,89$, $p < 0,01$) turėjo fermento koncentracija. Antras pagal svarbą faktorius – fermento pasirinkimas – taip pat turėjo reikšmingą įtaką tirpių baltymų kiekio padidėjimui ($F = 7,42$, $p < 0,05$) bei glitimo kiekio sumažėjimui ($F = 15,60$, $p < 0,05$). Nustatytas nestiprus ryšys tarp fermentinės hidrolizės temperatūros ir glitimo kiekio procentinio sumažėjimo ($F = 2,08$, $p < 0,5$) tarp visų bandinių, tačiau skirtumai tarp hidrolizuoto glitimo procentinės dalies esant 45 ir 50°C buvo statistiškai nereikšmingi ($F = 0,91$, $p > 0,5$). Analizuojant temperatūros įtaką atskirų fermentų aktyvumams nustatyta, kad aukštesnė temperatūra turėjo didesnę įtaką ($r = 0,71$, $p < 0,05$) bromelaino aktyvumui ir šiek tiek mažesnę ($r = 0,68$, $p < 0,05$) – papaino.

Siekiant įvertinti hidrolizės sąlygų įtaką skirtingų fermentų glitimo hidrolizės efektyvumui, sudarytas Bajeso statistinis modelis – tiesinės linijinės regresijos lygtis. Tiesinę priklausomybę tarp hidrolizės laipsnio, išreikšto glitimo sumažėjimo procentine dalimi, ir kontroliuojamų fermentinės hidrolizės parametrų (fermento /substrato santykio, temperatūros bei trukmės) galima užrašyti 3.1–3.3 lygtimis:

kai apdorojama bromelainu:

$$HL = 32,6292 \times C + 1,6454 \times T + 1,9619 \times t - 14,3295; \quad (3.1)$$

kai apdorojama papainu:

$$HL = 30,782 \times C + 1,450 \times T + 2,146 \times t - 1,786; \quad (3.2)$$

kai apdorojama bromelaino ir papaino deriniu:

$$HL = 31,8085 \times C + 1,5585 \times T + 2,1355 \times t - 8,0312; \quad (3.3)$$

čia: HL – glitimo hidrolizės laipsnis, išreikštas glitimo sumažėjimo procentine dalimi;

C – fermento koncentracija, %;

T – trukmė, val.;

t – temperatūra, °C.

Sudarant linijinės regresijos lygtis fermentų koncentracijos ir temperatūros svartiniai koeficientai nustatyti esant $p < 0,001$, o fermentinės hidrolizės trukmės įtakos svartinis koeficientas $p < 0,1$. Iš tiesinės regresijos lygčių taip pat matosi, kad didžiausią įtaką hidrolizės efektyvumui turi fermento koncentracija, o reakcijos temperatūra ir trukmė – mažesnę [269].

Taigi, didesnis tirpių baltymų kiekis bei mažesnis glitimo kiekis hidrolizatuose įrodė didesnę papaino efektyvumą. Naudojant papaino ir bromelaino derinį, tikėtinas sinerginis poveikis glitimo hidrolizei nebuvo gautas. Gauti rezultatai koreliuoja su Cornell, Doherty ir Stelmasiak [270] rezultatais, kai papaino sinerginis poveikis šiek tiek sumažėja naudojant kartu su bromelainu, bet padidėja sąveikoje su kiaulių virškinamojo trakto fermentais. Vertinant temperatūros įtaką augalinių fermentų aktyvumui, gauti panašūs rezultatai, kaip Li ir kt. [251], kai optimali papaino veikimo temperatūra glitimo hidrolizei buvo 48°C. Skirtingų temperatūrų įtaka bromelaino proteolitiniam efektyvumui tyrinėta mažai, tačiau atskiruose tyrimuose įrodytas jo aktyvumas skaidant kviečių glitimą esant 37°C [224, 271] ir esant 50°C [10] temperatūrai.

Kadangi kiekybiniai skirtumai tarp bromelaino, papaino ir jų bendro derinio efektyvumo hidrolizuojant glitimą iš esmės nustatyti nedideli, tolimesniems jų efektyvumo tyrimams, derinant su kitomis biopriemonėmis ir imituojant duonos gamybos sąlygas, naudojami abu fermentai. Nebuvo nustatyta reikšmingų skirtumų tarp bromelaino ir papaino proteolitinio aktyvumo naudojant koncentracijas 0,5 ir 0,75% bei temperatūras 45 bei 50°C, todėl tolimesniems tyrimų etapams pasirinktas optimumas: F/S santykis – 0,5% ir fermentinės hidrolizės temperatūra – 45°C.

3.4. Kompleksinis biopriemonių veikimas ir jo efektyvumas hidrolizuojant kviečių sėlenų glitimą

Įvertinus atskirų biologinių priemonių (pieno rūgšties bakterijų (PRB), augalų permeatų ir komercinių fermentų) efektyvumo rezultatus hidrolizuojant kviečių sėlenų glitimą ir fermentų veikimo sąlygas, optimaliam glitimo skaidymo rezultatui pasiekti naudotas kompleksinis metodas, kur sėlenų apdorojimas augaliniais fermentais buvo nuosekliai derintas su atrinktų PRB (*L. acidophilus* 308, *L. brevis* R-1 ir *L. plantarum* P-1) mišiniu. Pirmame etape kviečių sėlenos buvo apdorotos augalų fermentais bromelainu ir papainu sudarant anksčiau nustatytas optimalias sąlygas jų veikimui (45°C, F/S santykis 0,5%). Po 2 val. fermentinės hidrolizės, siekiant maksimaliai padidinti suskaidytų peptidų kiekį, sėlenų substratai inokuliuoti atrinktų trijų PRB kultūrų, pasižymėjusių didžiausiu proteolitinio aktyvumu, mišiniu. Tuo tikslu 2 val. taikyta temperatūra 30°C, palanki mezofilinių kultūrų *L. brevis* R-1 ir *L. plantarum* P-1 veikimui, vėliau (dar 8 val. iki eksperimento pabaigos) sudarytas temperatūrinis režimas, palankus *L. acidophilus* 308 (37°C). Gauti kiekybiniai ir kokybiniai pokyčiai hidrolizuotuose sėlenų bandiniuose, tokie kaip pH, tirpių baltymų koncentracijos,

glitimo kiekio, baltymų molekulinės masės, laisvųjų aminorūgščių, gliadinų ir imunoreaktyvių peptidų hidrolizė, parodė didesnę kompleksinio apdorojimo skirtingos kilmės biopriemonėmis poveikį.

3.4.1. pH pokyčiai ir proteolitinis aktyvumas substratuose fermentacijos metu

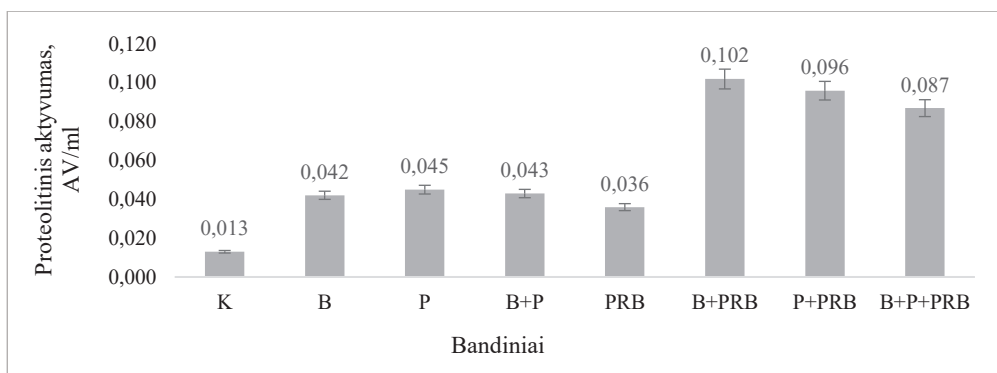
Visuose kompleksinės hidrolizės etapuose buvo įvertinti pH pokyčiai substratuose (3.9 lent.). Proceso pradžioje kviečių sėlenų substratuose su augaliniais fermentais pH buvo $6,5 \pm 0,03$. Per 2 val. veikiant bromelainui ir papainui pH sumažėjo iki $6,44\text{--}6,45 \pm 0,03$. Dar po 2 val. fermentacijos bandiniuose su PRB rūgštingumas padidėjo iki $5,00\text{--}5,02 \pm 0,04$, o kompleksinio fermentacijos proceso pabaigoje (po 12 val.) substratų rūgštingumas pasiekė pH $4,01\text{--}4,28 \pm 0,02$. Kontroliniuose augalinių fermentų substratuose su vandeniu pH vertė taip pat kito tik siauresniame intervale ir po 4 ir 12 val. nuo $6,5 \pm 0,03$ nukrito atitinkamai iki $6,34 \pm 0,03$ ir $5,37 \pm 0,03$.

3.9 lentelė. pH pokyčiai kviečių sėlenų substratuose nuoseklaus kompleksinio apdorojimo skirtingomis biopriemonėmis metu

Fermentai	Po 2 val. fermentinės hidrolizės 45°C	Po 2 val. fermentacijos 30°C		Po 8 val. fermentacijos 37°C	
		Su H ₂ O	Su PRB	Su H ₂ O	Su PRB
Kontrolė	$6,42 \pm 0,03$	$6,34 \pm 0,03$	$4,92 \pm 0,03$	$5,37 \pm 0,03$	$4,15 \pm 0,04$
Bromelainas	$6,44 \pm 0,02$	$6,43 \pm 0,02$	$5,00 \pm 0,04$	$5,31 \pm 0,02$	$4,16 \pm 0,05$
Papainas	$6,45 \pm 0,03$	$6,44 \pm 0,04$	$5,00 \pm 0,02$	$5,42 \pm 0,03$	$4,28 \pm 0,02$
Bromelainas +papainas	$6,44 \pm 0,02$	$6,43 \pm 0,04$	$5,02 \pm 0,04$	$5,35 \pm 0,02$	$4,01 \pm 0,02$

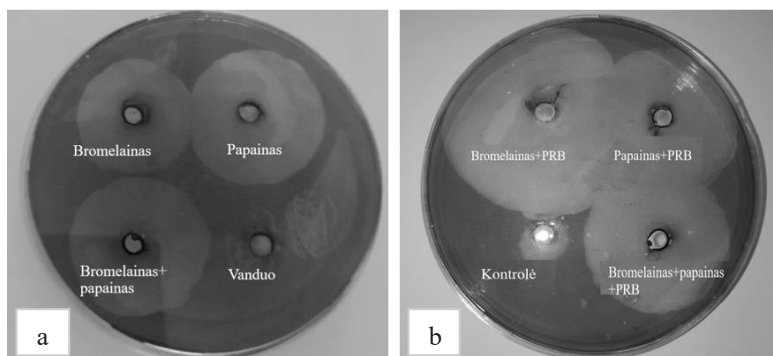
Susidarius silpnai rūgštiniais pH, tikėtina, kad kontroliniuose sėlenų bandiniuose suaktyvėjo kviečių endogeniniai fermentai, o bandiniuose su PRB jie galėjo sustiprinti bakterijų peptidazių glitimo hidrolizės procesą. Susidaręs žemesnis pH buvo palankus ir aktyvesnei bromelaino veiklai.

Proceso pabaigoje, po 12 val. fermentacijos kombinuotu metodu, buvo nustatytas bendras proteolitinis aktyvumas kviečių sėlenų substratuose (3.11 pav.). Bendras proteolitinis aktyvumas kviečių sėlenų substratuose po 12 val. apdorojimo augaliniais fermentais bromelainu, papainu bei jų deriniu buvo panašus (atitinkamai $0,042$, $0,045$ ir $0,043 \pm 0,003$ AV/ml). PRB apdorotų sėlenų substratuose nustatytas mažesnis proteolitinis aktyvumas $0,036 \pm 0,004$ AV/ml. Substratuose, kur taikytas kombinuotos fermentacijos metodas, proteolitinis aktyvumas buvo daug didesnis (nuo $0,087$ iki $0,102$ AV/ml). Didžiausias proteolitinis aktyvumas nustatytas bromelaino ir PRB hidrolizatuose ($0,102 \pm 0,008$ AV/ml), šiek tiek mažesnis – substratuose su papainu ir PRB ($0,096 \pm 0,007$ AV/ml) bei substratuose su bromelainu, papainu ir PRB ($0,087 \pm 0,004$ AV/ml).



3.11 pav. Bendras proteolitinis aktyvumas kviečių sėlenų substratuose po fermentacijos kombinuotu biopriemonių metodu. K – kontrolė, B – bromelainas, P – papainas, B+P – bromelainas+papainas, PRB – pieno rūgšties bakterijų (*L. acidophilus* 308, *L. brevis* R-1 ir *L. plantarum* P-1) mišinys, B+PRB – bromelainas ir PRB, P+PRB papainas ir PRB, B+P+PRB – bromelainas, papainas ir PRB

Proteolitinio aktyvumo rezultatai pasikartojo ir atliekant proteazių aktyvumo tyrimą įdubų metodu agarizuotoje gliadinų terpėje (3.12 pav.). Vertinant vizualiai matosi, kad vien tik bromelainu hidrolizuotų gliadinų zona yra siauresnė, o papainu ir abiejų augalinių fermentų deriniu – platesnė (3.12 pav., a). Derinant kompleksiškai augalinius fermentus su PRB mišiniu, plačiausia hidrolizuotų gliadinų zona nustatyta veikiant bromelainui ir PRB, t. y. šio derinio proteolitinis aktyvumas buvo didžiausias (3.12 pav., b).

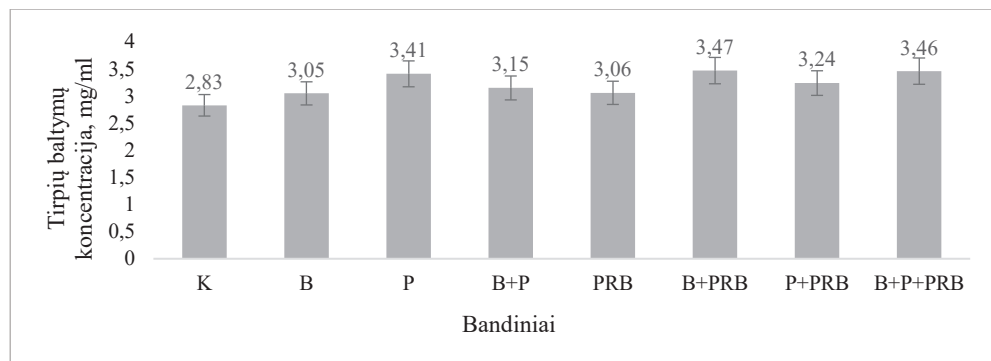


3.12 pav. Proteolitinis aktyvumas agarizuotuose gliadinų substratuose įdubų metodu esant 37°C po apdorojimo biopriemonėmis: a – augaliniais fermentais bromelainu, papainu bei jų deriniu; b – augalinių fermentų ir PRB kompleksais

3.4.2. Tirpių baltymų koncentracijos pokytis hidrolizatuose

Kviečių sėlenų hidrolizatuose po apdorojimo skirtingomis biopriemonėmis rasta reikšmingų tirpių baltymų koncentracijų skirtumų (3.13 pav.). Veikiant vien fermentais, efektyviausiai baltymus skaidė papainas – palyginti su kviečių sėlenų kontroliniais bandiniais, tirpių baltymų kiekis bandiniuose su papainu buvo didesnis 20%, o bromelaino substratuose – tik 7,85%. Vertinant kompleksinį augalų fermentų ir PRB poveikį, didžiausias tirpių baltymų kiekis nustatytas bromelaino ir PRB kviečių

sėlenų substrate – $3,47 \pm 0,06$ mg/ml (22,59% daugiau, palyginti su kontroliniu mėginiu). Bandiniuose su papaino bei abiejų augalinių proteazių deriniu ir PRB rasta $3,24$ – $3,46 \pm 0,05$ mg/ml tirpių baltymų, taigi, šiek tiek mažiau negu apdorojant tik bromelainu ir PRB.



3.13 pav. Tirpių baltymų koncentracija kviečių sėlenų hidrolizatuose po apdorojimo biopriemonėmis: K – kontrolė, B – bromelainas, P – papainas, B+P – bromelainas, papainas, PRB – pieno rūgšties bakterijos, B+PRB – bromelainas ir PRB, P+PRB – papainas ir PRB, B+P+PRB – bromelainas, papainas ir PRB

Nustatyta stipri priklausomybė ($r = 0,80$, $p < 0,05$) tarp bendro proteazių aktyvumo hidrolizatuose ir tirpių baltymų koncentracijų padidėjimo. Daugiausia tirpių baltymų rasta bandiniuose su bromelainu ir PRB, kuriuose buvo ir didžiausias dviem metodais įvertintas proteolitinis aktyvumas. Didelė tirpių baltymų koncentracija substrate parodė, kad taikant kompleksinę sėlenų fermentaciją bromelainu ir PRB aktyviausiai vyko glitimo baltymų skaidymas.

3.4.3. Glitimo kiekio pokyčiai hidrolizatuose

Mažiausias glitimo kiekis ELISA R5 metodu nustatytas substratuose su bromelainu ir PRB (3.10 lent.).

3.10 lentelė. Glitimo kiekis ir jo pokyčiai* kviečių sėlenų hidrolizatuose po fermentacijos skirtingomis biopriemonėmis bei jų deriniais

Biopriemonės	Glitimo kiekis, mg/kg	Glitimo kiekio sumažėjimas, %
K	37606 ± 3808	35,88
B	3955 ± 316	93,26
P	2650 ± 220	95,48
B+P	3802 ± 304	93,52
PRB	7695 ± 886	86,88
B+PRB	620 ± 43	98,94
P+PRB	950 ± 76	98,38
B+P+PRB	1530 ± 148	97,39

*Glitimo kiekio sumažėjimas skaičiuotas % nuo pradinio glitimo kiekio sėlenose (58650 mg/kg)

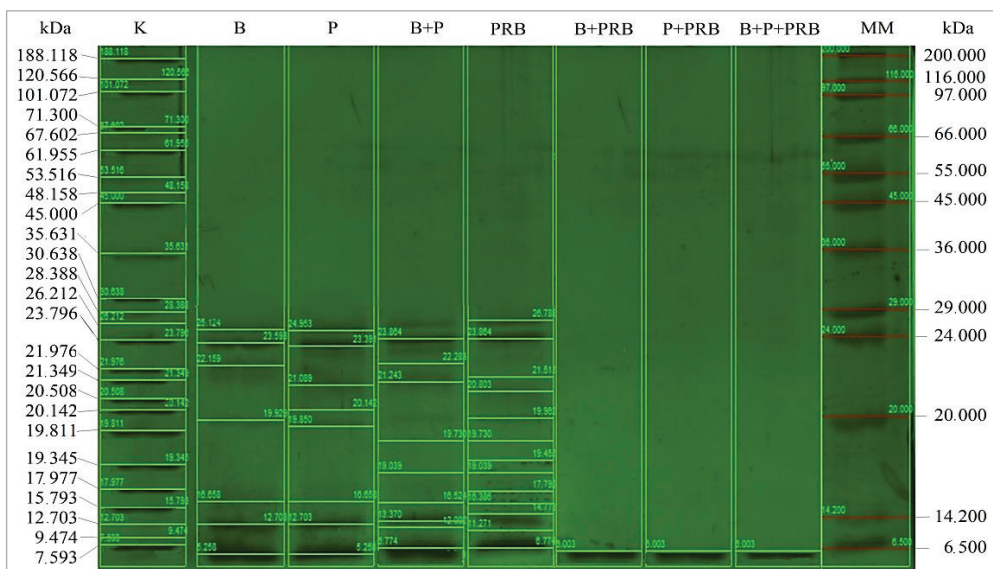
K – kontrolė (su dejonizuotu vandeniu), B – bromelainas, P – papainas, B+P – bromelainas, papainas, PRB – pieno rūgšties bakterijos, B+PRB – bromelainas ir PRB, P+PRB – papainas ir PRB, B+P+PRB – bromelainas, papainas ir PRB

ELISA R5 tyrimo rezultatai parodė reikšmingus glitimo koncentracijos pokyčius ir skirtumus tarp bandymo variantų. Mažiausias glitimo kiekis rastas kviečių sėlenų substrate po kompleksinio apdorojimo bromelainu ir PRB (620 ± 43 mg/kg). Tai įrodė, kad šis kompleksinis fermentacijos metodas gali reikšmingai sumažinti imunoreaktyvaus glitimo kiekį (98,94%). Kiti deriniai buvo mažiau efektyvūs skaidant glitimą: derinant papainą su PRB pasiektas mažesnis efektyvumas (98,38%), o dviejų augalinių fermentų ir PRB derinys glitimo kiekį sumažino 97,39%. Poveikis glitimo hidrolizei taikant atskiras biopriemones buvo reikšmingai mažesnis: su bromelainu – 93,26%, su papainu – 95,48% ir su PRB mišiniu – 86,88%.

Lyginant rezultatus su kitų panašių tyrimų duomenimis, kuriuose bakterijos bei grybų proteazės kartu su PRB naudotos kvietiniams miltams fermentuoti, galima konstatuoti, kad gautas hidrolizės efektas aukštesnis nei Mickowskos ir kt. [272] tyrime, kur veikiant flavorzimui kartu su PRB buvo pasiektas 1,5–2,3% likutinis glitimo kiekis, tačiau šiek tiek mažesnis už didžiausią grybinės kilmės fermento AN-PEP ir PRB pasiektą 99,20% hidrolizės efektą [238, 243, 244, 245, 253, 273].

3.4.4. Glitimo baltymų molekulinės masės pokyčiai

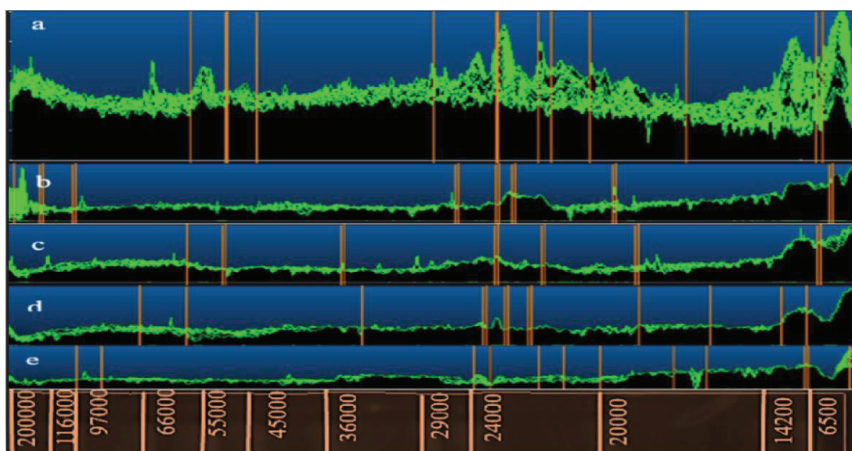
Siekiant įvertinti, kokios molekulinės masės baltymų frakcijos vyrauja kviečių sėlenų bandiniuose po apdorojimo skirtingomis biopriemonėmis, baltymai buvo analizuoti gelinės elektroforezės metodu. Kviečių sėlenų baltymų molekulinį masių analizės ataskaita, suformuota UVITEC 1D gelių dokumentavimo sistema, pateikiama 3.14 pav.



3.14 pav. Kviečių sėlenų glitimo baltymų frakcijos hidrolizatuose (UVITEC 1D gelių dokumentavimo sistema). K (kontrolė): 188,118–7,593 kDa; B (bromelainas): 25,124–5,258 kDa; P (papainas): 24,953–5,258 kDa; B+P (bromelainas, papainas): 26,788–6,774 kDa; PRB (pieno rūgšties bakterijos): 26,788–6,774 kDa; B+PRB (bromelainas, PRB): <6,003 kDa; P+PRB (papainas, PRB): <6,003 kDa; B+P+PRB (bromelainas, papainas, PRB): <6,003 kDa; MM (molekulinis masės žymuo): 200,000–6,500 kDa

Nustatyti skirtumai tarp kviečių sėlenų baltymų, apdorotų skirtingomis biopriemonėmis, molekulinį masių. Po kviečių sėlenų fermentinės hidrolizės bei kombinuoto apdorojimo biopriemonėmis sėlenų substratuose sumažėjo didelės molekulinės masės baltymų ir padaugėjo jų skilimo produktų. Kontroliniame sėlenų mėginyje (K) rasta įvairios molekulinės masės baltymų nuo 188,118 iki 7,593 kDa. Čia nustatyta: 101,00–188,00 kDa molekulinės masės gliuteninai bei jų skilimo produktai, ω -gliadinai (61,00–71,00 kDa), α - β - ir γ -gliadinai (28,00–42,00 kDa), o taip pat mažesnės molekulinės masės jų skilimo produktai, albuminai bei globulinai, kurių molekulinė masė mažesnė negu 25,00 kDa. Augaliniais fermentais apdorotuose mėginiuose (B, P, B+P) nebuvo rasta baltymų, kurių molekulinė masė būtų didesnė kaip 26,80 kDa, tačiau gana ryškios baltymų juostos, kurios patenka į 22,00–26,00 ir 6,00–12,00 kDa diapazonus. Tai reiškia, kad augaliniai fermentai gali suskaidyti stambius prolaminus iki smulkesnių darinių, jie turi specifinių proteazių, kurios nutraukia sieros tiltelius tarp Cys, tačiau jie nepajėgia iki galo hidrolizuoti visų α -, β - ir γ -gliadinų, nors ir pastebėtas mažos molekulinės masės junginių koncentracijos padidėjimas. Panašios molekulinės masės baltymų juostos susiformavo ir kviečių sėlenų mėginyje, fermentuotame tik su PRB – jame taip pat nerasta baltymų, kurių molekulinė masė viršytų 26,80 kDa, tačiau jame nustatyta daugiau vidutinio dydžio (11,00–20,00 kDa) skilimo produktų. Pagal skiriamąją gebą atliktas baltymų išskirstymas nėra tinkamas tiksliai labai mažos molekulinės masės baltymų analizei, tačiau gelyje aiškiai matyti, kad po apdorojimo augaliniais fermentais ir PRB kviečių sėlenų hidrolizatuose neliko glitimo fragmentų, kurių molekulinė masė viršytų 6,00 kDa.

Naudojant UVITEC 1D gelių dokumentavimo sistemą buvo galima palyginti skirtingomis biopriemonėmis apdorotų sėlenų nudažytų baltymų juostų intensyvumą, taigi tokiu būdu buvo įvertintos skirtingų frakcijų baltymų koncentracijos. Skirtumai tarp baltymų juostų intensyvumų takeliuose stebėti vizualiai (3.15 pav.).



3.15 pav. Kviečių sėlenų glitimo baltymų juostų intensyvumo palyginimas: a – kontrolinis sėlenų mėginys, b – bromelainas, c – papainas, d – bromelainas ir papainas, e – bromelainas, papainas ir PRB

Iš baltymų frakcijų smailių aukščio matyti, kad kviečių sėlenų kontroliniame bandinyje (3.15 pav., a) didžiausiu intensyvumu pasižymėjo gliadinų, kurių molekulinė masė 23,00–29,00 kDa, ir mažiausios molekulinės masės, t. y. mažesnės negu 6,50 kDa, baltymų juostos, kurios vyrauja ir kituose, tik augaliniais fermentais apdorotuose bandiniuose (3.15 pav., b, c, d), o kompleksiniu metodu (bromelainu, papainu ir PRB) apdorotų kviečių bandinyje (3.15 pav., e) didesniu intensyvumu išsiskyrė tik mažos molekulinės masės (mažesnės nei 6,00 kDa) baltymų juostos.

NaDS-PAGE analizė papildė ir praplėtė rezultatus apie fermentavimo metodo biotechnologinėmis priemonėmis ir jų deriniais glitimo proteolizės efektyvumą. Kita vertus, nors akivaizdžiai matyti, kad sėlenų hidrolizatuose sėkmingai pavyko suskaidyti glitimo baltymus iki mažesnės molekulinės masės peptidų, tačiau šis metodas neleidžia identifikuoti, kokie tiksliai skilimo produktai susidarė ir liko substratuose po fermentacijos.

3.4.5. Laisvųjų aminorūgščių kiekio pokyčiai sėlenose

Laisvųjų aminorūgščių kiekio padidėjimas fermentuojamuose substratuose yra svarbus baltymų hidrolizės efektyvumo rodiklis, kuris parodo, kaip fermentai ar jų deriniai su PRB mikroorganizmų proteazėmis geba skaidyti peptidines jungtis. ESCh metodu nustatytas suminis aminorūgščių kiekis neapdorotame sėlenų mėginyje – $13,29 \pm 0,72$ g/100g. Gauti rezultatai (3.11 lent.) koreliuoja su nustatytu bendru baltymų kiekiu sėlenose ($13,88 \pm 0,22$ g/100 g) ir yra panašūs į paskelbtus Zhang ir Tan [274]. Daugiausia kviečių sėlenose rasta Gln ($3,08 \pm 0,29$ g/100 g) ir Pro ($1,33 \pm 0,12$ g/100 g), taip pat Asp, Arg ir Ile aminorūgščių, o visai nerasta Asn.

Lyginant kviečių sėlenų bandinius, apdorotus tik augaliniais fermentais, daugiausia laisvų aminorūgščių nustatyta substratuose su papainu bei papaino ir bromelaino deriniu, o substrate su bromelainu – mažiau. Palyginti su kontroliniu sėlenų bandiniu, kuriame laisvos aminorūgštys sudarė tik $0,688 \pm 0,05$ mg/100g (5,17% bendro aminorūgščių kiekio) po fermentinės hidrolizės bromelainu jų padaugėjo iki 17,32% (3,35 kartus), po apdorojimo papainu laisvos aminorūgštys sudarė 25,55% (padaugėjo 4,94 karto). Fermentų derinio poveikis buvo vidutinio lygio – atsilaisvino $3,20 \pm 0,24$ mg/100 g aminorūgščių, kas sudarė 24,06% nuo suminio aminorūgščių kiekio, palyginti su kontroliniu mėginiu, jų rasta daugiau 4,65 karto.

Analizuojant atskirų aminorūgščių koncentracijų padidėjimo skirtumus, ypač svarbus yra glitimui būdingų laisvų Gln ir Pro aminorūgščių kiekybinis pokytis. Jis įrodo galimybę, kad naudojant biopriemones (augalinius ir PRB fermentus bei jų derinius) galima hidrolizuoti specifines sunkiai skaidomas glitimo peptidines jungtis. Šiame kontekste efektyviausias buvo papainas, palyginti su kontroliniu mėginiu, laisvo Gln kiekis padidėjo 3,91 karto nuo $0,076 \pm 0,007$ g/100 g iki $0,297 \pm 0,020$ g/100 g, o laisvo Pro kiekis padidėjo net 139 kartus: nuo $0,006 \pm 0,001$ g/100 g iki $0,822 \pm 0,070$ g/100 g.

3.11 lentelė. Amino rūgščių kiekiai kviečių sėlenose ir jų hidrolizės produktuose po apdorojimo skirtingomis biopriemonėmis, g/100g

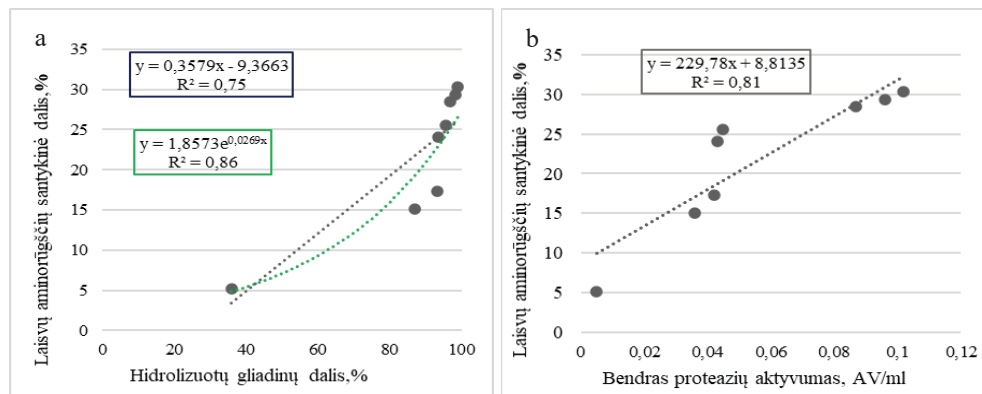
Amino rūgštys	S	K	B	P	B+P	PRB	B+PRB	P+PRB	B+P+PRB
Asp	0,95±0,08	0,045±0,003	0,101±0,010	0,104±0,010	0,110±0,010	0,101±0,009	0,145±0,012	0,134±0,010	0,133±0,010
Gln	3,08±0,29	0,076±0,007	0,187±0,015	0,297±0,020	0,210±0,020	0,099±0,008	0,241±0,020	0,237±0,020	0,237±0,020
Asn	0,00±0,00	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Ser	0,60±0,06	0,033±0,003	0,125±0,010	0,175±0,010	0,178±0,014	0,027±0,002	0,140±0,011	0,110±0,010	0,110±0,010
His	0,25±0,02	0,014±0,001	0,037±0,003	0,057±0,004	0,048±0,003	0,023±0,002	0,043±0,003	0,038±0,003	0,032±0,003
Gly	0,66±0,06	0,030±0,002	0,072±0,006	0,094±0,008	0,091±0,007	0,058±0,005	0,106±0,010	0,096±0,007	0,096±0,008
Thr	0,43±0,04	0,032±0,002	0,090±0,007	0,120±0,010	0,110±0,009	0,062±0,005	0,124±0,010	0,113±0,010	0,108±0,010
Arg	0,96±0,09	0,060±0,005	0,175±0,014	0,056±0,005	0,235±0,020	0,140±0,010	0,296±0,020	0,334±0,030	0,324±0,030
Ala	0,66±0,07	0,070±0,006	0,165±0,013	0,197±0,015	0,195±0,015	0,141±0,010	0,247±0,020	0,229±0,020	0,227±0,020
Tyr	0,37±0,03	0,008±0,006	0,022±0,002	0,017±0,001	0,039±0,003	0,050±0,004	0,117±0,010	0,113±0,010	0,113±0,010
Cys	0,42±0,03	0,012±0,001	0,018±0,001	0,036±0,003	0,050±0,004	0,014±0,001	0,038±0,003	0,035±0,003	0,049±0,004
Val	0,49±0,04	0,051±0,004	0,139±0,010	0,174±0,010	0,169±0,014	0,110±0,010	0,217±0,020	0,218±0,020	0,204±0,020
Met	0,30±0,03	0,030±0,002	0,072±0,007	0,095±0,008	0,090±0,008	0,064±0,006	0,128±0,010	0,093±0,008	0,113±0,010
Trp	0,65±0,05	0,042±0,003	0,156±0,010	0,256±0,020	0,233±0,020	0,133±0,010	0,325±0,030	0,310±0,030	0,308±0,030
Phe	0,54±0,05	0,038±0,003	0,132±0,010	0,175±0,010	0,172±0,014	0,101±0,009	0,203±0,020	0,188±0,015	0,185±0,015
Ile	0,87±0,08	0,063±0,005	0,207±0,018	0,340±0,030	0,275±0,020	0,205±0,018	0,421±0,040	0,421±0,040	0,404±0,040
Leu	0,44±0,04	0,027±0,002	0,085±0,007	0,113±0,010	0,104±0,010	0,109±0,010	0,189±0,015	0,185±0,015	0,190±0,015
Lys	0,27±0,02	0,053±0,004	0,163±0,013	0,267±0,020	0,236±0,020	0,243±0,020	0,247±0,020	0,265±0,020	0,226±0,030
Pro	1,33±0,12	0,006±0,001	0,355±0,030	0,822±0,070	0,653±0,050	0,324±0,030	0,800±0,070	0,790±0,070	0,718±0,060
Viso	13,29±0,72	0,688±0,050	2,302±0,200	3,396±0,260	3,198±0,240	2,003±0,140	4,027±0,280	3,906±0,260	3,780±0,250
Laisvų amino rūgščių kiekis, % nuo suminio		5,18	17,32	25,55	24,06	15,07	30,30	29,39	28,44
Laisvų amino rūgščių kiekio padidėjimas			3,35	4,94	4,65	2,91	5,86	5,68	5,50
Kartais, palyginti su K									

S – suminis amino rūgščių kiekis sėlenose; laisvų amino rūgščių kiekiai mėginiuose: K – kontrolė, B – bromelainas, P – papainas, B+P – bromelainas, papainas, PRB – pieno rūgšties bakterijos, B+PRB – bromelainas ir PRB, P+PRB papainas ir PRB, B+P+PRB – bromelainas, papainas ir PRB

Lyginant rezultatus bandinių, kuriuose fermentinė hidrolizė buvo kompleksiskai derinta su PRB poveikiu, nustatytas didesnis bromelaino efektyvumas, kur laisvų aminorūgščių, palyginti su kontroliniu mėginiu, padaugėjo 5,86 karto (iki $4,027 \pm 0,280$ g/100 g) (3.11 lent.). Papaino ir PRB poveikis buvo šiek tiek silpnesnis ($3,906 \pm 0,260$ g/100 g, 5,68 karto), o abiejų fermentų derinys veikė silpniau sprendžiant pagal mažesnį susiformavusių laisvų aminorūgščių kiekį ($3,780 \pm 0,250$ g/100g, 5,50 karto padidėjimas). Taikant kompleksinį augalinių fermentų ir PRB poveikį, visais atvejais substratuose buvo nustatyta daugiau laisvų aminorūgščių negu apdorojus tik fermentais arba PRB, tačiau, nors buvo tikėtasi didesnio laisvų Gln ir Pro aminorūgščių kiekio padidėjimo, jis buvo vidutinio lygio: didesnis negu po apdorojimo bromelainu arba fermentų deriniu, tačiau truputį mažesnis negu skaidant sėlenų baltymus tik papainu.

Gauti laisvų aminorūgščių tyrimo rezultatai dar kartą patvirtino gautą didesnę hidrolizės efektą taikant kompleksinį apdorojimą augalų fermentais ir PRB. Palyginti su kitais moksliniais tyrimais, vertinant laisvų aminorūgščių rezultatus gautas didesnis hidrolizės efektas dėl fermentinio apdorojimo ir PRB mikroorganizmų fermentacijos derinimo. Mickowska ir kt. [272] nustatė, kad po 24 val. fermentinės hidrolizės flavorzimu kviečių ir rugių substratuose išsiskiria daugiau nei 33% laisvųjų aminorūgščių, o kombinuoto flavorzimo poveikio su PRB atveju laisvų aminorūgščių procentinė dalis nustatyta mažesnė (22,50–26,70%).

Kita vertus, laisvų aminorūgščių tyrimo duomenys gali ne iki galo parodyti tikrąją glitimo hidrolizės situaciją, nes dalis gliadinų ir gliuteninų suskyla iki di-, tripeptidų ar ilgesnių peptidų, todėl buvo tikslinga įsitikinti, ar laisvų aminorūgščių pokyčių rezultatai koreliuoja su bendru glitimo kiekiu, nustatytu imunofermentiniu ELISA R5 metodu (3.10 lent.), kuris parodo, kiek sumažėja antikūnais atpažįstamų imunoreaktyvių glitimo fragmentų. Atlikus Pearsono koreliacijos analizę nustatyta, kad yra stipri tiesioginė priklausomybė ($r = 0,87$, $p < 0,05$) tarp laisvų aminorūgščių procentinės dalies ir glitimo kiekio sumažėjimo procentinės išraiškos. Tiesinės priklausomybės lygties determinacijos koeficientas nustatytas vidutinio dydžio ($R^2 = 0,75$) (3.16 pav., a), todėl šią priklausomybę tiksliau galima pavaizduoti eksponentine lygtimi ($R^2 = 0,86$).



3.16 pav. Ryšys tarp laisvų aminorūgščių santykinės dalies kviečių sėlenų hidrolizatuose ir hidrolizuoto glitimo dalies (a) bei bendro proteolitinio aktyvumo (b)

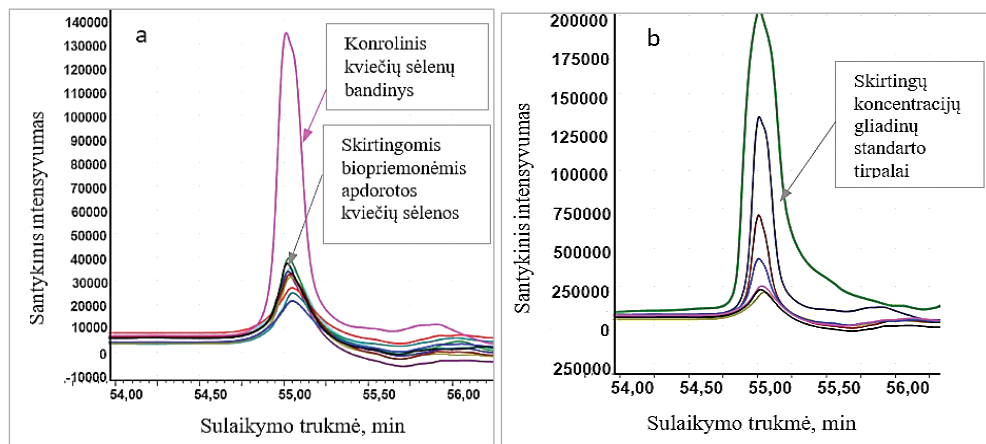
Taip pat nustatytas stiprus tiesinis ryšys tarp laisvųjų aminorūgščių santykinės dalies ir bendro proteazių aktyvumo ($R^2 = 0,81$) (3.16 pav., b), kuris patvirtino, kad bendram proteazių aktyvumo nustatymui naudotas metodas, įvertinantis laisvo Tyr kiekį, susidariusį kazeino hidrolizės metu, gana tiksliai parodė visų laisvų aminorūgščių padidėjimą ir biopriemonių efektyvumą skaidant glitimo baltymus.

3.4.6. Hidrolizės biopriemonėmis įtaka glitimo baltymų gliadinų pokyčiams kviečių sėlenose

3.4.6.1. Kiekybiniai pokyčiai

Kiekybiniam glitimo nustatymui šiuo metu nėra visuotinai pripažinto standartizuoto chromatografijos metodo [275]. Vienintelis standartais įteisintas glitimo nustatymo metodas yra ELISA R5 imunofermentinis metodas, tačiau kyla nemažai diskusijų dėl jo tikslumo [276, 277]. Moksliniuose tyrimuose dažniausiai naudojamas ESCh/MS tandemas leidžia nustatyti atskirų glitimo peptidų išėjimo laikus ir jų kiekybinius parametrus. Šio metodo trūkumas yra brangi įranga, jis sudėtingas ir reikalauja aukštos kvalifikacijos tyrėjų [278]. AF-ESCh galėtų būti nepriklausomas pamatinis glitimo baltymų koncentracijos nustatymo metodas, tačiau susiduriama su problema, kad glitimas yra ne cheminis junginys, o baltymų ir peptidų mišinys, todėl nėra chromatografiniams tyrimams tinkamo tikslaus glitimo standarto. Moksliniuose tyrimuose glitimo kiekybiniam įvertinimui ESCh metodu kaip standartą bandyta naudoti jaučio serumo albuminą [79, 202, 279], susintetintus gliadinų peptidus [87, 273]. Taip pat yra tyrimų metodikų, kur glitimo kalibracinei tiesei naudotas kviečių gliadinas [261, 262, 278, 280, 281].

Šiame tyrime AF-ESCh metodui kaip glitimo standartas taip pat naudotas *Sigma Aldrich* kviečių gliadinas, kuris yra įvairių alkoholyje tirpių kviečių gliadinų mišinys. Skirstant skirtingomis biopriemonėmis apdorotų kviečių sėlenų gliadinų frakcijų bandinius (3.17 pav., a) bei skirtingų koncentracijų gliadino standarto tirpalus (3.17 pav., b), aukščiausios smailės užfiksuotos 54–58 min.



3.17 pav. Palyginamosios smailių chromatogramos, rodančios skirtingas nesuskaidytų gliadinų bei standartinės gliadinų medžiagos koncentracijas: a – γ -gliadinų koncentracijos,

gautos po kviečių sėlenų apdorojimo skirtingomis biopriemonėmis, b – skirtingų koncentracijų gliadinų standarto išėjimo smailės

Buvo pastebėta, kad 55 min. užfiksuotų smailių plotai buvo proporcingi paruoštų standarto tirpalų koncentracijoms. tirpaluose. Šiame taške buvo sudaryta kalibracinė tiesė (žr. 7 priedą). Gautas tiesės determinacijos koeficientas $R^2 = 0,9997$ parodė, kad smailių plotai tiksliai koreliuoja su gliadinų koncentracijomis

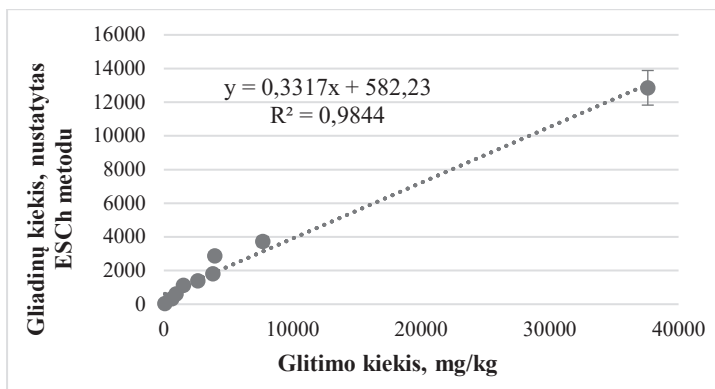
Skirtingomis biologinėmis priemonėmis apdorotų sėlenų gliadinų smailių plotai (3.17 pav., 3.12 lent.) patvirtino kompleksinio apdorojimo fermentais ir PRB metodo efektyvumą. Remiantis kalibracine tiese nustatyti santykiniai kviečių gliadinų kiekiai skaitine išraiška patvirtino, kad geriausias hidrolizės rezultatas pasiektas taikant bromelaino ir PRB kombinuotą poveikį. ESCh metodu nustatytas santykinis gliadinų kiekis buvo vidutiniškai 1,5–3 kartus mažesnis už imunofermentiniu metodu gautus glitimo rodiklius (3.12 lent.). Apskaičiuojant glitimo koncentraciją pagal *Codex Alimentarius* standartinę metodiką [113], gliadinų kiekis dauginamas iš dviejų, tačiau šiame darbe perskaičiavimas netaikomas dėl galimų nedidelių gliadinų nuostolių bandinių gryninimo (kietafazės ekstrakcijos) metu.

3.12 lentelė. Santykinis kviečių gliadinų kiekis, nustatytas AF-ESCh, ir glitimo kiekis, nustatytas ELISA R5 metodu, kviečių sėlenų hidrolizės produktuose po apdorojimo skirtingomis biopriemonėmis

Biologinės priemonės	Santykinis gliadinų kiekis, nustatytas ESCh metodu	Glitimo kiekis, mg/kg, nustatytas ELISA R5 metodu
K	12855±625	37606±3808
B	2877±160	3955±316
P	1389±111	2650±220
B+P	1811±220	3802±304
PRB	3725±146	7695±887
B+PRB	338±30	620±43
P+PRB	617±52	950±76
B+P+PRB	1124±129	1530±148

K – kontrolė (su dejonizuotu vandeniu), B – bromelainas, P – papainas, B+P – bromelainas, papainas, PRB – pieno rūgšties bakterijos, B+PRB – bromelainas ir PRB, P+PRB – papainas ir PRB, B+P+PRB – bromelainas, papainas ir PRB

Siekiant įvertinti AF-ESCh metodo tikslumą kiekybiniam kviečių gliadinų tyrimui buvo nustatyta priklausomybė tarp šiuo metodu gautų gliadino kiekybinių rezultatų ir glitimo kiekio, nustatyto ELISA R5 metodu (3.18 pav.), bei tirpių baltymų koncentracijos substratuose. Gauta stipri tiesinė priklausomybė tarp AF-ESCh metodu nustatyto santykinio gliadinų kiekio ir glitimo kiekio, nustatyto imunofermentiniu metodu. Nustatytas aukštas determinacijos koeficientas ($R^2 = 0,98$) parodė šio metodo tinkamumą glitimo kiekiui įvertinti. Koreliacija tarp gliadino kiekių, nustatytų AF-ESCh ir ELISA R5 metodais, gauta aukštesnė nei Scherf tyrime [281], kur buvo nustatytas vidutinio stiprumo ryšys ($r = 0,763$). Kita vertus, AF-ESCh metodas glitimo kiekiui tirti naudojant gliadiną kaip standartą nėra tinkamas mažesniems nei 100 mg/kg kiekiams nustatyti, nes standarto smailių plotai su 10–100 mg/kg gliadino nebuvo proporcingi tirpalų koncentracijoms.

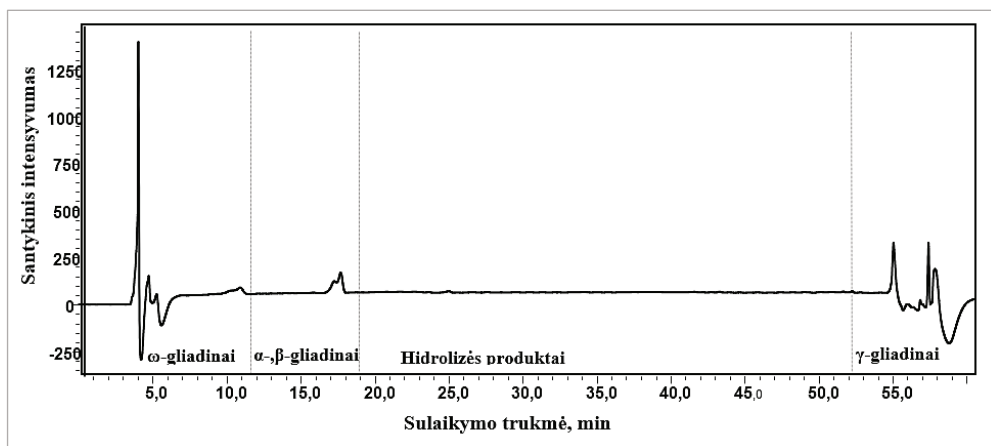


3.18 pav. Priklausomybė tarp gliadinų ir glitimo kiekio, nustatyto ESCh ir ELISA R5 metodais

Buvo nustatyta stipri neigiama koreliacija ($r = -0,89$, $p < 0,05$) tarp tirpių baltymų koncentracijos kviečių sėlenų substratuose ir santykinio gliadinų kiekio, nustatyto ESCh metodu, ir silpnesnė neigiama koreliacija tarp tirpių baltymų koncentracijos ($r = -0,76$, $p < 0,05$) ir glitimo kiekio, nustatyto ELISA R5 metodu. Taigi, tirpių baltymų koncentracijos nustatymas yra gana paprastas ir tikslus metodas glitimo hidrolizės efektyvumui vertinti.

3.4.6.2. Kokybiniai pokyčiai

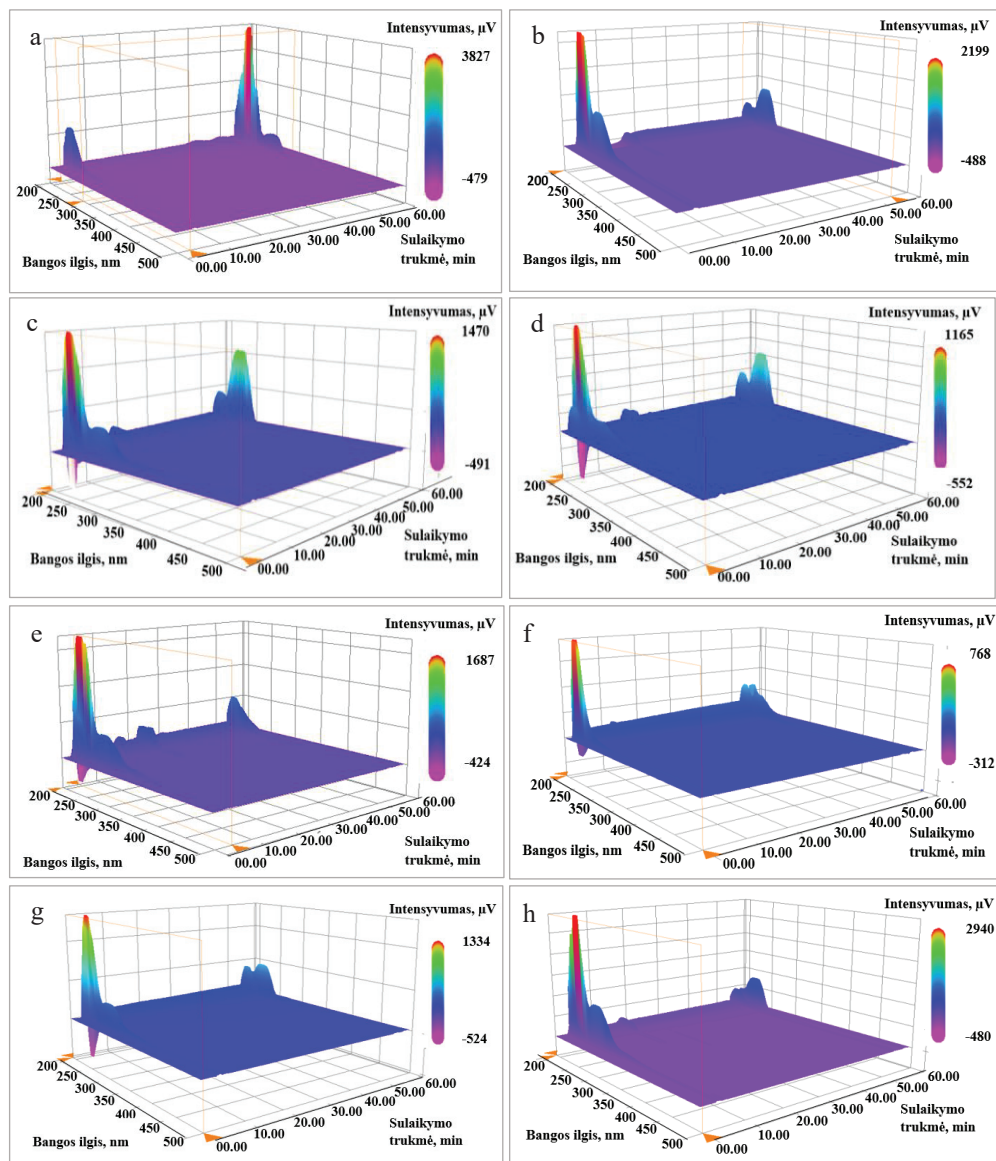
Kviečių sėlenų baltymų gliadinų frakcijos kokybiniai pokyčiai buvo įvertinti AF-ESCh skirstymo metodu. Taikant gradientą, pateiktą 2.2.10. skyriuje, pirmiau eliuavo didžiausiu poliškumu pasižymintys ω -gliadinai, po jų – α -/ β -gliadinai ir hidrolizuoti gliadinų peptidai, o proceso pabaigoje – daugiausia sieros turintys γ -gliadinai (3.19 pav.).



3.19 pav. Kviečių sėlenų, apdorotų bromelainu, gliadinų AF-ESCh chromatograma

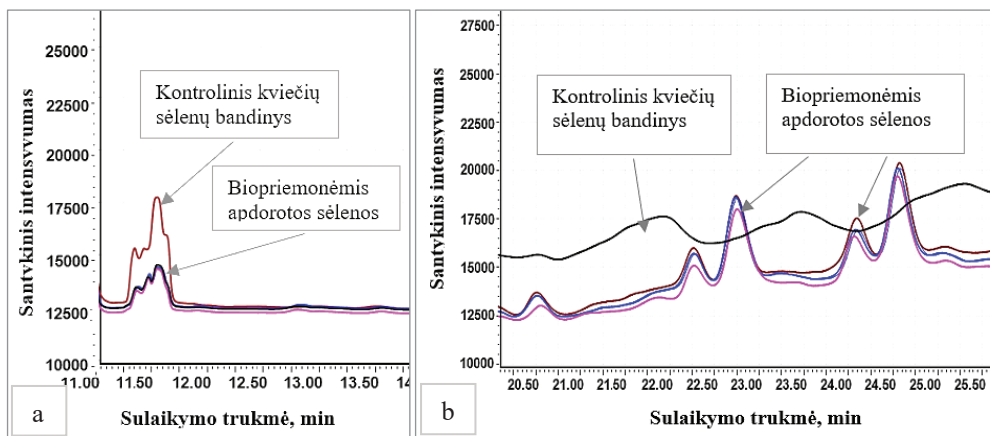
3D chromatogramose (3.20 pav.) matomos aukščiausios smailės skirstymo pradžioje – iki 5 min. bei pabaigoje – nuo 50 min. Kadangi diodų matricos detektorius registruoja visą bangos ilgių spektrą, didžiausias smailių intensyvumas buvo esant

200–250 nm bangos ilgiui, maksimali raiška nustatyta esant 210 nm, todėl šis bangos ilgis ir pasirinktas tolimesniems tyrimams. Skirtingomis biopriemonėmis apdorotų kviečių sėlenų hidrolizatuose išryškėjo akivaizdūs skirtumai tarp smailių, kurios išėjo 55–58 min., intensyvumų: didžiausias γ -gliadinų smailių intensyvumas užfiksuotas kontroliniame bandinyje (3.20 pav., a), o bandiniuose, apdorotuose augaliniais fermentais, jis buvo mažesnis (3.20 pav., b, c, d).



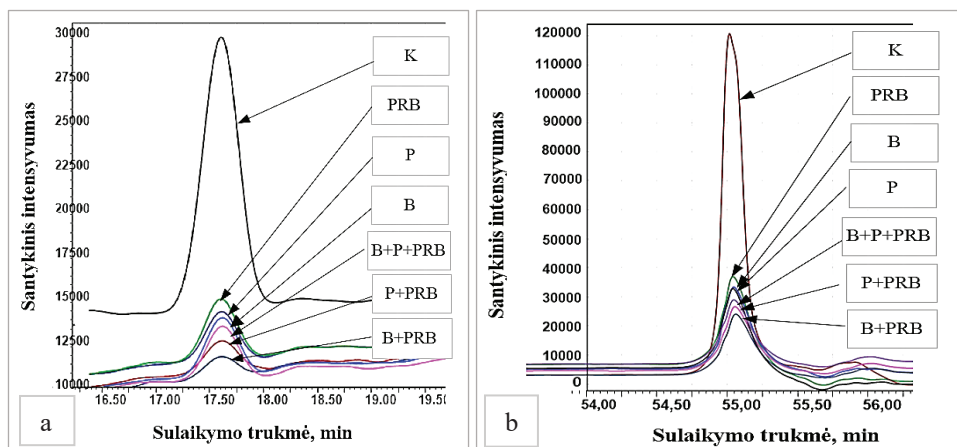
3.20 pav. Kviečių sėlenų gliadinų, apdorotų augaliniais fermentais, AF-ESCh 3D chromatogramos: a – kontrolinis sėlenų mėginys, b – bromelainas, c – papainas, d – bromelainas ir papainas, e – pieno rūgšties bakterijos (PRB), f – bromelainas ir PRB, g – papainas ir PRB, h – bromelainas, papainas ir PRB

Bandinyje, apdorotame tik PRB (3.20 pav., e), buvo matomos gana intensyvios α - β - γ -gliadinų smailės. Bandiniuose su augaliniais fermentais ir PRB (3.20 pav., f, g, h) šių smailių intensyvumai buvo mažesni. Mažiausi α - β - γ -gliadinų smailių intensyvumai nustatyti sėlenų hidrolizatuose, apdorotuose bromelainu ir PRB (3.16 pav., f). Sugretinant kviečių sėlenų kontrolinio mėginio ir fermentiniu būdu suskaidytų gliadinų chromatogramas, buvo pastebėtas akivaizdus skirtumas tarp baltymų, kurie eliuavo tarp 2–5 min. (baltymų, kurių kolonėlė nesulaikė). Iš gliadinų pirmieji eliuavo ω -gliadinai – ryškiausia smailė išėjo 11,5 min. (3.18 pav. ir 3.21 pav., a). Kontrolinio sėlenų mėginio smailių plotai buvo 2–2,5 karto didesni negu biopriemonėmis apdorotų mėginių, iš to galima spręsti, kad po apdorojimo biopriemonėmis ω -gliadinų koncentracija sumažėjo. Nepastebėta akivaizdžių skirtumų tarp skirtingomis biopriemonėmis apdorotų sėlenų ω -gliadinų smailių intensyvumų, vadinasi, jų hidrolizės efektyvumas skaidant ω -gliadinus buvo panašus. Akivaizdžių skirtumų nepastebėta ir tarp skirtingomis priemonėmis apdorotų sėlenų gliadinų skilimo produktų (3.21 pav., b). Iš chromatogramų matyti, kad biopriemonėmis apdorotų gliadinų bandiniuose skilimo produktų smailės didesnės, palyginti su kontrole. Kontroliniuose bandiniuose jų arba neužfiksuota, arba užfiksuoti daug mažesni smailių plotai. Tai parodė, kad apdorojant sėlenas biopriemonėmis susidarė mažesnės molekulinės masės peptidai, kurių nebuvo kontroliniame bandinyje.



3.21 pav. Kviečių sėlenų gliadinų kokybiniai pokyčiai substratuose, užfiksuoti AF-ESCh metodu, po fermentinės hidrolizės skirtingais fermentais esant 45°C: a – ω -gliadinų smailių intensyvumai, b – gliadinų skilimo produktai

Akivaizdūs skirtumai nustatyti lyginant skirtingų sėlenų bandinių α - β -gliadinų (3.22 pav., a) ir γ -gliadinų (3.22 pav., b) smailių intensyvumus. Tai parodo šių gliadinų peptidų kiekio sumažėjimą, palyginti su kontroliniu bandiniu. Iš smailių intensyvumų išsidėstymo galima spręsti, kad, skaidant α - β -gliadinus didžiausiu efektyvumu, tiek veikdamas vienas, tiek kartu su PRB, pasižymėjo bromelainas. Bromelaino ir PRB derinys buvo efektyviausias ir skaidant γ -gliadinus.

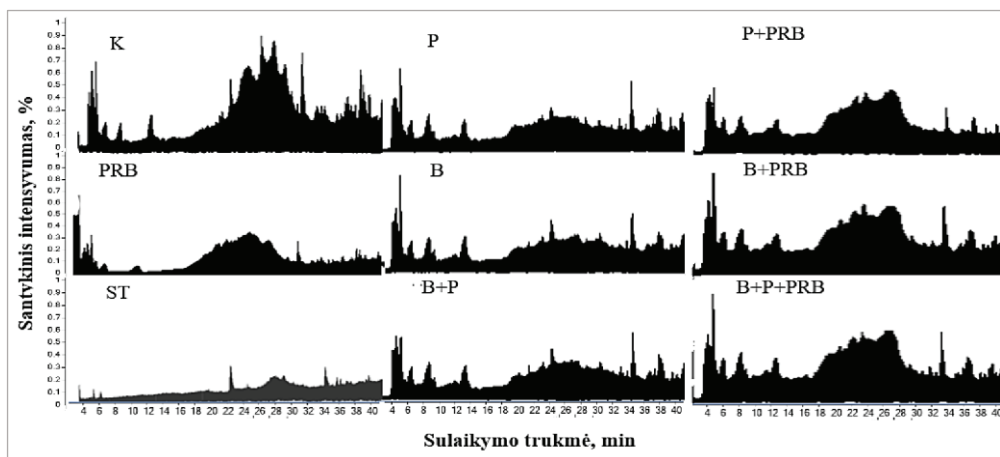


3.22 pav. α/β -gliadinų (a) ir γ -gliadinų (b) smalių intensyvumo palyginimas: K – kontrolė (su dejonizuotu vandeniu), P – papainas, B – bromelainas, B+P – bromelainas ir papainas, PRB – pieno rūgšties bakterijos, P+PRB – papainas ir PRB, B+PRB – bromelainas ir PRB, B+P+PRB – bromelainas, papainas ir PRB

3.4.6.3. Gliadinų hidrolizės produktų analizė

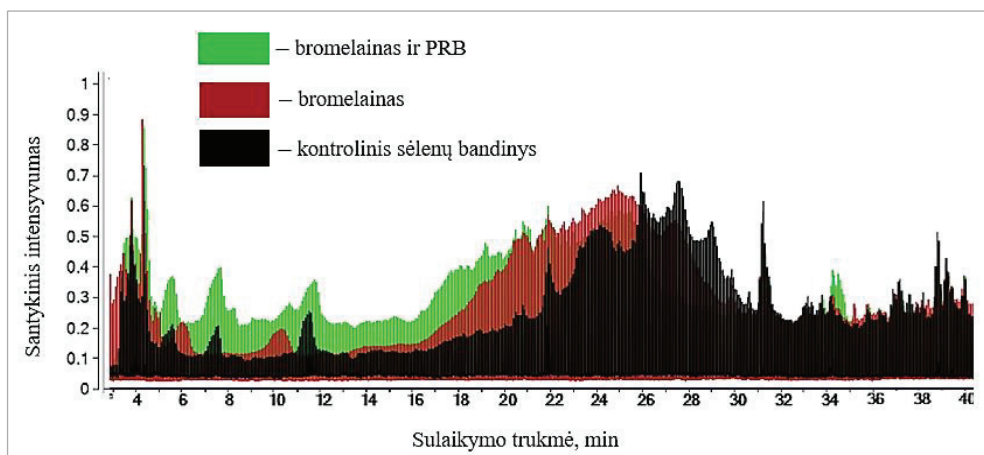
Kviečių sėlenų baltymų hidrolizės produktams tirti buvo naudota efektyviosios skysčių chromatografijos su kvadrupoliniu-skriejimo laiko masių spektrometru (ESCh-Q/TOF) analizė, kadangi tyrimui naudojant gliadinų standartą peptidų ilgių ir aminorūgščių sekų identifikuoti negalima. Dažniausiai atliekant MS/MS analizę ir automatizuotą junginių paiešką bibliotekoje kviečių baltymų mėginiai papildomai skaidomi tripsinu arba chimotripsinu [82, 282], tačiau šiame tyrime būtų neaišku, ar identifikuoti hidrolizės skilimo produktai mėginiuose susidarė po apdorojimo biopriemonėmis, ar po galutinio skaidymo tripsinu / chimotripsinu mėginio paruošimo metu. Įvertinus šiuos niuansus, buvo pasirinkta atlikti mėginių MS fragmentų analizę be papildomo fermentinio apdorojimo.

Analizuojant biologinėmis priemonėmis apdorotų bandinių gliadinų frakcijas (analogiškas bandiniams 3.7.6. skyriuje, taikant tas pačias skirstymo sąlygas ir kolonėlę) naudojant jautresnį ESCh-Q/TOF instrumentą, geriau išryškėjo skirtumai chromatogramose tarp gliadinų skilimo produktų, kurie išėjo tarp 16 ir 27 min. Pastebėtas akivaizdus skirtumas tarp kviečių sėlenų kontrolinio mėginio ir biopriemonėmis apdorotų mėginių hidrolizės produktų signalų intensyvumų. Fermentais hidrolizuotų gliadinų mėginiuose vyravo mažesnės molekulinės masės peptidai, kurie eliuavo anksčiau, o kontroliniame mėginyje fiksuoti akivaizdžiai intensyvesni skilimo produktai signalai, ir jie eliuavo vėliau (3.23 pav.).



3.23 pav. Kviečių sėlenų hidrolizės produktų chromatogramos, gautos ESCh/MS: K – kontrolė (su dejonizuotu vandeniu), P – papainas, B – bromelainas, B+P – bromelainas, papainas, PRB – pieno rūgšties bakterijos, ST – gliadinų standartas, P+PRB – papainas ir PRB, B+PRB – bromelainas ir PRB, B+P+PRB – bromelainas, papainas ir PRB

Geriausiai peptidų molekulių masių skirtumus buvo galima pastebėti sugretinant skirtingomis biopriemonėmis apdorotų sėlenų baltymų peptidų išėjimo signalų intensyvumus. Analizės rezultatai parodė, kad po kompleksinio sėlenų apdorojimo susidarė daugiau mažesnės molekulinės masės glitimo skilimo produktų, kurių didžioji dalis eliuavo 16–20 min., po apdorojimo augaliniais fermentais didžiausi signalų intensyvumai buvo fiksuojami 19–26 min., o kontroliniame bandinyje nustatyti endogeninių fermentų sukeltos hidrolizės produktų, turinčių didesnes molekulinės mases, signalai buvo intensyviausi 24–29 min. (3.24 pav.).



3.24 pav. Kviečių sėlenų kontrolinio mėginio ir mėginių, apdorotų skirtingomis biopriemonėmis, hidrolizės produktų signalų intensyvumų palyginimas

ESCh-Q/TOF chromatogramų analizė papildė ankstesnius tyrimo rezultatus ir įrodė, kad, kompleksškai apdorojant kviečių baltymus augaliniais fermentais ir PRB,

glitimo hidrolizė vyko efektyviau ir susidarė mažesnės molekulinės masės baltymų skilimo produktai, tačiau visuose hidrolizatuose buvo pastebimi ir didesnės molekulinės masės gliadinų skilimo produktų bei nesuskaidytų gliadinų signalai.

Kadangi net ir taikant kombinuotą sėlenų apdorojimą nepavyko visiškai suardyti glitimo – tarp skilimo produktų liko ELISA antikūnais atpažįstamų glitimo fragmentų, aktualu ištirti, kokie glitimo hidrolizės produktai susidarė, ar tarp jų liko peptidų, ilgesnių negu 9 aminorūgštys, turinčių imunotoksiškų sekų, kurie sukeltų CL simptomus.

3.4.7. Imunoreaktyvių peptidų analizė hidrolizės produktuose

Siekiant detalai ištirti glitimo hidrolizės mechanizmą, glitimo skilimo produktų sandarą ir įvertinti likutinių glitimo darinių imunoreaktyvumą, buvo atlikta peptidų ir baltymų molekulinį masių analizė naudojant M-QTOF instrumentą. Pradiniame MS tyrimų etape peptidų molekulinį jonų $[M-H]^+$ m/z reikšmės buvo stebėtos vizualiai, analizuotos „MassHunter“ programa, pagal jas apskaičiuotos peptidų molekulinės masės lygintos su imunoreaktyvių epitopų molekulinėmis masėmis, apskaičiuotomis „Expasy“ bioinformatikos įrankiu [283], taip identifikuota keletas imunoreaktyvių peptidų. Galutiniame etape, atlikus automatizuotą peptidų analizę, gautus MS/MS analizės duomenis lyginant su pateiktomis peptidų spektrinėmis charakteristikomis, visuose kviečių sėlenų hidrolizatuose buvo rasta oligopeptidų. 3.13 lent. pateikiamos kviečių sėlenų peptidų, atskirtų ESCh-MS/MS metodu ir identifikuotų *Spectrum Mill* proteomikos programa, sulaukymo trukmės (ST), tikėtinos aminorūgščių sekos, MS/MS programinės analizės tikimybinės atitiktys (%), peptidų molekulinės masės ir baltymų, kuriems priklauso identifikuoti peptidai, pavadinimai UNIPROT duomenų bazėje [263].

3.13 lentelė. Peptidai kviečių sėlenų mėginiuose, identifikuoti *Spectrum Mill* programa

Nr. Bandinys	ST, min.	Aminorūgščių seka*	Atitiktis, %	Molekulinė masė, Da	Baltymo pavadinimas
1. B+PRB	18.82	NQSGQPQ	76,60	858,353	ω-gliadinas
2. B+PRB	19.47	PEPQQPEL	60,80	937,463	γ-prolaminas
3. B+PRB	19.83	LGQGLQP	78,10	712,404	D-hordeinas Lmul 2.4
4. B+PRB	20.57	KEEPQPQP	36,50	952,474	Neatpažintas baltymas
5. B+PRB	21.43	LVAKIL	71,70	656,471	Neatpažintas baltymas
6. B+PRB	21.98	GGLTTQQPQGGQQP	58,4	1396,682	D-hordeinas
7. B+PRB	22.10	EEPKQPQ	66,30	824,415	Neatpažintas baltymas
8. B+PRB	23.83	PFPEPQQPEL	42,00	1181,584	γ-prolaminas
9. P+PRB	19.43	PEPQQPEL	62,40	937,463	γ-prolaminas
10. P+PRB	19.90	KAQGIQP	70,50	741,426	Difunkcinis baltymas FoID
11. P+PRB	20.08	HQAFPQPQQT	75,50	1181,570	γ-gliadinas
12. P+PRB	21.45	LVAKIL	76,40	656,471	Neatpažintas baltymas
13. P+PRB	21.90	QPEQIIIPQQPQQPFPPQ TQ	77,30	3132,078	ω-gliadinas
14. P+PRB	22.12	EEPKQPQ	67,40	824,415	Neatpažintas baltymas
15. P+PRB	23.83	PFPEPQQPEL	42,90	1181,584	γ-prolaminas
16. B+P+PRB	18.77	NQSGQPQ	75,80	858,3527	ω-gliadinas
17. B+P+PRB	19.95	IGLQP	39,50	527,319	Neatpažintas baltymas

3.13 lentelės tęsinys. Peptidai kviečių sėlenų mėginiuose, identifikuoti *Spectrum Mill* programa

Nr.	Bandinys	ST, min.	Aminorūgščių seka*	Atitiktis, %	Molekuli- nė masė, Da	Baltymo pavadinimas
18.	B+P+PRB	20.02	EPQQPELPFP	63,30	1181,584	γ-prolaminas
19.	B+P+PRB	20.33	QQQVPQPQQPQ	60,70	1305,655	γ-gliadinas
20.	B+P+PRB	20.62	KEEPQPQP	34,70	952,474	Neatpažintas baltymas
21.	B+P+PRB	21.45	LVAKIL	67,40	656,471	Neatpažintas baltymas
22.	B+P+PRB	22.00	GGLTTQQPQGGQQP	53,60	1396,682	D-hordeinas
23.	B+P+PRB	22.22	PSPLQP	66,20	638,351	ω-gliadinas
24.	B+P+PRB	22.38	VQPEQP	56,30	697,352	AA domeną turintis baltymas
25.	B+P+PRB	23.82	PFPEPQQPEL	42,20	1181,584	γ-prolaminas
26.	B+P+PRB	24.68	GSVQPQQPP	61,20	937,474	α-gliadinas
27.	PRB	19.30	VGIGVG	43,10	501,304	MMM gluteninas A3-2
28.	PRB	19.78	LGQGLQP	73,60	712,399	D-hordeinas Lmul 2.4
29.	PRB	20.70	VRVPVQLQPQNPSQQ QPQEQ	94,30	2425,259	α/β gliadinas MM1
30.	PRB	20.80	VRVPVQLQPQNPSQQ QPQ	88,80	2168,158	α/β gliadinas MM1
31.	PRB	20.82	VRVPVQLQPQNPSQQ QPQE	87,20	2297,200	α/β gliadinas MM1
32.	PRB	22.27	LPYPQPQPF	75,20	1086,256	α/β gliadinas MM1
33.	PRB	22.78	VRVPVQLQPQNPSQQ QPQEQVPL	89,60	2734,464	α/β gliadinas MM1
34.	B	20.40	QQQVPQPQQPQQP	72,20	1530,767	γ-gliadinas
35.	B	20.90	PQQQPILPQQPP	59,80	1370,743	MMM gluteninas A3-5
36.	B	22.20	PSPLQP	63,30	638,351	ω-gliadinas
37.	B	23.82	PFPEPQQPEL	45,50	1181,584	γ-prolaminas
38.	P	19.27	VIGNATAI	67,30	746,405	TADe šeimos baltymas
39.	P	19.95	IGLQP	39,70	527,319	Neatpažintas baltymas
40.	P	20.50	QQQVPQPQQPQQP	65,70	1530,767	γ-gliadinas
41.	P	21.22	EEPKPQP	64,00	824,415	Neatpažintas baltymas
42.	P	21.55	DDHAAKA	64,10	727,337	ROK šeimos baltymas
43.	P	21.93	QPEQIIPQQPQQPFPQT Q	78,90	3132,078	ω-gliadinas
44.	P	21.95	QPEQIIPQQPQQPFPQT Q	82,10	3132,078	ω-gliadinas
45.	P	22.22	PSPLQP	61,70	638,351	ω-gliadinas
46.	P	23.12	PQQVVQIIPQQPQQPFP LHTNQPPQ	55,80	2918,528	ω-gliadinas
47.	B+P	20.32	ETHVELS	72,90	814,395	γ-gliadinas
48.	B+P	20.40	QQQVPQPQQPQ	63,70	1305,655	γ-gliadinas
49.	B+P	22.18	DLSFTLP	61,80	792,414	Energiją pernešantis baltymas
50.	B+P	22.22	PSPLQP	62,10	638,351	ω-gliadinas
51.	B+P	23.23	QQQVPQPQQPQQPF	69,70	1677,835	γ-gliadinas
52.	B+P	23.30	EHTLPLP	68,20	806,441	ROK šeimos baltymas
53.	B+P	26.23	SQQPRQFPQPQQPQQ PFPQPQP	75,50	2710,349	75k γ-sekalinas

3.13 lentelės tęsinys. Peptidai kviečių sėlenų mėginiuose, identifikuoti *Spectrum Mill* programa

Nr.	Bandinys	ST, min.	Aminorūgščių seka*	Atitiktis, %	Molekulinė masė, Da	Baltymo pavadinimas
54.	K	21.63	RVPVPQLQPQNPSQQQ PQEQVPLVQQ	93,50	2990,581	α/β gliadinas MM1
55.	K	22.30	VPVPQLQPQNPSQQQP QEQQVPLVQQ	91,80	2834,480	α/β gliadinas MM1
56.	K	22.95	VPVPQLQPQNPSQQQP QEQQVPL	85,30	2479,295	α/β gliadinas MM1
57.	K	25.00	APFASIVAGIGGQ	50,50	1187,642	γ -gliadinas
58.	K	26.21	LQLQFPQPQLPYQPQ PF	81,20	2263,620	α/β gliadinas MM1

*Peptidai, turintys imunotoksiškų sekų, paryškinti rausva spalva, peptidai, kurie šių sekų neturi, tačiau dėl didesnio aminorūgščių Gln ir Pro kiekio bei ilgesnės sekos gali turėti imunogeninį poveikį, pažymėti gelsva spalva;

K – kontrolė (su dejonizuotu vandeniu), B – bromelainas, P – papainas, B+P – bromelainas ir papainas, PRB – pieno rūgšties bakterijos, P+PRB – papainas ir PRB, B+PRB – bromelainas ir PRB, B+P+PRB – bromelainas, papainas ir PRB)

Iš gautų duomenų matyti, kad aminorūgščių atitikčių procentas pakankamai didelis (36,50–78,10%) ir labai didelis (55,80–94,30%) identifikuojant peptidus su ilgesnėmis aminorūgščių sekomis. MS analizės rezultatai patvirtino, kad pasirinktos biopriemonės kviečių sėlenoms fermentuoti sumažino imunotoksiškų gliadino frakcijų. Bandiniuose, apdorotuose augaliniais fermentais ir PRB, vyravo mažiausios molekulinės masės peptidai (527,319–1396,682 Da), bandiniuose, apdorotuose tik augaliniais fermentais, – vidutinio dydžio (638,351–1530,767 Da), o sėlenų bandiniuose po fermentacijos PRB ir kontroliniuose bandiniuose buvo rasta daugiau didesnės molekulinės masės (2168,158–2990,581 Da) peptidų. Nepaisant šių skirtumų, visuose bandiniuose buvo rasta peptidų, kurių sekos ilgesnės negu 9 aminorūgštys. Tokie peptidai galėtų sukelti nepageidaujamas reakcijas sergantiems CL ir jautrumą glitimui turintiems asmenims, todėl svarbu įvertinti šių bandiniuose rastų peptidų imunoreaktyvumą. Vertinimas buvo pagrįstas sekos tapatumo nustatymu su žinomais T ląstelių epitopais naudojant Nebraskos universiteto (Linkolnas, JAV) sukurtą CL sukeliančių peptidų duomenų bazę (3 versija, atnaujinta 2022-04-07, sąraše 1041 peptidas) ir su šia duomenų baze susietą baltymų rizikos vertinimo bioinformatikos įrankį [264]. Visus 3.13 lent. pateiktus peptidus patikrinus rizikos vertinimo įrankiu, teigiami sutapčių rezultatai pateikiami 3.14 lent.

Iš peptidų rizikos vertinimo analizės matyti, kad ne visuose kviečių sėlenų bandiniuose buvo rasta imunoreaktyvių epitopų. Imunogeninių fragmentų nerasta bromelainu, bromelainu ir PRB bei abiejų fermentų deriniu ir PRB apdorotuose kviečių sėlenų gliadinų bandiniuose, o daugiausia imunogeninių peptidų, priskiriamų α -gliadinams, rasta kontroliniame ir vien PRB apdorotuose bandiniuose. Remiantis šiais rezultatais galima konstatuoti, kad kviečių sėlenų fermentacija tik atrinktomis PRB kultūromis nesuskaidė nepageidaujamų imunoreaktyvių peptidų kviečių sėlenose. Iš CL sukeliančių peptidų duomenų bazėje pateikiamos informacijos (3.14 lent.) matosi, kad didžioji dalis rastų α -gliadinų imunoreaktyvių epitopų gali sukelti

reakcijos asmenims, turintiems ŽLA-DQ2 T-ląstelių rinkinius, tačiau nustatyti ir ω -/ γ -gliadinai, kurie sukelia CL simptomus asmenims su ŽLA-DQ2.5/8, taip pat rasta keletas skirtingo ilgio peptidų su epitopu VPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPL, kurio imuninis atsakas organizme nėra iki galo ištirtas.

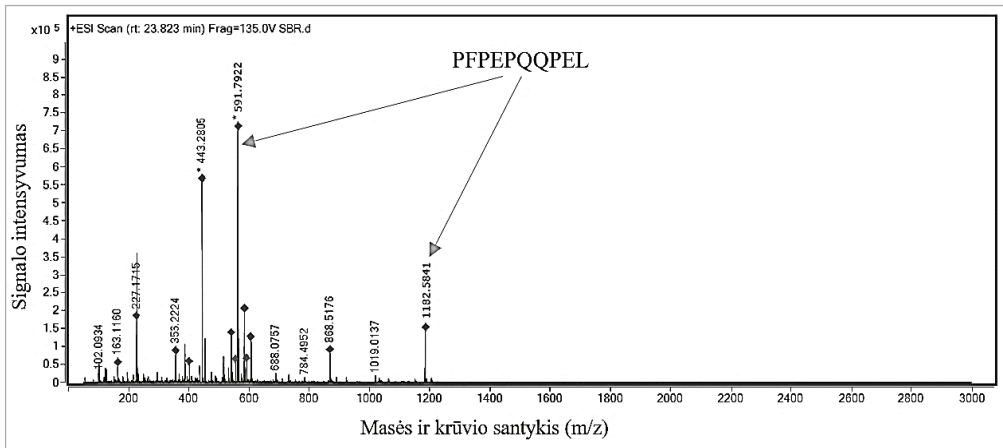
3.14 lentelė. CL sukeliantys glitimo peptidai kviečių sėlenų hidrolizės produktuose

Gliadinų peptidų aminorūgščių sekos*	ŽLA**	K	B	P	B+P	PRB	B+PRB	P+PRB	B+P+PRB
ω-gliadinai									
QPEQIIPQQPQQPFPQTQ	DQ2.5/8	-	-	+	-	-	-	+	-
PQQVVQIIPQQPQQPFPLHTNQPPQ	DQ2	-	-	+	-	-	-	-	-
α-gliadinai									
VRVPVPQLQPQNPSQQQPQEQ	DQ2	-	-	-	-	+	-	-	-
VRVPVPQLQPQNPSQQQPQ	DQ2	-	-	-	-	+	-	-	-
VRVPVPQLQPQNPSQQQPQEQ	DQ2	-	-	-	-	+	-	-	-
VRVPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPL	nežinoma	-	-	-	-	+	-	-	-
RVPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQ	nežinoma	+	-	-	-	-	-	-	-
VPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQ	nežinoma	+	-	-	-	-	-	-	-
VPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPL	nežinoma	+	-	-	-	-	-	-	-
LQLQPFQPQLPYQPQPF	DQ2	+	-	-	-	-	-	-	-
γ-gliadinai									
SQQPRQPFPQPQQPQQPFPQPQP	DQ2/8	-	-	-	+	-	-	-	-

*Peptidų sudėtyje paryškintos imunoreaktyvios sekos; **ŽLA – T-ląstelių rinkiniai, priklausantys nuo CL paciento genotipo, atpažįstantys skirtingus epitopus;

K – kontrolė (su dejonizuotu vandeniu), P – papainas, B – bromelainas, B+P – bromelainas, papainas, PRB – pieno rūgšties bakterijos, P+PRB – papainas ir PRB, B+PRB – bromelainas ir PRB, B+P+PRB – bromelainas, papainas ir PRB)

Kita vertus, kol kas nėra mokslinių duomenų dėl kitų bandiniuose rastų peptidų imunoreaktyvumo, todėl tikėtina, kad jie yra saugūs glitimo netoleruojantiems asmenims, tačiau išlieka tam tikra rizika dėl jų saugumo. Pavyzdžiui, bandinio, apdoroto bromelainu ir PRB (B+PRB), masių spektre rasti baltymų fragmentai, kurių nėra Nebraskos universiteto CL epitopų duomenų bazėje, tačiau jų aminorūgščių seka kelia abejonių dėl imunogeninio saugumo. Šis peptidas GGLTTQQPQGGQQP, priskiriamas D-hordeinams, teoriškai galėtų sukelti glitimo netoleravimo problemas, kadangi yra ilgesnis negu 9 aminorūgštys ir turi pasikartojančių Gln ir Pro sekų. γ -prolamino fragmentas PFPEPQQPEL, masių spektre identifiikuotas pagal dvi molekulių jonų [M-H]⁺ m/z reikšmes: 591,7922 (+2) ir 1182,5841 (+1) (3.25 pav.), taip pat nėra dažnai sutinkamas tarp glitimo skilimo produktų, jo sekoje nėra CL toksiškų motyvų QPYP, QQPY, PSQQ, QQQP, tačiau dėl didelio Gln ir Pro aminorūgščių likučių kiekio galėtų būti atsparus virškinimui žarnyne ir sukelti nepageidaujamas reakcijas. Kita vertus, pastebėta, kad, pritaikius kompleksinį apdorojimą augaliniais fermentais ir PRB, buvo iki galo suskaidyti visi α - ir γ -gliadinai, nes tarp skilimo produktų nebuvo rasta fragmentų, ilgesnių nei 8 aminorūgštys, kurios turėtų imunitoksiškų epitopų.



3.25 pav. γ -prolamino MS fragmentas PFPEPQQPEL kviečių sėlenų bandinyje, apdorotame bromelainu ir PRB

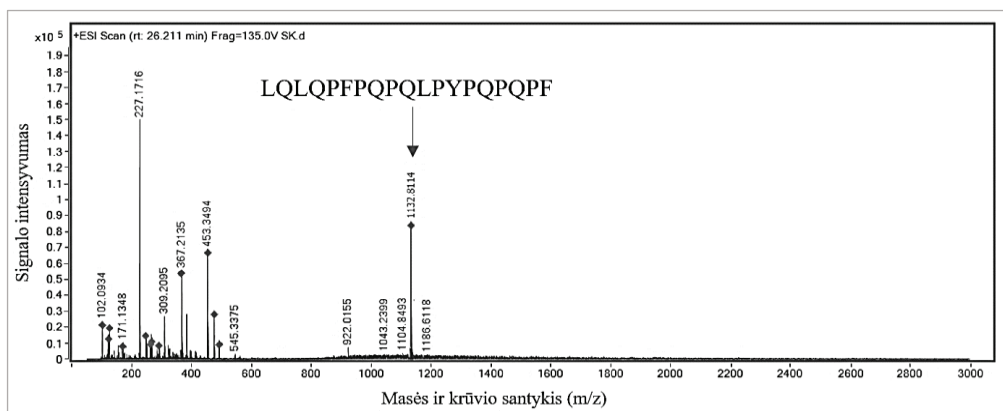
MS analizės rezultatai parodė, kad sunkiausiai hidrolizuojamas buvo kviečių sėlenų α/β gliadinas MM1 (UniProtKB-P18573). Šio baltymo molekulinė masė 35397 Da, sudarytas iš 307 aminorūgščių (3.26 pav.).

MKTFLILALL AIVATTARIA **VRVPVQLQP QNPSQQQPFQ QVPLVQQQF** PGQQQFFPPQ
 QPYPQPQFPF SQQPY**LQLQP FPQPQLPYPQ PQLPYPQPQL YYPQPQFPRP** QQPYPQSQPQ
 YSQPQQPISQ QQQQQQQQQQ QKQQQQQQQQ ILQQILQQQL IPCRDVVLQQ HSIAYGSSQV
 LQQSTYQLVQ QLCCQQLWQI PEQSRCQAIH NVVHAILHQ QQQQQQQQQQ QPLSQVFSFQQ
 PQQQYPSQG SFQPSQQNPF AQGSVQFQQ PQQFEEIRNLA LETLPAMCNV YIPPYCTIAP
 VGIFGTN

3.26 pav. α/β gliadino MM1 (UniProtKB-P18573) aminorūgščių seka.

*Sekoje paryškinti likę nesuskaidyti peptidai

Šio baltymo įvairaus ilgio imunoreaktyvių skilimo produktų daugiausia rasta kviečių sėlenų kontroliniuose (K) ir PRB fermentuotuose bandiniuose (PRB), tačiau jų nerasta bandiniuose, kompleksškai apdorotuose augaliniais fermentais kartu su PRB (3.14 lent.). Būtent α/β gliadino MM1 daug Pro ir Gln turintys peptidai dažniausiai sukelia reakciją CL sergantiems asmenims. Kontroliniame kviečių sėlenų mėginyje buvo rasti 4 skirtingo ilgio šio gliadino peptidai, kas parodė, kad, inkubuojant sėlenas 12 val. 30–45 °C temperatūroje, aktyvavosi jų endogeniniai fermentai, turintys specifinių savybių skaidyti baltymus, tačiau šio gliadino skaidymo atveju jos buvo ribotos. Tai įrodė kontrolinio sėlenų mėginio baltymų spektruose nustatytas molekulinis jonas m/z 1132,8114 (+2) (3.27 pav.), pagal kurį identifikuoti α -gliadino fragmentas LQLQFPQPQLPYPQPQPF, kurio masė 2263,620 Da.



3.27 pav. α -gliadino fragmentas LQLQPFPPQQLPYPPQPF kontroliniame kviečių sėlenų bandinyje

Nustatyta, kad kai kurie ω -gliadinai, tarp jų 62485 Da ω -gliadinas (UniProtKB-A2F452), sudarytas iš 553 aminorūgščių (3.28 pav., a) buvo visiškai hidrolizuoti, nes substratuose nebuvo rasta peptidų, ilgesnių negu 7 aminorūgščių liekanos. Sunkiausiai skaidomas buvo ω -gliadinas, kurio molekulinė masė 36767 Da (UniProtKB-C0KEI8), sudarytas iš 314 aminorūgščių (3.28 pav., b). Šio gliadino imunogeninių peptidų sekų buvo rasta kviečių sėlenų substratuose, apdorotuose papainu bei jo deriniu su PRB, tačiau nerasta bandiniuose, kurių hidrolizei naudotas bromelainas.

- a
- | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|
| MHRTPVVFIR | LNQISNVNAP | SQNNQMFSLI | VKLLPNTRED | HTELHGTRNL | ITDITWSFPM |
| TNINVEQISL | TLKMNSNNAD | VAKLTLPLKW | FRPDTVRE | YPMRGILQTA | PQIMADLDVH |
| ISAKGELPFT | APPASLAVIP | AWRSAQPINV | NPQQAYANVP | ISGPGWANPF | EPQPDHVPPA |
| PVIPNTPQGN | KLIKRTNLIQ | QVRPAPNPYL | QNDQPQHQS | GPPLIAAGPT | MPPPTFLIPP |
| QPQQPKIVEV | REDPTDRTHD | LQKTILEKRK | QRLQQENSDN | ENDDEEEFTY | EYESEVEEEE |
| IEQEPQQEQE | QSLQQFNQSS | QPQQQPQYQY | QYPQMPQPQV | IYLPFGQQPP | QPQYVYYQPP |
| PPQNQAPNQ | QPQPYVYVQ | APPPQQVPMQ | IQNQSGQPQF | VYMQPPPPQP | YVYMQPGGQP |
| QQVIYLPQGG | VPFNPQQNPS | YQAPQPTQQP | AFQPRPADAP | ARIVTHHPQ | SQFQMRPPPP |
| QRTENTAMIK | ENTAAPVTDL | GVPAEGDVVA | ESVSGGMPQN | GKLDDNLQSL | DMDKAKKSHK |
| SLGEIKEGLL | ADK | | | | |
- b
- | | | | | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------|------------|------------|
| ARQLNPSNRE | LQSPQQSFH | QQQFPKQSS | YPQQPYPPQ | YPPQQPYPSQ | QPFPTPQQQF |
| PQQPQQLFQ | PQQSPPPQP | QFPFPQQPF | PWQPQQPFPL | QPQQPFPQF | QQPQQPFPQ |
| QLPFPQ QPEQ | IIPQQPQPF | PQTQLPFPQ | PEQIIPQQP | QFPFPQQPF | FPQQQFPQF |
| QPIPLPQQP | FPPQPRQPF | QPEQFPQQP | QQPFLPPHQ | PFPQQRQSSQ | QSFPQFPQ |
| PQRPSILQP | QPLPRPQQP | QKFLQSQQP | LPQQPEQIIS | QQPQQPFPQ | PHQPQQPYLQ |
| QQPSGSSVTS | IGGQ | | | | |

3.28 pav. ω -gliadinių UniProtKB-A2F452 (a) ir UniProtKB-C0KEI8 (b) aminorūgščių sekos

Nustatyta, kad augalinių fermentų skaidymui atspariausi buvo γ -gliadinai (Cys turintys gliadinai, stabilizuoti disulfidiniais ryšiais), nes būtent jų imunoreaktyvių sekų daugiausia rasta tarp hidrolizės produktų. Vienas iš tokių – γ -gliadinas UniProtKB-P08453, kurio molekulinė masė 37,122 kDa, sudarytas iš 327 aminorūgščių (3.29 pav.). Šio gliadino įvairaus ilgio skilimo produktų rasta bandiniuose, hidrolizuotuose papainu ir fermentų deriniu.

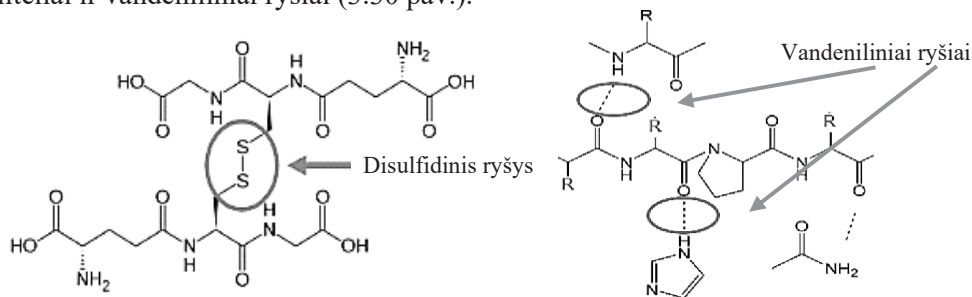
MKTLILITIL AMAITIGTAN IQVDPSGQVQ WLQQQLVPQL QQPLSQQPQQ TFPQPQQTFF
 HQPQQQVPQP QQPQQPFLQP QQPFPQQPQQ PFPQTQQPQQ PFPQQPQQPF PQTQQPQQPF
 PQQPQQPFPQ TQQPQQPFPQ LQQPQQPFPQ PQQQLPQPQQ PQQSFPQQQR PFIQPSLQQQ
 LNPCKNILLQ QSKPASLVSS LWSIWPQSD CQVMRQCCQ QLAQIPQQLQ CAAIHSVVS
 IIMQQQQQQQ QQQGIDIFLP LSQHEQVGQG SLVQGQGIIQ PQQPAQLEAI RSLVLQTLPS
 MCNVYVPEEC SIMRAPFASI VAGIGGQ

3.29 pav. γ -gliadino UniProtKB-P08453 aminorūgščių seka

Gliadinų skaidymo rezultatai po fermentacijos, gauti MS metodu, koreliuoja su kitų autorių tyrimais, kuriuose po kviečių produktų apdorojimo PRB monokultūromis arba jų mišiniais bandiniuose taip pat buvo rasti imunoreaktyvūs glitimo skilimo produktai [168], tačiau, kietųjų kviečių miltus apdorojus įvairiomis PRB išgrynintomis peptidazėmis kartu su grybiniu fermentu AN-PEP, gaminiuose imunoreaktyvių epitopų nebuvo rasta [253]. PRB ir AN-PEP derinio efektyvumas skaidant glitimą taip pat buvo analizuotas Pilolli ir kt. [82] duonos gamybos procese (imant 30 % tokiu būdu paruošto raugo ir 70% natūraliai glitimo neturinčių kultūrų miltų), tačiau, priklausomai nuo kviečių genotipo, dalyje šių gaminių buvo rasta imunogeninių peptidų.

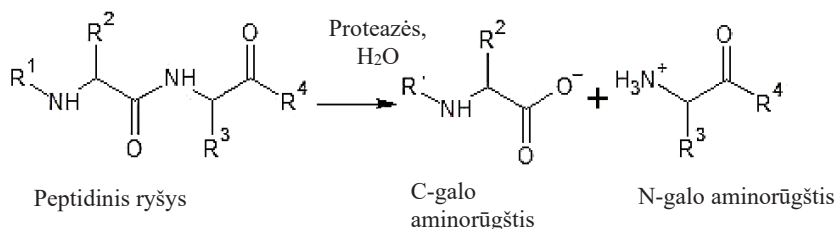
3.4.8. Glitimo baltymų fermentinės hidrolizės mechanizmas

3.7.2. ir 3.7.3. skyriuose buvo įrodyta, kad taikant skirtingas biopriemonės ir jų derinius aktyviai vyko glitimo baltymų skaidymas. Tikėtina, kad pirmaisia buvo nutraukti atskiras glitimo grandines jungiantys ryšiai, o svarbiausi iš jų – disulfidiniai tilteliai ir vandeniliniai ryšiai (3.30 pav.).



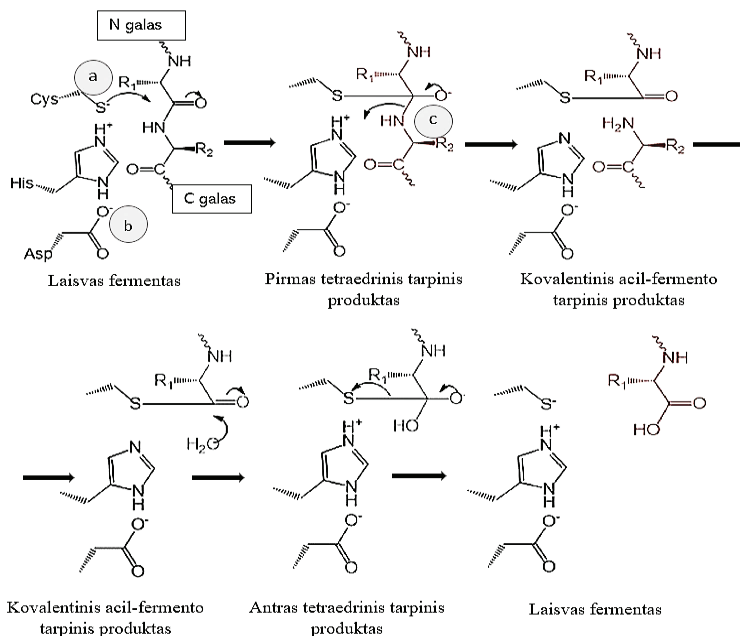
3.30 pav. Glitimo antrinę struktūrą palaikančių jungčių nutraukimas

Šį procesą katalizavo Cys, Ser proteinazės, kurių turi grūdų endogeniniai fermentai, augalų bei PRB fermentai. Toliau vyko glitimo peptidinių grandinių hidrolizė prisijungiant vandenį (3.31 pav.).



3.31 pav. Principinė peptidinių ryšių hidrolizės schema

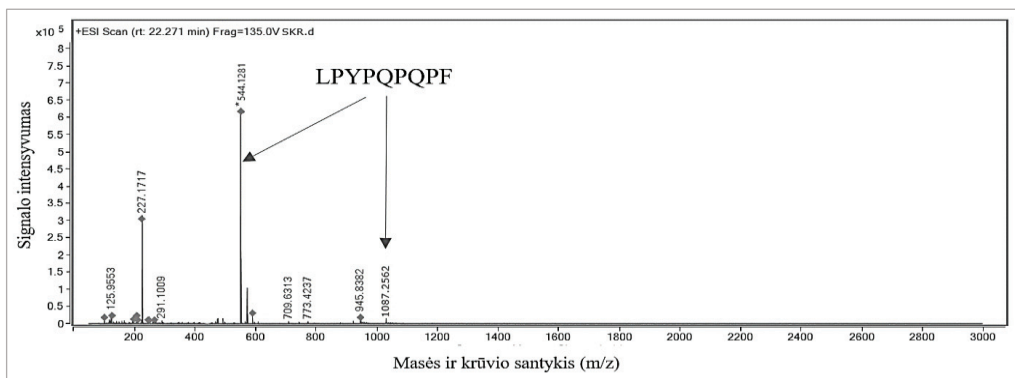
Šiame procese gali dalyvauti platus spektras proteazių. Visų klasių fermentų peptidinio ryšio hidrolizės mechanizmas iš esmės yra labai panašus. Fermentų aktyviuose centruose esančios grupės protonuoja anglį, kuri yra arčiausiai peptidinio ryšio, šis nutrūksta, susidaro tarpiniai produktai, lengviau išsilaivina aminorūgštys ir prijungiamas vanduo. Cys ir Ser proteazių aktyviuose centruose funkcinės grupės paprastai yra suporuotos su protonus atimančiomis grupėmis, kad būtų skatinama nukleofilinė peptidinio ryšio ataka, o Asp proteazės ir metaloproteazės aktyvuoja vandens molekulę, kuri atlieka nukleofilo vaidmenį, o ne naudoja paties fermento funkcinę grupę. 3.32 pav. pateikta Cys proteazių veikimo schema.



3.32 pav. Cys proteinazių veikimo mechanizmas: a – deprotonuotas Cys, b – Asp-175 liekana, c – tetraedrinis tarpinis junginys. Sudaryta remiantis Shafee [284]

Cys proteazės turi aktyviąją vietą, kurią sudaro trys liekanos: Cys-25, His-159 (a) Asp-175 (b). Cys-25 esanti sulfhidrilo grupė dažnai sudaro kovalentinius ryšius su substratais. His-159 palaiko Cys-25, o Asp-175 tiesiogiai nedalyvauja katalizės mechanizme, tačiau palaiko His-159 stabilizuotą imidazolo formą. Fermentinės hidrolizės mechanizmas prasideda, kai peptidas prisijungia prie aktyviosios vietos. Tada Cys-25 deprotonuojamas His-159 liekanos ir atakuoja substrato karbonilo anglį. Susidaro kovalentinis tetraedrinis tarpinis junginys, kurį stabilizuoja oksianijono skylė [284]. Toliau His-159 veikia kaip rūgštis, protonuodama peptidinio ryšio azotą, amino grupė atsiskiria, o karbonilinė grupė persitvarko. Tada laisva C-galinė peptido dalis atsilaivina, į aktyviąją vietą patenka vanduo ir atakuoja karbonilo anglį, o His-159 ją deprotonuoja, vėl susidarant oksianijono skylėmis stabilizuotam tetraedriniam kovalentiniam tarpiniam junginiui. Galiausiai karbonilas persitvarko, o Cys-25 grupė atsiskiria, atpalaiduodama peptido N-galinę dalį ir regeneruodama fermentą.

Taigi, tyrimo rezultatai parodė, kad skirtingos biologinės priemonės skaidė skirtingas glitimo peptidų jungtis, nes susidarė skirtingi hidrolizės produktai. Nustatyta, kad kompleksinio apdorojimo metu buvo suskaidytas ir α -gliadino 33 aminorūgščių fragmentas LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF, kuris laikomas atspariausiu fermentiniam skaidymui [91, 93], tad aktualu išanalizuoti, kaip vyko jo hidrolizės procesas bromelainu ir papainu bei augalinių fermentų ir PRB deriniu. Kadangi augaliniai fermentai bromelainas ir papainas nėra įtraukti į internetinio įrankio, kuris parodo potencialias aminorūgščių sekų kirpimo vietas, fermentų sąrašą (https://web.expasy.org/peptide_cutter/), tai prognozuojamos skilimo vietos, numatytos remiantis tiekėjų pateikta informacija, mokslinė literatūra ir MS fragmentų analize. Žinoma, kad bromelainas skelia peptidinius ryšius po Tyr, tad tikėtina, kad α -gliadino peptido hidrolizė pirmiausia vyko pagal tokią schemą: LQLQFPQPQLPY↓PQPQLPY↓PQPQLPY↓PQPQPF. Moksliniais tyrimais [253, 285] buvo nustatyta, kad nė viena atskirai naudojama PRB padermė neskaldo šio fragmento, tam reikalingas kelių PRB mišinys arba papildomi fermentai, kurie suskaidytų šį fermentą į peptidus, tinkamus tolimesnei PRB hidrolizei. *Lactobacillus* sp. gamina proteolitinių fermentų mišinį: metaloendopeptidazes (EC 3.4.24), pvz., PepO aminopeptidazes (EC 3.4.11), pvz., PepN ir PepC, dipeptidil- ir tripeptidilpeptidazes (EC 3.4.14), pvz., prolinui būdingą dipeptidilpeptidazę (PepX) [161]. Aminopeptidazės (PepN), kurių turi dauguma PRB, paprastai atskelia vieną aminorūgštį nuo peptido galo: L↑QLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF. Prolindipeptidazės (PepO), kurios yra būdingos daugumai *L. plantarum* padermių ir kurių buvimą fermentuojamuose substratuose patvirtino *Spectrum Mill* programa, skaido peptidą pagal schemą: LQ↑LQFPQPQ↑LPYPQPQ↑LPYPQPQ↑LPYPQPQPF, o PEP nutraukia ryšius tarp Pro ir Phe: LQLQP↑FPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF. Įvertinus visų proteazių potencialias peptidų skaidymo vietas, tikėtina, kad peptidas buvo suskaidytas iki fragmentų: L↑Q↑LQP↑FPQPQ↑LPY↓PQPQ↑LPY↓PQPQ↑LPY↓PQPQPF. Veikiant tik PRB proteazėms, galinis fragmentas LPYPQPQPF dažniausiai lieka nesuskaidytas. Tai patvirtino MS analizė, kai šis peptidas buvo identifikuotas sėlenų bandiniuose, apdorotuose tik PRB pagal molekulinį jonų m/z reikšmes 544,1281 (+2) ir 1087,2562 (+1) (3.33 pav.).



3.33 pav. α -gliadino fragmentas LPYPQPQPF sėlenų bandinyje, apdorotame PRB

Žinant, kad papainas specifiškai skaido peptidinius ryšius po Arg ir Lys, jis mažiau tinkamas α/β gliadinų hidrolizei ir hidrolizės efektas nustatytas mažesnis.

Apibendrinant atliktų tyrimų duomenis, galima teigti, kad maksimalus proteolitinis aktyvumas buvo nustatytas kompleksiskai derinant fermentinę hidrolizę bromelainu su PRB fermentacija – kviečių sėlenose buvo nustatytas tik 1,06 % pradinio glitimo kiekis, šiame mėginyje nebuvo rasta imunoreaktyvių epitopų, kurie gali sukelti ligas glitimui jautriems asmenims. Skirtingą proteolitinį specifiškumą turintys išgryninti augaliniai fermentai bromelainas ir papainas bei atrinktos PRB kultūros papildė vieni kitų veikimą skaidant kviečių sėlenų glitimą, t. y. augalinių fermentų hidrolizės produktai buvo panaudoti kaip substratas PRB intraląstelinėms mono-, di- ir oligopeptidazėms. Didžiausiu aktyvumu kartu su PRB pasižymėjęs bromelainas būtų geresnė alternatyva šiuo metu naudojamiems mikroorganizmų fermentams, nes yra palyginti pigus, naudojamas medicininėje terapijoje gydant uždegimines ir žarnyno ligas, turi antitrombozinį ir vėžį stabdantį poveikį [286], vienintelis jo trūkumas – galimas retas alerginis poveikis jautriems žmonėms [287]. Taip pat kadangi bromelainas aktyvus esant rūgštiniam pH, tęsiant tyrimus, būtų tikslinga ištirti paprastesnį kompleksinio apdoravimo variantą apdorojant kviečių produktus ne nuosekliai, o fermento į substratą pridedant kartu su PRB.

3.5. Biologinėmis priemonėmis apdorotų kviečių sėlenų panaudojimo mažai glitimo turinčių kepinų gamyboje rekomendacijos

Remiantis tyrimo rezultatais, fermentinei hidrolizei naudojant pasirinktas biopriemonės – bromelainą bei PRB (*L. acidophilus* 308, *L. brevis* R-1 ir *L. plantarum* P-1) mišinį, glitimo kiekį kviečių sėlenose pavyko sumažinti iki 620 ± 43 mg/kg, tačiau liko nedidelės molekulinės masės peptidų. Nors tyrimas parodė, kad juose nėra CL sukeliančių epitopų, tarp skilimo produktų gali būti fragmentų, sukeliančių nepageidaujamas reakcijas glitimui itin jautriems asmenims. Taigi, taip apdorotas sėlenas galima naudoti tik mažai glitimo turinčių (iki 100 mg/kg) produktų gamyboje, smulkiai sumaltų sėlenų dedant iki 15% (geriausia 6–12%) nuo kitų sausų produktų masės. Ankstesniais moksliniais tyrimais nustatyta, kad kvietinės duonos su maltomis sėlenomis tekstūra gaunama geriausia, kai derinama PRB ir mielių (*S. cerevisiae*) fermentacija [274], todėl gaminant raugą rekomenduojama naudoti atrinktų PRB (*L. acidophilus* 308, *L. brevis* R-1 ir *L. plantarum* P-1) derinį su mielėmis.

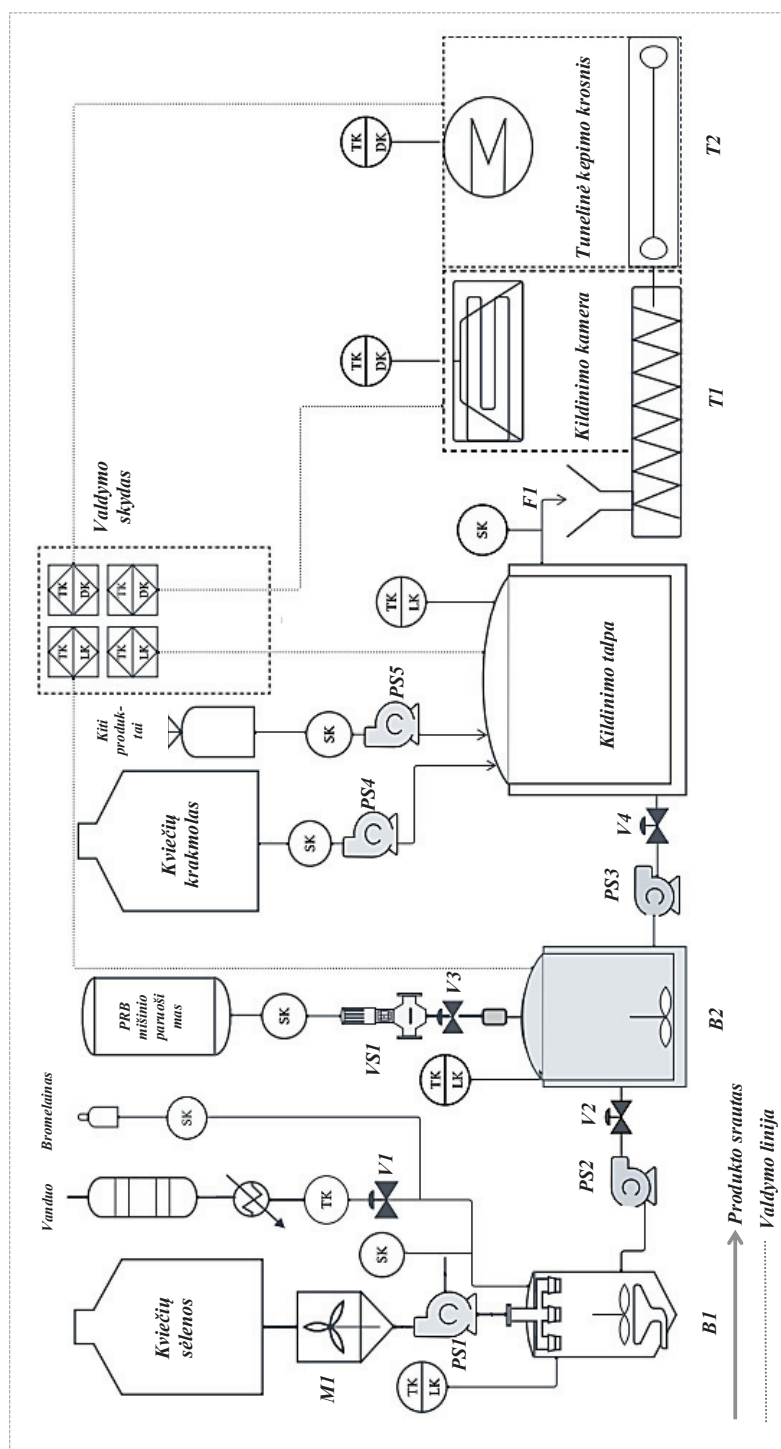
Kitas technologinis iššūkis kepinų be glitimo iš kviečių šalutinių perdirbimo produktų gamyboje yra glitimo pakeitimas alternatyviais ingredientais, nes jis yra esminis struktūrą formuojantis baltymas, būtinas aukštos kokybės grūdiniams produktams gaminti. Ši problema aktuali gaminant iš žaliavų, kurios natūraliai neturi glitimo baltymų (krakmolo, ryžių, grikių, kukurūzų miltų), tačiau išlieka ir gaminant iš kviečių produktų, kuriuose glitimas yra hidrolizuotas [288]. Norint užtikrinti tinkamą produktų be glitimo tekstūrą, gamyboje naudojami įvairūs hidrokoloidai (hidroksipropilmetilceliuliozė, agaras, guaras, ksantano dervos ir t. t.) bei procesai (krakmolo kleisterizavimas, riebalų emulgavimas ir pan. [210, 289].

Nepertraukiamo veikimo proceso schema, skirta mažai glitimo turinčių kepinų gamybai su kompleksinio biotechnologinio metodo žingsniu, pateikiama 3.34 pav. Kaip žaliavą mažai glitimo turinčių kepinų gamybai rekomenduojama naudoti

termiškai neapdorotas ir smulkiai sumaltas kviečių sėlenas. Sėlenos iš talpyklos vamzdynu patenka į malūną M1, kur smulkiai sumalamos ir peristaltiniu siurbliu PS1 vamzdynu transportuojamos į biofermentatorių B1, kuriame sumaišomos su 45°C bromelaino tirpalu (fermento koncentracija – 0,5% nuo sėlenų masės, imama 30% sėlenų ir 70% vandens). Gamybos procese dozuojuant žaliavas vykdoma svorio kontrolė (SK), o srautai valdomi vožtuvais (V1– V4). Biofermentatoriuje vykdoma temperatūros ir laiko kontrolė (45°C, 2 val.).

PRB suspensijai paruošti kultūros sėjamos į MRS agarą (Biolife, Italija) ir inkubuojama 30°C (*L. plantarum* P-1, *L. brevis* R-1) ir 37°C temperatūroje (*L. acidophilus* 308) 24 val., tada kultūros 2 kartus plaunamos distiliuotu vandeniu, kiekviena PRB kultūra atskirai suspenduojama vandenyje, atskiriama centrifuguojant (10000 aps./min., 4°C), ląstelių tankis turi būti apie 10^8 KfV/ml. Trijų PRB kultūrų suspensijos sumaišomos lygiomis dalimis. Paruošta suspensija (dozuojuant iki 10%) vertikaliu siurbliu VS1 vamzdynu pernešama į biofermentatorių B2, kur patenka ir sėlenos su bromelainu, nepertraukiamai maišant fermentacija vykdoma 2 val. palaikant 30°C temperatūrą ir 10 val. palaikant 37°C temperatūrą.

Iš biofermentatoriaus B2 masė peristaltiniu siurbliu PS3 perpumpuojama į kildinimo talpą, kur vamzdynu transportuojami kiti sausi produktai: kviečių krakmolai arba natūraliai glitimo baltymų neturintys miltai (optimalus kiekis 30%), kepinio mielės (1–2%), druska (iki 2,0%) ir tekstūrą pagerinanti medžiaga (guaro derva, ksantano derva ar jų mišinys 0,5–1%, hidrokoloidai prieš naudojimą išbrinkinami nedideliame vandens kiekyje). Mažiau glitimo turintiems kepiniams gali būti naudojami natūraliai glitimo neturinčių kultūrų (ryžių, grikių, kukurūzų) miltai ar jų mišiniai. Į pagerintus gaminius galima dėti kiaušinių, cukraus, sviesto ir kitų produktų. Tešla išmaišoma ir kildinama 1,5 val. 30 °C temperatūroje.



Iš kildinimo talpos tešla patenka į dozavimo ir formavimo įrenginį F1. Suformuoti gaminiai dar 0,5 val. kildinami ant transportavimo linijos T1 esant 35°C. Gaminiai kepami tunelinėje krosnyje 30–50 min. 220–250°C temperatūroje, priklausomai nuo gaminio dydžio. Kildinimo ir kepimo kameroje automatiškai būdu palaikoma temperatūros ir drėgmės kontrolė.

Pastaba. Norint įrodyti, kad iškeptas gaminyje atitinka mažiau glitimo turinčių produktų grupei keliamus reikalavimus (iki 100 mg/kg), būtina atlikti kiekvienos gamybinės partijos produktų glitimo kontrolės tyrimą ELISA R5 metodu.

Taikant šią technologiją, buvo sukurta keletas gaminių, kurių receptūros pateiktos 5 priede. Geriausiomis tekstūros ir juslinėmis savybėmis pasižymėjo duona su guaro bei ksantano derva. Nustatyta duonos drėgmė 23,86–26,12%, pH – 5,39–5,65, rūgštingumas – 5,20–5,31°N. Tokios duonos, paruoštos su kviečių sėlenų PRB raugu ir kviečių krakmolu, minkštume nustatytas 81,10–94,5 mg/kg glitimo kiekis, kas atitinka reikalavimus mažai glitimo turintiems kviečių produktams.

Kadangi tyrimo metu nustatyta, kad aktyviausiai kviečių sėlenų glitimą kartu su PRB hidrolizuoja bromelainas ir jo aktyvumas didžiausias esant pH 4–5, o toks pH susidaro substrate PRB fermentacijos metu, tęsiant tyrimus būtų tikslinga nustatyti, ar būtina laikytis kviečių sėlenų apdorojimo nuoseklumo. Tikėtina, kad panašus efektyvumas turėtų būti pasiektas ir taikant lygiagrečių apdorojimą (t. y. bromelaino fermentą naudojant PRB fermentacijos metu). Be to, būtų aktualu ištirti, kokią poveikį hidrolizės efektyvumui turėtų kviečių sėlenų terminis apdorojimas – ar panašus efektas būtų pasiektas kaip tyrimų objektą naudojant komercinėje rinkoje prieinamas sėlenas.

Nors šiame tyrime įrodyta, kad po apdorojimo bromelaino ir atrinktų PRB mišinio kompleksu imunoreaktyvių epitopų sėlenose nelieka, prieš tokios technologijos praktinį pritaikymą reikėtų atlikti papildomus klinikinius tyrimus, įrodančius produktų saugumą CL sergantiems asmenims.

4. IŠVADOS

1. Celiakijos paplitimas pasaulyje, remiantis biopsijos tyrimais, yra 0,77%, pagal serologinių tyrimų rezultatus – 1,25%. Didžiausias CL paplitimas (1,07%) nustatytas Europoje. Stipri teigiama koreliacija ($r = 0,88$, $p < 0,05$) tarp kviečių vartojimo ir CL paplitimo buvo nustatyta įvertinus duomenis pagal žemynus, tačiau nenustatyta koreliacijos ($r = -0,036$; $p > 0,50$) tarp CL paplitimo ir atskirų šalių kviečių vartojimo duomenų. Kviečių vartojimo pokyčiai per pastaruosius kelis dešimtmečius neturi reikšmingos įtakos CL paplitimui.
2. Biologinės sėlenų hidrolizės priemonės turi skirtingą bendrą ir specifinį proteolitinį efektyvumą:
 - 2.1. Didžiausiu bendru proteolitinio pajėgumu ir stipriausiomis glitimo hidrolizės savybėmis pasižymi *Lactiplantibacillus plantarum* P-1, *Levilactobacillus brevis* R-1 ir *Lactobacillus acidophilus* 308 kultūros, kurios fermentuojant 24 val. glitimo kiekį kviečių sėlenose sumažino 72,97–88,83%.
 - 2.2. Ananasų (*Ananas comosus*), kivių (*Actinidia deliciosa*) ir papajų (*Carica papaya*) vaisių permeatų proteazių glitimo hidrolizės efektyvumas kviečių sėlenų substratuose siekia iki 99,10% per 24 val.
 - 2.3. Mikroorganizmų fermentai alkalazė, neutrazė ir flavorzimas efektyviai skaido glitimą kviečių sėlenose esant pH 6,6–6,7. Kviečių sėlenų substratuose veikiant šioms proteazėms glitimo kiekis per 4 val. sumažėja 94,70–95,26%.
 - 2.4. Augalų fermentai aktyviai veikia neutralioje terpėje, bromelainas per 4 val. hidrolizuoja 93,01%, papainas – 95,23 % glitimo kviečių sėlenose.
3. Papaino ir bromelaino derinys sinerginio poveikio proteolitiniam aktyvumui neturi. Optimali hidrolizei augalinių fermentų koncentracija yra 0,5% esant 45°C temperatūrai. Didžiausią įtaką glitimo hidrolizei kviečių sėlenose turi pasirinktas fermentas ($F = 15,60$, $p < 0,01$) ir jo koncentracija ($F = 45,89$, $p < 0,01$).
4. Kviečių sėlenas nuosekliai apdorojus biopriemonių kompleksu – bromelainu ir papainu bei atrinktų PRB *L. plantarum* P-1, *L. brevis* R-1 ir *L. acidophilus* 308 mišiniu, gautas didesnis glitimo hidrolizės efektyvumas nei naudojant pavienes biopriemones. Komplekse su PRB didžiausiu hidrolizės efektyvumu pasižymi bromelainas, kur substratuose gaunama didžiausia tirpių baltymų koncentracija 3,47 mg/ml (22,59% daugiau, palyginti su kontrole), laisvų aminorūgščių koncentracija (4,027 g/100 g, 5,86 karto daugiau, palyginti su kontrole), pasiekiamas iki 98,94% glitimo hidrolizės efektyvumas ir tarp skilimo produktų nelieta imunoreaktyvių epitopų.
5. Apdorotos biopriemonių kompleksu – bromelainu ir PRB mišiniu – kviečių sėlenos yra tinkamos mažai glitimo turinčių produktų gamybai. Gaminiams ruošti rekomenduojamas iki 10–12% fermentuotų sėlenų priedas nuo kviečių krakmolo arba beglitimių miltų masės. Nors įrodyta, kad po apdorojimo biopriemonėmis imunoreaktyvių epitopų sėlenose nelieta, reikia papildomų klinikinių tyrimų, kurie įrodytų visišką produktų saugumą celiakija sergantiems asmenims.

5. SUMMARY

INTRODUCTION

Globally, wheat is one of the most widely consumed food grains, however, the gluten present in wheat flour products causes food intolerance-related reactions or diseases in consumers sensitive to wheat protein. One of the most common diseases caused by gluten is celiac disease (CD). Currently, the only possible and effective treatment for CD is a strict gluten-free diet. Diseases related to food allergies and intolerances are becoming more frequent all over the world, and the same applies to CD. Therefore, the number of people who require gluten-free diet is growing as well. Gluten-free diet requires exclusion of products made from wheat, rye, barley, and, in some cases, oat, thus, alternative raw materials need to be chosen for food production. Although public opinion is that this alternative cereal diet is healthier, its benefits have not been proven by scientific studies. Compared to traditional wheat products, gluten-free products often contain more sugar, fat, but less B group vitamins, minerals, and fiber. That is why the complete exclusion of grain cultures can be non-beneficial or even harmful to the organism. Healthy individuals should certainly not restrict cereals, they should only prefer whole grain products, which are more favorable to health.

Gluten-intolerant consumers are often constrained by a lack of gluten-free products on the market that are similar in sensory properties, price and nutritional value to traditional bread, confectionery, and other wheat products. The increasing demand for such products requires the search for new production methods and strategies to eliminate or reduce the allergenic effects of wheat gluten. Despite a number of studies carried out in recent years that use physical and biological means to hydrolyse gluten, such products are almost non-existent on the market and the range of wholegrain gluten-free products that can be safely consumed by people with CD needs to be extended. For these reasons, it is essential to investigate tools for eliminating/reducing the immunogenicity of wheat, to apply them in the technology of bread, pasta, and confectionery products, and to provide manufacturers with guidelines for the development of such gluten-free or low-gluten food products.

Considerable amount of studies related to the removal of gluten from wheat raw material can be found in the scientific literature, however, the most common object of research is white wheat flour, which contains a high amount of starch, gluten, but few biologically valuable substances. The high content of gluten proteins in flour usually makes it difficult to achieve the desired hydrolysis effect: high enzyme concentrations, long treatment times, etc. are required.

In order to optimize the bio-treatment process and to expand the production of gluten-free wheat products with higher nutritional value, it is worth exploring the possibilities of reducing the gluten content of wheat by-products obtained from wheat fractionation by bio-treatment. The bran fraction from wheat processing is rich in biologically valuable nutrients, mainly non-starch polysaccharides, B group vitamins, and micronutrients necessary for the body, but only a very small proportion of the produced bran is currently used in food production. Little research has also been carried out on the potential for degradation of the immunoreactive proteins they

contain. In order to achieve sustainable economic development and the introduction of sustainable technologies into the industry, it would be preferable to use wheat bran for the production of gluten-free products, only the problem of effectively removing the residual gluten protein needs to be solved.

The immunoreactivity of food proteins can be reduced by removing or degrading the protein fragments that trigger immune reactions. Hydrolysis of wheat gluten proteins can be induced by exposure to strong acids or alkalis, some physical methods of exposure, but biological/biotechnological means are the most promising in the context of food safety as they produce better results under natural conditions, have the least negative impact on biologically active substances, and in some cases even promote their activity.

After assessing the potential of biological tools, it would be appropriate to focus on research of the effectiveness of these tools to eliminate or reduce the immunogenicity of wheat products. Research at the KTU Food Institute has previously shown that some lactic acid bacteria (LAB) cultures from the KTU Food Institute micro-organism collection had active proteolytic enzymes, but their ability to hydrolyse gluten has not been investigated. Since studies by other researchers have shown that LAB fermentation alone is able to break down only a fraction of wheat gluten fragments, it would be appropriate to combine the effects of LAB with other biological tools, such as enzymatic hydrolysis.

It is likely that the combined effect of the biological measures would be sufficiently effective to remove or at least significantly reduce gluten residues from wheat bran. This type of bio-treated wheat bran could be used in bakery or other gluten-free products with higher nutritional value and good technological and sensory properties. These products could be used not only by people suffering from gluten intolerance but also by other personalised consumer groups.

The aim of this thesis is to investigate the possibility of reducing the immunogenicity of gluten in wheat bran through the selection and complex application of biotechnological measures.

Objectives of the dissertation:

1. To evaluate the relationship of wheat consumption and its dynamics with the prevalence of celiac disease;
2. To investigate the effectiveness of different biological tools (lactic acid bacteria (LAB), plant permeates, purified micro-organisms and plant enzymes) for the hydrolysis of gluten in wheat bran;
3. To determine the optimum conditions of bromelain and papain (temperature, pH, duration, enzyme concentration) and to evaluate the influence of these parameters on the efficiency of enzymatic hydrolysis in wheat bran substrates;
4. To use selected biological tools in an integrated manner to effectively reduce the total amount of gluten and its immunoreactive peptides in wheat bran;
5. To evaluate the influence of biofermentation on the quantitative and qualitative change of gluten proteins;

6. To provide recommendations for the production technology of bread with lower gluten content, supplemented with wheat bran after treatment with biological tools.

Scientific novelty

1. When the relationship between wheat consumption and celiac disease prevalence was assessed at different levels, a strong positive correlation ($r = 0.88$, $p < 0.05$) was found between wheat intake and prevalence of celiac disease by continent.

2. The efficiency of plant enzymes (bromelain, papain, and their combination) for the hydrolysis of wheat bran gluten in neutral medium was investigated and a reduction of up to 95.23% of the gluten content with papain was observed. The optimum hydrolysis conditions: concentration of plant enzymes of 0.5% and temperature of 45°C were determined.

3. The complex effect of bio-treatment on gluten reduction in wheat bran was applied and investigated for the first time, and the sequential combination of enzymatic hydrolysis with papain, bromelain, or both enzymes and fermentation with a mixture of selected LABs (*L. plantarum* P-1, *L. brevis* R-1, and *L. acidophilus* 308) resulted in a 98.94% reduction of gluten content and efficient degradation of immunoreactive peptides.

Practical significance of the study

On the basis of the results of the general and specific protease activity assays, LAB cultures (*L. plantarum* P-1, *L. brevis* R-1, and *L. acidophilus* 308) with the highest potential for wheat gluten hydrolysis were selected. The plant proteases bromelain and papain have been shown to reduce the gluten content in wheat bran significantly and can be applied in food production processes based on the optimum conditions for their hydrolysis (enzyme concentration, temperature, duration).

An efficient and safe biotechnological method for the practical treatment of wheat bran (hydrolysis with a mixture of bromelain and selected LAB strains) has been proposed for the degradation of gluten and the immunoreactive peptides, which may have a positive effect on the diet of people with gluten intolerance or CD. A technology for the production of bread with higher nutritional value and lower gluten content is proposed, the recipe of which is supplemented with wheat bran treated with a complex of biological tools.

Key points presented for the defence:

1. The effect of the purified plant proteases bromelain and papain in combination with LAB fermentation in a sequential manner results in a higher efficiency of wheat bran gluten hydrolysis than with the use of separate biological tools.

2. The combined effect of bromelain and selected LABs is characterised by a high efficiency of wheat bran gluten hydrolysis (98.94%), with no immunoreactive peptides remaining among the hydrolysis products.

3. The treatment of wheat bran with a complex of bromelain and PRB can be applied in the bread-making process to obtain products with lower gluten content for special nutritional use.

Structure and outline of the dissertation

The dissertation is written in Lithuanian. It consists of a list of abbreviations, an introduction, a review of the most relevant scientific literature, a section on the employed materials and methods, a chapter covering the results and discussion, conclusions, literature references (in total, 290 references were used), a *curriculum vitae*, a list of publications on the subject of the dissertation, and annexes. The thesis contains 20 tables and 44 figures. The total length of the dissertation is 154 pages.

Publications of the research results

The results of the research have been presented in three publications delivered in journals covered in the list of *Clarivate Analytics* Web of Science database and reported at seven conferences.

OBJECTS AND METHODS

Determining the association of wheat consumption and its dynamics with celiac disease prevalence

Continent and country-wise wheat consumption data were obtained from the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) database [254] as the average wheat consumption per person per year (kg) as of February 2021. To analyze the dynamics (decrease or increase) of long-term wheat consumption, the earliest available data on wheat consumption by continents from 1961 to 2018 was collected. The data on wheat consumption by countries from 2004 to 2018 was collected and used from both countries and continents to assess the short-term dynamics of wheat consumption and to evaluate the correlation between wheat consumption and the prevalence of CD. The average wheat consumption per person per year (kg) from 2004 to 2018 was calculated to compare wheat consumption data during the analysis period by country and continent.

To estimate the long-term dynamics of wheat consumption (decrease or increase), the ratio was calculated between the most recent 10-year (2008–2018) average wheat consumption and the earliest available on FAO 10-year (1961–1971) average wheat consumption. To estimate the dynamics of wheat consumption (decrease or increase) during the analyzed period of CD prevalence, the ratio between the most recent 5-year (2014–2018) average wheat consumption (short-term) and the earliest 5-year (2004–2008) average wheat consumption was calculated by continent and country.

Objects

Samples of wheat (*Triticum aestivum*) bran were provided by a biotechnology company based in Lithuania. A fraction of wheat bran was obtained as a by-product of dry milling of wheat grains, and no heat treatment was applied during the process.

Two commercially available plant enzymes, papain and bromelain, were used in the present study. Papain (EC 3.4.22.2) from papaya (*Carica papaya*) (enzymatic activity 3000 U/g) and bromelain (EC 3.4.22.32) from pineapple (*Ananas comosus*)

stems (enzymatic activity 3000 U/g) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany).

Preparation of Samples

Wheat bran was ground in a laboratory mill Perten 3303 (Perten Instruments GmbH, Hamburg, Germany).

Fermentation with lactic acid bacteria (LAB). Experiments were carried out with LAB cultures from the collection of the Food Institute, Kaunas University of Technology. The LAB strains *L. plantarum* P-1, *L. brevis* R-1, *L. acidophilus* 308, *L. acidophilus* 336, *L. Casei* g and *L. Casei* 12 were selected for the evaluation of their proteolytic activity and efficiency of gluten hydrolysis. Wheat bran samples (1 g) were weighed and placed in glass tubes (15 ml), the control samples were suspended in deionised water (10 ml), the others were spiked with LAB suspensions (10 ml) at an active concentration of $1.7\text{--}2.8 \times 10^8$ and mixed well. Samples were incubated at 30 and 37°C, respectively, under anaerobic conditions using an anaerostat. The changes in the pH of the media, the total number of bacteria, the protease activity, and the gluten content of the substrates were measured after 12, 24 and 48 hours by using ELISA G12. The enzyme activities were determined immediately and for the gluten assays the samples were frozen and stored at -18°C or below. All samples were prepared in triplicate and each sample was analysed twice.

Enzymatic hydrolysis. Samples of wheat bran (1 g) were weighed and placed in glass tubes (15 mL), 5 mL of distilled water was added to the tubes for control, and solutions of distilled water and enzymes (5 mL) were added to the others at the enzyme concentrations 0.25, 0.5, and 0.75% of substrate and mixed well. Enzymatic hydrolysis was carried out at 37°C, 45°C, and 50°C for 1–4 h.

A complex approach was used to achieve the optimum gluten digestion result, where the treatment of bran with plant enzymes was consistently combined with a mixture of selected LABs (*L. acidophilus* 308, *L. brevis* R-1 and *L. plantarum* P-1).

Wheat bran was treated with the plant enzymes bromelain and papain under the optimum conditions previously established for their action (45°C, F/S ratio 0.5%) in step 1. After 2 h of enzymatic hydrolysis, the bran substrates were inoculated with a mixture of the three LAB cultures selected for their highest proteolytic activity in order to maximise the amount of cleaved peptides. A favourable temperature (30°C) was applied for 2 hours for the mesophilic cultures *L. brevis* R-1 and *L. plantarum* P-1, followed by a temperature regime favourable to *L. acidophilus* 308 (37°C) for 8 h until the end of the experiment.

Physico-Chemical and immunological analysis of the composition of wheat bran and hydrolysates

The pH of samples was measured using a pH meter (PP-15, Sartorius AG, Germany).

The total protease activity in the samples was performed according to the Sigma-Aldrich SSCASE01.001 protocol, described by Cupp-Enyard [257].

Gluten was extracted as described by Dhaka and Khatkar [259].

The total protein content in bran was determined using the Kjeldahl method (ICC Standard Method No. 105/2:1994) by multiplying the determined nitrogen content by 5.7.

The soluble protein content of wheat bran substrates was evaluated spectrophotometrically. This method is based on the ability of protein solutions to absorb UV rays at 280 and 260 nm.

Immunological Analysis. After hydrolysis, the samples were weighed and used for immunological analysis. Gluten residues in the wheat bran samples were quantified by competitive ELISA using a monoclonal R5 antibody (R-Biopharm AG, Germany). ELISA measurements were performed according to the manufacturer's instructions.

Determination of total and free amino acids by effective liquid chromatography. The method is adapted to the determination of amino acids in foodstuffs by HPLC with a fluorescence detector. For the determination of total amino acids in wheat bran, amino acids were extracted with 6 mol/l HCl solution and free amino acids were extracted with dilute 0.1 mol/l HCl. The amino acids were separated by liquid chromatography, measuring the fluorescence emission at 450 nm (Pro - 305 nm). For quantitative analysis, an amino acid analytical standard (AAS18-10x1ml) (Sigma-Aldrich, Germany) was used.

Liquid Chromatography (HPLC) Analysis. The supernatant of ethanol aqueous solution extracts of the samples was filtered through a 0.45 µm filter (Millipore, Ireland) and used for analysis with a SHIMADZU LC 2040-C 3D Nexera-i Plus chromatograph (Shimadzu, Japan), equipped with a UV DAD detector, operating at 210 nm using a reverse-phase Inertsil WP300-C18 (wide pore size of 300 Å) 5 µm analytical column 4.0 × 150 mm; GL Sciences, Japan). A gradient of acetonitrile in water with 0.1% (v/v) TFA (from 5 to 85% over 60 min), a flow rate of 0.4 mL/min at 45°C was used. The injection volume was 10 µL. The chromatographic conditions were optimised and maintained constant throughout the experiment. Reference solutions of gliadin were prepared by dissolving the standard material, wheat gliadin G3375 (Sigma-Aldrich, Germany), in a 70% alcohol solution with 0.05% TFA (10 ml).

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to resolve the gluten proteins on the basis of molecular weight according to the methodology proposed by Laemmli [258].

Qualitative analyses of the immunoreactive fragments were carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC) and single- and double-mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS/MS). The Agilent 6530 Accurate-Mass Efficient Liquid Chromatography with Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) Mass Spectrometer tandem was used for analysis, with Inertsil WP300-C18 5µm, 4.0×150 mm reversed-phase chromatography column (GL Sciences, Japan). MassHunter 10.0 software (Agilent Technologies, USA) was used for system control and MS data monitoring.

Spectrum Mill proteomics software was used for data analysis, automated peptide search and peptide identification, and the MS/MS data was compared with the Uniprot Consortium's Universal Protein Information Database [263]. Peptide immunogenicity assessment was based on sequence identity to known T-cell epitopes

using the database of CD-causing peptides developed by the University of Nebraska, Lincoln, USA (version 3, updated on 7 April 2022), and the Protein Risk Assessment Tool [264].

Statistical Analysis. SPSS version 26 (IBM Inc., USA) and MS Excel were used for statistical analyses. Analysis of variance *ANOVA* was performed, the significance level of the factor was determined by Fisher's (*F*) test at 95% confidence level, and Pearson's correlation coefficient was calculated to estimate the correlation between wheat consumption with the prevalence of celiac disease, between hydrolysis conditions and gluten content reduction in wheat bran. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Relationship of wheat consumption and its dynamics with the prevalence of celiac disease

The data about CD prevalence rates of a healthy population was found in 40 countries; 31 of them presented biopsy-based data. A large number of studies have estimated CD prevalence among blood donors. Most epidemiological studies ($n = 70$) were carried out through the determination of specific serological markers of CD (IgA tTG and/or IgA EMA) in the blood. Genetic markers (HLA-DQ characterization) were considered in only 10 studies. Most of the authors ($n = 54$) have included the histological findings of the duodenal biopsy specimens.

Based on the CD epidemiology literature published from 2005 to 2020, the biopsy-proven global pooled prevalence of CD was estimated to be 0.77% (95% CI, 0.50–0.87%, $p < 0.05$). According to data obtained from 54 studies, 197,361 individuals were screened, and 1,510 were diagnosed with CD. The global seroprevalence of CD was calculated by the weight of the studies: 1.25% (95% CI, 1.02–1.57%, $p < 0.05$) (3,222 from 256,936 individuals, data from 70 studies). Anti-tissue transglutaminase (tTG) and anti-endomysial antibody (EMA) tests have been used in most clinical trials for CD screening.

Table 1. Wheat consumption and pooled CD prevalence by continents

Continents	Wheat consumption per capita year 2004–2018, kg	Wheat consumption per increase/decrease over 2004–2018*	Wheat consumption per increase/decrease over 1961–2018**	The prevalence (biopsy proven) of CD, (95% CI, $p < 0.05$)
Europe	110.00	1.035	0.861	1.07 (0.86–1.35)
Asia	63.20	1.021	1.873	0.69 (0.56–0.85)
N. America	81.54	0.952	1.165	0.53 (0.43–0.66)
S. America	57.01	1.028	1.125	0.49 (0.40–0.61)
Africa	49.03	1.055	1.582	0.42 (0.34–0.52)
Australia+New Zealand	72.88	1.126	0.785	0.66 (0.53–0.82)

*Ratio between the average wheat consumption during the last five years (2014–2018) available on the FAO database and the period of 2004–2008 by continent; **ratio between the

average wheat consumption during the last 10 years (2009–2018) available on the FAO database and the earliest FAO data (1961–1971) by continent

During the period of 2004–2018, the average global wheat consumption per capita per year was 66.09 kg. Considerable continent-wide variation was noted in Africa (ranging from 49.03 kg), South America (57.01 kg), and Europe (110.00 kg) (Table 1). Wheat consumption continent-wide dynamics (decrease or increase) from 1961 to 2018 were analyzed. The calculated relative changes are listed in Table 1.

A multilevel analysis was performed to assess the association between wheat consumption and CD prevalence. A high positive correlation ($r = 0.88$, $p < 0.05$) between wheat consumption and the prevalence of CD (biopsy-proved) was found by estimating data by continent, but no correlation was found ($r = -0.036$; $p > 0.50$) when the data were compared by country. Statistical analysis showed a very low correlation between short-term wheat consumption increase/decrease ($r = 0.10$) and CD prevalence, and also a low negative correlation ($r = -0.39$) between increase/decrease in long-term wheat consumption and CD, but these relations are not reliable ($p > 0.5$). The relationship between the changes in wheat consumption and the prevalence of CD was assessed by country in the short term only; however, the correlation was not significant ($r = 0.10$, $p > 0.5$) either.

Gluten content in wheat bran fermented with LAB

In order to assess the specific capacity of LAB proteases to degrade gluten proteins, pH and residual gluten levels were analyzed by using ELISA G12 in wheat bran substrates after 12 and 24 h of fermentation. After 24 h, the lowest levels of immunoreactive gluten peptides were found in the samples containing *L. acidophilus* 308, *L. brevis* R-1, and *L. plantarum* P-1. As the wheat bran had a high initial gluten content (up to 58,650 mg/kg), after fermentation with LAB the gluten content was reduced by between 72.97% and 88.83% but remained above the permissible limit (see Table 2) for the use of such bran in the manufacture of gluten-free products.

Table 2. Changes in gluten content during fermentation of wheat bran with different LAB cultures

LAB	Temperature °C	Duration of fermentation, h			
		12		24	
		pH	Gluten content mg/ kg	pH	Gluten content mg/ kg
C	37	5.56±0.02	49,500 ±1,442	4.62±0.02	33,750±945
LA 308	37	3.71±0.02	9,800±318	3.67±0.02	7,250±240
LA 336	37	3.76±0.02	1,585±447	3.58±0.02	9,100±271
LB R-1	30	4.42±0.02	9,250±303	3.95±0.02	6,850±236
LP P-1	30	4.39±0.02	8,500±282	3.82±0.02	6,550±225
LC g	37	4.51±0.02	12,800±327	3.84±0.02	8,700±260
LC 12	37	4.37±0.02	11,950±323	3.75±0.02	7,450±252

C– control bran samples with deionized water, LA308 – *L. acidophilus* 308, LA336 – *L. acidophilus* 336, LBR-1 – *L. brevis* R-1, LPP-1 – *L. plantarum* P-1, LCg – *L. casei* g, LC12 – *L. casei* 12

A pH-dependent decrease in the gluten content was observed during the fermentation of the bran. Since the gluten content decreased also in the control sample, this indicates that endogenous enzymes were active in the bran substrate. Di Cagno et al. [157], Rollan et al. [165], Gerez et al. [166] have also shown that primary proteolysis of wheat proteins is triggered by endogenous wheat enzymes, which are activated by low pH. The results of this study showed that the initial proteolysis in LAB samples could also be induced by endogenous enzymes, but the subsequent peptide hydrolysis was carried out in the presence of LAB intracellular peptidases, which are secreted by different cultures, the number of cleaved peptide bonds depended on the strain undergoing the enzyme digestion.

The results showed that during the wheat bran fermentation with LAB cultures, the number of gluten peptides recognized by using ELISA G12 antibodies remained high after hydrolysis. On the other hand, LAB fermentation could be used in the production of low-gluten raw materials, and it would be appropriate to combine their action with another proteolytic enzymes.

The efficacy of plant enzymes bromelain and papain as a tool for reducing gluten immunogenicity from wheat bran

Enzyme Activity Depending on pH

Bromelain was found to have the strongest effect at pH 4–5, as the pH increased, its activity decreased. The proteolytic activity of papain was less affected by the acidity of the substrate, it was the highest at pH 6–7, furthermore, the proteolytic activity of the combination of these enzymes was similar over a wider pH range (at pH 4–6.5). Because the initial acidity of wheat bran samples with aqueous suspensions of plant enzymes is close to pH 6.5, enzymatic hydrolysis was performed without the addition of buffers to monitor pH changes during the process, aiming for its potential application in the production. The data showed that the hydrolysis conditions of wheat bran had a significant effect on the soluble protein and gluten content.

The Influence of Hydrolysis Conditions on the Degradation of Gluten in Wheat Bran

The conditions of action of the plant enzymes bromelain, papain, and their combination were optimized for bran substrates by assessing the influence of temperature, enzyme concentration, and duration of action on the hydrolysis parameters of the bran protein.

Soluble protein content in wheat bran hydrolysates

Spectrophotometric evaluation of soluble protein content in wheat bran substrates showed significant differences ($p < 0.05$) compared to the control sample. After 2 h and 4 h of hydrolysis, the highest soluble protein content was found in the samples with papain (3.06–3.91 mg/mL, depending on enzyme concentration, temperature, and duration). Samples with bromelain had a lower soluble protein content (2.94–3.60 mg/mL), and the combination of the two enzymes had a medium (3.02–3.77 mg/mL) soluble protein content.

Decrease in gluten content in wheat bran hydrolysates

The residual immunochemical reactivity of cleaved prolamins after 2 and 4 h of proteolysis with plant enzymes detected by the R5 antibody showed that both enzymes have gluten degrading properties (Table 3). The treatment with papain reduced the levels of gluten content in bran from initial 58,650.00 to 2,588.20 mg/kg, with bromelain – to 3,544.50 mg/kg in the best case (with a 0.75 E/S ratio and a temperature of 45°C, within 4 h). The gluten content of the bran substrates after 2 and 4 h of enzymatic treatment showed a significant decrease in the percentage of gluten in wheat bran (53.86–95.32%) compared to the control sample (12.62–20.31%).

Table 3. The soluble protein and gluten content in wheat bran substrates after 2–4 h enzymatic hydrolysis under different conditions

Enzymes	E/S Ratio	Temperature, °C	Soluble protein content*, mg/mL		Gluten content, mg/kg		Decrease in gluten content, %	
			Duration of enzymatic hydrolysis, h					
			2	4	2	4	2	4
C	0	37	2.09±0.02	2.21±0.02	55,588±2800	51,250±2,204	5.22	12.62
B	0.25	37	2.94±0.03	3.13±0.03	28,598±1212	27,060±1,028	51.24	53.86
P	0.25	37	3.06±0.04	3.47±0.04	26,222±1055	24,549±933	55.29	58.14
B+P	0.25	37	3.02±0.04	3.24±0.04	27,501±960	25,856±946	53.11	55.91
B	0.5	37	3.15±0.05	3.28±0.04	17,466±862	15,321±734	70.22	73.88
P	0.5	37	3.21±0.06	3.44±0.04	14,498±740	12,168±628	75.28	79.25
B+P	0.5	37	3.19±0.06	3.35±0.05	15,560±715	13,219±737	73.47	77.46
B	0.75	37	3.18±0.06	3.31±0.04	15,220±788	12,963±720	74.05	77.90
P	0.75	37	3.29±0.08	3.54±0.05	11,396±656	8,911±619	80.57	84.81
B+P	0.75	37	3.28±0.08	3.43±0.06	12,281±745	9,860±716	79.06	83.19
C	0	45	2.83±0.08	2.95±0.05	51,870±1,215	47,606±1,011	11.56	18.83
B	0.25	45	3.31±0.06	3.47±0.04	14,270±868	12,073±800	75.67	79.42
P	0.25	45	3.36±0.06	3.45±0.07	12,252±923	9,851±766	79.11	83.20
B+P	0.25	45	3.34±0.05	3.41±0.05	12,715±543	10,258±770	78.32	82.51
B	0.5	45	3.05±0.06	3.62±0.04	6,012±387	4,100±227	89.75	93.01
P	0.5	45	3.40±0.09	3.43±0.04	5,601±54	2,800±215	90.45	95.23
B+P	0.5	45	3.15±0.08	3.54 ±0.04	5,959±385	3,150±220	89.84	94.63
B	0.75	45	3.55±0.06	3.69±0.05	6,340±421	3,544±203	89.19	93.96
P	0.75	45	3.66±0.05	3.86±0.04	5,349±199	2,588±199	90.88	95.59
B+P	0.75	45	3.64±0.06	3.77±0.06	5,578±325	2,785±182	90.49	95.25
C	0	50	2.94±0.04	3.04±0.06	50,550±1365	46,740±1,012	13.81	20.31
B	0.25	50	3.02±0.04	3.32±0.05	13,273±866	10,785±606	77.37	81.61
P	0.25	50	3.32±0.06	3.46±0.06	10,170±713	7,606±555	82.66	87.03
B+P	0.25	50	3.30±0.06	3.40±0.06	10,580±963	8,063±569	81.96	86.25
B	0.5	50	3.56±0.08	3.57±0.05	6,704±695	4,010±176	88.57	93.16
P	0.5	50	3.67±0.06	3.88±0.06	5,683±365	2,800±157	90.31	95.23
B+P	0.5	50	3.67±0.05	3.75±0.05	5,964±543	3,198±153	89.83	94.55
B	0.75	50	3.54±0.04	3.60±0.08	6,633±415	3,946±163	88.69	93.27
P	0.75	50	3.69±0.06	3.91±0.05	5,501±359	2,744±148	90.62	95.32
B+P	0.75	50	3.68±0.06	3.77±0.08	5,648±397	2,855±146	90.37	95.13

C, control sample; B, bromelain; P, papain; B+P, bromelain and papain

The data showed that papain was the most active in degrading gluten and that higher enzyme concentrations resulted in a higher hydrolysis effect. Ten small

proportion of hydrolyzed gliadins found in the control sample showed that incubation of the bran for up to 4 h activated the endogenous enzymes.

Fisher's exact test showed that enzyme concentration had the greatest effect on gluten reduction ($F = 45.89$, $p < 0.01$). It also had the greatest effect on soluble protein content ($F = 8.97$, $p < 0.05$). The second most important factor, the choice of an enzyme, had a significant effect on the decrease in gluten concentration ($F = 15.60$, $p < 0.05$) and the increase in soluble protein concentration ($F = 7.42$, $p < 0.05$). A weak relationship was found between the temperature of enzymatic hydrolysis and the percentage decrease in gluten ($F = 2.08$, $p < 0.5$).

The complex action of biological tools and their effectiveness in hydrolyzing wheat bran gluten

Following the evaluation of the performance of individual bio-agents (lactic acid bacteria (LAB)), it was decided to test the combined effect of plant enzymes and LAB fermentation.

pH changes and proteolytic activity in substrates during fermentation

Changes in the pH of the substrates were evaluated at all stages of the complex hydrolysis (Table 3). At the beginning of the process, the pH of the wheat bran substrates with plant enzymes was 6.5 ± 0.03 . Within 2 h, the pH decreased to $6.44\text{--}6.45 \pm 0.03$ with bromelain and papain. After further 2 h of fermentation at 30°C , the acidity of the samples with LAB increased to $5.00\text{--}5.02 \pm 0.04$ and at the end of the complex fermentation process (after 12 h) the acidity of the substrates reached pH $4.01\text{--}4.28 \pm 0.05$. The pH of the control plant enzyme substrates with water also varied only within a narrower range and dropped from 6.5 ± 0.03 to 6.34 ± 0.03 and 5.37 ± 0.03 after 4 and 12 h, respectively.

Table 4. Changes in pH in wheat bran substrates during sequential treatment with different biological agents

Enzymes	After 2 h of enzymatic hydrolysis at 45°C	After 2 h fermentation with LAB at 30°C		After 8 h fermentation at 37°C	
		With H_2O	With LAB	With H_2O	With LAB
Control	6.42 ± 0.03	6.34 ± 0.03	4.92 ± 0.03	5.37 ± 0.03	4.15 ± 0.04
Bromelain	6.44 ± 0.02	6.43 ± 0.02	5.00 ± 0.04	5.31 ± 0.02	4.16 ± 0.05
Papain	6.45 ± 0.03	6.44 ± 0.04	5.00 ± 0.02	5.42 ± 0.03	4.28 ± 0.02
Bromelain + papain	6.44 ± 0.02	6.43 ± 0.04	5.02 ± 0.04	5.35 ± 0.02	4.01 ± 0.02

At slightly acidic pH, it is likely that wheat endogenous enzymes were activated in the control bran samples and may have enhanced the bacterial peptidase hydrolysis of gluten in LAB samples.

The total proteolytic activity

At the end of the process, after 12 h of fermentation by the combined method, the total proteolytic activity in the wheat bran substrates was determined. The total proteolytic activity of wheat bran substrates after 12 h treatment with the plant enzymes bromelain, papain, and their combination was similar (0.042, 0.045 and

0.043±0.003 AU/ml, respectively). The LAB-treated bran substrates showed a lower proteolytic activity of 0.036±0.004 AU/ml. Substrates treated with the combined fermentation method showed significantly higher proteolytic activity (0.087 to 0.102 AU/ml). The highest proteolytic activity was found in hydrolysates with bromelain and LAB (0.102±0.008 AU/ml), while slightly lower activity was found in substrates with papain and LAB (0.096±0.007 AU/ml) and in substrates with bromelain, papain, and LAB (0.087±0.004 AU/ml).

The change in soluble protein concentration in hydrolysates

Significant differences in soluble protein concentrations were found in wheat bran hydrolysates after treatment with different bio-agents. Papain was the most efficient protein degrader when treated with enzymes alone, with a 20% higher soluble protein content in the samples with papain compared to the wheat bran controls, and only 7.85% higher in the bromelain substrate. When considering the combined effect of plant enzymes and LAB, the highest soluble protein content was found in the wheat bran substrate of bromelain and LAB at 3.47±0.06 mg/ml (22.59% more than in the control). Samples treated with a combination of papain and both plant proteases and LAB showed soluble proteins of 3.24–3.46±0.05 mg/ml, which is slightly lower than after the treatment with bromelain and LAB alone. The high concentration of soluble proteins in the substrate indicated that the complex fermentation of the bran with bromelain and LAB resulted in the most active hydrolysis of gluten proteins. The resulting lower pH was also favorable for a higher activity of bromelain.

Changes in the gluten content of hydrolysates

The lowest gluten content was found in substrates containing bromelain and LAB by using ELISA R5 (Table 4).

Table 5. Gluten content and its changes* in wheat bran hydrolysates after fermentation with different biological tools and combinations thereof

Biological tools	Gluten content, mg/kg	Decrease in gluten content, %
C	37,606±3,808	35.88
B	3,955±316	93.26
P	2,650±220	95.48
B+P	3,802±304	93.52
LAB	7,695±886	86.88
B+LAB	620±43	98.94
P+LAB	950±76	98.38
B+P+LAB	1,530±148	97.39

*Reduction in gluten content calculated as % of the initial gluten content of the bran (58,650 mg/kg)

C – control (with deionized water), B – bromelain, P – papain, B+P – bromelain and papain, LAB – mixture of lactic acid bacteria (*L. acidophilus* 308, *L. brevis* R-1 and *L. plantarum* P-1), B+LAB – bromelain and LAB, P+LAB – papain and LAB, B+P+LAB – bromelain, papain, and LAB

The results of ELISA R5 showed significant changes in gluten concentration and differences between the test variants. The lowest gluten content was found in the wheat bran substrate after a complex treatment with bromelain and LAB (620±43 mg/kg).

This proved that this complex fermentation method can significantly reduce the immunoreactive gluten content (98.94%). Other combinations were less effective in the degradation of gluten: the combination of papain with LAB was less effective (98.38%), while the combination of the two plant enzymes and LAB reduced gluten by 97.39%. The effect on gluten hydrolysis with the individual bio-tools was significantly lower: 93.26% with bromelain, 95.48% with papain and 86.88% with the LAB combination.

Changes in the molecular weight of gluten proteins

In order to assess the molecular weight of protein fractions that predominate in wheat bran samples after treatment with the different bio-tools, the proteins were analyzed by gel electrophoresis (SDS-PAGE). The report on the analysis of the molecular masses of the wheat bran proteins generated by the UVITEC 1D gel documentation system is presented in Fig. 1.

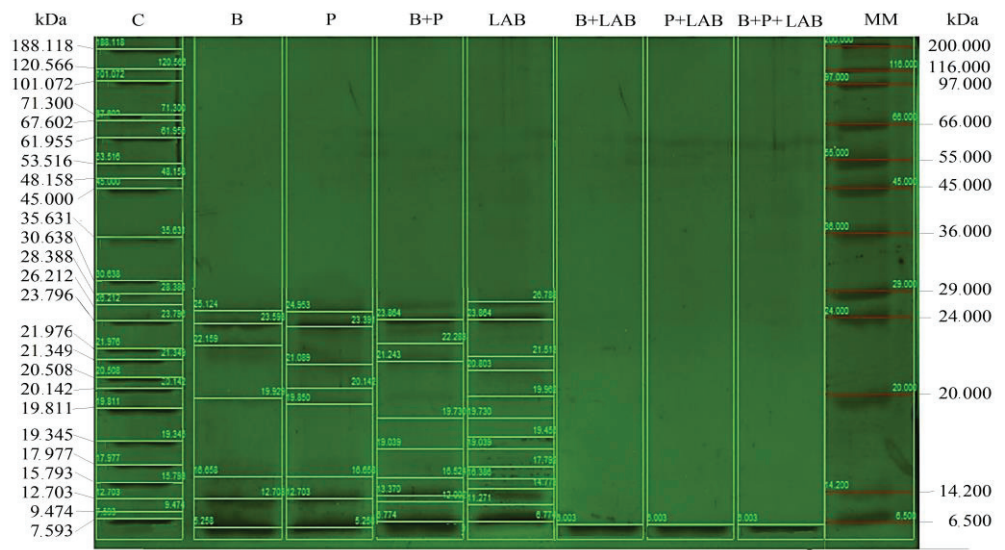


Fig. 1. Wheat bran gluten protein fractions in hydrolysates (UVITEC 1D gel documentation system). C (control): 188.118–7.593 kDa; B (bromelain): 25.124–5.258 kDa; P (papain): 24.953–5.258 kDa; B+P (bromelain, papain): 26.788– 6.774 kDa; LAB (lactic acid bacteria): 26.788–6.774 kDa; B+LAB (bromelain, LAB): <6.003 kDa; P+LAB (papain, LAB): <6.003 kDa; B+P+LAB (bromelain, papain and LAB): <6.003 kDa; MM (molecular marker): 200.000–6.500 kDa

Significant differences were found in the molecular weights of wheat bran proteins treated with different bio-tools. After enzymatic hydrolysis of wheat bran with combined bio-treatment, there was a significant decrease in high molecular weight proteins and an increase in their degradation products in the bran substrates. Proteins ranging in molecular weight from 188.118 to 7.593 kDa were found in the control bran sample (C). No proteins with a molecular weight greater than 26.80 kDa were found in the samples treated with plant enzymes (B, P, B+P), but rather pronounced bands of proteins in the 22.00–26.00 and 6.00–12.00 kDa ranges were

found. This means that the plant enzymes are able to break down large prolamins into smaller derivatives, they have specific proteases that break the sulphur bridges between Cys, but they are not able to fully hydrolyze all α -, β - and γ -gliadins. Similar molecular weight protein bands were formed in the wheat bran sample fermented with LAB alone, which also did not contain any proteins with a molecular weight above 26.80 kDa but contained a higher number of degradation products of medium size (11.00–20.00 kDa). In terms of resolution, the protein separation carried out is not suitable for the precise analysis of very low molecular weight proteins, but the SDS-PAGE clearly shows that no gluten fragments with a molecular weight above 6.00 kDa were present in the wheat bran hydrolysates after treatment with the plant enzymes and LAB.

The SDS-PAGE analysis complemented and extended the results on the efficiency of the fermentation method for the proteolysis of gluten by biotechnological means and combinations thereof. On the other hand, although it is evident that the bran hydrolysates were successful in degrading the gluten proteins to lower molecular weight peptides, this method does not allow the identification of the exact degradation products that were formed and remained in the substrates after fermentation.

Changes in the free amino acid content of bran

The increase in the free amino acid content of fermented substrates is an important indicator of the efficiency of protein hydrolysis, which shows the ability of the enzymes or their combinations with the proteases of the LAB micro-organisms to degrade peptide bonds. The total amino acid content of the crude bran sample determined by HPLC was 13.29 ± 0.72 g/100g. The results obtained correlate with the total protein content of the bran (13.88 ± 0.22 g/100 g) and are similar to those published by Zhang and Tan [274]. Gln (3.08 ± 0.29 g/100 g) and Pro (1.33 ± 0.12 g/100 g), as well as the amino acids Asp, Arg and Ile, were the most abundant amino acids found in wheat bran, whereas Asn was not found at all.

When comparing wheat bran samples treated only with plant enzymes, the substrates with papain and a combination of papain and bromelain were found to have the highest amount of free amino acids, while the substrate with bromelain had the lowest amount. Compared with the control bran sample, which contained only 0.688 ± 0.05 mg/100g, the free amino acid content increased to 17.32% after enzymatic hydrolysis with bromelain and to 25.55% after treatment with papain. The effect of the enzyme combination was moderate, with a release of 3.20 ± 0.24 mg/100 g of amino acids.

Comparing the results of the samples in which enzymatic hydrolysis was combined with LAB, the efficiency of bromelain was higher, with a 5.86-fold increase in free amino acids compared to the control sample (to 4.027 ± 0.280 g/100 g). The effect of papain and LAB was slightly weaker (3.906 ± 0.260 g/100 g, 5.68-fold increase), while the combination of the two enzymes had a weaker effect, as judged by the lower amount of free amino acids formed (3.780 ± 0.250 g/100 g, 5.50-fold increase). In all cases, the combined action of the plant enzymes and LAB resulted in higher free amino acid content in the substrates than either the enzyme or LAB treatment alone.

Influence of hydrolysis with biological tools on changes in gliadins of gluten proteins in wheat bran

In this study, Sigma Aldrich wheat gliadin, which is a mixture of different alcohol-soluble wheat gliadins, was used as a gluten standard material for the RF-HPLC method. The highest peaks were recorded at 54–58 min for samples of the gliadin fractions of wheat bran samples treated with different biological tools and for solutions of gliadin standards at different concentrations. It was observed that the peak areas recorded at 55 min were proportional to the concentrations of the prepared standard solutions. At this point a calibration line was established (see Annex 7). The resulting coefficient of determination of the line, $R^2 = 0.9997$, showed that the peak areas correlate accurately with the concentrations of gliadins in the solutions.

The areas of the gliadin peaks of the bran treated with different biological treatments (Table 6) confirmed the effectiveness of the complex treatment with enzymes and the LAB method. The relative amounts of wheat gliadins quantified on the basis of the calibration line confirmed that the best hydrolysis result was obtained with the combined effect of bromelain and LAB. The relative gliadin content determined by HPLC was on average 1.5–3 times lower than the gluten values obtained by immunoassay (Table 6). The gliadin content was multiplied by two to calculate the gluten concentration according to the *Codex Alimentarius* standard methodology [113], but the conversion is not applied in this work due to the possible slight loss of gliadins during the purification of the samples (solid-phase extraction).

Table 6. Relative wheat gliadin content determined by RF-HPLC and gluten content determined by using ELISA R5 in wheat bran hydrolysis products

Biological tools	Relative gliadin content determined by HPLC	Gluten content, mg/kg, determined by ELISA R5
C	12,855±625	37,606±3,808
B	2,877±160	3,955±316
P	1,389±111	2,650±220
B+P	1,811±220	3,802±304
LAB	3,725±146	7,695±886
B+LAB	338±30	620±43
P+LAB	617±52	950±76
B+P+LAB	1,124±129	1,530±148

C – control (with deionized water), B – bromelain, P – papain, B+P – bromelain and papain, LAB – mixture of lactic acid bacteria (*L. acidophilus* 308, *L. brevis* R-1 and *L. plantarum* P-1), B+LAB – bromelain and LAB, P+LAB – papain and LAB, B+P+LAB – bromelain, papain, and LAB

In order to assess the accuracy of the RF-HPLC method for the quantification of wheat gliadins, a correlation was established between the gliadin quantification results obtained by this method and the gluten content determined by ELISA R5. A strong linear relationship was obtained between the relative gliadin content determined by RF-HPLC and the gluten content determined by immunoassay. The high coefficient of determination ($R^2 = 0.98$) showed the suitability of this method for the estimation of gluten content. On the other hand, the RF-HPLC method for the determination of gluten content using gliadin as a standard is not suitable for the determination of

amounts below 100 mg/kg, as the peak areas of the standard with 10–100 mg/kg gliadin were not proportional to the concentrations of the solutions.

Analysis of immunoreactive peptides in hydrolysis products

In order to investigate the mechanism of gluten hydrolysis, the structure of the gluten degradation products and to assess the immunoreactivity of the residual gluten derivatives, peptide and protein molecular mass analysis was performed using the M-QTOF instrument. The amino acid sequences of the wheat bran peptides were separated by HPLC-MS/MS and identified by the Spectrum Mill proteomics software. A comparison of the MS/MS analytical data obtained by automated peptide analysis with the spectral characteristics of the peptides showed that oligopeptides were found in all wheat bran hydrolysates. The results of the MS analysis confirmed that the selected bio-treatments for the fermentation of wheat bran reduced the immunotoxic gliadin fractions. Samples treated with plant enzymes and LAB were dominated by the lowest molecular weight peptides (527.319–1396.682 Da), samples treated with plant enzymes alone were dominated by medium molecular weight peptides (638.351–130.767 Da), while more peptides with higher molecular weight (2,168.158–2,990.581 Da) were detected in the bran samples after fermentation with LAB and in the control samples. Despite these differences, peptides with sequences longer than 9 amino acids were found in all samples. Such peptides could cause adverse reactions in CD patients and gluten-sensitive individuals; it is therefore important to assess the immunoreactivity of these peptides found in the samples. The results of assessment of all peptides found in samples with the risk assessment tool are reported in Table 7.

Table 7. Gluten peptides causing CD in hydrolysis products

Amino acid sequences of gliadin peptides*	C	B	P	B+P	LAB	B+LAB	P+LAB	B+P+LAB
ω-gliadins								
QPEQHPPQQPQQPFPTQ	-	-	+	-	-	-	+	-
PQQVVQHPPQQPQQPFPLHTNQPPQ	-	-	+	-	-	-	-	-
α-gliadins								
VRVPVPQLQPQNPSQQQPQEQ	-	-	-	-	+	-	-	-
VRVPVPQLQPQNPSQQQPQ	-	-	-	-	+	-	-	-
VRVPVPQLQPQNPSQQQPQE	-	-	-	-	+	-	-	-
VRVPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPL	-	-	-	-	+	-	-	-
RVPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQ	+	-	-	-	-	-	-	-
Q								
VPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQ	+	-	-	-	-	-	-	-
VPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPL	+	-	-	-	-	-	-	-
LQLQPFPPQLPYPQPQPF	+	-	-	-	-	-	-	-
γ-gliadins								
SQQPRQPFPPQQPQQPFPQPQP	-	-	-	+	-	-	-	-

*Immunoreactive sequences are highlighted in the peptides

The peptide risk assessment analysis showed that not all wheat bran samples contained immunoreactive epitopes. No immunogenic fragments were found in the wheat bran gliadin samples treated with bromelain, bromelain and LAB, and a combination of both enzymes and LAB, while the highest number of immunogenic peptides attributed to α-gliadins was found in the control and LAB-only treated

samples. On the basis of these results, it can be concluded that the fermentation of wheat bran with selected LAB cultures alone did not result in the degradation of immunoreactive peptides in wheat bran.

The quantitative and qualitative changes obtained in the hydrolyzed bran samples, such as pH, soluble protein content, gluten content, protein molecular weight, free amino acids, gliadins, and immunoreactive peptides, showed a higher hydrolysis effect of the biological tools of different origin, and the highest – when bran was treated with bromelain and LAB fermentation.

Recommendations for the use of biologically treated wheat bran in the production of low-gluten bakery products

According to the results of the study, the enzymatic hydrolysis with the selected bio-treatment – bromelain and a mixture of LABs (*L. acidophilus* 308, *L. brevis* R-1 and *L. plantarum* P-1) – was able to reduce the amount of gluten in wheat bran to 620 ± 43 mg/kg. Bran treated in this way can only be used for the production of low-gluten products (up to 100 mg/kg). Finely ground wheat bran is recommended as a raw material for low-gluten bakery products. The addition bran up to 15% (preferably 6–12%) from the dry weight of the other products is possible.

The recommended production process consists of the following main operations:

1. Mixing of wheat bran with the bromelain enzyme solution in water (0.5% of the enzyme of the bran weight) at a rate of 30% bran and 70% water, enzymatic hydrolysis for 2 h at 45°C.
2. Mixing with the prepared LAB suspension (10%). For the preparation of the LAB suspension, the cultures are sown on MRS agar (Biolife, Italy) and incubated at 30°C (*L. plantarum* P-1, *L. brevis* R-1) and 37°C (*L. acidophilus* 308) for 24 h. Then the cultures are washed twice with distilled water, each LAB culture is suspended separately in water, separated by centrifugation (cell density is approximately 10^8 CFU/ml.) The three LAB cultures suspensions are mixed in equal parts.
3. Fermentation for 2 h at 30°C and 8 h at 37°C.
4. Mixing with other dry ingredients: wheat starch or naturally gluten-free flour (10–40%, optimally 30%), baker's yeast (1–2%), salt (up to 2.0%) and a texture-enhancing agent (guar gum, xanthan gum or a mixture of 0.5–1%, hydrocolloids swelled in a little water before use). For lower-gluten bakers, naturally gluten-free flour mixtures (rice, buckwheat, maize) can be used. Eggs, sugar, butter, and other ingredients may be added to some products.
5. Proofing of the dough for 1.5 h at 30°C, kneading, shaping and rising.
6. Baking for 30–50 min. at 220–250°C, depending on the size of the product.

Note. In order to prove that the baked product belongs to the group of products with lower gluten content (up to 100 mg/kg), it is necessary to carry out a gluten control test on the products of each production batch.

CONCLUSIONS

1. The prevalence of biopsy-proven global CD was estimated at 0.77%. The highest prevalence of CD (1.07%) has been observed in Europe, as compared with other continents. The high positive correlation ($r = 0.88$, $p < 0.05$) between wheat consumption and the prevalence of CD was established by estimating data by continent; however, a correlation was not found ($r = -0.036$; $p > 0.50$) when the data were compared by country. Changes in wheat consumption in the last few decades have no significant effects on the development of CD.
2. After testing various biological tools for total and specific protease activity, the following was found:
 - 2.1 The monocultures of *Lactiplantibacillus plantarum* P-1, *Levilactobacillus brevis* R-1 and *Lactobacillus acidophilus* 308 reduced the initial gluten content in wheat bran by 72.97–88.83% during the 24 h fermentation period.
 - 2.2 Pineapple (*Ananas comosus*), kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) and papaya (*Carica papaya*) permeate contain active proteases, and the treatment of wheat bran with these permeates resulted in an efficiency of up to 99.10% of the gluten hydrolysis in a period of 24 h.
 - 2.3 The micro-organism enzymes alcalase, neutrase, and flavorzyme efficiently degrade gluten in wheat bran at pH 6.6–6.7 and reduced the gluten content by 94.70–95.26% within 4 h.
 - 2.4 The plant enzymes are active in neutral media, with bromelain hydrolyzing 93.01% and papain hydrolyzing 95.23% of the gluten in wheat bran within 4 h.
3. The combination of papain and bromelain has no synergistic effect on proteolytic activity. The optimum concentration of plant enzymes for hydrolysis is 0.5% at 45°C. The selected enzyme ($F = 15.60$, $p < 0.01$) and its concentration ($F = 45.89$, $p < 0.01$) have the greatest influence on the hydrolysis of gluten in wheat bran.
4. The sequential treatment of wheat bran with plant enzymes and a mixture of selected LABs resulted in a higher hydrolysis efficiency than either enzymes or LABs alone. The higher effect of combining the action of the plant enzymes with LAB fermentation was achieved, with up to 98.94% gluten hydrolysis efficiency in wheat bran. In combination with LAB, bromelain showed a higher hydrolysis efficiency, with the highest soluble protein content of 3.47 mg/ml (22.59% increase compared to the control) and the highest concentration of free amino acids (4.027 g/100 g, a 5.86-fold increase compared to the control). No immunoreactive epitopes are found in these samples.
5. Wheat bran is suitable for the production of low-gluten products after complex bio-treatment with a mixture of bromelain and LAB (*Lactobacillus plantarum* P-1, *L. brevis* R-1 and *L. acidophilus* 308). An addition of up to 10–12% of fermented bran to wheat starch or gluten-free flour is recommended for the production of bread. Although it has been shown that no immunoreactive epitopes remain in the bran after bio-treatment, further clinical studies are needed to demonstrate the complete safety of the products in celiac patients.

CURRICULUM VITAE

Vijolė Bradauskienė

E-mail: vijole.bradauskiene@gmail.com

Education:

1986 – 1989 Šakiai Z. Angarietis secondary school, secondary education
1989 – 1994 Studies at Kaunas University of Technology, Faculty of
Chemical Technology, degree as a Chartered Engineer
2017 – 2022 Doctoral degree studies at Kaunas University of Technology,
Food institute

Practical experience:

1994 – 1996 "Margiris" UAB, head chef
1996 – 2001 "Karalas" UAB, production manager
2001 to present Higher Education Institution Klaipėdos valstybinė kolegija,
Head of of Food Technology and Nutrition Department, lecturer.

Research interests:

Development and technological research on health-friendly and functional products, use of biotechnologies in the food industry.

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere gratitude to my supervisor, Dr. Lina Vaičiulyte, for the idea of the dissertation topic, scientific advice, trust and support in the preparation of scientific publications and the dissertation. I would like to thank Dr. Darius Černauskas, Ernestas Mockus and other staff of the KTU Food Institute for their support during the research. I would also like to thank Edita M. Pašilaitienė, a Research Manager at "Roquette Amilina" AB, and researcher Gediminas Plakys for their valuable advice in the areas of chromatographic separation and mass spectrometric analysis of wheat protein. Thank you also "Roquette Amilina" AB for the wheat bran and starch samples and the microorganism enzymes.

I sincerely thank my family and friends for their moral support, trust, understanding and patience.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. WIESER, H., KOEHLER, P. ir K. A. SCHERF. The two faces of wheat. *Frontiers in nutrition*, 2020, 7, 517313.
2. MAMONE, G., PICARIELLO, G., ADDEO, F., ir P. FERRANTI. Proteomic analysis in allergy and intolerance to wheat products. *Expert Review of Proteomics*. 2011, 8(1), 95-115.
3. GUTIÉRREZ, S. S. M., PALACIOS, A. T., RUIZ-VANOYE, J. A. ir S. L. PÉREZ. Sustainable and technological strategies for basic cereal crops in the face of climate change: A literature review. *African Journal of Agricultural Research*. 2018, 13(5), 220-227.
4. KAMIŃSKI, M., SKONIECZNA-ŻYDECKA, K., NOWAK, J. K. ir E. STACHOWSKA. Global and local diet popularity rankings, their secular trends, and seasonal variation in Google Trends data. *Nutrition*. 2020, 79, 110759.
5. ZANELLA, S., DE LEO, L., NGUYEN-NGOC-QUYNH, L., NGUYEN-DUY, B., NOT, T. ir kt. Cross-sectional study of coeliac autoimmunity in a population of Vietnamese children. *BMJ Open*. 2016, 6(6), e011173.
6. CURTIS, T. ir N. G. HALFORD. Food security: the challenge of increasing wheat yield and the importance of not compromising food safety. *Annals of Applied Biology*. 2014, 164(3), 354-372.
7. GIRALDO, P., BENAVENTE, E., MANZANO-AGUGLIARO, F. ir E. GIMENEZ. Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis. *Agronomy*. 2019, 9(7), 352.
8. RACHON, L., SZUMILO, G., BRODOWSKA, M. ir A. WOZNIAK. Nutritional value and mineral composition of grain of selected wheat species depending on the intensity of a production technology. *Journal of Elementology*. 2015, 20(3).
9. TRAN, K. D., KONVALINA, P., CAPOUCHOVA, I., JANOVSKA, D., LACKO-BARTOSOVA, M. ir kt. Comparative study on protein quality and rheological behavior of different wheat species. *Agronomy*, 2020, 10(11), 1763.
10. WANG, J., CHATZIDIMITRIOU, E., WOOD, L., HASANALIEVA, G., MARKELLOU, E. ir kt. Effect of wheat species (*Triticum aestivum* vs *T. spelta*), farming system (organic vs conventional) and flour type (wholegrain vs white) on composition of wheat flour—Results of a retail survey in the UK and Germany—2. Antioxidant activity, and phenolic and mineral content. *Food chemistry*. 2020, X, 6, 100091.
11. VENSKE, E., DOS SANTOS, R. S., BUSANELLO, C., GUSTAFSON, P. ir A. COSTA DE OLIVEIRA. Bread wheat: a role model for plant domestication and breeding. *Hereditas*. 2019, 156(1), 1-11.
12. GOESAERT, H., BRIJS, K., VERAVERBEKE, W. S., COURTIN, C. M., GEBRUERS, K. ir J. A. DELCOUR. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in food science & technology*. 2005, 16(1), 12-30.
13. ONIPE, O. O., JIDEANI, A. I. ir D. BESWA. Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. *International Journal of Food Science & Technology*. 2015, 50(12), 2509-2518.
14. RYAN, M. H., DERRICK, J. W. ir P. R. DANN. Grain mineral concentrations and yield of wheat grown under organic and conventional management. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2004, 84(3), 207-216.

15. LAMACCHIA, C., CAMARCA, A., PICASCIA, S., DI LUCCIA, A. ir C. GIANFRANI. Cereal-based gluten-free food: how to reconcile nutritional and technological properties of wheat proteins with safety for celiac disease patients. *Nutrients*. 2014, 6(2), 575-590.
16. DE BRIER, N., GOMAND, S.V., JOYE, I.J., PAREYT, B., COURTIN, C. M. ir J.A. DELCOUR. The impact of pearling as a treatment prior to wheat roller milling on the texture and structure of bran-rich breakfast flakes. *LWT-Food Science and Technology*. 2014, 62, 668-674.
17. HOSSAIN, K., ULVEN, C., GLOVER, K., GHAVAMI, F., SIMSEK, S. ir kt. Interdependence of cultivar and environment on fiber composition in wheat bran. *Australian Journal of Crop Science*. 2013, 7(4), 525.
18. BABU, C. R., KETANAPALLI, H., BEEBI, S. K. ir V. C. KOLLURU. Wheat bran-composition and nutritional quality: a review. *Advances in Biotechnology and Microbiology*. 2018, 9(1), 1-7.
19. HEMERY, Y., HOLOPAINEN, U., LAMPI, A. M., LEHTINEN, P., NURMI, T. ir kt. Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part II: Electrostatic separation of particles. *Journal of Cereal Science*. 2011, 53(1), 9-18.
20. ORDAZ-ORTIZ, J. J. ir L. SAULNIER. Structural variability of arabinoxylans from wheat flour. Comparison of water-extractable and xylanase-extractable arabinoxylans. *Journal of Cereal Science*. 2005, 42(1), 119-125.
21. SHAH, A., MASOODI, F. A., GANI, A., GANI, A., NOOR, N. ir A. FAZLI. Arabinoxylans. In *Food biopolymers: Structural, functional and nutraceutical properties*. Springer: Cham, 2021. pp. 173-186.
22. DERVILLY, G., SAULNIER, L., ROGER, P. ir J. F. THIBAUT. Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48(2), 270-278.
23. COURTIN, C. M. ir J. A. DELCOUR. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science*. 2002, 35(3), 225-243.
24. LI, W., ZHANG, S. ir C. SMITH. The molecular structure features-immune stimulatory activity of arabinoxylans derived from the pentosan fraction of wheat flour. *Journal of Cereal Science*. 2015, 62, 81-86.
25. MENDIS, M., LECLERC, E. ir S. SIMSEK. Arabinoxylans, gut microbiota and immunity. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 139, 159-166.
26. HAN, H. S., JANG, J. H., JANG, J. H., CHOI, J. S., KIM, Y. J. ir kt. Water extract of *Triticum aestivum* L. and its components demonstrate protective effect in a model of vascular dementia. *Journal of Medicinal Food*. 2010, 13(3), 572-578.
27. LOVEGROVE, A., EDWARDS, C. H., DE NONI I., PATEL, H., EL, S. N. ir kt. Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017, 57(2), 237-253.
28. MAKKI, K., DEEHAN, E. C., WALTER, J. ir F. BÄCKHED. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell Host & Microbe*. 2018, 23(6), 705-715.
29. MENDIS, M. ir S. SIMSEK. Arabinoxylans and human health. *Food Hydrocolloids*. 2014, 42, 239-243.

30. DURANTE, M., LENUCCI, M. S., RESCIO, L., MITA, G. ir S. CARETTO. Durum wheat by-products as natural sources of valuable nutrients. *Phytochemistry Reviews*. 2012, 11(2-3), 255-262.
31. ZANELLA, I., BIASIOTTO, G., HOLM, F. ir D. DI LORENZO. Cereal lignans, natural compounds of interest for human health?. *Natural Product Communications*. 2017, 12(1), 1934578X1701200139.
32. GORZKIEWICZ, J., BARTOSZ, G. ir I. SADOWSKA-BARTOSZ. The Potential Effects of Phytoestrogens: The Role in Neuroprotection. *Molecules*. 2021, 26(10), 2954.
33. RODRÍGUEZ-GARCÍA, C., SÁNCHEZ-QUESADA, C., TOLEDO, E., DELGADO-RODRÍGUEZ, M. ir J. J. GAFORIO. Naturally lignan-rich foods: A dietary tool for health promotion?. *Molecules*. 2019, 24(5), 917.
34. LI, L., SHEWRY, P. R. ir J. L. WARD. Phenolic acids in wheat varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56(21), 9732-9739.
35. HEMDANE, S., LEYS, S., JACOBS, P. J., DORNEZ, E., DELCOUR, J. A. ir C. M. COURTIN. Wheat milling by-products and their impact on bread making. *Food Chemistry*. 2015, 187, 280-289.
36. HEMDANE, S., JACOBS, P. J., DORNEZ, E., VERSPREET, J., DELCOUR, J. A. ir C. M. COURTIN. Wheat (*Triticum aestivum* L.) bran in bread making: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016, 15(1), 28-42.
37. IDRIS, W. H., BABIKER, E. E. ir A. H. EL TINAY. Fractionation, solubility and functional properties of wheat bran proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2003, 47(6), 425-429.
38. BOCK, J. ir K. SEETHARAMAN. Unfolding gluten: An overview of research on gluten. *Cereal Foods World*. 2012, 57(5), 209-214.
39. BIESIEKIERSKI, J. R. What is gluten?. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2017, 32, 78-81.
40. ŽILIĆ, S. Wheat gluten: Composition and health effects. In *Gluten*. New York: Nova Science Publishers. 2013. pp. 71-86.
41. LASZTITY, R. *The chemistry of cereal proteins*. Routledge: CRC Press, 2017.
42. WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*. 2007, 24(2), 115-119.
43. MIGUEL, Â. S. M., MARTINS-MEYER, T. S., DA COSTA FIGUEIREDO, É. V., LOBO, B. W. P. ir G. M. DELLAMORA-ORTIZ. Enzymes in bakery: current and future trends. In *Food Industry*. IntechOpen, 2013. pp. 287-321.
44. SHEWRY, P. R., HALFORD, N. G., BELTON, P. S. ir A. S. TATHAM. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 2002, 357(1418), 133-142.
45. RADOVANOVIC, N., CLOUTIER, S., BROWN, D., HUMPHREYS, D. G. ir O. M. LUKOW. Genetic variance for gluten strength contributed by high molecular weight glutenin proteins. *Cereal Chemistry*. 2002, 79(6), 843-849.
46. METAKOVSKY, E. V. ir R. A. GRAYBOSCH. Gliadin alleles in wheat: identification and applications. *Gliadin and Glutenin: the Unique Balance of Wheat Quality*. 2006, 85-114.
47. REUBEN, B. *Bread chemistry on the rise*. Chemistry world. UK: The History Press, 2009.

48. SHEWRY, P. What is gluten – Why is it special?. *Frontiers in Nutrition*. 2019, 6, 101.
49. GUPTA, R. B., KHAN, K. ir F. MACRITCHIE. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. *Journal of Cereal Science*. 1993, 18(1), 23-41.
50. HAMER, R. J. ir T. V. VLIET. Understanding the structure and properties of gluten: an overview. *Special Publication-Royal Society of Chemistry*. 2000, 261, 125-131.
51. RHAZI, L., CAZALIS, R. ir T. AUSSENAC. Sulfhydryl-disulfide changes in storage proteins of developing wheat grain: influence on the SDS-unextractable glutenin polymer formation. *Journal of Cereal Science*. 2003, 38(1), 3-13.
52. HU, X., CHENG, L., HONG, Y., LI, Z., LI, C. ir Z. GU. An extensive review: How starch and gluten impact dough machinability and resultant bread qualities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023, 63(13), 1930-1941.
53. SINGH, H. ir F. MACRITCHIE. Application of polymer science to properties of gluten. *Journal of Cereal Science*. 2001, 33(3), 231-243.
54. HE, W., YANG, R., ir W. ZHAO. Effect of acid deamidation-alkalase hydrolysis induced modification on functional and bitter-masking properties of wheat gluten hydrolysates. *Food chemistry*. 2019, 277, 655-663.
55. CHOI, Y., LIM, T., HE, Y. ir K. T. HWANG. Chemical characteristics and antioxidant properties of wheat gluten hydrolysates produced by single and sequential enzymatic hydrolyses using commercial proteases and their application in beverage system. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2019, 13(1), 745-754.
56. KYRIAKOPOULOU, K., KEPPLER, J. K. ir A. J. VAN DER GOOT. Functionality of ingredients and additives in plant-based meat analogues. *Foods*. 2021, 10(3), 600.
57. WANG, J. S., ZHAO, M. M., ZHAO, Q. Z. ir Y. M. JIANG. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chemistry*. 2007, 101(4), 1658-1663.
58. CRUZ-CHAMORRO, I., ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, N., SANTOS-SÁNCHEZ, G., PEDROCHE, J., FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S., MILLÁN, F. ir kt. Immunomodulatory and antioxidant properties of wheat gluten protein hydrolysates in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrients*. 2020, 12(6), 1-12.
59. LIM, T., HE, Y., PARK, B., CHOI, Y. ir K. T. HWANG. Wheat gluten hydrolysates prepared by sequential treatment with different combinations of commercial proteases. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2022, 16(5), 4064-4074.
60. NAVARRO, V., DEL PILAR FERNÁNDEZ-GIL, M., SIMÓN, E. ir M. Á. BUSTAMANTE. Gluten: general aspects and international regulations for products for celiac people. In: *Nutritional and Analytical Approaches of Gluten-Free Diet in Celiac Disease*, Miranda, J., Simón, E. (Eds.). Cham: Springer, 2017, pp. 15-27.
61. ROSZKOWSKA, A., PAWLICKA, M., MROCZEK, A., BAŁABUSZEK, K. ir B. NIERADKO-IWANICKA. Non-celiac gluten sensitivity: a review. *Medicina*. 2019, 55(6), 222.
62. NWARU, B. I., HICKSTEIN, L., PANESAR, S. S., ROBERTS, G., MURARO, A. ir kt. Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2014, 69(8), 992–1007.
63. CATASSI, C. New celiac icebergs are spotted, other are slowly emerging. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2017, 65(6), 601-2.

64. SINGH, P., ARORA, A., STRAND, T. A., LEFFLER, D. A., CATASSI, C. ir kt. Global prevalence of celiac disease: systematic review and meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2018, 16(6), 823-836.
65. KING, J. A., JEONG, J., UNDERWOOD, F. E., QUAN, J., PANACCIONE, N. ir kt. Incidence of celiac disease is increasing over time: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*. 2020, 115(4), 507-525.
66. WIESER, H. ir P. KOEHLER. Detoxification of gluten by means of enzymatic treatment. *Journal of AOAC international*. 2012, 95(2), 356–363.
67. PIETZAK, M. ir J. A. KERNER JR. Celiac disease, wheat allergy, and gluten sensitivity: when gluten free is not a fad. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2012, 36, 68S-75S.
68. YOOSUF, S. ir G. K. MAKHARIA. Evolving therapy for celiac disease. *Frontiers in Pediatrics*. 2019, 7, 193.
69. LIONETTI, E., PULVIRENTI, A., VALLORANI, M., CATASSI, G., VERMA, A. K. ir kt. Re-challenge studies in non-celiac gluten sensitivity: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Physiology*. 2017, 8, 1-9.
70. CATASSI, C., ELLI, L., BONAZ, B., BOUMA, G., CARROCCIO, A., CASTILLEJO, G. ir kt. Diagnosis of non-celiac gluten sensitivity (NCGS): the Salerno experts' criteria. *Nutrients*. 2015, 7(6), 4966-4977.
71. TANVEER, M. ir A. AHMED. Non-celiac gluten sensitivity: A systematic review. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. 2019, 29(1), 51-57.
72. PALOSUO, K. Update on wheat hypersensitivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2003, 3(3), 205-209.
73. TANABE, S. IgE-binding abilities of pentapeptides, QQPFP and PQQPF in wheat gliadin. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2004, 50(5), 367-370.
74. HERATIZADEH, A., WICHMANN, K., ir T. WERFEL. Food allergy and atopic dermatitis: how are they connected?. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2011, 11(4), 284-291.
75. BATTAIS, F., RICHARD, C., JACQUENET, S., DENERY-PAPINI, S. ir D. A. MONERET-VAUTRIN. Wheat grain allergies: an update on wheat allergens. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*. 2008, 40(3), 67.
76. ALLRED, L. K. ir B. W. RITTER. Recognition of gliadin and glutenin fractions in four commercial gluten assays. *Journal of AOAC International*. 2010, 93(1), 190-196.
77. MATSUO, H., MORITA, E., TATHAM, A. S., MORIMOTO, K., HORIKAWA, T. ir kt. Identification of the IgE-binding epitope in ω -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(13), 12135-12140.
78. HOFMANN, S. C., FISCHER, J., ERIKSSON, C., BENGTSSON GREF, O., BIEDERMANN, T. ir T. JAKOB. IgE detection to $\alpha/\beta/\gamma$ -gliadin and its clinical relevance in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergy*. 2012, 67(11), 1457-1460.
79. UVACKOVA, L., SKULTETY, L., BEKESOVA, S., MCCLAIN, S. ir M. HAJDUCH. MSE based multiplex protein analysis quantified important allergenic proteins and detected relevant peptides carrying known epitopes in wheat grain extracts. *Journal of proteome research*. 2013, 12(11), 4862-4869.
80. LARRE, C., LUPI, R., GOMBAUD, G., BROSSARD, C., BRANLARD, G. ir kt. Assessment of allergenicity of diploid and hexaploid wheat genotypes: Identification of

- allergens in the albumin/globulin fraction. *Journal of Proteomics*. 2011, 74(8), 1279-1289.
81. BURKHARDT, J. G., CHAPA-RODRIGUEZ, A. ir S. L. BAHNA. Gluten sensitivities and the allergist: Threshing the grain from the husks. *Allergy*. 2018, 73(7), 1359.
 82. PIOLLI, R., DE ANGELIS, M., LAMONACA, A., DE ANGELIS, E., RIZZELLO, C. G. ir kt. Prototype Gluten-Free Breads from Processed Durum Wheat: Use of Monovarietal Flours and Implications for Gluten Detoxification Strategies. *Nutrients*. 2020, 12(12), 3824.
 83. SOLLID, L. M., TYE-DIN, J. A., QIAO, S. W., ANDERSON, R. P., GIANFRANI, C. ir F. KONING. Update 2020: nomenclature and listing of celiac disease–relevant gluten epitopes recognized by CD4+ T cells. *Immunogenetics*. 2020, 72(1), 85-88.
 84. ARENTZ-HANSEN, H., MCADAM, S. N., MOLBERG, Ø., FLECKENSTEIN, B., LUNDIN, K. E. ir kt. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*. 2002, 123(3), 803-809.
 85. GIMÉNEZ, M. J., SÁNCHEZ-LEÓN, S., BARRO, F. ir M. D. GARCÍA-MOLINA. Gluten free wheat: Are we there?. *Nutrients*. 2019, 11(3), 487.
 86. MCALLISTER, B. P., WILLIAMS, E. ir K. CLARKE. A comprehensive review of celiac disease/gluten-sensitive enteropathies. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2019, 57(2), 226-243.
 87. OGILVIE, O., ROBERTS, S., SUTTON, K., DOMIGAN, L., LARSEN ir kt. Proteomic modelling of gluten digestion from a physiologically relevant food system: A focus on the digestion of immunogenic peptides from wheat implicated in celiac disease. *Food Chemistry*. 2020, 333, 127466.
 88. DZIUBA, M., DZIUBA, J., ir A. IWANIAK. Bioinformatics-aided characteristics of the structural motifs of selected potentially celiac-toxic proteins of cereals and leguminous plants. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2007, 57(4), 405-414.
 89. TOMER, R., PATIYAL, S., DHALL, A., ir G. P. RAGHAVA. Prediction of celiac disease associated epitopes and motifs in a protein. *Frontiers in Immunology*. 2023, 14, 1056101.
 90. ROCHER, A., SORIANO, F., MOLINA, E., GONZÁLEZ-LIMAS, G. ir E. MÉNDEZ. Characterization of distinct α - and γ -type gliadins and low molecular weight components from wheat endosperm as coeliac immunoreactive proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1995, 1247(1), 143-148.
 91. SHAN, L., QIAO, S. W., ARENTZ-HANSEN, H., MOLBERG, Ø., GRAY, G. M. ir kt. Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *Journal of Proteome Research*. 2005, 4(5), 1732-1741.
 92. GAO, J., YU, P., LIANG, H., FU, J., LUO, Z. ir D. YANG. The wPDI Redox Cycle Coupled Conformational Change of the Repetitive Domain of the HMW-GS 1Dx5 – A Computational Study. *Molecules*. 2020, 25(19), 4393.
 93. BROMILOW, S., GETHINGS, L. A., BUCKLEY, M., BROMLEY, M., SHEWRY, P. ir kt. A curated gluten protein sequence database to support development of proteomics methods for determination of gluten in gluten-free foods. *Journal of Proteomics*. 2017, 163, 67-75.
 94. TYE-DIN, J. A., STEWART, J. A., DROMEY, J. A., BEISSBARTH, T., VAN HEEL, D. A. ir kt. Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Science Translational Medicine*. 2010, 2(41), 41ra51.

95. JOUANIN, A., GILISSEN, L. J., SCHAART, J. G., LEIGH, F. J., COCKRAM, J. ir kt. CRISPR/Cas9 gene editing of gluten in wheat to reduce gluten content and exposure – reviewing methods to screen for coeliac safety. *Frontiers in Nutrition*. 2020, 7, 51.
96. SPAENIJ-DEKKING, L., KOOY-WINKELAAR, Y., VAN VEELLEN, P., DRIJFHOUT, J. W., JONKER, H. ir kt. Natural variation in toxicity of wheat: potential for selection of nontoxic varieties for celiac disease patients. *Gastroenterology*. 2005, 129(3), 797-806.
97. RIBEIRO, M., RODRIGUEZ-QUIJANO, M., NUNES, F. M., CARRILLO, J. M., BRANLARD, G. ir G. IGREJAS. New insights into wheat toxicity: Breeding did not seem to contribute to a prevalence of potential celiac disease's immunostimulatory epitopes. *Food Chemistry*. 2016, 213, 8-18.
98. ZANNINI, E., PONTONIO, E., WATERS, D. M. ir E. K. ARENDT. Applications of microbial fermentations for production of gluten-free products and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 93(2), 473-485.
99. KRIGEL, A. ir B. LEBWOHL. Nonceliac gluten sensitivity. *Advances in Nutrition*. 2016, 7(6), 1105-1110.
100. DO NASCIMENTO, A. B., FIATES, G. M. R. ir E. TEIXEIRA. We want to be normal! Perceptions of a group of Brazilian consumers with coeliac disease on gluten-free bread buns. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2017, 7, 27-31.
101. SLOT, I. B., BREMER, M. G. E. G., HAMER, R. J. ir H. J. VAN DER FELS-KLERX. Part of celiac population still at risk despite current gluten thresholds. *Trends in Food Science & Technology*. 2015, 43(2), 219-226.
102. ESTÉVEZ, V., AYALA, J., VESPA, C. ir M. ARAYA The gluten-free basic food basket: a problem of availability, cost and nutritional composition. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2016, 70(10), 1215-1217.
103. HOPKINS, S. ir J. M. SOON. Nutritional quality, cost and availability of gluten-free food in England. *British Food Journal*. 2019, 121(11), 2867-2882.
104. STANTIAL, S. E. ir L. SERVINTI. Nutritional and sensory challenges of gluten-free bakery products: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2018, 69(4), 427-436.
105. PELLEGRINI, N. ir C. AGOSTONI. Nutritional aspects of gluten-free products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015, 95(12), 2380-2385.
106. VICI, G., BELL, L., BIONDI, M. ir V. POLZONETTI. Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clinical Nutrition*. 2016, 35(6), 1236-1241.
107. CHISHTY, S. ir N. SINGH. Nutritional status of celiac and non-celiac children from Rajasthan, India. *Nutrition & Food Science*. 2017, 47(2), 240-253.
108. TRAN, C. D., KATSIKEROS, R., MANTON, N., KREBS, N.F., HAMBIDGE, K.M. ir kt. Zinc homeostasis and gut function in children with celiac disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011, 94, 1026-1032.
109. STAZI, A. V. ir B. TRINTI. Selenium deficiency in celiac disease: risk of autoimmune thyroid diseases. *Minerva Medica*. 2008, 99(6), 643-653.
110. AGUIAR, E. V., SANTOS, F. G., KRUPA-KOZAK, U. ir V. D. CAPRILES. Nutritional facts regarding commercially available gluten-free bread worldwide: Recent advances and future challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021, 1-13.
111. NAQASH, F., GANI, A., GANI, A., ir F. A. MASOODI. Gluten-free baking: Combating the challenges-A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2017, 66, 98-107.

112. EL-GHAISH, S., AHMADOVA, A., HADJI-SFAXI, I., EL MECHERFI, K. E., BAZUKYAN ir kt. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Science & Technology*. 2011, 22(9), 509-516.
113. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten, 2008, [žiūrėta 2020-09-19]. Prieiga per internetą: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/291/cxs_118e.pdf.
114. BASSI, N. D. *Gluten-free starch and methods of producing the same*. U.S. Patent Application No. 15/193, 622, 2016. [žiūrėta 2019-11-16]. Prieiga per internetą: <https://patents.google.com/patent/US20160374374A1/en>.
115. LESZCZYŃSKA, J., ŁĄCKA, A., SZEMRAJ, J., LUKAMOWICZ, J. ir H. ZEGOTA. The effect of microwave treatment on the immunoreactivity of gliadin and wheat flour. *European Food Research and Technology*. 2003, 217(5), 387-391.
116. LAMACCHIA, C., LANDRISCINA, L. ir P. D'AGNELLO. Changes in wheat kernel proteins induced by microwave treatment. *Food Chemistry*. 2016, 197, 634-640.
117. GIANFRANI, C., MAMONE, G., LA GATTA, B., CAMARCA, A., DI STASIO, L. ir kt. Microwave-based treatments of wheat kernels do not abolish gluten epitopes implicated in celiac disease. *Food and Chemical Toxicology*. 2017, 101, 105-113.
118. MAHROUG, H., RIBEIRO, M., RHAZI, L., BENTALLAH, L., ZIDOUNE, M. N. ir kt. How microwave treatment of gluten affects its toxicity for celiac patients? A study on the effect of microwaves on the structure, conformation, functionality and immunogenicity of gluten. *Food Chemistry*. 2019, 297, 124986.
119. KANG, B. K., KIM, K. B. W. R., KIM, M. J., BARK, S. W., PAK, W. M. ir kt. Changes in Allergenicity of Gliadin in Strong Wheat Flour by Physical Treatments. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2014, 43(4), 557-563.
120. STANCIUC, N., BANU, I., BOLEA, C., PATRASCU, L. ir I. APRODU. Structural and antigenic properties of thermally treated gluten proteins. *Food Chemistry*, 267, 43-51.
121. YAO, Y., JIA, Y., LU, X. ir H. LI. Release and conformational changes in allergenic proteins from wheat gluten induced by high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*. 2022, 368, 130805.
122. ZHANG, H., CLAVER, I. P., ZHU, K. X. ir H. ZHOU. The effect of ultrasound on the functional properties of wheat gluten. *Molecules*. 2011, 16(5), 4231-4240.
123. ZHANG, Y., MA, H., WANG, B., QU, W., LI, Y. ir kt. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymolysis and structural characterization of wheat gluten. *Food Biophysics*. 2015, 10(4), 385-395.
124. YANG, X., LI, Y., LI, S., OLADEJO, A. O., WANG, Y. ir kt. Effects of multi-frequency ultrasound pretreatment under low power density on the enzymolysis and the structure characterization of defatted wheat germ protein. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017, 38, 410-420.
125. KWIATKOWSKA, B., BENNETT, J., AKUNNA, J., WALKER, G. M. ir D. H. BREMNER. Stimulation of bioprocesses by ultrasound. *Biotechnology Advances*. 2011, 29(6), 768-780.
126. DELGADO-POVEDANO, M. M. ir M. L. DE CASTRO. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. *Analytica Chimica Acta*. 2015, 889, 1-21.

127. YU, Z. L., ZENG, W. C., ZHANG, W. H., LIAO, X. P. ir B. SHI. Effect of ultrasound on the activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014, 21(3), 930-936.
128. RIZZELLO, C. G., DE ANGELIS, M., DI CAGNO, R., CAMARCA, A., SILANO, M. ir kt. Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73(14), 4499-4507.
129. RAHAMAN, T., VASILJEVIC T. ir L. RAMCHANDRAN. Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, 49, 24-34.
130. GAO, H., JORGENSEN, R., RAGHUNATH, R., NAGISETTY, S., NG, P. K. ir V. GANGUR. Creating hypo-/nonallergenic wheat products using processing methods: Fact or fiction?. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021, 20(6), 6089-6115.
131. BRADAUSKIENE, V., VAICIULYTE-FUNK, L., SHAH, B. R., CERNAUSKAS, D., ir M. A TITA. Recent advances in biotechnological methods for wheat gluten immunotoxicity abolishment—a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2021, 71(1), 5-20.
132. SCHERF, K.A., WIESER, H. ir P. KOEHLER. Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. *Food Research International*. 2018, 110, 62-72.
133. JOUANIN, A., GILISSEN, L. J., BOYD, L. A., COCKRAM, J., LEIGH ir kt. Food processing and breeding strategies for coeliac-safe and healthy wheat products. *Food Research International*. 2018, 110, 11-21.
134. GOBBETTI, M., DE ANGELIS, M., DI CAGNO, R., CALASSO, M., ARCHETTI, G., ir C. G. RIZZELLO. Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2019, 302, 103-113.
135. LOPONEN, J., MIKOLA, M., KATINA, K., SONTAG-STROHM, T. ir H. SALOVAARA. Degradation of HMW glutenins during wheat sourdough fermentations. *Cereal Chemistry*. 2004, 81(1), 87-93.
136. TANNER, G. J., COLGRAVE, M. L. ir C. A. HOWITT. Gluten, celiac disease, and gluten intolerance and the impact of gluten minimization treatments with prolylendopeptidase on the measurement of gluten in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2014, 72(1), 36-50.
137. GUERDRUM, L. J. ir C. W. BAMFORTH. Prolamin levels through brewing and the impact of prolyl endoproteinase. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2012, 70(1), 35-38.
138. KNORR, V., WIESER, H. ir P. KOEHLER. Production of gluten-free beer by peptidase treatment. *European Food Research and Technology*. 2016, 242(7), 1129-1140.
139. KERPEŠ, R., KNORR, V., PROCOPIO, S., KOEHLER, P. ir T. BECKER. Gluten-specific peptidase activity of barley as affected by germination and its impact on gluten degradation. *Journal of Cereal Science*. 2016, 68, 93-99.
140. MICHALCOVÁ, E., POTOCKÁ, E., CHMELOVÁ, D. ir M. ONDREJOVIC. Study of wheat protein degradation during germination. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2019, 1(6), 1437-1447.

141. ADRIANOS, S. L., MATTIONI, B. ir M. TILLEY. Confirmation of gluten-free status of wheatgrass (*Triticum aestivum*). *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*. 2017, 9(1), 123-128.
142. STENMAN, S. M., VENÄLÄINEN, J. I., LINDFORS, K., AURIOLA, S., MAURIALA, T. ir kt. Enzymatic detoxification of gluten by germinating wheat proteases: implications for new treatment of celiac disease. *Annals of Medicine*. 2009, 41(5), 390-400.
143. GEßENDORFER, B., HARTMANN, G., WIESER, H. ir P. KOEHLER. Determination of celiac disease-specific peptidase activity of germinated cereals. *European Food Research and Technology*. 2011, 232(2), 205-209.
144. SCHWALB, T., WIESER, H. ir P. KOEHLER. Studies on the gluten-specific peptidase activity of germinated grains from different cereal species and cultivars. *European Food Research and Technology*. 2012, 235(6), 1161-1170.
145. DIAZ-MENDOZA, M., DIAZ, I. ir M. MARTINEZ. Insights on the proteases involved in barley and wheat grain germination. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20(9), 2087-2098.
146. DING J., HOU G. G., NEMZER B. V., XIONG S., DUBAT A. ir H. FENG. Effects of controlled germination on selected physicochemical and functional properties of whole-wheat flour and enhanced γ -aminobutyric acid accumulation by ultrasonication. *Food Chemistry*. 2018, 243, 214-221.
147. BARANZELLI, J., KRINGEL, D. H., COLUSSI, R., PAIVA, F. F., ARANHA, B. C. ir kt. Changes in enzymatic activity, technological quality and gamma-aminobutyric acid (GABA) content of wheat flour as affected by germination. *LWT-Food Science and Technology*. 2018, 90, 483-490.
148. CARDONE, G., D'INCECCO, P., PAGANI, M. A. ir A. MARTI. Sprouting improves the bread-making performance of whole wheat flour (*Triticum aestivum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2020, 100(6), 2453-2459.
149. THOMASON, W. E., HUGHES, K. R., GRIFF, C. A., PARRISH, D. J. ir W. E. BARBEAU. Understanding pre-harvest sprouting of wheat. *Publications, Virginia Cooperative Extension*. 2019, 424, 1-4.
150. BATTCOCK, M. ir S. AZAM-ALI *Fermented fruits and vegetables: a global perspective*. Rome Food and Agriculture Organization of the United Nations,. 1998.
151. KATINA, K., HEINIÖ, R. L., AUTIO, K. ir K. POUTANEN. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *LWT-Food Science and Technology*. 2006, 39(10), 1189-1202.
152. LUZ, C., D'OPAZO, V., MAÑES, J. ir G. MECA. Antifungal activity and shelf life extension of loaf bread produced with sourdough fermented by *Lactobacillus* strains. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2019, 43(10), 1-8.
153. SUN, L., LI, X., ZHANG, Y., YANG, W., MA, G. ir kt. A novel lactic acid bacterium for improving the quality and shelf life of whole wheat bread. *Food Control*. 2020, 109, 106914.
154. GÄNZLE, M. G., LOPONEN, J. ir M. GOBBETTI. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science & Technology*. 2008, 19(10), 513-521.
155. VUKOTIĆ, G., STRAHINIĆ, I., BEGOVIĆ, J., LUKIĆ, J., KOJIĆ, M. ir D. FIRA. Survey on proteolytic activity and diversity of proteinase genes in mesophilic lactobacilli. *Microbiology*. 2016, 85(1), 33-41.

156. STEFAŃSKA, I., PIASECKA-JÓŹWIAK, K., KOTYRBA, D., KOLENDA, M. ir K. M. STECKA. Selection of lactic acid bacteria strains for the hydrolysis of allergenic proteins of wheat flour. *Journal of the Science of Food & Agriculture*. 2016, 96(11), 3897-3905.
157. DI CAGNO, R., DE ANGELIS, M., LAVERMICOCCA, P., DE VINCENZI, M., GIOVANNINI, C. ir kt. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68(2), 623-633.
158. DI CAGNO, R., DE ANGELIS, M., AURICCHIO, S., GRECO, L. , CLARKE, C. ir kt. Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected *Lactobacilli* is tolerated in celiac sprue patients. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, 70, 1088-96.
159. DI CAGNO, R., RIZZELLO, C. G., DE ANGELIS, M., CASSONE, A., GIULIANI, G. ir kt. Use of selected sourdough strains of *Lactobacillus* for removing gluten and enhancing the nutritional properties of gluten-free bread. *Journal of Food Protection*. 2008, 71(7), 1491-1495.
160. THIELE, C., GRASSL, S. ir M. GÄNZLE. Gluten hydrolysis and depolymerization during sourdough fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52(5), 1307-1314.
161. VERMEULEN, N., KRETZER, J., MACHALITZA, H., VOGEL, R. F. ir M. G. GÄNZLE. Influence of redox-reactions catalysed by homo-and hetero-fermentative *lactobacilli* on gluten in wheat sourdoughs. *Journal of Cereal Science*. 2006, 43(2), 137-143.
162. YIN, Y., WANG, J., YANG, S., FENG, J., JIA, F. ir C. ZHANG. Protein degradation in wheat sourdough fermentation with *Lactobacillus plantarum* M616. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*. 2015, 7(2), 205-210.
163. EL MECHERFI, K. E., LUPI, R., CHERKAoui, M., ALBUQUERQUE, M. A., TODOROV, S. D. ir kt. Fermentation of gluten by *Lactococcus lactis* LLGKC18 reduces its antigenicity and allergenicity. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2022, 14(5), 779-791.
164. KUNDUHOGLU, B. ir S. HACIOGLU. Probiotic potential and gluten hydrolysis activity of *Lactobacillus brevis* KT16-2. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2021, 13(3), 720-733.
165. ROLLAN, G., DE ANGELIS, M., GOBBETTI, M. ir G. F. DE VALDEZ. Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough *lactobacilli*. *Journal of Applied Microbiology*. 2005, 99(6), 1495-1502.
166. GEREZ, C. L., FONT DE VALDEZ, G. ir G. C. ROLLAN. Functionality of lactic acid bacteria peptidase activities in the hydrolysis of gliadin-like fragments. *Letters in Applied Microbiology*. 2008, 47(5), 427-432.
167. GEREZ, C. L., DALLAGNOL, A., ROLLÁN, G. ir G. F. DE VALDEZ. A combination of two lactic acid bacteria improves the hydrolysis of gliadin during wheat dough fermentation. *Food Microbiology*. 2012, 32(2), 427-430.
168. ROMANOVÁ, K. ir D. URMINSKÁ. Potential of *Lactobacillus plantarum* CCM 3627 and *Lactobacillus brevis* CCM 1815 for fermentation of cereal substrates. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 2017, 11(1), 544-549.
169. DE ANGELIS, M., RIZZELLO, C.G., FASANO, A., CLEMENTE, M.G., DE SIMONE, C. ir kt. VSL# 3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides

responsible for celiac sprue probiotics and gluten intolerance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease*. 2006, 1762(1), 80-93.

170. FRANCAVILLA, R., DE ANGELIS, M., RIZZELLO, C. G., CAVALLO, N., DAL BELLO, F. ir M. GOBBETTI. Selected probiotic *lactobacilli* have the capacity to hydrolyze gluten peptides during simulated gastrointestinal digestion. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017, 83(14), 1-12.
171. FU, W., XUE, W., LIU, C., TIAN, Y., ZHANG, K. ir Z. ZHU. Screening of Lactic Acid Bacteria and yeasts from sourdough as starter cultures for reduced allergenicity wheat products. *Foods*. 2020, 9(6), 751-761.
172. DE ALMEIDA, N. E. C., ESTEVES, F. G., DOS SANTOS-PINTO, J. R. A., PERES DE PAULA, C., DA CUNHA, A. F. ir kt. Digestion of intact gluten proteins by *Bifidobacterium* species: Reduction of cytotoxicity and proinflammatory responses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020, 68(15), 4485-4492.
173. LAATIKAINEN, R., KOSKENPATO, J., HONGISTO, S. M., LOPONEN, J., POUSSA, T. ir kt. Pilot study: Comparison of sourdough wheat bread and yeast-fermented wheat bread in individuals with wheat sensitivity and irritable bowel syndrome. *Nutrients*. 2017, 9(11), 1215.
174. HEREDIA-SANDOVAL, N. G., VALENCIA-TAPIA, M. Y., CALDERÓN DE LA BARCA, A. M. ir A. R. ISLAS-RUBIO. Microbial proteases in baked goods: modification of gluten and effects on immunogenicity and product quality. *Foods*. 2016, 5(3), 59-69.
175. MATYSIAK-BUDNIK, T., CANDALH, C., CELLIER, C., DUGAVE, C., NAMANE, A. ir kt. Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*. 2005, 129(3), 786-796.
176. SOCHA, P., MICKOWSKA, B., URMINSKÁ, D. ir K. KAČMÁROVÁ. The use of different proteases to hydrolyze gliadins. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2015, 4(2), 101-104.
177. BOUKID, F., PRANDI, B., BUHLER, S. ir S. SFORZA. Effectiveness of germination on protein hydrolysis as a way to reduce adverse reactions to wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, 65(45), 9854-9860.
178. SHETTY, R., VESTERGAARD, M., JESSEN, F., HÄGGLUND, P., KNORR, V. ir kt. Discovery, cloning and characterisation of proline specific prolyl endopeptidase, a gluten degrading thermo-stable enzyme from *Sphaerobacter thermophiles*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2017, 107, 57-63.
179. SAKANDAR, H. A., USMAN, K. ir M. IMRAN. Isolation and characterization of gluten-degrading *Enterococcus mundtii* and *Wickerhamomyces anomalus*, potential probiotic strains from indigenously fermented sourdough (Khamir). *LWT- Food Science and Technology*. 2018, 91, 271-277.
180. KUMAR, J., VERMA, M. K., KUMAR, T., GUPTA, S., PANDEY, R., ir kt. S9A serine protease engender antigenic gluten catabolic competence to the human gut microbe. *Indian Journal of Microbiology*. 2018, 58(3), 294-300.
181. SHAN, L., MARTI, T., SOLLID, L. M., GRAY, G. M. ir C. KHOSLA. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochemical Journal*. 2004, 383(2), 311-318.
182. MORENO AMADOR, M. D. L., ARÉVALO-RODRÍGUEZ, M., DURÁN, E. M., MARTÍNEZ REYES, J. C. ir C. SOUSA MARTÍN. A new microbial gluten-degrading

- prolyl endopeptidase: Potential application in celiac disease to reduce gluten immunogenic peptides. *PLoS One*. 2019, 14(6), e0218346.
183. CAVALETTI, L., TARAVELLA, A., CARRANO, L., CARENZI, G., SIGURTÀ, A. ir kt. E40, a novel microbial protease efficiently detoxifying gluten proteins, for the dietary management of gluten intolerance. *Scientific Reports*. 2019, 9(1), 1-11.
 184. RASHMI, B. S., GAYATHRI, D., VASUDHA, M., PRASHANTKUMAR, C. S., SWAMY, C. T. ir kt. Gluten hydrolyzing activity of *Bacillus spp* isolated from sourdough. *Microbial Cell Factories*. 2020, 19(1), 1-11.
 185. LIU, Y. Y., LEE, C. C., HSU, J. H., LEU, W. M. ir M. MENG. Efficient hydrolysis of gluten-derived celiac disease-triggering immunogenic peptides by a bacterial serine protease from *Burkholderia gladioli*. *Biomolecules*. 2021, 11(3), 451.
 186. KÕIV, V. ir T. TENSON. Gluten-degrading bacteria: Availability and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021, 105(8), 3045-3059.
 187. GORDON, S. R., STANLEY, E. J., WOLF, S., TOLAND, A., WU, S. J. ir kt. Computational design of an α -gliadin peptidase. *Journal of the American Chemical Society*. 2012, 134(50), 20513-20520.
 188. WOLF, C., SIEGEL, J. B., TINBERG, C., CAMARCA, A., GIANFRANI, C. ir kt. Engineering of Kuma030: a gliadin peptidase that rapidly degrades immunogenic gliadin peptides in gastric conditions. *Journal of the American Chemical Society*. 2015, 137(40), 13106-13113.
 189. EHREN, J., MORÓN, B., MARTIN, E., BETHUNE, M. T., GRAY, G. M. ir C. KHOSLA. A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PLoS One*. 2009, 4(7), e6313.
 190. KIYOSAKI, T., ASAKURA, T., MATSUMOTO, I., TAMURA, T., TERAUCHI, K. ir kt. Wheat cysteine proteases triticain α , β and γ exhibit mutually distinct responses to gibberellin in germinating seeds. *Journal of Plant Physiology*. 2009, 166(1), 101-106.
 191. SAVVATEEVA, L. V., GOROKHOVETS, N. V., MAKAROV, V. A., SEREBRYAKOVA, M. V., SOLOVYEV, A. G. ir kt. Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease *Triticain- α* : feasibility for enzymatic therapy assays. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2015, 62, 115-124.
 192. LUONGO, D., MAURANO, F., BERGAMO, P. ir M. ROSSI. Microbial transglutaminase: A biotechnological tool to manage gluten intolerance. *Analytical Biochemistry*. 2020, 592, 113584.
 193. ZHOU, L., WU, Y., CHENG, Y., WANG, J., LU, J. ir kt. Blocking celiac antigenicity of the glutamine-rich gliadin 33-mer peptide by microbial transglutaminase. *RSC Advances*. 2017, 7(24), 14438-14447.
 194. MAZZEO, M. F., BONAVIDA, R., MAURANO, F., BERGAMO, P., SICILIANO, R. A. ir M. ROSSI. Biochemical modifications of gliadins induced by microbial transglutaminase on wheat flour. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2013, 1830(11), 5166-5174.
 195. MARINO, M., CASALE, R., BORGHINI, R., DI NARDI, S., DONATO, G. ir kt. The effects of modified versus unmodified wheat gluten administration in patients with celiac disease. *International Immunopharmacology*. 2017, 47, 1-8.
 196. AARON, L. ir M. TORSTEN. Microbial transglutaminase: A new potential player in celiac disease. *Clinical Immunology*. 2019, 199, 37-43.

197. AMIRDIVANI, S., KHORSHIDIAN, N., FIDELIS, M., GRANATO, D., KOUSHKI, M. R. ir kt. Effects of transglutaminase on health properties of food products. *Current Opinion in Food Science*. 2018, 22, 74-80.
198. MATTHIAS, T., JEREMIAS, P., NEIDHÖFER, S. ir A. LERNER. The industrial food additive, microbial transglutaminase, mimics tissue transglutaminase and is immunogenic in celiac disease patients. *Autoimmunity Reviews*. 2016, 15(12), 1111-1119.
199. STEPNIAK, D., SPAENIJ-DEKKING, L., MITEA, C., MOESTER, M., DE RU, A. ir kt. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006, 291(4), G621-G629.
200. TOFT-HANSEN, H., RASMUSSEN, K. S., STAAL, A., ROGGEN, E. L., SOLLID, L. M. ir kt. Treatment of both native and deamidated gluten peptides with an endo-peptidase from *Aspergillus niger* prevents stimulation of gut-derived gluten-reactive T cells from either children or adults with celiac disease. *Clinical Immunology*. 2014, 153(2), 323-331.
201. JANSSEN, G., CHRISTIS, C., KOOY-WINKELAAR, Y., EDENS, L., SMITH, D. ir kt. Ineffective degradation of immunogenic gluten epitopes by currently available digestive enzyme supplements. *PLoS ONE*. 2015, 10(6), 1-15.
202. KUMAR, B. M., SARABHAI, S. ir P. PRABHASANKAR. Targeted degradation of gluten proteins in wheat flour by prolyl endoprotease and its utilization in low immunogenic pasta for gluten sensitivity population. *Journal of Cereal Science*. 2019, 87, 59-67.
203. MITEA, C., HAVENAAR, R., DRIJFHOUT, J. W., EDENS, L., DEKKING, L. ir F. KONING. Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut*. 2008, 57(1), 25-32.
204. MONTSERRAT, V., BRUINS, M. J., EDENS, L. ir F. KONING. Influence of dietary components on *Aspergillus niger* prolyl endoprotease mediated gluten degradation. *Food Chemistry*. 2015, 174, 440-445.
205. DECKER, C. *Aspergillus niger*-derived Prolyl Endoprotease Improves Gluten Degradation. *Integrative Medicine Alert*. 2015, 18(11).
206. MICKOWSKA, B., ROMANOVA, K., SOCHA, P. ir D. URMINSKA. Reduction of immunoreactivity of wheat and rye prolamins by *Flavourzyme* proteolysis. *Journal of Food & Nutrition Research*. 2018, 57(3).
207. SCHULZ K., GIESLER L., LINKE D. ir R. G. BERGER. A prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* for the possible degradation of celiac disease provoking toxic peptides in cereal proteins. *Process Biochemistry*. 2018, 73, 47-55.
208. JAYAWARDANA, I. A., MONTOYA, C. A., MCNABB, W. C. ir M. J. BOLAND. Possibility of minimizing gluten intolerance by co-consumption of some fruits – A case for positive food synergy? *Trends in Food Science & Technology*. 2019, 94, 91-97.
209. MESHRAM, A., SINGHAL, G., BHAGYAWANT, S. S. ir N. SRIVASTAVA. Plant-derived enzymes: a treasure for food biotechnology. In M. Kuddus (Edr.), *Enzymes in Food Biotechnology*, Academic Press, pp. 483-502, 2019.
210. SUN, Q., ZHANG, B., YAN, Q. J. ir Z. Q. JIANG. Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. *Food Chemistry*. 2016, 213, 708-713.

211. WATANABE, M., WATANABE, J., SONOYAMA, K. ir S. TANABE. Novel method for producing hypoallergenic wheat flour by enzymatic fragmentation of the constituent allergens and its application to food processing. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2000, 64(12), 2663-2667.
212. XUE, L., LI, Y., LI, T., PAN, H., LIU, J. ir kt. Phosphorylation and enzymatic hydrolysis with alcalase and papain effectively reduce allergic reactions to gliadins in normal mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019, 67(22), 6313-6323.
213. LAROCCA, M., ROSSANO, R. ir P. RICCIO. Analysis of green kiwi fruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) proteinases by two-dimensional zymography and direct identification of zymographic spots by mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010, 90(14), 2411-2418.
214. KAUR, L., RUTHERFURD, S. M., MOUGHAN, P. J., DRUMMOND, L. ir M. J. BOLAND. Actinidin enhances protein digestion in the small intestine as assessed using an *in vitro* digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58(8), 5074-5080.
215. RUTHERFURD, S. M., MONTOYA, C. A., ZOU, M. L., MOUGHAN, P. J., DRUMMOND, L. N. ir M. J. BOLAND. Effect of actinidin from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on the digestion of food proteins determined in the growing rat. *Food Chemistry*. 2011, 129(4), 1681-1689.
216. TAGA, Y., HAYASHIDA, O., KUSUBATA, M., OGAWA-GOTO, K. ir S. HATTORI. Production of a novel wheat gluten hydrolysate containing dipeptidyl peptidase-IV inhibitory tripeptides using ginger protease. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2017, 81(9), 1823-1828.
217. REY, M., YANG, M., LEE, L., ZHANG, Y., SHEFF, J. G. ir kt. Addressing proteolytic efficiency in enzymatic degradation therapy for celiac disease. *Scientific Reports*. 2016, 6, 30980.
218. BELLIR, N., BELLIR, M. N. ir L. ROUABAH. Enzymatic degradation of gliadin by *Nigella sativa* seeds protease: Implications for new treatment of celiac disease. *World Journal of Pharmacy Sciences*. 2014, 3(12), 1555-1571.
219. GABR, G. A. Extraction and purification of protease from *Nigella sativa* for its potential use in celiac disease. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*. 2018, 8(3), 1-9.
220. MILAN, K. M., DHOLAKIA, H., TIKU, P. K. ir P. VISHVESHWARAIAH. Enhancement of digestive enzymatic activity by cumin (*Cuminum cyminum* L.) and role of spent cumin as a bionutrient. *Food Chemistry*. 2008, 110(3), 678-683.
221. SIOW, H. L., CHOI, S. B. ir C. Y. GAN. Structure–activity studies of protease activating, lipase inhibiting, bile acid binding and cholesterol-lowering effects of pre-screened cumin seed bioactive peptides. *Journal of Functional Foods*. 2016, 27, 600-611.
222. WHITEHURST, R. J. ir M. VAN OORT. (Eds.). *Enzymes in food technology*. Singapore: Wiley-Blackwell, 2010.
223. FEIJOO-SIOTA, L. ir T. G. VILLA. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess Technology*. 2011, 4(6), 1066-1088.
224. PAHLAVAN, A., SHARMA, G. M., PEREIRA, M. ir K. M. WILLIAMS. Effects of grain species and cultivar, thermal processing, and enzymatic hydrolysis on gluten quantitation. *Food Chemistry*. 2016, 208, 264-271.

225. POLAINA, J. ir A. P. MACCABE. *Industrial Enzymes* Netherlands: Springer, 2007. (pp. 531–547).
226. CAO, W., BAUMERT, J. L. ir M. L. DOWNS. Evaluation of N-terminal labeling mass spectrometry for characterization of partially hydrolyzed gluten proteins. *Journal of Proteomics*. 2020, 210, 103538.
227. GIORGI, A., CERRONE, R., CAPOBIANCO, D., FILARDO, S., MANCINI, P. ir kt. A probiotic preparation hydrolyzes gliadin and protects intestinal cells from the toxicity of pro-inflammatory peptides. *Nutrients*. 2020, 12(2), 495, 1-13.
228. PILON, F. M., SILVA, C. D. R., VISÔTTO, L. E., BARROS, R. D. A., DA SILVA JÚNIOR, N. R. it kt. Purification and characterization of trypsin produced by gut bacteria from *Anticarsia gemmatalis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 2017, 96(2), e21407.
229. RAMALHO-ORTIGAO, J. M., KAMHAWI, S., ROWTON, E. D., RIBEIRO, J. M. C. ir J. G. VALENZUELA. Cloning and characterization of trypsin-and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2003, 33(2), 163-171.
230. OSUNA-AMARILLAS, P. S., CINCO-MOROYOQUI, F. J., CÁRDENAS-LÓPEZ, J. L., EZQUERRA-BRAUER, J. M., SOTELO-MUNDO, R. ir kt. Biochemical and kinetic characterization of the digestive trypsin-like activity of the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* (F.)(Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research*. 2012, 51, 41-48.
231. GOPTAR, I. A., SHAGIN, D. A., SHAGINA, I. A., MUDRIK, E. S., SMIRNOVA, Y. ir kt. A digestive prolyl carboxypeptidase in *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2013, 43(6), 501-509.
232. MIKA, N., GORSHKOV, V., SPENGLER, B., ZORN, H. ir M. RÜHL. Characterization of novel insect associated peptidases for hydrolysis of food proteins. *European Food Research and Technology*. 2015, 240(2), 431-439.
233. TERESHCHENKOVA, V. F., GOPTAR, I. A., KULEMZINA, I. A., ZHUZHNIKOV, D. P., SEREBRYAKOVA, M. V. ir kt. Dipeptidyl peptidase 4 – an important digestive peptidase in *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2016, 76, 38-48.
234. GROVER, S., KAUR, S., GUPTA, A. K., TAGGAR, G. K. ir J. KAUR. Characterization of trypsin like protease from *Helicoverpa armigera* (Hubner) and its potential inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 2018, 88. pp. 49-56.
235. PRANDI, B. Celiac Disease: Gluten Peptides Characterization after *In Vitro* Digestion. In *Wheat Improvement, Management and Utilization*. IntechOpen, 2017.
236. HEREDIA-SANDOVAL, N. G., ISLAS-RUBIO, A. R., CABRERA-CHÁVEZ, F. ir A. M. C. DE LA BARCA. Transamidation of gluten proteins during the bread-making process of wheat flour to produce breads with less immunoreactive gluten. *Food & Function*. 2014, 5(8), 1813-1818.
237. GUTIÉRREZ, S., PÉREZ-ANDRÉS, J., MARTÍNEZ-BLANCO, H., FERRERO, M. A., VAQUERO, L. ir kt. The human digestive tract has proteases capable of gluten hydrolysis. *Molecular Metabolism*. 2017, 6(7), 693-702.

238. TAVANO, O. L., BERENGUER-MURCIA, A., SECUNDO, F. ir R. FERNANDEZ-LAFUENTE. Biotechnological applications of proteases in food technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018, 17(2), 412-436.
239. LOPONEN, J., SONTAG-STROHM, T., VENÄLÄINEN, J. ir H. SALOVAARA. Prolamin hydrolysis in wheat sourdoughs with differing proteolytic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55(3), 978-984.
240. LUOTO, S., JIANG, Z., BRINCK, O., SONTAG-STROHM, T., KANERVA, P. ir kt. Malt hydrolysates for gluten-free applications: Autolytic and proline endopeptidase assisted removal of prolamins from wheat, barley and rye. *Journal of Cereal Science*. 2012, 56(2), 504-509.
241. ARTE, E., RIZZELLO, C. G., VERNI, M., NORDLUND, E., KATINA, K. ir R. CODA. Impact of enzymatic and microbial bioprocessing on protein modification and nutritional properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, 63(39), 8685-8693.
242. DI CAGNO, R., BARBATO, M., DI CAMILLO, C., RIZZELLO, C. G., DE ANGELIS, M. ir kt. Gluten-free sourdough wheat baked goods appear safe for young celiac patients: a pilot study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2010, 51(6), 777-783.
243. GIULIANI, G., BENEDUSI, A., DI CAGNO, R., RIZZELLO, C. G., DE ANGELIS, M. ir kt. *Process of microbic biotechnology for completely degrading gluten in flours*. U.S. Patent No. 9386777. Washington, U.S.A., 2016. [žiūrėta 2019-09-27]. Prieiga per internetą: <https://patents.google.com/patent/US9386777B2/en>
244. BRZOZOWSKI, B., STASIEWICZ, K., OSTOLSKI, M. ir M. ADAMCZAK. Reducing immunoreactivity of gliadins and coeliac-toxic peptides using peptidases from *L. acidophilus* 5e2 and *A. niger*. *Catalysts*. 2020, 10(8), 923.
245. RIZZELLO, C. G., CURIEL, J. A., NIONELLI, L., VINCENTINI, O., DI CAGNO, R. ir kt. Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. *Food Microbiology*. 2014, 37, 59-68.
246. CURIEL, J. A., CODA, R., LIMITONE, A., KATINA, K., RAULIO, M. ir kt. Manufacture and characterization of pasta made with wheat flour rendered gluten-free using fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria. *Journal of Cereal Science*. 2014, 59(1), 79-87.
247. GRECO, L., GOBBETTI, M., AURICCHIO, R., DI MASE, R., LANDOLFO, F. ir kt. Safety for patients with celiac disease of baked goods made of wheat flour hydrolyzed during food processing. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2011, 9(1), 24-29.
248. MANDILE R., PICASCIA S., PARRELLA C., CAMARCA, A., GOBBETTI, M. ir kt. Lack of immunogenicity of hydrolysed wheat flour in patients with coeliac disease after a short-term oral challenge. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2017, 46(4), 440-446.
249. PYLE, G. G., PAASO, B., ANDERSON, B. E., ALLEN, D. D., MARTI, T. ir kt. Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2005, 3(7), 687-694.
250. XIAO, B., ZHANG, C., SONG, X., WU, M., MAO, J. ir kt. Rationally engineered prolyl endopeptidases from *Sphingomonas capsulata* with improved hydrolytic activity towards pathogenic peptides of celiac diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, 202, 112499.

251. LI, Y., YU, J., GOKTEPE, I. ir M. AHMEDNA. The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. *Food Chemistry*. 2016, 196, 1338-1345.
252. BOUKID, F., MEJRI, M., PELLEGRINI, N., SFORZA, S. ir B. PRANDI. How looking for celiac-safe wheat can influence its technological properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2017, 16(5), 797-807.
253. DE ANGELIS, M., CASSONE, A., RIZZELLO, C. G., GAGLIARDI, F., MINERVINI, F. ir kt. Mechanism of degradation of immunogenic gluten epitopes from *Triticum turgidum* L. var. durum by sourdough *lactobacilli* and fungal proteases. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, 76(2), 508-518.
254. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAOSTAT. [žiūrėta 2021-02-21]. Prieiga per internetą: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>.
255. BRADAUSKIENE, V., VAICIULYTE-FUNK, L., MARTINAITIENE, D., ANDRUSKIENE, J., VERMA, A. K. ir kt. Wheat consumption and prevalence of celiac disease: Correlation from a multilevel analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023, 63(1), 18-32.
256. GIANNEKAS M. Interaktyvus žemėlapių kūrimo įrankis. [žiūrėta 2020-12-14]. Prieiga per internetą: <https://mapchart.net/>
257. CUPP-ENYARD C. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2008, (19), 899.
258. CLEVELAND, D. W., FISCHER, S. G., KIRSCHNER, M. W. ir U. K. LAEMMLI. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*. 1977, 252(3), 1102-1106.
259. DHAKA, V. ir B. S. KHATKAR. Effects of gliadin/glutenin and HMW-GS/LMW-GS ratio on dough rheological properties and bread-making potential of wheat varieties. *Journal of Food Quality*. 2015, 38(2), 71-82.
260. LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*. 1957, 3, 447-454.
261. WALTER, T., WIESER, H. ir P. KOEHLER. Degradation of gluten in wheat bran and bread drink by means of a proline-specific peptidase. *Journal of Nutrition & Food Sciences*. 2014, 4(1000293), 10-4172.
262. SCHALK, K., LEXHALLER, B., KOEHLER, P. ir K. A. SCHERF. Isolation and characterization of gluten protein types from wheat, rye, barley and oats for use as reference materials. *PloS One*. 2017, 12(2), e0172819.
263. UNIPROT konsorciūmas. Universali informacinė baltymų duomenų bazė. [žiūrėta 2022-06-06]. Prieiga per internetą: <https://www.uniprot.org/uniprot/>
264. Nebraskos universitetas. Alergenų duomenų bazė ir elektroninis įrankis. (Linkolnas, JAV). [žiūrėta 2022-07-05]. Prieiga per internetą: <http://www.allergenonline.org/ceciacfasta.shtml>
265. ASHTARI, S., NAJAFIMEHR, H., POURHOSEINGHOLI, M. A., ROSTAMI, K., ASADZADEH-AGHDAEI, H. ir kt. Prevalence of celiac disease in low and high risk population in Asia-Pacific region: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2021, 11(1), 2383.
266. ROMBOUTS, I., LAGRAIN, B., BRUNNBAUER, M., KOEHLER, P., BRIJS, K. ir J. A. DELCOUR. Identification of isopeptide bonds in heat-treated wheat gluten peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 59(4), 1236-1243.

267. GÄNZLE, M. G. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*. 2014, 37, 2-10.
268. SIGMA ALDRICH. Informacija apie produktus, [žiūrėta 2022-05-12]. Prieiga per internetą: <https://www.sigmaaldrich.com/LT/en/product/sigma/b4882>
269. BRADAUSKIENE, V., VAICIULYTE-FUNK, L., CERNAUSKAS, D., DZINGELEVICIENE, R., LIMA, J. P. ir kt. The efficacy of plant enzymes bromelain and papain as a tool for reducing gluten immunogenicity from wheat bran. *Processes*. 2022, 10(10), 1948.
270. CORNELL, H. J., DOHERTY, W. ir T. STELMASIAK. Papaya latex enzymes capable of detoxification of gliadin. *Amino Acids*. 2010, 38(1), 155-165.
271. TANABE, S., ARAI, S. ir M. WATANABE. Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1996, 60(8), 1269-1272.
272. MICKOWSKA, B., ROMANOVA, K. ir D. URMINSKA. Reduction of immunoreactivity of rye and wheat prolamins by *lactobacilli* and *Flavourzyme* proteolysis during sourdough fermentation--a way to obtain low-gluten bread. *Journal of Food & Nutrition Research*. 2019, 58(2), 153-166.
273. WALTER, T., WIESER H. ir P. KOEHLER. Production of gluten-free wheat starch by peptidase treatment. *Journal of Cereal Science*. 2014, 60(1), 202-209.
274. ZHANG, D. ir B. TAN. Effects of different solid-state fermentation ratios of *S. cerevisiae* and *L. plantarum* on physico-chemical properties of wheat bran and the quality of whole wheat bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021, 101(11), 4551-4560.
275. SCHERF, K. A., CATASSI, C., CHIRDO, F. G., CICLITIRA, P. J., FEIGHERY, C. F. ir kt. Statement of the prolamins working group on the determination of gluten in fermented foods containing partially hydrolyzed gluten. *Frontiers in Nutrition*. 2021, 7, 626712.
276. SCHERF, K. A. ir R. E. POMS. Recent developments in analytical methods for tracing gluten. *Journal of Cereal Science*. 2016, 67, 112-122.
277. CEBOLLA RAMÍREZ, Á., MORENO AMADOR, M. D. L., COTO, L. ir C. SOUSA MARTÍN. Gluten immunogenic peptides as standard for the evaluation of potential harmful prolamins content in food and human specimen. *Nutrients*. 2018, 10(12), 1927.
278. SCHALL, E., SCHERF, K. A., BUGYI, Z., TÖRÖK, K., KOEHLER, P. ir kt. Further steps toward the development of gluten reference materials--wheat flours or protein isolates?. *Frontiers in Plant Science*. 2020, 11, 906.
279. MEJÍAS, J., LU, X., OSORIO, C., ULLMAN, J., VON WETTSTEIN, D. ir S. RUSTGI. Analysis of wheat prolamins, the causative agents of celiac sprue, using reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Nutrients*. 2014, 6(4), 1578-1597.
280. VAN ECKERT, R., BERGHOFER, E., CICLITIRA, P. J., CHIRDO, F., DENERY-PAPINI, S. ir kt. Towards a new gliadin reference material – isolation and characterisation. *Journal of Cereal Science*. 2006, 43(3), 331-341.
281. SCHERF, K. A. Impact of the preparation procedure on gliadin, glutenin and gluten contents of wheat starches determined by RP-HPLC and ELISA. *European Food Research and Technology*. 2016, 242(11), 1837-1848.

282. ALVES, T. O., D'ALMEIDA, C. T., SCHERF, K. A. ir M. S. FERREIRA. Modern approaches in the identification and quantification of immunogenic peptides in cereals by LC-MS/MS. *Frontiers in Plant Science*. 2019, 10, 1470.
283. ŠVEICARIJOS BIOINFORMATIKOS INSTITUTAS. Elektroninis portalas Expasy. [žiūrėta 2022-06-06]. Prieiga per internetą: https://web.expasy.org/peptide_cutter/
284. SHAFEE, T. Evolvability of a viral protease: experimental evolution of catalysis, robustness and specificity. 2014 (daktaro tezės). [žiūrėta 2021-11-06]. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.17863/CAM.16528>
285. ENGSTRÖM, N., SANDBERG, A. S. ir N. SCHEERS. Sourdough fermentation of wheat flour does not prevent the interaction of transglutaminase 2 with α 2-gliadin or gluten. *Nutrients*. 2015, 7(4), 2134-2144.
286. RAMLI, A. N. M., AZNAN, T. N. T., ir R. M. ILLIAS. Bromelain: from production to commercialisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017, 97(5), 1386-1395.
287. HALE, L. P., FITZHUGH, D. J. ir H. F. STAATS. Oral immunogenicity of the plant proteinase bromelain. *International Immunopharmacology*. 2006, 6(13-14), 2038-2046.
288. NIONELLI, L. ir C. G RIZZELLO. Sourdough-based biotechnologies for the production of gluten-free foods. *Foods*. 2016, 5(3), 65-79.
289. SALEHI, F. Improvement of gluten-free bread and cake properties using natural hydrocolloids: A review. *Food Science & Nutrition*. 2019, 7(11), 3391-3402.
290. CAPPELLI, A., OLIVA, N. ir E. CINI. A systematic review of gluten-free dough and bread: Dough rheology, bread characteristics, and improvement strategies. *Applied Sciences*. 2020, 10(18), 6559.

GYVENIMO APRAŠYMAS (CV)

Vijolė Bradauskienė

vijole.bradauskiene@gmail.com

Išsilavinimas:

- | | |
|-----------|---|
| 1986–1989 | Šakių Z. Angariečio vidurinė mokykla |
| 1989–1994 | Kauno technologijos universitetas, Maisto technologijų diplomuoto inžinieriaus laipsnis |
| 2017–2022 | Kauno technologijos universitetas, Chemijos inžinerijos (T 005) doktorantūros studijos |

Profesinė patirtis:

- | | |
|-----------|--|
| 1994–1996 | UAB „Margiris“, vyr virėja |
| 1996–2001 | UAB „Karalas“, gamybos vadovė |
| Nuo 2001 | Klaipėdos valstybinė kolegija, Maisto technologijų ir mitybos katedros vedėja, lektorė |

Mokslinių interesų sritys:

Sveikatai palankesnių ir funkcionalių produktų kūrimas ir technologiniai tyrimai, biotechnologijų naudojimas maisto pramonėje.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Mokslinės publikacijos disertacijos tema, paskelbtos mokslinės informacijos Clarivate Analytics WOS sąrašo leidiniuose:

1. **Bradauskienė, Vijolė;** Vaičiulytė-Funk, Lina; Shah, Bhat Ramin; Černauskas, Darius; Tita, Mihaela Adriana. (2021). Recent Advances in Biotechnological Methods for Wheat Gluten Immunotoxicity Abolishment – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 71(1), 5-20. [IF: 2,736].
2. **Bradauskienė, Vijolė;** Vaičiulytė-Funk, Lina; Martinaitienė, Dalia; Andruškienė, Jurgita; Verma, Anil Kumar; Lima, Joao. P. M.; Serin, Yeliz; Catassi, Carlo. (2021). Wheat consumption and prevalence of celiac disease: correlation from a multilevel analysis. *Critical reviews in food science and nutrition*. 00,1-15. [IF: 11,176].
3. **Bradauskienė, Vijolė;** Vaičiulytė-Funk, Lina; Černauskas, Darius; Dzingelevičienė, Reda; Lima, Joao P. M.; Bradauskaitė, Aida; Tita, Mihaela Adriana. The efficacy of plant enzymes bromelain and papain as a tool for removing/reducing gluten immunogenicity from wheat bran. *Processes*. 12(2), 790. [IF: 3,352].

Mokslinės publikacijos paskelbtos Clarivate Analytics Web of Science duomenų bazės leidiniuose, neturinčiuose citavimo rodiklio:

1. **Bradauskienė, Vijolė;** Vaičiulytė-Funk, Lina; Mažonienė, Edita; Černauskas, Darius. Fermentation with *Lactobacillus* strains for elimination of gluten in wheat (*Triticum aestivum*) by-products. ISSN 2255-9817, p.

109-114.DOI: 10.22616/FoodBalt.2019.029. Foodbalt 2019 13th Baltic conference on food science and technology “Food. Nutrition. Well-being”, Jelgava May 2-3, 2019: conference proceedings / Latvia University of Life Sciences and Technologies. Faculty of Food Technology. [DB: Web of Science].

Kitų tarptautinių duomenų bazių leidiniuose:

1. **Bradauskienė, Vijoľė; Šilas, Giedrius; Vaičiulytė-Funk, Lina; Mažonienė, Edita.** Augalinių ekstraktų panaudojimas glitimo imunogeniškumui sumažinti = Use of plant extracts for the reduction of gluten immunogenicity // Darnios aplinkos vystymas = Sustainable environmental development. Klaipėda: Klaipėdos valstybinė kolegija. ISSN 2538-9017. eISSN 2538-9025. 2020, t. 17, Nr. 1, p. 60-66. [DB: Index Copernicus].

Mokslinės konferencijos:

1. Biomedical and Social Sciences: Education, Research and Innovation: Biologically value of by-products from fractionation of wheat (*Triticum aestivum* L.) and the possibility of using them for gluten-free products (2018).
2. 9th Central European Congress on Food (CEFood) in Sibiu, Romania “Food Science for Well- being”: The Prevalence of Coeliac Disease in the World Depends on Wheat Consumption (2018).
3. Foodbalt 2019 13th Baltic conference on food science and technology “Food. Nutrition. Well-being”: Fermentation with *Lactobacillus* strains for elimination of gluten in wheat (*Triticum aestivum*) by-products (2019).
4. KTU Maisto instituto konferencija „Tradicinio žemės ūkio perėjimas į darnias maisto sistemas: tyrimai ir inovacijos“: Biologinės priemonės beglitimių produktų kūrimui (2019)
5. Sustainable Environmental Development: Innovative Technologies: Use of plant extracts for the reduction of gluten immunogenicity (2020).
6. Sustainable Environmental Development: Innovative Technologies: Application of Biological Methods to Reduce the Immunogenicity of Gluten in Wheat Products (2021).
7. Sustainable Environmental Development: Innovative Technologies: Reduction of Gluten Immunogenicity by Different Biological Tools and Combinations Thereof in Wheat (*Triticum Aestivum*) Bran (2023).

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovei dr. Linai Vaičiulytei už disertacijos temos idėją, mokslines konsultacijas, pasitikėjimą ir pagalbą rengiant mokslines publikacijas ir disertaciją. Dėkoju dr. Dariui Černauskui, Ernestui Mockui ir kitiems KTU Maisto instituto darbuotojams už pagalbą atliekant mokslinius tyrimus. Noriu padėkoti AB „Roquette Amilina“ mokslinių tyrimų vadovei Editai M. Pašilaitienei ir tyrėjui Gediminui Plakiui už vertingas konsultacijas kviečių baltymų chromatografinio skirstymo ir masių spektrometrijos analizės srityse, taip pat dėkoju AB „Roquette Amilina“ už kviečių sėlenų ir krakmolo pavyzdžius bei mikroorganizmų fermentus.

Nuoširdžiai dėkoju savo artimiesiems ir draugams už moralinį palaikymą, pasitikėjimą, supratingumą ir kantrybę.

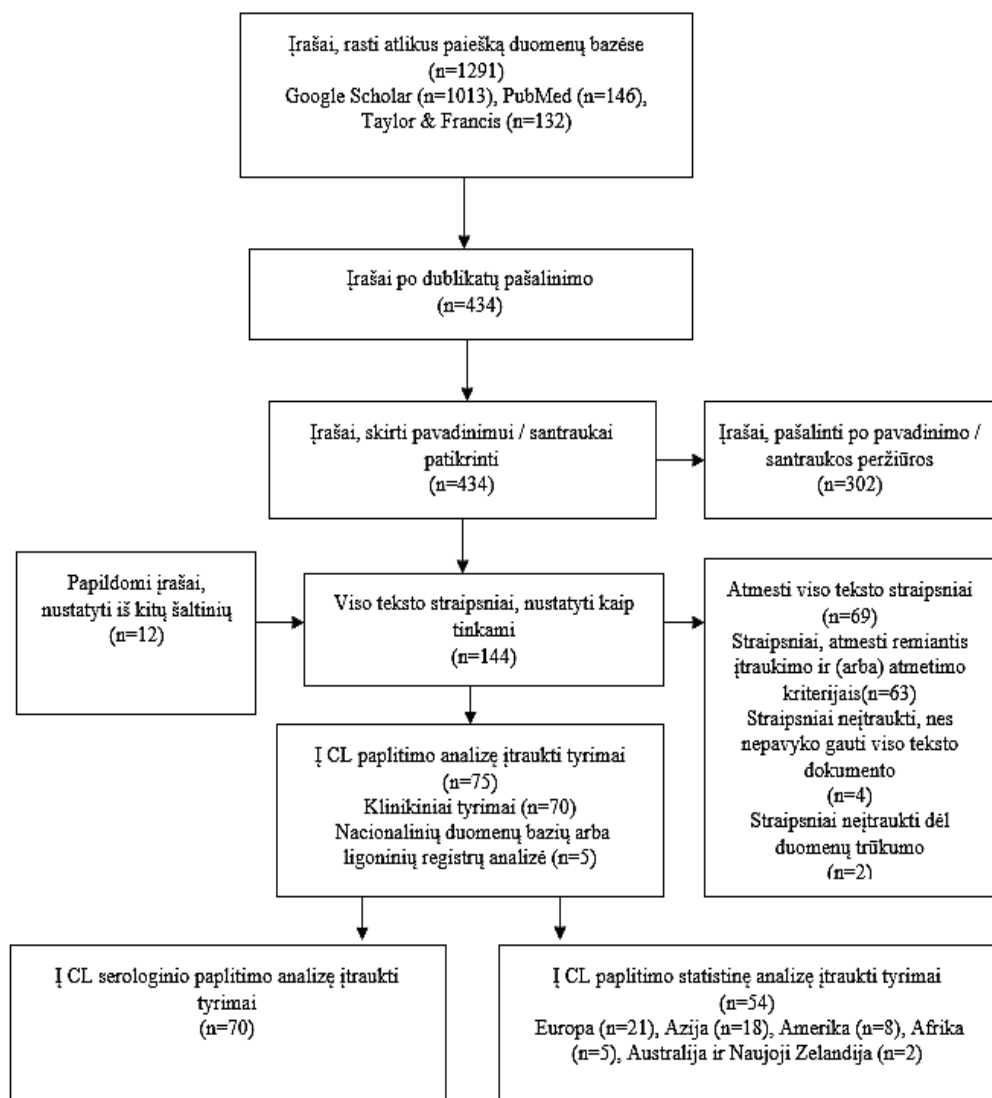
PRIEDAI

1 priedas. Imunoreaktyvios kviečių glitimo peptidų aminorūgščių sekos

1 lentelė. Imunoreaktyvios kviečių glitimo peptidų aminorūgščių sekos [83]

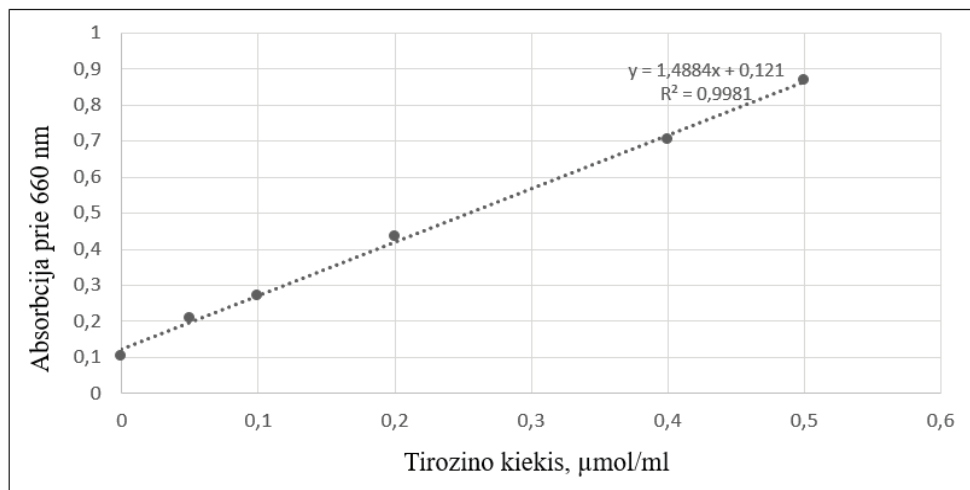
Epitopas	Ankstesnis pavadinimas	Aminorūgščių seka								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
DQ2.5 epitopai										
DQ2.5-glia- α 1a	DQ2- α -I, α 9	P	F	P	Q	P	E	L	P	Y
DQ2.5-glia- α 1b	DQ2- α -III	P	Y	P	Q	P	E	L	P	Y
DQ2.5-glia- α 2	DQ2- α -II, α 2	P	Q	P	E	L	P	Y	P	Q
DQ2.5-glia- α 3	gliadinas- α 20	F	R	P	E	Q	P	Y	P	Q
DQ2.5-glia- γ 1	DQ2- γ -I	P	Q	Q	S	F	P	E	Q	Q
DQ2.5-glia- γ 2	DQ2- γ -II, γ 30	I	Q	P	E	Q	P	A	Q	L
DQ2.5-glia- γ 3	DQ2- γ -III	Q	Q	P	E	Q	P	Y	P	Q
DQ2.5-glia- γ 4a	DQ2- γ -IV	S	Q	P	E	Q	E	F	P	Q
DQ2.5-glia- γ 4b	DQ2- γ -VIIc	P	Q	P	E	Q	E	F	P	Q
DQ2.5-glia- γ 4c	DQ2- γ -VIIa	Q	Q	P	E	Q	P	F	P	Q
DQ2.5-glia- γ 4d	DQ2- γ -VIIb	P	Q	P	E	Q	P	F	C	Q
DQ2.5-glia- γ 4e		L	Q	P	E	Q	P	F	P	Q
DQ2.5-glia- γ 5	DQ2- γ -VI	Q	Q	P	F	P	E	Q	P	Q
DQ2.5-glia- ω 1	DQ2- ω -I	P	F	P	Q	P	E	Q	P	F
DQ2.5-glia- ω 2	DQ2- ω -II	P	Q	P	E	Q	P	F	P	W
DQ2.5-glut-L1	gliuteninas-17	P	F	S	E	Q	E	Q	P	V
DQ2.5-glut-L2	gliuteninas-156	F	S	Q	Q	Q	E	S	P	F
DQ2.2 epitopai										
DQ2.2-glut-L1	gliuteninas-17	P	F	S	E	Q	E	Q	P	V
DQ2.2-glut- α 1	-	Q	G	S	V	Q	P	Q	Q	L
DQ2.2-glut- α 1	-	Q	Y	S	Q	P	E	Q	P	I
DQ8 epitopai										
DQ8-glia- α 1	DQ8- α -I	E	G	S	F	Q	P	S	Q	E
DQ8-glia- γ 1a	DQ8- γ -Ia	E	Q	P	Q	Q	P	F	P	Q
DQ8-glia- γ 1b	DQ8- γ -Ib	E	Q	P	Q	Q	P	Y	P	E
DQ8-glia- γ 2	-	P	Q	Q	S	F	P	E	Q	E
DQ8-glut-H1	DMM-gliuteninas	Q	G	Y	Y	P	T	S	P	Q
DQ8.5 epitopai										
DQ8.5-glia- α 1	DQ8- α -I	E	G	S	F	Q	P	S	Q	E
DQ8.5-glia- γ 1	-	P	Q	Q	S	F	P	E	Q	E
DQ8.5-glut-H1	DMM-gliuteninas	Q	G	Y	Y	P	T	S	P	Q

2 priedas. Celiakijos paplitimo tyrimų atrankos proceso struktūrinė schema



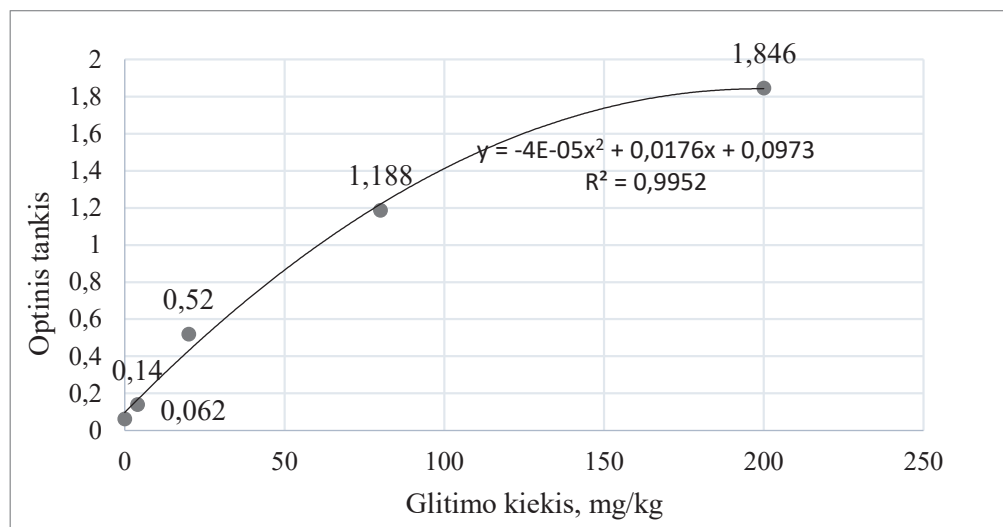
1 pav. Celiakijos paplitimo tyrimų atrankos proceso struktūrinė schema

3 priedas. Kalibracinė tiesė bendram proteazių aktyvumui nustatyti

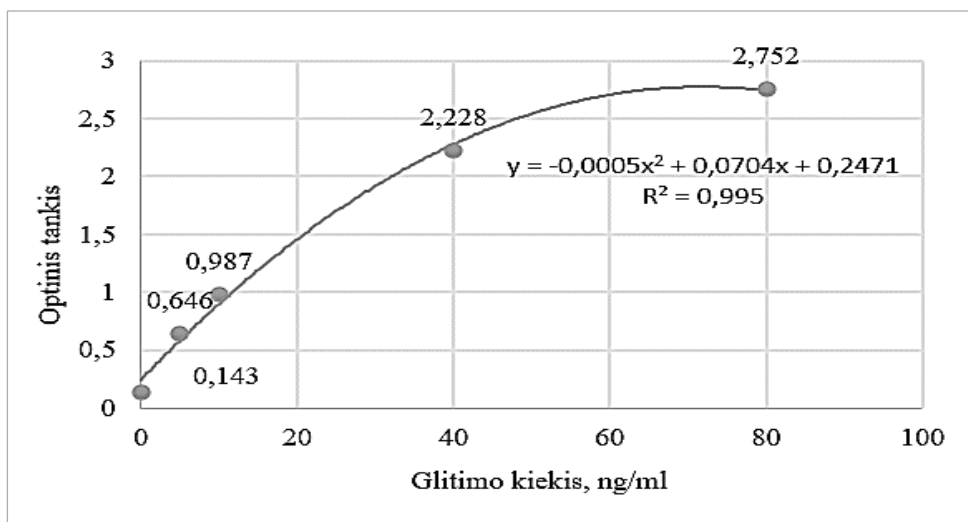


1 pav. Kalibracinė tiesė bendram proteazių aktyvumui nustatyti

4 priedas. Kalibracinės kreivės glitimo koncentracijai nustatyti pagal ELISA glitimo standartus



1 pav. Kalibracinė kreivė glitimo koncentracijai nustatyti pagal glitimo (ELISA G12) standartus



2 pav. Kalibracinė kreivė glitimo koncentracijai nustatyti pagal glitimo (ELISA R5) standartus

5 priedas. Susisteminta informacija apie celiakijos paplitimo duomenis

1 lentelė. CL paplitimas Europoje (ND – nėra duomenų; biopsija neatlikta)

Šalis	Tyrimo imtis	Tyrimo subjektai	Diagnozės kriterijai	CL paplitimas pagal serologinius testus, %	CL paplitimas nustatytas biopsija, % (n)
Belgija	1159	Vaikai	tTG, EMA	0,86/0,35	ND
Kroatija	1404	Vaikai	tTG	5,60	0,50 (7)
Danija	2297	Suaugusieji	tTG	2,44	0,48 (11)
	9754	Bendra populiacija	tGA, ŽLA	0,77	ND
Estija	1160	Vaikai	tTG	0,43	0,34 (4)
Suomija	6403	Suaugusieji	tTG, EMA	2,50/2,00	1,33 (85)
	2815	Suaugusieji	tTG	2,70	2,34 (66)
	3654	Vaikai	tTG	1,42	0,25 (9)
Vokietija	2157	Suaugusieji	tTG	0,65	0,37 (8)
	4173	Suaugusieji	tTG, EMA	0,50/0,30	0,14 (6)
	12741	Vaikai	tTG	0,90	ND
Graikija	2230	Suaugusieji	tTG, EMA	0,18	0,18 (4)
	1136	Vaikai	tTG, EMA	0,83	0,62 (7)
Vengrija	2690	Vaikai	tTG	1,79	1,38 (37)
Islandija	813	Suaugusieji	tTG	0,74	0,49 (4)
Italija	2645	Vaikai	tTG, EMA	1,30/1,10	0,72 (19)
	4781	Suaugusieji	tTG, EMA	1,40/0,70	0,50 (24)
	4570	Vaikai	tTG, EMA, ŽLA	5,62	1,58 (72)
	4048	Vaikai	tTG	1,26	1,16 (47)
	1002	Bendra populiacija	tTG, EMA	1,30	1,00 (10)
Latvija	1444	Suaugusieji	tTG, EMA	0,49/0,35	ND
Norvegija	797360	Vaikai	Norvegijos pacientų registras	ND	0,38 (3006)
Lenkija	3235	Vaikai	EMA	0,80	0,22 (7)
Portugalija	536	Paaugliai	tTG, EMA	2,05/0,75	0,75 (4)
Rusijos Federacija	1740	Suaugusieji	tTG, EMA	2,40	0,52 (9)
	1988	Vaikai	tTG	0,60	0,20 (4)
Slovakija	5412000	Bendra populiacija	CL pacientų registruotas skaičius	0,27	0,25 (14500)
Ispanija	2215	Suaugusieji	tTG	0,63	0,27 (6)
	4230	Bendra populiacija	tTG, EMA	0,50	0,49 (21)
	198	Vaikai	tTG	3,00	2,50 (6)
Švedija	7567	Vaikai	tTG, EMA	3,60	2,90 (217)
	5712	Vaikai	tTG, EMA	3,07	2,20 (123)
Jungtinė Karalystė	4566240	Bendra populiacija	Klinikinių tyrimų duomenų registras	0,24	0,24 (10872)
	1975	Vaikai	tTG, EMA	1,00/0,90	0,66 (13)
Europa	77374				1,07 (830)

2 lentelė. CL paplitimas Azijoje

Šalis	Tyrimo imtis	Tyrimo subjektai	Diagnozės kriterijai	CL paplitimas pagal serologinius testus %	CL paplitimas nustatytas biopsija, % (n)
Kinija	19778	Paaugliai ir jauni asmenys	tTG / ŽLA	2,19/0,06	ND
Indija	2277	Suaugusieji	tTG, EMA, ŽLA	1,27	0,35 (8)
	2879	Bendra populiacija	tTG	1,44	1,08 (31)
	4347	Vaikai	tTG	0,48	0,32 (14)
Iranas	400	Vaikai	tTG	1,25	1,00 (4)
	23331	Suaugusieji	tTG, ŽLA	0,73	ND
	2799	Suaugusieji	tTG, EMA	0,96	ND
	1600	Suaugusieji	tTG	0,88	0,75 (12)
	1506	Vaikai	tTG	2,00	0,60 (9)
Izraelis	634	Vaikai	tTG	0,50	0,50 (3)
	850	Suaugusieji	tTG	1,10	0,70 (6)
Jordanija	1985	Vaikai	tTG, EMA	0,80	ND
Japonija	2008	Suaugusieji	tTG, EMA	8,02/0,00	0,05 (1)
	2055	Suaugusieji	tTG	0,19	ND
Saudo Arabija	1167	Vaikai	EMA	2,23	ND
Turkija	1141	Vaikai	tTG	2,80	0,88 (10)
	7930	Vaikai	tTG	2,80	1,50 (119)
	20190	Vaikai	tTG, EMA	1,34/1,06	0,47 (95)
	1730	Vaikai	tTG	0,46	0,46 (8)
	1263	Vaikai	tTG	0,87	0,63 (11)
Jungtiniai Arabų Emyratai	906	Suaugusieji	tTG	5,70	0,99 (9)
	1000	Vaikai	tTG	1,00	0,90 (9)
	1197	Suaugusieji	tTG	1,17	ND
Vietnamas	1961	Vaikai	tTG, EMA, ŽLA	1,07/0/0,36	ND
Azija	50661				0,69 (349)

3 lentelė. CL paplitimas Šiaurės ir Pietų Amerikos žemynuose

Šalis	Tyrimo imtis	Tyrimo subjektai	Diagnozės kriterijai	CL paplitimas pagal serologinius testus %	CL paplitimas nustatytas biopsija, % (n)
Kanada	3850	Suaugusieji	tTG, EMA	0,88	0,52 (20)
Jungtinės Amerikos Valstijos	7798	Bendra populiacija	tTG, EMA	0,71	0,71 (55)
	22278	Bendra populiacija	Duomenų registras	0,69	0,48 (106)
	14701	Bendra populiacija	tTG, EMA	0,79	ND
Kolumbija	228	Suaugusieji	tTG, EMA, ŽLA	1,32	ND
Argentina	2219	Vaikai	tTG, EMA	1,62/1,30	1,26 (28)
	144	Bendra populiacija	tTG, EMA, ŽLA	2,10	ND
Brazilija	4000	Suaugusieji	tTG, EMA, ŽLA	0,60	0,35 (14)
	2086	Suaugusieji	tTG	0,29	0,24 (5)
	3000	Suaugusieji	tTG/EMA	0,80/0,50	0,37 (11)
	3000	Suaugusieji	tTG	1,50	0,47 (14)
	946	Pagyvenę asmenys	tTG, EMA, ŽLA	0,95/0/0,32	0,11 (1)
	2034	Vaikai		ND	0,54 (11)
Kuba	595	Vaikai	tTG	1,18	ND
Meksika	1009	Suaugusieji	tTG	2,67	ND
Šiaurės Amerika	33926				0,53 (161)
Pietų Amerika	17285				0,49 (84)

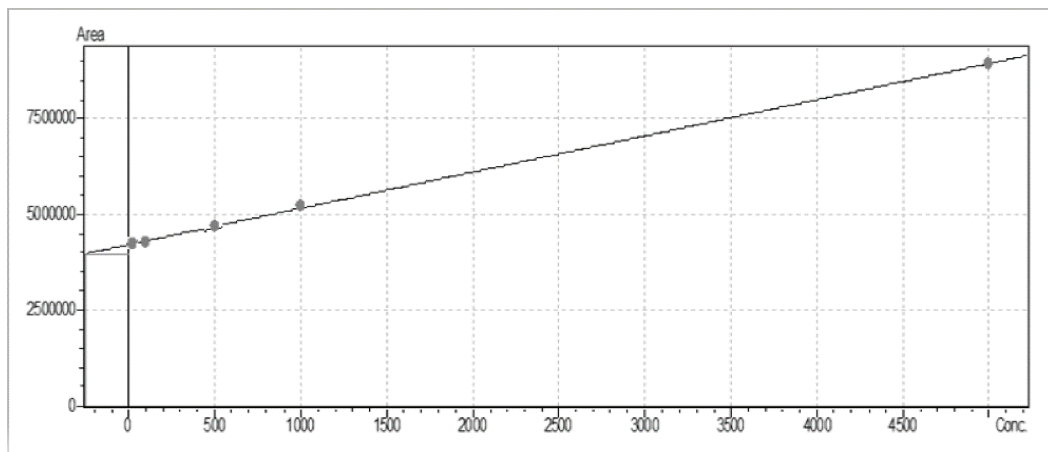
4 lentelė. CL paplitimas Afrikoje, Australijoje ir Naujojoje Zelandijoje

Šalis	Tyrimo imtis	Tyrimo subjektai	Diagnozės kriterijai	CL paplitimas pagal serologinius testus %	CL paplitimas nustatytas biopsija, % (n)
Egiptas	1500	Vaikai	tTG, EMA	0,93/0,53	0,53 (8)
Libija	2920	Vaikai	tTG, EMA	1,70/0,68	0,65 (19)
Tunisas	6286	Vaikai	tTG, EMA	2,20/0,64	0,41 (26)
	2064	Vaikai	tTG, EMA	0,34	0,24 (5)
	1418	Suaugusieji	tTG, EMA	0,21	0,14 (2)
Australija	3011	Suaugusieji	tTG	1,56	0,56 (17)
Naujoji Zelandija	916	Vaikai	CL duomenų registras	ND	0,98 (9)
Afrika	14188				0,42 (60)
Australija ir Naujoji Zelandija	3927				0,66 (26)

**6 priedas. Kviečių sėlenų baltymų pokyčiai substratuose taikant skirtingas fermentinės hidrolizės sąlygas
1 lentelė. Kviečių sėlenų baltymų pokyčiai substratuose taikant skirtingas fermentinės hidrolizės sąlygas**

Bandiniai	F/S, %	Temperatūra, °C	Tirpių baltymų koncentracija, mg/ml		Fermentinės hidrolizės trukmė, val.		Glitimo kiekis, mg/kg		Glitimo sumažėjimas, %		
			2		4		2			4	
Kontrolė	0,00	37	2,09±0,02	2,21±0,02	55589±2800	51250 ±2204	5,22	12,62			
Bromelainas	0,25	37	2,94±0,03	3,13±0,03	28598±1212	27060±1028	51,24	53,86			
Papainas	0,25	37	3,06±0,04	3,47±0,04	26222±1055	24549±933	55,29	58,14			
Bromelainas+papainas	0,125+0,125	37	3,02±0,04	3,24±0,04	27501±960	25856±946	53,11	55,91			
Bromelainas	0,5	37	3,15±0,05	3,28±0,04	17466±862	15321±734	70,22	73,88			
Papainas	0,5	37	3,21±0,06	3,44±0,04	14499±740	12168±628	75,28	79,25			
Bromelainas+papainas	0,25+0,25	37	3,19±0,06	3,35±0,05	15560±715	13219±737	73,47	77,46			
Bromelainas	0,75	37	3,18±0,06	3,31±0,04	15220±788	12962±720	74,05	77,90			
Papainas	0,75	37	3,29±0,08	3,54±0,05	11396±656	8911±619	80,57	84,81			
Bromelainas+papainas	0,375+0,375	37	3,28±0,08	3,43±0,06	12281±745	9860±717	79,06	83,19			
Kontrolė	0,00	45	2,83±0,08	2,95±0,05	51870±1215	47606±1012	11,56	18,83			
Bromelainas	0,25	45	3,31±0,06	3,47±0,04	14270±868	12072±801	75,67	79,42			
Papainas	0,25	45	3,36±0,06	3,45±0,07	12252±923	9851±766	79,11	83,20			
Bromelainas+papainas	0,125+0,125	45	3,34±0,05	3,41±0,05	12715±543	10258±770	78,32	82,51			
Bromelainas	0,5	45	3,05±0,06	3,62±0,04	6012±386	4100±227	89,75	93,01			
Papainas	0,5	45	3,40±0,09	3,43±0,04	5600±354	2800±216	90,45	95,23			
Bromelainas+papainas	0,25+0,25	45	3,15±0,08	3,54±0,04	5959±385	3150±221	89,84	94,63			
Bromelainas	0,75	45	3,55±0,06	3,69±0,05	6340±421	3544±203	89,19	93,96			
Papainas	0,75	45	3,66±0,05	3,86±0,04	5349±198	2588±198	90,88	95,59			
Bromelainas+papainas	0,375+0,375	45	3,64±0,06	3,77±0,06	5578±325	2784±181	90,49	95,25			
Kontrolė	0,00	50	2,94±0,04	3,04±0,06	50550±1365	46740±1013	13,81	20,31			
Bromelainas	0,25	50	3,02±0,04	3,32±0,05	13272±865	10785±606	77,37	81,61			
Papainas	0,25	50	3,32±0,06	3,46±0,06	10170±712	7606±556	82,66	87,03			
Bromelainas+papainas	0,125+0,125	50	3,30±0,06	3,40±0,06	10580±963	8063±569	81,96	86,25			
Bromelainas	0,5	50	3,56±0,08	3,57±0,05	6704±695	4010±176	88,57	93,16			
Papainas	0,5	50	3,67±0,06	3,88±0,06	5683 ±364	2800 ±157	90,31	95,23			
Bromelainas+papainas	0,25+0,25	50	3,67±0,05	3,75±0,05	5965 ±542	3197±153	89,83	94,55			
Bromelainas	0,75	50	3,54±0,04	3,60±0,08	6633±415	3946±163	88,69	93,27			
Papainas	0,75	50	3,69±0,06	3,91±0,06	5501±358	2744±148	90,62	95,32			
Bromelainas+papainas	0,375+0,375	50	3,68±0,06	3,77±0,08	5648±396	2855±146	90,37	95,13			

7 priedas. Kalibracinė tiesė gliadinų kiekiams nustatyti remiantis AF-ESCh rezultatais



1 pav. Kalibracinė tiesė gliadinų kiekiams nustatyti AF-ESCh, sudaryta pagal 10, 100, 500, 1000 ir 5000 mg/kg koncentracijos gliadino standarto tirpalų rezultatus

8 priedas. Duonos kepinio su kviečių sėlenomis gamybos technologija

1 lentelė. Mažai glitimo turinčios duonos iš kviečių antrinių produktų receptūra

Produkto pavadinimas	Masė, g			
Kviečių krakmolos	400	400	400	400
Vanduo	380	380	380	380
Kviečių sėlenos	100	100	100	100
PRB suspensija	20	20	20	20
Cukrus	40	40	40	40
Kmynai	40	40	40	40
Mielės	16	16	16	16
Druska	4	4	4	4
Bromelainas	2,5	2,5	2,5	2,5
Agaras	2	-	-	-
Gumiarabikas		2	-	-
Guaro derva		-	2	
Ksantano derva	-	-	-	2
Pusgaminio masė	1000	1000	1000	1000
Iškepto gaminio masė	805	808	820	822

Trumpas gamybos proceso aprašymas

1. Kviečių sėlenos sumaišomos su vandeniu ir bromelainu. 2 val. vykdoma fermentinė hidrolizė esant 45°C.

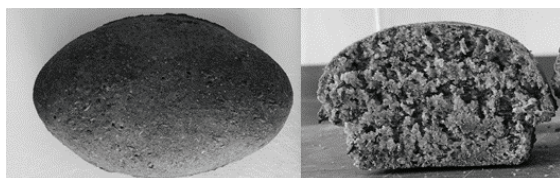
3. Sėlenų masė sumaišoma su PRB raugu, kuriame yra atrinktos trijų rūšių, PRB.

4. Fermentacija vykdoma 10 val. 30–37°C temperatūroje.

5. Į raugą sudedami visi likę produktai ir vandenyje ištirpintas hidrokoloidas. Tešla išminkoma.

6. Kildinama 1,5 val. 30 °C temperatūroje. Pakilusi tešla perminkoma, formuojami gaminiai ir dar 0,5 val. kildinami.

7. Kepama 50 min. 240°C temperatūroje.



1 pav. Duona su guaro derva



2 pav. Duona su ksantano derva

UDK 633.11+664.641.12+577.112.82](043.3)

SL344. 2023-09-05, 19,25 leidyb. apsk. l. Tiražas 14 egz. Užsakymas 145.
Išleido Kauno technologijos universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44249 Kaunas
Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas

