



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Agnė Pučilauskaitė**

**PRB KIETAFAZĖS FERMENTACIJOS ĮTAKA DARŽINIŲ  
PUPŲ (VICIA FABAE L. (PARTIM)) CHEMINEI SUDĖČIAI IR  
FUNKCINĖMS SAVYBĖMS**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovas**

prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

**KAUNAS, 2017**

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

**PRB KIETAFAZĖS FERMENTACIJOS ĮTAKA DARŽINIŲ  
PUPŲ (VICIA FABAE L. (PARTIM)) CHEMINEI SUDĖČIAI IR  
FUNKCINĖMS SAVYBĖMS**

Baigiamasis magistro projektas  
Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

**Vadovas**

(parašas) prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė  
(data)

**Recenzentas**

(parašas) dr. Dalia Čižeikienė  
(data)

**Projektą atliko**

(parašas) Agnė Pučilauskaitė  
(data)

**KAUNAS, 2017**



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Agnė Pučilauskaitė

(Studento vardas, pavardė)

**Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)**

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„PRB kietafazės fermentacijos įtaka daržinių pupų (*Vicia faba* L. (partim)) cheminei sudėčiai ir funkcinėms savybėms“

**AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

20 17 m. birželio 04 d.  
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Agnės Pučilauskaitės**, baigiamasis projektas tema „PRB kietafazės fermentacijos įtaka daržinių pupų (*Vicia faba* L. (partim)) cheminei sudėčiai ir funkcinėms savybėms“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

\_\_\_\_\_  
(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

\_\_\_\_\_  
(parašas)

## Turinys

Santrumpos.....	10
Įvadas .....	11
1. Literatūros apžvalga .....	13
1.1. Pupų chemijos savitumai.....	13
1.1.1. Maistinė vertė ir panaudojimas pramonėje .....	13
1.1.2. Antimonybiniai faktoriai.....	14
1.2. Baltyminių medžiagų koncentratų ir izoliatų gamyba .....	15
1.2.1. Šlapieji baltyminių medžiagų ekstrakcijos metodai.....	15
1.2.2. Klasifikavimo oru panaudojimas baltyminių medžiagų gamybai.....	17
1.3. Perdirbimo būdo įtaka išgautų baltyminių medžiagų chemijai ir funkcinėms savybėms. ....	17
1.3.1. Baltymų išgavimas naudojant ekstrakcijos technologijas .....	18
1.3.1.1. Baltymų funkcinės savybės .....	18
1.3.1.2. Baltyminių medžiagų ekstrakcijos metodų įtaka antimonybinių komponentų kiekiui bei baltymų funkcinėms savybėms .....	19
1.3.2. PRB kietafazės fermentacijos panaudojimo galimybės pupų perdirbimui .....	20
1.3.2.1. Pieno rūgščių bakterijų kultūrų charakteristika.....	22
1.3.2.2. Ultragarso panaudojimas mikroorganizmų mažinimui .....	23
1.3.2.3. Pupų cheminės sudėties ir antimonybinių faktorių pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu ir naudojant proteazes.....	23
2. Tyrimo objektai ir metodai.....	25
2.1. Tyrimų kryptys.....	25
2.2. Tyrimo objektai .....	25
2.2.1. Mėginio paruošimas .....	25
2.2.1.1. Klasifikavimas oru .....	26
2.2.1.2. Klasifikavimas sietais.....	29
2.2.2. Pieno rūgšties bakterijos.....	32
2.2.3. PRB kietafazė fermentacija.....	32

2.3. Tyrimų metodai .....	32
2.3.1. Baltyminių medžiagų analizės metodai.....	32
2.3.2. Baltymų ir miltų funkcinių savybių įvertinimas .....	35
2.3.3. Antimonybinių faktorių nustatymo metodai .....	36
2.3.4. Spektrofotometriniai metodai.....	37
2.3.5. PRB kietafazės fermentacijos eigos fiksavimo metodai .....	40
2.3.6. Bendro mikroorganizmų kiekio nustatymas .....	41
2.3.7. Matematinė statistinė duomenų analizė .....	41
3. Rezultatų aptarimas .....	42
3.1. Kietafazė fermentacija: ultragarso panaudojimo galimybių tyrimas fermentacijos terpių mikrobiologinės taršos mažinimui .....	42
3.2. Kietafazė fermentacija: pH, BTR, D(-) ir L(+) pieno rūgšties izomerų įvertinimas.....	45
3.3. Kietafazė fermentacija: baltymų pokyčiai.....	48
3.3.1. Baltymų pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu .....	48
3.3.2. Proteazių aktyvumo pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu.....	51
3.3.3. Baltymų pokyčiai pupas apdorojus proteazėmis.....	51
3.3.4. pH įtaka pupų baltymų tirpumui vandenyje .....	53
3.4. Kietafazės fermentacija: funkcinių savybių pokyčiai .....	54
3.4.1. Pupų miltų funkcinių savybių pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu .....	54
3.4.2. Pupų baltymų funkcinių savybių pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu.....	58
3.4.3. Pupų miltų funkcinių savybių pokyčiai po apdoravimo proteazėmis.....	61
3.5. Pupų miltų ir pupų baltymų proteazių inhibitorių ir virškinamumo pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu .....	63
3.6. Pupų lukštų PRB fermentavimas: BTR, pH, redukuojančių sacharidų, D(-) ir L(+) pieno rūgšties izomerų nustatymas .....	66
Išvados.....	70
Literatūros sąrašas .....	71
Priedai.....	79

Pučilaskaitė, Agnė. PRB kietafazės fermentacijos įtaka daržinių pupų (*Vicia faba* L. (partim)) cheminei sudėčiai ir funkcinėms savybėms.

*Magistro* baigiamasis projektas / vadovas prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: *pupos, kietafazė fermentacija, pieno rūgšties bakterijos, proteazės baltyminės medžiagos, funkcinės savybės, antimitybiniai faktoriai.*

Kaunas, 2017. 78 p.

### **Santrauka**

Šiuo metu didelis dėmesys skiriamas augalinės kilmės baltymų gamybos technologijų vystymui. Ankštiniai javai – vieni iš populiariausių vietinėse sąlygose auginamų augalų, kurie gali būti panaudoti naujų maisto priedų ir/ar produktų vystymui. Tačiau jų perdirbimui svarbu vystyti tiek efektyvius technologinius sprendimus baltymingų medžiagų išgavimui, tiek ir biopriemonės antimitybių faktorių minimizavimui bei funkcinių savybių gerinimui.

Darbas skirtas – vystyti pupų perdirbimo technologiją, įskaitant procesus baltymingų frakcijų išgavimui ir biotechnologines priemones, kurios leistų sumažinti augalinėje žaliavoje antimitybinius faktorius ir pagerinti produktų funkcines savybes; siekiant organizuoti beatliekinį pupų perdirbimą biorafinavimo principu, įvertinti pupų lukštų panaudojimo galimybę pieno rūgšties gamybai.

Nustatyta, kad klasifikavimas oru yra perspektyvi perdirbimo technologija, norint gauti didesniu baltymų kiekiu pasižyminčias pupų miltų frakcijas: po klasifikavimo oru, lyginant su žaliavinėmis pupomis (be apdorojimo), baltymų kiekis miltuose nustatytas 3,6 % didesnis.

PRB KF metu, lyginant su nefermentuotais pupų miltais, nustatytas po 72 h fermentacijos vandenyje tirpiųjų baltymų sumažėjimas (15 %). Didžiausią įtaką PRB KF turėjo pupų mažos molekulinės masės baltymams, tuo tarpu apdorojimas proteazėmis – didelės molekulinės masės baltyminių medžiagų frakcijoms. Norint pagerinti pupų miltų ir pupų baltymų funkcines savybes tokias, kaip pupų baltymų emulsijų susidarymo pajėgumą, svarbu parinkti optimalią PRB KF ir žaliavos apdorojimo fermentais trukmę, kuri sudarė, atitinkamai, 24 h ir 30 min, nes po 72 h KF buvo stebimas pupų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumo sumažėjimas (2,8 %). Be to, PRB kietafazė fermentacija gali būti naudojama pupų antimitybinių faktorių mažinimui: po 72 h fermentacijos proteazių inhibitorių aktyvumas pupų miltų sumažėjo 9,5 %, o pupų miltų virškinamumas po fermentacijos padidėjo 5 %. Nustatyta, kad ultragarsas yra efektyvus metodas augalinės žaliavos mikrobinės taršos mažinimui (prieš PRB fermentaciją): po 60 min apdorojimo 37 kHz ultragarsu bendras mikroorganizmų skaičius sumažėjo 2 kartus.

Siekiant vykdyti beatliekinį pupų perdirbimą, lukštais turtingą frakciją galima naudoti pieno rūgšties gamybai; pieno rūgšties išeigų padidinimui (39 %) pupų lukštus (prieš PRB fermentaciją) rekomenduotina apdoroti fermentiniu preparatu, susidedančiu iš celiulazių, ksilanazių ir  $\beta$  – gliukanazių.

Apibendrinant, galima teigti, išbandyti pupų perdirbimui technologiniai sprendimai (separavimas oru, apdorojimas ultragarsu) kombinacijoje su biopriemonėmis leidžia išgauti baltymais turtingas pupų frakcijas, sumažinti augalinės žaliavos mikrobiologinę taršą ir antimonybinius faktorius bei pagerinti funkcines baltymais praturtintų pupų frakcijų savybes. Kietafazė fermentacija, naudojant atrinktas pieno rūgšties bakterijas, leistų sukurti naujus pupų produktus ir išplėsti jų panaudojimo maisto pramonėje spektrą.

Pučilauskaitė, Agnė. Influence of LAB solid state fermentation on beans chemical composition and functional properties. Master's thesis in Food Science and Safety / supervisor prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology. Research area and field: Technological Sciences, Food Technology

Key words: *beans, solid state fermentation, lactic acid bacteria, protease, protein substances, functional properties, antinutritional factors*

Kaunas, 2017. 78 p.

## SUMMARY

Presently, a strong focus is given on the development of vegetable protein production technology, and grain legumes are among the most popular plants grown under the local conditions which can be used for development of new food additives and/or products. However, their processing requires development of both efficient technological solutions for extraction of protein material and biological means for minimisation of antinutritional factors as well as improvement of functional properties.

The goal of the study is the development of bean processing technology, including processes for extraction of protein fractions and biotechnological means which would allow reduction of antinutritional factors in the raw plant material as well as improvement of functional properties of products; organization of non-waste processing of beans using the biorefinery concept, evaluation of the possibility of using bean shells for production of lactic acid.

It was found that air classification was a viable processing technology for obtaining bean meal fractions richer in protein: following air classification, the protein content in bean meal was 3.6 % higher in comparison with raw beans (unprocessed).

During *solid state fermentation* by lactic acid bacteria (SSF LAB), a decrease (15 %) of the content of water soluble proteins was measured following 72 h of fermentation in water, compared to unfermented bean meal. SSF LAB had the greatest impact on bean proteins of low molecular mass, whereas protease processing influenced fractions of high molecular mass materials. In order to improve the functional properties of bean meal and bean proteins, such as the capacity of bean protein emulsion production, it was important to select an optimum duration of SSF LAB as well as processing of raw material with other enzymes, which was respectively 24 h and 30 min, since a decrease (2,8 %) of protein emulsion production capacity was observed after 72 h of SSF. In addition, SSF LAB can be used for reduction of antinutritional factors of beans: after 72 h of fermentation, the activity of protease inhibitors in bean meal decreased by



9,5 %, and digestibility of bean meal after fermentation increased by 5 %. It was found that ultrasound was an efficient method for reduction of microbial pollution of raw plant material (before LAB fermentation): following 60 min of ultrasound processing, the total bacterial count halved.

In order to carry out non-waste processing of beans, the shell-rich fraction can be used for production of lactic acid. In order to increase the yield of lactic acid (39 %), it is recommended to treat bean shells (before LAB fermentation) with enzymatic preparation, which consists of cellulases, xylanases and  $\beta$  – glucanases.

In summary, the tested bean processing technological solutions (air separation, ultrasound processing) in combination with biological means allow obtaining protein rich bean fractions to reduce bacterial pollution of raw plant materials and antinutritional factors as well as enhance the functional properties of protein rich fractions of beans. Solid state fermentation with use of selected lactic acid bacteria would allow for the development of new bean products and expand the range of their application in food industry.

## **Santrumpos**

BMS – bendras mikroorganizmų skaičius;

KF – kietafazė fermentacija;

ULT – ultragarsinis poveikis;

KSV – kolonijas sudarantys vienetai;

Ls – *Lactobacillus sakei* KTU 05-6;

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

NDS – natriododecilsulfatas;

Pa – *Pediococcus acidilactici* KTU 05-7;

Pp9 – *Pediococcus pentosaceus* KTU 05-9;

PRB – pieno rūgšties bakterijos;

PV – proteazinio aktyvumo vienetai;

s.m. – sausosios medžiagos;

TEMED – Tetrametiledilendiaminas;

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometanas;

BTR – bendras titruojamasis rūgštingumas;

SF – sunkioji frakcija;

LF – lengvoji frakcija.

## Ivadas

Besikeičianti žmonių mityba ir vis labiau augantis vartotojo susidomėjimas sveikatai palankiais maisto produktais, verčia pramonę iš naujo atsigręžti ir pradėti didinti baltymingų produktų gamybą. Nors tarptautiniu mastu daugiausiai naudojamos sojos pupelės, vis labiau didėja suinteresuotumas kitų ankštinių javų rūšių, kaip lęšių, avinžirnių, taip pat ir pupų perdirbimo technologijų baltymų išgavimui vystymui. Ši augalinė žaliava yra plačiai kultivuojama ES ir vartotojui ji yra labiau priimtina nei soja dėl galimų joje genetinių modifikacijų [1].

Pupos, kaip ir dauguma ankštinių javų, pasižymi dideliu baltymų kiekiu, todėl šis komponentas labiausiai domina maisto pramonę. Baltymų pritaikymo spektras yra labai platus, jie gali būti naudojami maisto produktų praturtinimui, sudėties subalansavimui ir funkcinių savybių gerinimui. Taip pat plintant vegetarizmo idėjoms, pupos vis labiau pradedamos vertinti, kaip mėsos analogas.

Tačiau platų pupų pritaikymą maisto pramonėje riboja: (i) efektyvių technologinių sprendimų stoka baltymingų frakcijų išgavimui ir (ii) jų antimitybiniai faktoriai, kaip tripsino inhibitoriai, nevirškinami trisacharidai – stachiozė ir rafinozė, lektinai ir kt. komponentai. Todėl norint, kad pupos būtų plačiau naudojamos maisto produktų gamyboje, jų antimitybiniai faktoriai turi būti minimizuoti. Ši problema gali būti sprendžiama, taikant tradicinius apdorojimo metodus, pvz., verdant, apdorojant slėgiu ar autoklavuojant. Tačiau šie apdorojimo metodai dažniausiai turi neigiamos įtakos pagrindiniam pupų komponentui – baltymams ir jų funkcinėms savybėms. Todėl pramonė ieško naujų apdorojimo metodų, kurie sumažintų žaliavos antimitybinių faktorių kiekį ir tuo pačiu metu pagerintų jos funkcines savybes.

Jau nuo seno Azijoje taikoma sojos pupelių fermentacija, kuri prigijo ir iki šiol plačiai naudojama šios žaliavos perdirbimui, todėl bioapdorojimas gali būti taikomas ir kitų ankštinių javų sėklų apdorojimui. Pastaruoju metu pramonė domisi kietafaze fermentacija (KF), nes jos metu naudojamas mažas vandens kiekis, todėl šis metodas yra ekonomiškas ir tuo pačiu saugesnis, nes mažas vandens kiekis neleidžia sparčiai daugintis pašalinei mikroflorai. KF metu gali būti naudojami įvairūs mikroorganizmai, priklausomai nuo to kokias norima išgauti galutinio produkto savybes. Mūsų sąlygomis maisto pramonė linkusi naudoti labiausiai paplitusius ir vartotojui žinomus mikroorganizmus – pieno rūgšties bakterijas (PRB). Iki šiol moksliniuose tyrimuose didelis dėmesys skiriamas PRB atrankai, ieškant naujų padermių ir ypač pasižyminčių antimikrobinėmis savybėmis. Tyrimų rezultatai rodo, kad fermentuojant ankštinius javus įvairiomis PRB kultūromis yra sumažinami jų antimitybiniai faktoriai, o parinkus optimalias fermentacijos sąlygas gali būti pagerinamos ir baltymų funkcines savybės, pvz., putų sudarymo pajėgumas. Taip pat norint pagerinti augalinės žaliavos perdirbimo efektyvumą, vis

didesnį susidomėjimą kelia mikrobinės fermentacijos kombinavimas su žaliavos papildomu apdorojimu fermentais.

Sumažinus pupose antimonybinių faktorių kiekį bei pagerinus funkcines savybes, pupų pritaikymo spektras padidėtų. Baltymais praturtinti pupų priedai galėtų būti naudojami kepinių maistinės vertės pagerinimui, ypač kepinių be glitimo vystymui, konditerijos sektoriuje kremų gamybai ir kt.

**Darbo tikslas** – vystyti pupų perdirbimo technologiją, įskaitant procesus baltymingų frakcijų išgavimui ir biotechnologines priemones, kurios leistų sumažinti augalinėje žaliavoje antimonybinius faktorius ir pagerinti produktų funkcines savybes; siekiant organizuoti beatliekinį pupų perdirbimą biorafinavimo principu, įvertinti pupų lukštų panaudojimo galimybę pieno rūgšties gamybai.

Tiksliui pasiekti darbe buvo sprendžiami šie uždaviniai:

1. Įvertinti perdirbimo technologijos – klasifikavimo oru naudojimo galimybę baltymais praturtintų pupų miltų frakcijų išgavimui;
2. Įvertinti ultragarso panaudojimo galimybę perdirbamos žaliavos mikrobinės taršos mažinimui;
3. Įvertinti KF, naudojant PRB ir proteazes, įtaką pupų tirpiųjų baltymų pokyčiams;
4. Įvertinti KF, naudojant PRB ir proteazes, įtaką pupų miltų ir jų baltymų izoliatų funkcinių savybių pokyčiams;
5. Įvertinti PRB kietafazės fermentacijos įtaką pupų antimonybinių faktorių pokyčiams;
6. Įvertinti biorafinavimo koncepcijos taikymo galimybes pupų beatliekiniam perdirbimui, įskaitant lukštų perdirbimą į pieno rūgštį (PR).

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Pupų chemijos savitumai

#### 1.1.1. Maistinė vertė ir panaudojimas pramonėje

Šiuo metu pasaulyje vis didėja susidomėjimas ankštiniais javais. Jų aukštą maistinę vertę turinti cheminė kompozicija apsprendžia, kad vis daugiau vartotojų ankštinių javų sėklas įtraukia į savo dietą. Jos, lyginant su grūdais, turi žymiai daugiau baltymų, vidutiniškai 20 – 25 %, priklausomai nuo ankštinių javų rūšies, o grūdiniuose javuose baltymų kiekis vidutiniškai yra 6 – 10 %. Taip pat, ankštinuose javuose gausu amino rūgščių lizino ir metionino, šių amino rūgščių grūdinių kultūrų javuose yra nedaug, todėl maistiniu požiūriu, ankštiniai javai pralenkia grūdinių javų maistinę vertę. Ankštinius javus galima suskirstyti į 2 grupes: kuriuose kaupiami riebalai ir kuriuose kaupiamas krakmolos kaip atsarginis energijos šaltinis. Pirmajai grupei priskiriami lubinai bei sojos pupelės, antrajai – pupos, žirniai, lęšiai. Šiuo metu didžiausią pritaikymą tarptautinėje plotmėje turi sojos pupelės, jų pritaikymo spektras yra labai platus, jos naudojamos kaip mėsos, sūrio analogas, taip pat jų įvairūs perdirbimo produktai naudojami gerinti juslines ir funkcinės maisto produktų savybes. Tačiau vis daugiau dėmesio skiriama ir kitiems ankštiniais javams, nes daugėja mokslinių tyrimų, kuriuose įrodoma, kad ir kiti ankštiniai javai pasižymi geromis funkcinėmis ir juslinėmis savybėmis. Vieni iš tokių ankštinių javų yra pupos, kurios vis daugiau pritaikomos maisto pramonėje [56].

Pupa (lot *Vicia faba*) – tai *Fabaceae* šeimai priklausantys ankštiniai javai [1]. Lietuvoje auginamos daržinės ir pašarinės pupos. Iš pastarųjų populiariausios veislės yra: „Ada“, „Aušra“, „Geltonos“, „Kupa“, „Nida“, „Nora“, „Scirocco“, „Ukko“ [2]. Pupos auginamos visame pasaulyje, tačiau didžiausi kiekiai pupų išauginami yra Kinijoje, o daugiausiai pupų eksportuoja Europos šalys: Prancūzija, Jungtinė Karalystė [3,4].

Pupos vertinamos dėl savo maistinės vertės. Vienas pagrindinių komponentų kodėl pupos yra taip vertinamos pasaulyje – baltymai. Priklausomai nuo pupų rūšies, auginimo ir klimato sąlygų baltymų pupose būna apie 26 % [5,6]. Iš amino rūgščių vyrauja: glutamo rūgštis (~16 %), asparto rūgštis (~10 %) ir argininas (~9 %) [7,8,9].

Pupose riebalų kiekis svyruoja nuo 1,2 iki 1,9 % [5,10]. Didžiausią kiekį iš riebalų rūgščių sudaro linolo rūgštis, apie 41,3–59,7%, kitų riebalų rūgščių, oleino ir palmitino, atitinkamai, nuo 15,0 iki 33,0 % ir nuo 13,9 iki 21,0 % [10,11]. Fosfolipidų kiekis pupose yra apie 1,2 g/100 g, kuriose vyrauja tos pačios, kaip ir triacilgliceriduose riebalų rūgštys: linolo, oleino, palmitino rūgštys [11].

Angliavandenių kiekis pupose, taip pat, priklauso nuo pupų rūšies, auginimo ir klimato sąlygų, jų kiekis pupose būna apie 58 %, iš kurių didžiąja dalį sudaro krakmolos (~40 %

pupose). Sacharidų kiekis pupose yra apie 5,7 %. Taip pat, pupose yra didelis kiekis skaidulinių medžiagų – apie 25 % [5,12,13].

Be pagrindinių maistinių medžiagų pupose, taip pat, yra ir vitaminų ir mineralinių medžiagų. Daugiausiai pupose yra B grupės vitaminų: B<sub>1</sub> (tiaminas) apie 0,555 mg/100g (46,25 % rekomenduojamos paros normos (RPN)), B<sub>6</sub> (piridoksinas) apie 0,366 mg/100g (28 % RPN), vitamino B<sub>2</sub> (riboflavino) apie 0,333 mg/100 g (25 % PRN) ir vitamino B<sub>3</sub> (niacinas) 2,832 mg/100 g (18 % RPN) [14]. Iš mineralinių medžiagų pupose vyrauja: varis 0,824 μg/100g (91 % RPN), geležis 6,70 mg/100 g (84 % RPN), manganas 1,626 mg/100 g (71 % RPN) ir fosforas 421 mg/100g (60 % RPN) [14].

Pupos, be savo maistinės vertės, turi ir kitų komponentų, kurie pasižymi teigiama fiziologine įtaka žmogui, pvz., antioksidantų. Tai junginiai, kurie saugo ląsteles nuo žalingo laisvųjų radikalų poveikio. Polifenolinių junginių kiekis gali svyruoti nuo 20 iki 28 mg GAE/g, flavanoidų – nuo 3 iki 8 mg CE/g [23,24,25]. Taip pat, pupose yra ir amino rūgšties L – DOPA, ši amino rūgštis padidina dopamino koncentraciją kraujyje, kuris padeda gydant Parkinsono ligą. Pupose amino rūgšties L – DOPA kiekis priklauso nuo pupų genotipo, auginimo sąlygų ir svyruoja nuo 50 iki 100 mg/100 g [26,27].

Pupose, taip pat, gausu taninų. Seniau taninai buvo apibūdinami kaip antimonybiniai komponentai, todėl buvo išvestos pupų veislės su mažesniu taninų kiekiu. Didžiausi kiekiai taninų yra pupų lukštuose. Šiuo metu taninai apibūdinami, kaip teigiamą poveikį turintys komponentai. Pupose šių junginių gali būti nuo 2 iki 21 g/kg [21,15].

Kadangi pupos pasižymi aukšta maistine verte, pramonė vis daugiau pradeda pupas naudoti maisto produktų gamyboje. Pupų miltai, jų baltymų izoliatais galima visiškai ar iš dalies pakeisti kvietinius, sojų ar ryžių miltus. Baltymų izoliatai gali būti panaudojami gaminti mėsos produktus ar jų analogus, sūrio analogus, kepinų pramonėje, gaminti duoną, saldžius kepinus, picas, makaronus, užkandžius, ekstruduotus gaminius. Taip pat dėl pupų puikios maistinės vertės, jos gali būti naudojamos, kaip puiki alternatyva, duonos be gliutimo gamyboje – maistinės vertės pagerinimui [54].

### **1.1.2. Antimonybiniai faktoriai**

Ankštinių javų panaudojimą pramonėje riboja jų antimonybiniai faktoriai. Pupose, kaip ir kitų ankštinių javų sėklose yra antimonybinių komponentų, pvz., tripsino inhibitoriai, rafinozės ir stachiozės, fitino rūgšties, vicino ir konvicino. Tripsino inhibitoriai – tai serino proteazės inhibitoriai, kurie sumažina tripsino biologinį aktyvumą. Tripsinas yra fermentas, kuris skaldo įvairius baltymus žmogaus virškinimo trakte. Pupose tripsino inhibitorių aktyvumas, priklausomai nuo pupų genotipo, auginimo ir klimato sąlygų būna apie 1,6 – 3 TIU/mg [15]. Pupose, taip pat, gausu angliavandenių rafinozės ir stachiozės. Šie angliavandeniai yra

nevirškinami žmogaus žarnyne, jie storojoje žarnoje fermentuojami iki dujų, kas sukelia pilvo pūtimą. Pupose šių angliavandenių būna apie 18 g/kg [15,16]. Kitas antimonybinis faktorius pupose yra fitino rūgštis, kuri suriša mineralines medžiagas ir neleidžia jų įsisavinti organizme, šios rūgšties pupose būna apie 9 mg/g [17,18]. Taip pat, pupose yra vicino ir konvicino, tai yra glikozidai, kurie yra hidrolizuojami žmogaus virškinamojo trakto mikrofloros į diviciną, kuris sukelia hemolizinę anemiją. Pupose šių glikozidų būna apie 7 – 9 mg/kg [19,20]. Kitas antimitybinis faktorius pupose yra lektinai, tai angliavandenius prisijungiantys baltymai. Šie baltymai sąlygoja mitybos nepakankamumą bei imunines (alergines) reakcijas. Lektinų aktyvumas pupose yra labai įvairus, priklausomai nuo pupų genotipo svyruoja nuo 28 iki 56 vienetų [21, 22]. Kadangi pupose yra ganėtinai daug antimonybinių faktorių, jos prieš vartojimą turi būti apdorojamos, pvz, išverdamos, mirkomos, autoklavuojamos ar fermentuojamos [18,21].

## **1.2. Baltyminių medžiagų koncentratų ir izoliatų gamyba**

Didžiausią susidomėjimą ankštiniai javai maisto pramonėje turi dėl savo didelio baltymų kiekio. Besivystančiose šalyse ankštiniai javai yra pagrindinis baltymų šaltinis, išsivysčiusiose šalyse ankštiniai javai daugiausiai naudojami gyvulių šėrimui, o maisto pramonėje – kaip mėsos pakaitalai. Tačiau vis labiau pradedama vertinti ankštinių javų cheminė sudėtis bei jų baltymų funkcinės savybės, todėl ankštinių javų baltymų koncentratai ir izoliatai vis plačiau pritaikomi maisto produktų praturtinimui. Šiuo metu baltymų izoliatai ir koncentratai išskiriami 2 būdais: šlapiaisiais metodais – šarmine ekstrakcija, izoelektriniu nusodinimu, ultrafiltracija ir sausuoju – klasifikavimu oru.

### **1.2.1. Šlapieji baltyminių medžiagų ekstrakcijos metodai**

Baltyminių medžiagų iš vandeninių suspensijų išskyrimui galima naudoti įvairius metodus. Visais atvejais galutinis produktas yra sausi milteliai, kurių baltymų kiekis ir kokybė priklauso nuo išskyrimo metodo. Baltymų kiekis tokiuose izoliatuose gali būti nuo 30 iki 90 %, taip pat, nuo išskyrimo metodo priklauso ir baltymų denatūracijos laipsnis, baltymų denatūracija turi didelės įtakos baltymų funkcinėms savybėms. Todėl įvairūs baltymų išskyrimo metodai turi įtakos skirtingoms baltymų izoliatų pritaikymo sritims. Maisto pramonėje didesnę vertę turi baltymų izoliatai, kurių denatūracijos laipsnis yra mažesnis dėl jų geresnių funkcinių savybių: kaip tirpumas, emulsijos sudarymo pajėgumas, putų sudarymo pajėgumas, gelių sudarymo pajėgumas [34].

Ekstrakcijos metodai:

*Izoelektrinis nusodinimas:* baltymų izoelektrinis taškas (pI), tai toks pH, kuriame baltymo krūvis lygus 0. Šiame taške baltymai linkę agreguotis ir nusėsti, nes pI nėra elektrosstatinės

stūmos jėgų, dėl kurių baltymų molekulės stumtų vienos kitą. Baltymai turi skirtingą pI dėl jų skirtingos amino rūgščių kompozicijos, todėl jie gali būti išskirti iš tirpalų keičiant terpės pH. Tyrimai su sojos pupomis parodė, kad tiek ekstrakcijos sąlygos (temperatūra, trukmė), tiek naudojama ekstrakcijai rūgštis turi įtakos išskirtų izoliatų kiekiui ir kokybei. Daugumos ankštinių javų sėklų baltymų izoelektrinis taškas yra apie pH 4,2 [37].

*Šarminė ekstrakcija:* atlikus tyrimus nustatyta, kad ankštinių javų sėklų baltymų tirpumas didėja, didėjant terpės pH. Tačiau šarminė ekstrakcija gali turėti neigiamos įtakos: šarminės ekstrakcijos metu galimi baltymų pokyčiai, pvz., gali vykti lizino racemizacija į alaniną, tai sąlygoja baltymų maistinės vertės sumažėjimą [37].

*Ultrafiltracija:* tai procesas, kuriame naudojamos membranos baltymams atskirti. Filtravimo metu mažos dalelės prasiskverbia per filtro skylutes, o didelės molekulės lieka ant filtro. Ultrafiltracija baltymų išskyrimui pradėta taikyti sojos pupoms prieš maždaug 20 metų. Tikima, kad ultrafiltracija pakeis izoelektrinį nusodinimą [37].

Šiuo metu daugiausiai taikoma izoelektrinio nusodinimo ir šarminės ekstrakcijos kombinacija, pvz., pupų miltai suspenduojami  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  tirpale (pH 10,5), tirpalas išlaikomas ir nucentrifuguojamas, susidaręs supernantas parūgštinamas iki pH 4 (izoelektrinis nusodinimas), nusėdę baltymai nucentrifuguojami ir išdžiovinami. Tokiu būdu išgaunami baltymų izoliatai, kuriuose baltymų kiekis yra apie 90 % [38].

Baltymų iš tirpalų ekstrakcijos trūkumas – išskirti baltymai turi būti išdžiovinami. Džiovinimui gali būti taikomi įvairūs būdai: konvekcinis, radiacinis – konvekcinis, konduktyvinis, sublimacinis ar džiovinimas elektromagnetiniame lauke. Parenkant džiovinimo būdą, svarbu įvertinti baltymų denatūracijos laipsnį. Šiuo metu didžiausias dėmesys yra skiriamas liofilizacijai, nes šio proceso metu mažiausiai pakinta baltymų struktūra bei funkcinės savybės [39].

Baltymų izoliatų panaudojimą maisto pramonėje lemia tiek jų funkcinės savybės, tiek maistinė vertė. Dauguma ankštinių javų izoliatų pasižymi dideliu lizino kiekiu, todėl dėl savo geros maistinės vertės baltymų izoliatai yra naudojami salotų padažų, mėsos produktų ir desertų gamyboje. Didžiausią pritaikymą pupų izoliatai turi duonos pramonėje. Tešla su pupų izoliatais pasižymi didesne vandens absorbcija. Taip pat, pupų izoliatai naudojami ir makaronų gamyboje. Populiarėjant produktams be glitimo ir norint, kad produktai pasižymėtų geromis juslinėmis savybėmis bei maistine verte, pramonėje buvo pradėta ieškoti žaliavų, kurios patenkintų šiuos reikalavimus. Kadangi pupų baltymai pasižymi gera amino rūgščių kompozicija bei funkcinėmis savybėmis, jie gali būti pritaikomi duonos be glitimo gamyboje. Didėjant susidomėjimui ankštinių javų baltymais, vis daugiau baltymų izoliatų pradėta naudoti mėsos pramonėje. Pupų



baltymų izoliatai naudojami, norint sumažinti riebalų kiekį, pagerinti juslines ir maistines mėsos produktų savybes [40].

### **1.2.2. Klasifikavimo oru panaudojimas baltyminių medžiagų gamybai**

Klasifikavimas oru – tai technologinis procesas, kurio metu naudojant orą dalelės atskiriamos priklausomai nuo jų dydžio ar formos. Seperavimo metu medžiaga suskirstomas į 2 frakcijas: lengvąją ir sunkiąją [31,32]. Pagrindiniai klasifikavimu oru privalumai: sausas metodas, paprastas, dauguma atveju nebrangus, procesui reikalingas tik oras. Trūkumai: triukšmingas, proceso metu medžiagos gali sulipti (ypač purios medžiagos), procesas labai priklauso nuo dalelių dydžio ir formos, retai pasiekiamas 100 % efektyvumas [33].

Taip pat, klasifikavimas oru naudojamas ir maisto pramonėje. Daugiausiai klasifikavimas oru yra taikomas ankštinių javų perdirbime, norint gauti turtingą baltymais miltų frakciją. Toks atskyrimas galimas dėl krakmolu ir baltymais turtingų dalelių dydžio, formos ir tankio skirtumų: krakmolu turtingos dalelės yra sunkesnės nei baltymais turtingos dalelės [34]. Naudojant klasifikavimą oru, galima gauti pupų miltus, kurių baltymų kiekis padidėja nuo 27,9 iki 66,1 % [35]. Tokie baltymais turtingi ankštinių javų miltai naudojami duonos pramonėje, norint pagerinti produktų maistinę vertę. Taip pat tokie baltymais praturtinti miltai gali būti naudojami ir mėsos produktų gamyboje, kaip priedai, pagerinantys produktų tekstūrą ar sumažinantys produktų savikainą [36].

### **1.3. Perdirbimo būdo įtaka išgautų baltyminių medžiagų chemijai ir funkcinėms savybėms.**

Kadangi ankštiniai javai turi daug antimitybinių faktorių bei gaminant baltymų izolialus ir koncentratas šie komponentai nėra pašalinami, todėl ankštinių javų miltai ar jų produktai prieš vartojimą arba panaudojimą gamyboje turi būti apdorojami. Pagrindiniai apdorojimo metodai, kurie nuo seno vyrauja ir žmonių virtuvėse, tai mirkymas ir apdorojimas karščiu. Pramonėje ankštinių javų sėklos, taip pat, apdorojamos slėgiu bei antimitybiniai komponentai gali būti sumažinami naudojant ekstruziją [58]. Tačiau, nors ir tradiciniai metodai sumažina nepageidaujamų komponentų kiekį, dažnai šie procesai turi neigiamos įtakos ankštinių javų funkcinėms savybėms. Todėl pramonė vis didesnę dėmesį skiria ankštinių javų apdorojimui, vykdant fermentaciją įvairiais mikroorganizmais. Šiuo metu didžiausią pritaikymą sojos pupelių fermentacijoje turi *Rhizopus oligosporus*. Fermentacijos metu yra sumažinami tokie antimitybiniai faktoriai kaip proteazių inhibitoriai, fito rūgštis, lektinai, taip pat pasikeičia sojos pupų funkcinės ir struktūrinės savybės [59]. Didėjant susidomėjimui ankštinių javų

panaudojimui maisto pramonėje, pradėta ieškoti naujų mikroorganizmų ar fermentų, kurie sumažintų antimitybinių komponentų kiekį bei pagerintų ankštinių javų funkcines savybes.

### **1.3.1. Baltymų išgavimas naudojant ekstrakcijos technologijas**

Baltymai yra vieni iš svarbiausių maisto komponentų, todėl pramonei svarbu didinti gamybos apimtį ir efektyvumą, išsaugant jų funkcines savybes ir eliminuojant antimitybinius faktorius.

#### **1.3.1.1. Baltymų funkcinės savybės**

Siekiant platesnio baltymų pritaikymo maisto pramonėje svarbu, kad jie būtų pilnaverčiai ir pasižymėtų geromis maistinėmis ir funkcinėmis savybėmis. Pagrindinės kontroliuojamos baltymų funkcinės savybės būtų tokios: putų sudarymo pajėgumas ir stabilumas, emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas, vandens/aliejaus absorbcija, gelių sudarymo pajėgumas.

*Putų sudarymo pajėgumas ir stabilumas.* Baltymų savybė sudaryti putas yra labai svarbi daugumoje maisto pramonės šakų. Putas galima apibūdinti kaip dvifazę sistemą, sudarytą iš oro burbuliukų, atskirtų tarpusavyje plonu skysčio sluoksniu. Putos maisto produktuose dažniausiai yra labai sudėtingos sistemos, susidedančios iš dujų, skysčių ir paviršiaus aktyviųjų medžiagų. Baltymai putų sistemoje sąlygoja tolygų burbuliukų pasiskirstymą. Be to, baltymai, naudotini putų sudarymui, turi greitai stabilizuoti putas, būti efektyvūs mažomis koncentracijomis ir esant skirtingiems terpės pH bei išlaikyti savo savybes esant sistemose inhibitorių, pvz., riebalų, kurie mažina putų sudarymo pajėgumą [41].

*Emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas.* Emulsija apibrėžiama, kaip dispersinė sistema, susidedanti iš dviejų nesimaišančių skysčių, dažniausiai ši sistema susideda iš vandens ir aliejaus. Baltymai emulsijos susidarymo metu atlieka emulsiklio funkciją. Baltymai turi hidrofilines ir hidrofobines grupes, kurios formuojantis emulsijai pasiskirsto tarp vandens ir aliejaus fazės, taip stabilizuodamos emulsiją [42].

*Baltymų tirpumas.* Baltymų tirpumas yra svarbi baltymų funkcinė savybė, nes baltymų tirpumas turi įtakos ir kitoms svarbioms baltymų funkcinėms savybėms, kaip emulgavimas, putojimas. Baltymų tirpumas priklauso nuo baltymo amino rūgščių kompozicijos ir sekos, baltymo molinės masės, struktūros bei polinių ir nepolinių grupių kiekio amino rūgštyse. Taip pat, baltymų tirpumui įtakos turi ir aplinkos veiksniai: joninė jėga, tirpiklio tipas, pH, temperatūra. Maisto pramonėje didžiausią įtaką baltymų tirpumui turi terpės pH. Baltymų tirpumo laipsnį vandeninėje terpėje apsprendžia elektrostatinė ir hidrofobinė sąveika tarp baltymų molekulių. Baltymų tirpumas padidėja, jei elektrostatinė stūma didesnė nei hidrofobinė sąveika. Mažiausias baltymų tirpumas yra izoelektriniame taške (pI) [43].

*Vandens ir aliejaus absorbcijos pajėgumas.* Vandens absorbcijos pajėgumas maisto produktuose gali būti apibūdinamas, kaip žaliavinio ar pridėtinio vandens sulaikymas apdorojimo metu, pvz., veikiant slėgiui, centrifuguojant, kaitinant [44]. Riebalų absorbcijos pajėgumas, taip pat, labai svarbi baltymų funkcinė savybė maisto produktuose, baltymų – riebalų sąveika turi įtakos maisto produkto tekstūrai bei kitoms juslinėms savybėms. Baltymai turi hidrofilinių ir hidrofobinių savybių, todėl gali sąveikauti maisto produktuose su vandeniu ir riebalais. Maža vandens absorbcija siejama su mažu polinių amino rūgščių kiekiu, kai maža riebalų absorbcija siejama su dideliu hidrofilinių ir polinių amino rūgščių kiekiu baltymų paviršiuje [45]. Pupos pasižymi didesne vandens absorbcija nei riebalų: vandens absorbcija yra 0,72 g vandens/g miltų, aliejaus absorbcija – 0,42 g vandens/g miltų [5].

Gelių sudarymo pajėgumas – kita svarbi baltymų funkcinė savybė. Įvairūs baltymai linę sudaryti gelius, pasižymintį skirtingomis tekstūros charakteristikomis: kietumu, lipnumu, adhezija. Unikali baltymų gelio savybė tai, kad jie elgiasi kaip kieti kūnai, tačiau kartu turi ir skysčiams būdingų savybių. Kad susiformuotų gelis baltymai turi būti dalinai išsivynioję, tada polipeptidai gali sąveikauti, susijungdami į trimatį tinklą. Dalinių baltymų išsivyniojimą galima pasiekti kaitinant, apdorojant rūgštimis, šarmais [46].

### **1.3.1.2. Baltyminių medžiagų ekstrakcijos metodų įtaka antimonybinių komponentų kiekiui bei baltymų funkcinėms savybėms**

Pasirinktas baltyminių medžiagų išskyrimo metodas, taip pat, turi įtakos ir ankštinių javų antimonybinių komponentų kiekiui baltymų izoliatuose ar koncentratuose bei baltymų funkcinėmis savybėmis. Šios dvi savybės yra svarbios maisto pramonėje, nes norint baltymų izoliatų ar koncentratų panaudoti produktuose, jie turi pasižymėti kuo geresnėmis funkcinėmis savybėmis bei turėti kuo mažiau antimonybinių komponentų [57].

Baltymų išskyrimo metodas turi įtakos antimonybinių komponentų kiekiui. Klasifikuojant ankštinius javus oru daugiausiai antimonybinių komponentų pasiskirsto lengvojoje frakcijoje (frakcijoje, kurioje vyrauja baltymai). Lengvojoje frakcijoje susikoncentruoja tripsino inhibitoriai, hemagliutinai,  $\alpha$  – galaksidazė ir kt. Pavyzdžiui, pupų miltuose konvicino kiekis – 0,29 %, o vicino – 0,68 %, po klasifikavimo oru sunkiojoje frakcijoje konvicino kiekis sumažėja iki 0,19 %, vicino – 0,47 %, o lengvojoje frakcijoje konvicino kiekis padidėja iki 0,68 %, vicino – 1,5 %. Išskiriant baltymines medžiagas šlapiuoju metodu, antimonybiniai faktoriai, taip pat, nėra visiškai panaikinami. Antimonybinių komponentų kiekis šlapijo išskyrimo metu priklauso nuo proceso parametrų (pH, temperatūros) bei baltyminių medžiagų plovimo vandeniu (po ekstrakcijos). Baltymų izoliatai dažniausiai pasižymi mažesniu antimonybinių komponentų kiekiu nei baltymų koncentratai. Lyginant šlapijo išskyrimo metodus, mažiausiai antimonybinių

faktorių turi baltymų izoliatai, gauti išskirti diafiltracijos metodu (konvicino kiekis – 0,019 %, vicino – 0,057 %). Taip pat, kaip jau buvo minėta antimonybinių komponentų kiekis šlapiojo išskyrimo metu priklauso nuo ekstrakcijos sąlygų, pvz., nustatyta, kad tripsino inhibitorių kiekis baltymų izoliatuose yra mažesnis, atliekant ekstrakciją esant terpės pH 9, nei esant terpės pH 7. Be to, išskiriant baltymines medžiagas izoelektrinio nusodinimo metodu, nustatytas fitatų pasiskirstymas baltymų izoliatuose, pvz., išskiriant baltymines medžiagas izoelektrinio nusodinimo metodu, žirnių baltymų izoliatuose fitatų nustatyta 1,2 % daugiau nei lukštentuose žirnių miltuose [57].

Baltyminių medžiagų išskyrimo metodas turi didelę įtakos baltymų funkcinėms savybėms. Išskiriant baltymines medžiagas šlapiuoju metodu, didelė įtaką jų funkcinėms savybėms turi ekstrakcijos sąlygos, todėl keičiant ekstrakcijos ir nusodinimo sąlygas galima išgauti baltymų izoliatus, kurie pasižymi skirtingomis baltymų tirpumo charakteristikomis. Pažymėtina, kad baltymų, išskirtų šlapiuoju būdu, funkcinės savybės gali pakisti ir dėl pasirinkto džiovinimo būdo. Ekstrakcijos sąlygų įtakos baltyminių medžiagų kokybei galima išvengti jas išskiriant sausuoju metodu, tokie baltymų koncentratai yra vienodesnės kokybės, tačiau šie baltymų koncentratai pasižymi blogesnėmis funkcinėmis savybėmis, pvz., putų sudarymo pajėgumu, nei izoliatai, gauti išskiriant baltymus šlapiuoju metodu. Tai aiškinama tuo, kad klasifikuojant ankštinius javus oru gautų miltų baltymų kiekis yra mažesnis nei izoliatų, gautų naudojant šlapiuosius būdus. Tačiau tokie izoliatai, išskirti klasifikuojant oru, dėl likusio krakmolo pasižymi geresnėmis klampumo ir vandens surišimo savybėmis [57].

Nors šlapiojo išskyrimo metu gautų izoliatų baltymų kiekis didesnis, jie pasižymi geresnėmis funkcinėmis savybėmis bei juose vyrauja mažiau antimonybinių komponentų, tačiau žiūrint iš ekonominės pusės, šis metodas yra brangus. Taip pat, didelę įtaką baltymų izoliatų kokybei daro ekstrakcijos, džiovinimo sąlygos. Todėl klasifikavimas oru yra perspektyvus metodas, gaminant baltymų koncentratų dėl savo paprastumo, pigumo bei stabilios išgaunamo produkto kokybės. Todėl pramonėje svarbu pagerinti šių baltymų koncentratų funkcines savybes bei sumažinti juose esančių antimonybinių komponentų kiekį [57].

### **1.3.2. PRB kietafazės fermentacijos panaudojimo galimybės pupų perdirbimui**

Kietafazė fermentacija (KF) yra apibrėžiama kaip fermentacija nesant vandens substrate, tačiau substrate turi būti tiek drėgmės, kad mikroorganizmai galėtų daugintis ir augti. Kietafazė fermentacija buvo naudojama jau nuo senų laikų, tačiau populiarumas sumažėjo, kai 1940 metais buvo išrasta skystafazė fermentacija. Didelio susidomėjimo KF vėl susilaukė paskutinį dešimtmetį ir ji vis plačiau taikoma vaistų, maisto, pašarų gamyboje [29].

Vykdam šios rūšies fermentaciją, svarbų tinkamai pasirinkti mikroorganizmus, substratą bei proceso parametrus. Renkantis mikroorganizmus reikia atsižvelgti į tai, kad fermentacijos metu laisvo vandens kiekis yra mažas, todėl ne visiems mikroorganizmams KF metu bus sudarytos palankios sąlygos augti ir daugintis. Labiausiai KF tinkantys mikroorganizmai yra grybai ir mielės, nes bakterijos reikalauja didesnio vandens kiekio. Tačiau naujausi tyrimai parodė, kad ir bakterijos prisitaiko prie KF sąlygų. Taip pat, svarbu tinkamai parinkti substratą, reikia atsižvelgti į maistinių medžiagų kiekį žaliavoje. Norint padidinti maistinių medžiagų kiekį substratai prieš KF dažniausiai yra apdorojami fermentais. Taip pat, susidarę metabolizmo produktai turi lengvai atsiskirti nuo substrato. Parenkant KF sąlygas, svarbu tinkamai parinkti: pH, temperatūrą, drėgmės kiekį, maišymą, aeraciją [29].

KF yra plačiai taikoma įvairiose pramonės šakose. Maisto pramonėje naudojama tradicinių fermentuotų produktų gamyboje, grybų ir grybienos auginime, maisto priedų gamyboje. Žemdirbystės pramonėje – bioinsektidų, augalų hormonų gamyboje. Pramoninėje fermentacijoje – fermentų, antibiotikų, organinių rūgščių, etanolio gamyboje [30].

Pagrindiniai KF privalumai: mažas vandens prieinamumas sumažina mikrobiologinę taršą, todėl yra lengviau sukurti aseptines sąlygas proceso metu. KF metu galima didesnė aeracija nei skystafazės fermentacijos metu, todėl kietafazė fermentacija yra tinkamesnė, kur vyksta intensyvūs oksidaciniai procesai. Kietafazės fermentacijos metu yra sudaromos priimtinos grybams augimo sąlygos. Kietafazėje fermentacija gali būti naudojami įvairūs substratai, kurie aprūpins mikroorganizmus visomis reikiamomis maisto medžiagomis. Kietafazės fermentacijos metu naudojami bioreaktoriai yra paprastos konstrukcijos. Taip pat, kietafazė fermentacija reikalauja mažesnio energijos poreikio nei skystafazė fermentacija, nes dažnai nebereikia papildomų procesų kaip substrato autoklavavimas, apdorojimas garais, maišymas ar aeracija. Kietafazės fermentacijos metu susidaro mažiau pašalinių produktų, todėl yra mažiau reikalavimų tirpikliui, kuriuo bus išekstrahuojamos susidariusios medžiagos. Mažas drėgmės kiekis leidžia išgauti specifinius komponentus, kurių beveik neįmanoma gauti skystafazės fermentacijos metu. Produktai, gauti KF metu, dažnai turi daugiau pageidaujamų savybių, kaip termostabilumas, palyginti su tais pačiais junginiais, gautais skystafazės fermentacijos metu [28].

Pagrindiniai KF trūkumai: daugumoje atvejų reikalingas pradinis substrato apdorojimas: smulkinimas, fermentinė hidrolizė. Taip pat dauguma mikroorganizmų reikalauja didesnio terpės drėgumo, todėl fermentacija gali būti neintensyvi, taigi KF dažniausiai būna ilgesnis procesas nei skystafazė fermentacija. Kietafazės fermentacijos metu dėl kietos substrato prigimties, taip pat, sunku sekti tokius proceso parametrus kaip pH, drėgmę, deguonies kiekį, susidariusių produktų ir maisto medžiagų kiekius. KF atveju dažniausiai fermentuojama statiniu būdu, nes maišymo procesas yra sudėtingas. Nors bioreaktoriai yra palyginti paprastos konstrukcijos, tačiau norint

realizuojant gamybą didelėmis apimtimis bioreaktoriai dar nėra sukurti. Kadangi KF metu grybams yra sudaroma priimtina aplinka jų augimui ir dauginimuisi, galimas proceso užteršimas nepageidaujamais grybais. Taip pat, dėl didelės kietų dalelių koncentracijos aeracija kartais būna neįmanoma [28].

### 1.3.2.1. Pieno rūgščių bakterijų kultūrų charakteristika

Pieno rūgštės bakterijos (PRB) – vienos iš plačiausiai naudojamų mikroorganizmų maisto pramonėje. Nors didžiausią pritaikymą šios bakterijos turi pieno pramonėje, vis daugiau jos naudojamos ir kitose maisto pramonės šakose, norint pagerinti produktų juslines ar funkcines savybes bei prailginti galiojimo terminą [48].

Pieno rūgštės bakterijos tai gramteigiamos, aerobinės ar fakultatyvūs anaerobinės, sporų nesudarančios lazdelės ar kokai. Pieno rūgštės bakterijos pagal išskiriamus metabolitus klasifikuojamos į homofermentines ir heterofermentines. Homofermentinės gamina tik pieno rūgštį, heterofermentinės – CO<sub>2</sub> ir kitas organines rūgštis. Taip pat, kai kurios pieno rūgščių bakterijų padermės gamina abu pieno rūgštės L(+) ir D(-) izomerus, pvz., *Lactobacillus* šeimos atstovai, *Lactococcus* šeimos atstovai gamina tik L(+) pieno rūgštės izomerą, o *Leuconostoc* šeimos atstovai – tik D(-) pieno rūgštės izomerą. Taip pat, pieno rūgštės bakterijos skiriasi ir savo optimaliomis augimo sąlygomis. Kai kurios pieno rūgštės bakterijos gerai auga esant rūgštiniam terpės pH, pvz., *Pediococcus* šeimos atstovai gerai auga esant terpės pH 4,4, kai kurios pieno rūgštės bakterijos gali augti ir šarminėje terpėje, pvz., *Enterococcus* šeimos atstovai. Dauguma pieno rūgščių bakterijų yra mezofilai, kurių optimali dauginimo temperatūra svyruoja temperatūrų ribose nuo 20 iki 40 °C, tačiau kai kurios pieno rūgščių bakterijų padermės gali augti žemoje ar aukštesnėse temperatūrose [49].

Be organinių rūgščių gamybos, fermentacijos metu pieno rūgščių bakterijomis susidaro ir kiti komponentai, kurie turi įtakos produktų juslinėms ir funkcinėms savybėms. Pieno rūgštės bakterijos konvertuoja sacharidus, baltymus, organines rūgštis ar riebalus į aromato komponentus ar antimikrobinius komponentus. Kai kurios pieno rūgštės bakterijos išskiria egzopolisacharidus, kurie turi didelės įtakos produkto klampai ir tekstūrai. Taip pat pieno rūgštės bakterijos išskiria homopolisacharidus, šie komponentai turi įtakos duonos gaminimo procesui, nes pagerina duonos struktūrą bei lėtina jos žiedėjimą. Hidrokolidai, tai maisto priedai, kurie šiuo metu ypatingai naudojami duonos be glitimo gamyboje, kad pagerinti duonos juslines savybes. PRB gaminami egzopolisacharidai yra perspektyvūs hidrokolidai, kurie gali būti naudojami kaip priedai duonos pramonėje [50].

### **1.3.2.2. Ultragarso panaudojimas mikroorganizmų mažinimui**

Pašalinė mikroflora dažnai apsunkina maisto gamybos procesus bei trumpina produktų galiojimo laiką. Labiausiai pramonėje paplitę mikroorganizmų inaktyvavimo metodai yra pasterizacija ir sterilizacija (terminiai procesai), todėl šie metodai dažnai pablogina produktų maistinę vertę ir kokybę, be to, jie yra neekonomiški. Norint gauti produktus su kuo mažiau pakeistomis savybėmis ir padidinti gamybos efektyvumą, buvo pradėta ieškoti naujų maisto apdorojimo būdų, vienas iš jų – ultragarso panaudojimas mikrobiologinės taršos mažinimui [47].

Ultragarso privalumai, lyginant su pasterizacija, būtų tokie: minimalūs kvapo nuostoliai, didesnis homogeniškumas, procesas reikalauja mažiau energijos, todėl yra ekonomiškesnis [47].

Ultragarso bangos, kurios yra ilgesnės nei 20 kHz. Ultragarso bangos skystyje sukelia kavitaciją, terpėje susidaro kavitacinės skylės, kurios dėl paviršiaus įtempimo jėgų yra rutulio formos. Toliau veikiant įtempimo jėgoms tokios kavitacinės skylės kelis kartus padidėja, atsiranda didelės spaudimo jėgos. Kavitacinei skylėi plystant susidaro galinga hidraulinio smūgio banga. Ji gali pasiekti kelių šimtų atmosferų slėgį. Tokia smūgio banga gali mechaniškai ardyti esantį arti jos kieto kūno paviršių [47].

Mikroorganizmų inaktyvavimo efektyvumas priklauso nuo ultragarso bangų amplitudės, apdorojimo trukmės, o taip pat, nuo pačių mikroorganizmų prigimties. Nustačius, kad kai kurie mikroorganizmai yra atsparūs ultragarso bangų sukeliama poveikiui, pramonėje ultragarso buvo pradėtas kombinuoti su kitais mikroorganizmų inaktyvavimo metodais, kaip slėgis ar temperatūra [47].

### **1.3.2.3. Pupų cheminės sudėties ir antimonybinių faktorių pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu ir naudojant proteazes**

Norint padidinti pupų pritaikymą maisto pramonėje, turi būti pagerinta jų maistinė vertė ir funkcinės savybės. Maisto produktų gamybai vis labiau taikoma fermentacija atrinktomis PRB bei apdorojimas fermentais. Pastebima, kad šių metodų metu galima gauti skirtingų savybių produktus, todėl yra tikslinga šiuos perdirbimo metodus, taip pat, naudoti ir pupoms.

Visų pirma, fermentacijos PRB kultūromis metu kinta terpes pH, dėl PRB gaminamų organinių rūgščių. PRB fermentavimo metu daugiausiai susidaro pieno rūgštis. Susidariusių organinių rūgščių kiekis priklauso nuo PRB padermės ir fermentuojamų sacharidų kiekio bei trukmės. Fermentuojant pupas *L. plantarum* laike 24 h, pH vertė sumažėjo nuo 6,4 iki 4,5. Fermentuojant heterofermentinėmis pieno rūgštis bakterijomis be pieno rūgštis susidaro ir kiti metabolitai, kaip etanolis, acto rūgštis ir anglies dioksidas [50].

Fermentacijos metu heterofermentinės PRB išskiria egzopolisacharidus, kurie didina klampą. Fermentuojant pupas *Lc. Lactis* 24 h mišinio klampa padidėjo nuo 160 mPas iki 310

mPas, norint gauti didesnes substrato klampas prieš fermentaciją į pupų mišinį galima įdėti sacharozės, 5,1 % sacharozės priedas suspensijos klampumą padidino 20 kartų [50].

Fermentuojant pupas atrinktomis PRB padermėmis, didėja jų maistinė vertė. Fermentuojant pupas *Lc. lactis* laike 24 h fito rūgšties kiekis sumažėjo 67 %, lyginant su nefermentuotomis pupomis. Taip pat fermentavimo metu sumažėja trisacharidų rafinozės ir stachiozės kiekiai, fermentuojant pupas *W. Confusa*, rafinozės kiekis sumažėjo nuo 0,32 % iki 0,04 %, stachiozės – nuo 1,52 % iki 0,73 %. Taip pat, KF metu sumažėja ir tripsino inhibitorių aktyvumas, fermentuojant pupas *Lactobacillus delbrueckii* ir *Streptococcus delbrueckii* mišiniu tripsino inhibitorių aktyvumas sumažėjo nuo 25,7 TIU/g iki 24,6 TIU/g [53]. Fermentuojant pupas *L. plantarum*, vicino kiekis sumažėjo nuo 11,46 mg/g dm iki 0,67 mg/g dm, o konvicino – nuo 6,24 mg/g dm iki 0,56 mg/g dm, taip pat, sumažėja ir kondensuotų taninų kiekis nuo 27,10 eq cat/100g iki 13,71 eq cat/100 g. Baltymų virškinamumas po fermentacijos padidėja, pvz., fermentuojant pupas *L. plantarum* pupų virškinamumas padidėja nuo 75,1 iki 76,6 % [55].

Fermentuojant pupas PRB, padidėja aminorūgščių kiekis. Po 24 h fermentavimo *L. plantarum* laisvų aminorūgščių kiekis padidėja nuo 5,6 g/kg iki 7,6 g/kg, o fermentuojant *Lc.lactis* – iki 10,4 g/kg. Svarbu paminėti, kad po fermentacijos padidėja laisvų, nepakeičiamų aminorūgščių: izoleucino, leucino, lizino, metionino, fenilalanino, valino [50]. Taip pat, fermentavimo metu padidėja fenolinių junginių kiekis, pvz., fermentuojant pupas *L. plantarum* fenolinių junginių kiekis padidėja nuo 3,86 mg GAE/g dm iki 5,21 mg GAE/g dm [55].

PRB fermentacija gali pagerinti produktų tekstūros savybes. Naudojant ekstruduotų užkandžių gamybai 25 % fermentuotų *L. plantarum* pupų, lyginant su kontrole (nefermentuotomis pupomis), užkandžių kietumas sumažėjo nuo 15 N iki 8 N, o traškumo indeksas padidėjo nuo 0,05 iki 0,17 [51]. PRB fermentacijos metu sumažėja pupų putų sudarymo pajėgumas ir stabilumas: fermentuojant pupų miltus *Lactobacillus delbrueckii* ir *Streptococcus delbrueckii* mišiniu putų sudarymo pajėgumas sumažėjo 20 %, o putų stabilumas – 45 % [53].

Proteazės maisto produktų gamyboje naudojamos jau ilgą laiką. Didžiausią pritaikymą jos turi duonos pramonėje, norint pagerinti funkcinės kviečių savybes ir pagerinti duonos tekstūrą. Tačiau, taip pat, proteazės vis didesnio susidomėjimo sulaukia ir kitų javų funkcinių savybių gerinimui.

Pagrindiniai pokyčiai, vykstantys fermentacijos proteazėmis metu, yra baltymų skaldymas. Baltymų molekulės skaldomos į mažesnius polipeptidus, todėl kinta baltymų funkcinės savybės. Po fermentavimo proteazėmis pagerėja baltymų virškinamumas, padidėja baltymų tirpumas, modifikuojamos baltymų funkcinės savybės, kaip emulsijos sudarymo pajėgumas, vandens ar riebalų surišimo pajėgumas, putojimo savybės, gelių sudarymo pajėgumas ir kt. Taip pat po fermentacijos pakinta ir produktų juslinės savybės [52].



## 2. Tyrimo objektai ir metodai

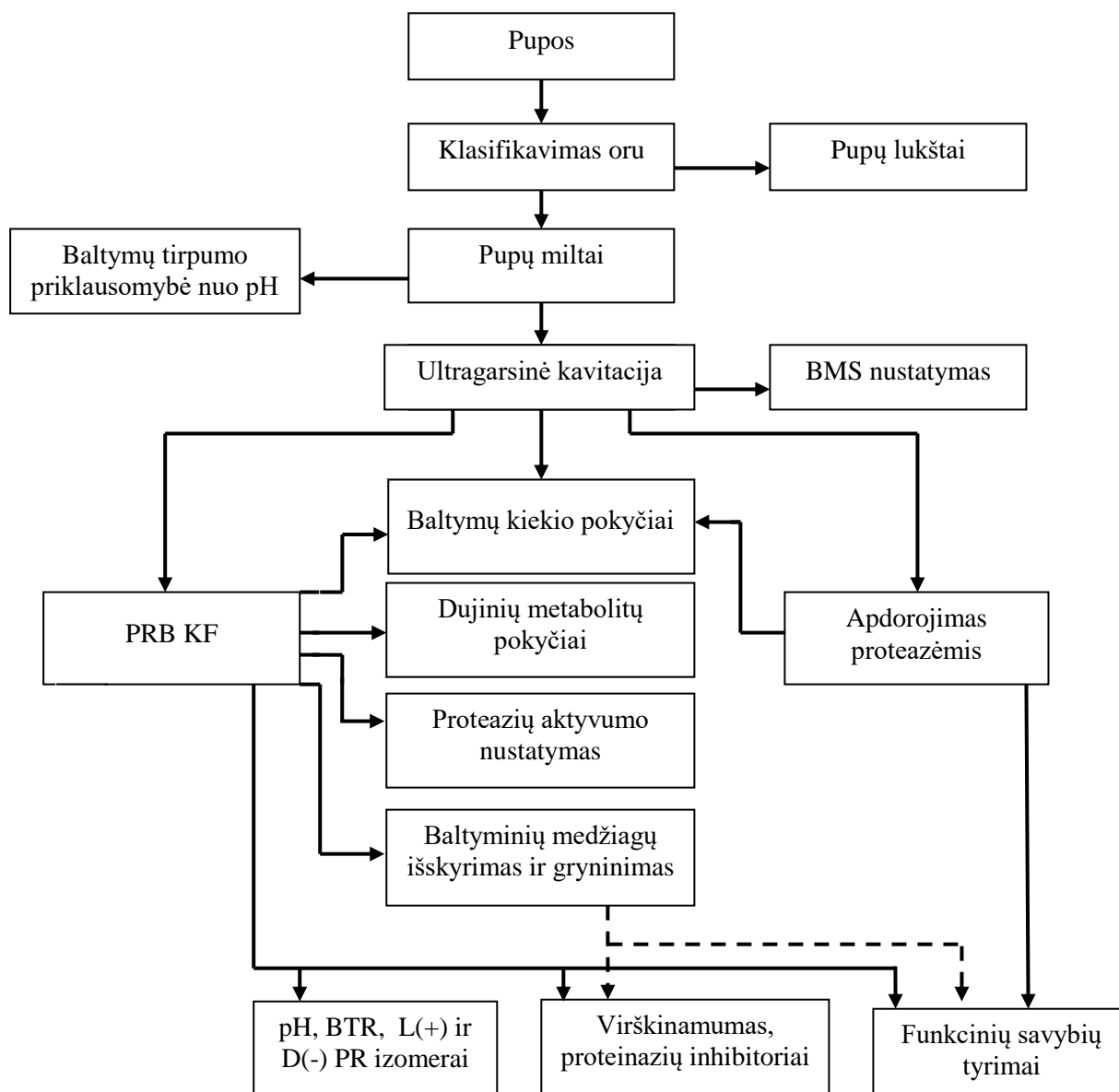
### 2.1. Tyrimų kryptys

Tiriamasis projektas vykdytas dviem etapais.

*Pirmojo etapo* metu nustatyta PRB KF ir apdorojimo proteazėmis įtaka pupų pokyčiams (1 pav.). Šiame etape įvertinta:

1. Terpės ir tirpiųjų baltymų pokyčiai KF metu;
2. KF įtaka pupų funkcinėms savybėms ir antitumorigeniškiems faktoriams.

*Antrojo etapo* metu įvertinta pupų lukštų panaudojimo galimybė pieno rūgšties gamybai.



1. pav. I etapo pagrindinės tyrimų kryptys

### 2.2. Tyrimo objektai

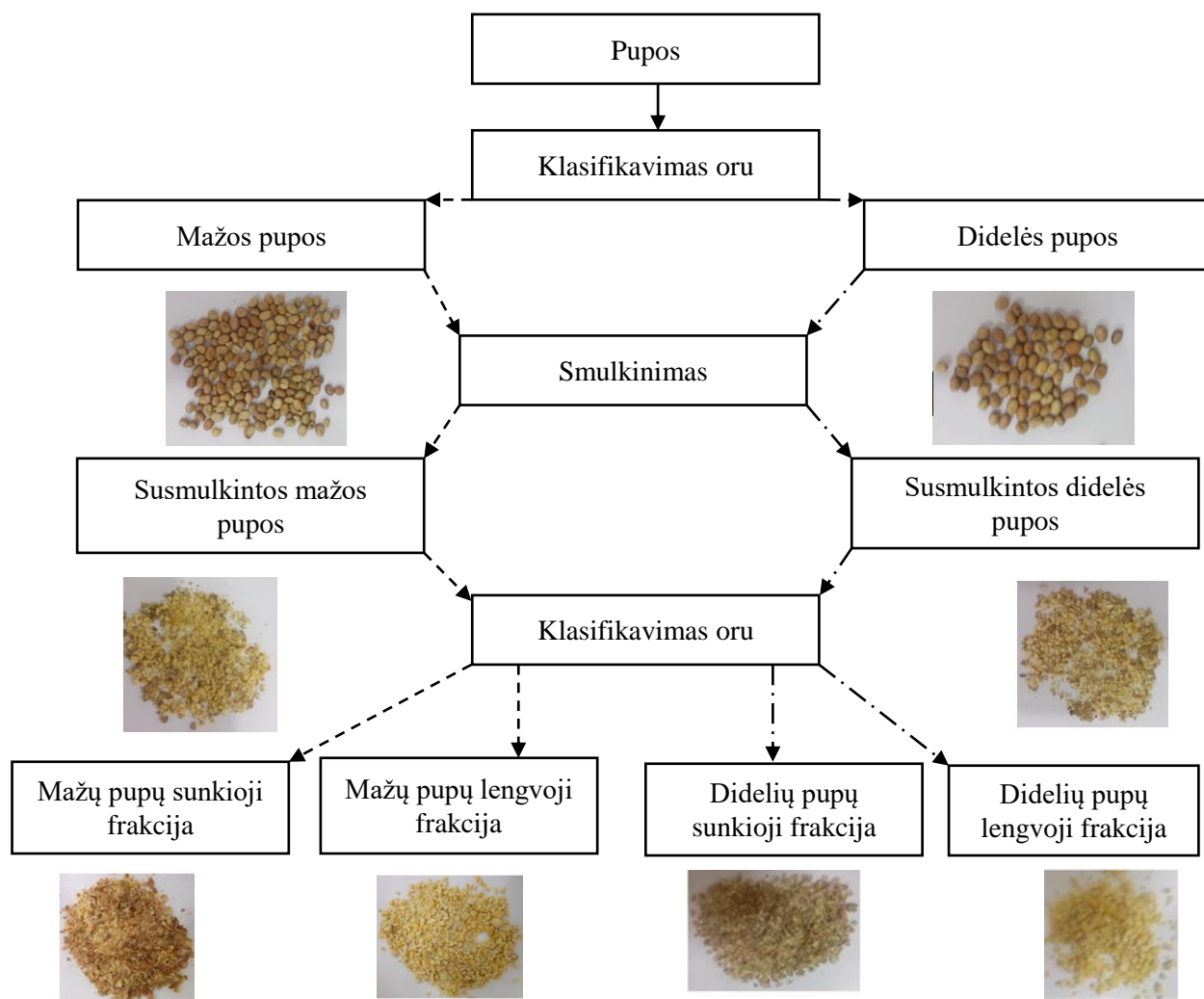
#### 2.2.1. Mėginio paruošimas

Tyrimams naudojamos daržinės pupos, veislė „Fuego“. Pupų veislė sukurta Vokietijoje „NPZ“ firmoje. Lietuvoje pirmą kartą pupos pradėtos auginti 2009 metais. Grūdų vidutinis derlingumas – 6,47 t ha<sup>-1</sup>. Šios veislės pupos yra stambios, sėklos gerai laikosi ankštyse, taip pat šios veislės pupos yra atsparios ligoms [60].

Siekiant gauti pupų mėginį su dideliu baltymų kiekiu, pupų mėginiai buvo ruošiami naudojant klasifikavimą oru bei klasifikavimą sietais.

### 2.2.1.1. Klasifikavimas oru

Vienas iš perspektyvių metodų, norint gauti baltymais turtingą pupų malinio frakciją, yra mėginio ruošimas, naudojant klasifikavimą oru. Klasifikuojant mėginį oru, galima medžiagą suskirstyti į kelias frakcijas. 2 pav. pateiktas mėginio paruošimas, kuris atliktas FINS (Serbija). Visų pirma prieš smulkinimą pupos buvo suskirstytos į 2 frakcijas: smulkias ir stambias. Vertinant frakcijų pasiskirstymą pagal stambumą, stambios pupos sudarė 74,6 % visų pupų, o smulkios pupos – 25,4 %. Toliau šios frakcijos buvo susmulkintos ir suskirstytos oru į lengvąją (LF) ir sunkiąją frakcijas (SF).



2.pav. Mėginio paruošimas naudojant klasifikavimą oru

Tiek stambių, tiek smulkių pupų sunkioji ir lengvoji frakcijos po klasifikavimo oru pasiskirstė panašiai: stambių pupų LF sudarė 26,38 %, o smulkių pupų LF – 26,61 %, SF stambių pupų sudarė 72,62 %, o smulkių pupų SF – 73,39 %.

**1 lentelė.** Frakcijų pasiskirstymas pupas klasifikuojant oru

Pavadinimas	Masė, g	Kiekis, %
Lengvoji frakcija (stambios pupos)	854,43	26,38
Sunkioji frakcija (stambios pupos)	2384,74	72,62
Lengvoji frakcija (smulkios pupos)	292,97	26,61
Sunkioji frakcija (smulkios pupos)	809,97	73,39

Sunkiosiose pupų frakcijose vyrauja pupų sėklaskilčių dalelės. Atlikus granulimetrinę sudėties analizę, pupų sunkioji frakcija suskirstyta Haver EML Digital Plus (Vokietija) sietais į 3 frakcijas: į daleles, kurių dydis  $\geq$  nei 2 mm, į daleles, kurių dydis  $<$  nei 2 mm, bet  $\geq$  nei 1,6 mm ir į daleles, kurių dydis  $<$  nei 1,6 mm. Tiek smulkių, tiek stambių pupų sunkiojoje frakcijoje vyravo pupų dalelės, kurių dydis  $>$  nei 2 mm: stambiose pupose jos sudarė 86,45 %, smulkiose pupose – 67,65 %. Pastebėta, kad smulkių pupų SF yra daugiau smulkių dalelių nei stambių pupų SF (2 lentelė).

**2 lentelė.** SF granulimetrinė sudėtis klasifikuojant pupas oru

Dydis, mm	Kiekis, % (stambios pupos)	Kiekis, % (smulkios pupos)
$D \geq 2$ (A)	$86,45 \pm 2,1$	$67,65 \pm 2,2$
$2 < D \leq 1,6$ (B)	$8,5 \pm 1,2$	$17,98 \pm 1,9$
$D < 1,6$ (C)	$5,05 \pm 0,9$	$14,37 \pm 0,8$



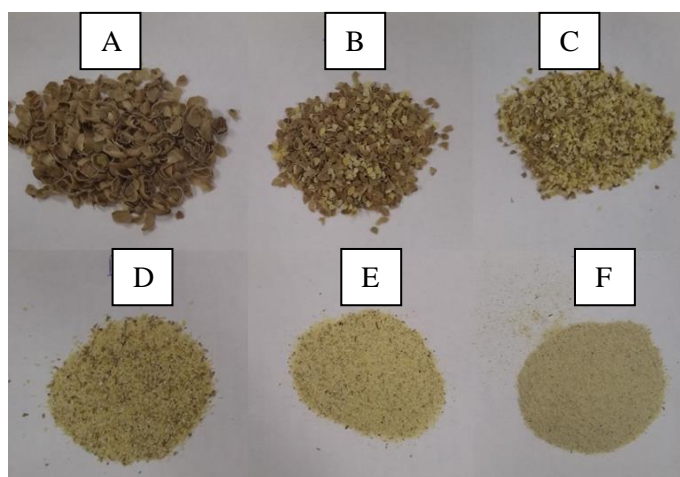
**3 pav.** Susmulkintų pupų sunkiosios frakcijos granulimetrinė sudėtis

Lengvojoje susmulkintų pupų frakcijoje vyrauja pupų lukštai, taip pat, į šią frakciją patenka smulkios (lengvos) sėklaskilčių dalelės. Atlikus granulimetrinę analizę, lengvoji pupų frakcija suskirstyta Haver EML Digital Plus (Vokietija) sietais į 6 frakcijas: 1) daleles, kurių dydis  $\geq$  nei 2 mm, 2) daleles, kurių dydis  $\geq$  nei 1,6 mm, bet  $<$  nei 2 mm, 3) daleles, kurių dydis  $\geq$  nei 1 mm, bet  $<$  nei 1,6 mm, 4) daleles, kurių dydis  $\geq$  nei 0,5 mm, bet  $<$  1 mm, 5) daleles, kurių dydis  $\geq$  nei 0,315 mm, bet  $<$  nei 0,5 mm 6) daleles, kurių dydis  $<$  nei 0,315 mm. Tiek stambių,

tiek smulkių pupų lengvojoje frakcijoje vyrauja dalelės, kurių dydis didesnis nei 2 mm, stambių pupų LF nustatyta 38,07 %, smulkų pupų LF – 34,05 % (3 lentelė), šioje frakcijoje vyrauja pupų lukštai (4 pav.).

**3 lentelė.** LF granuliometrinė sudėtis klasifikuojant pupas oru

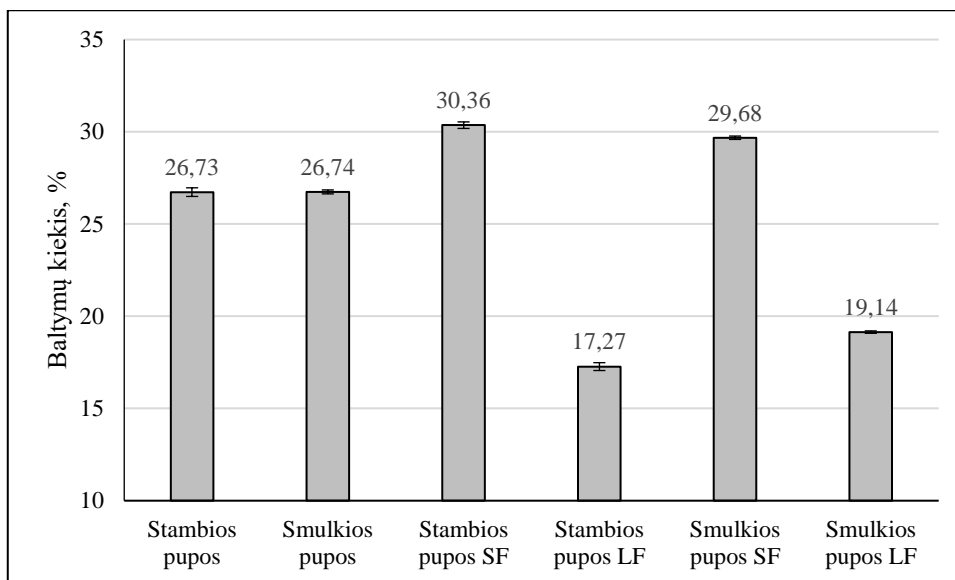
Dydis, mm	Kiekis, % stambios pupos	Kiekis, % smulkios pupos
$D \geq 2$ (A)	$38,07 \pm 1,9$	$34,05 \pm 2,6$
$2 < D \leq 1,6$ (B)	$8,70 \pm 1,1$	$6,90 \pm 0,9$
$1,6 < D \leq 1$ (C)	$22,96 \pm 2,0$	$17,32 \pm 0,9$
$1 < D \leq 0,5$ (D)	$18,65 \pm 1,9$	$21,70 \pm 1,8$
$0,5 < D \leq 0,315$ (E)	$5,22 \pm 0,6$	$9,51 \pm 0,7$
$D < 0,315$ (F)	$6,40 \pm 0,4$	$10,52 \pm 1,2$



**4 pav.** Susmulkintų pupų lengvosios frakcijos granuliometrinė sudėtis

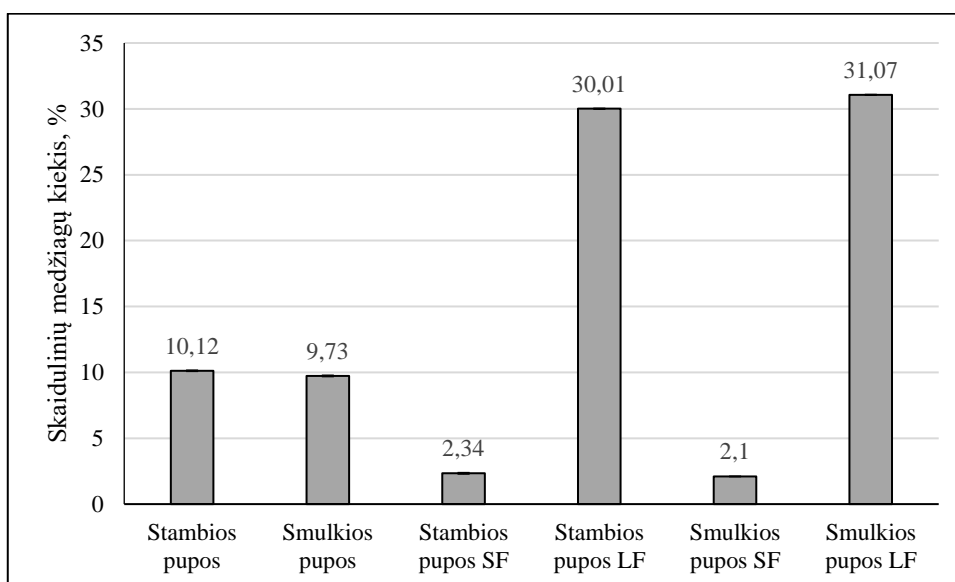
Kitame eksperimento etape tirta klasifikavimo oru įtaka baltymų ir skaidulinių medžiagų pasiskirstymui atskirose frakcijose.

Atlikus baltymų tyrimus atskirose frakcijose, gauta, kad tiek smulkiose pupose, tiek stambiose pupose baltymų kiekis yra vienodas, 26,7 %. Tiriant susmulkintų pupų LF ir SF, nustatyta, kad didesnis baltymų kiekis yra sunkiojoje frakcijoje, tiek smulkiose pupose (29,68 %), tiek stambiose pupose (30,36 %). Lengvojoje pupų frakcijoje nustatytas baltymų kiekis: stambiose pupose – 17,27 %, smulkiose pupose – 19,14 % (5 pav.).



**5 pav.** Baltymų kiekis atskirose pupų frakcijose po klasifikavimo oru

Atlikus skaidulinių medžiagų analizę atskirose frakcijose, nustatyta, kad tiek smulkiose, tiek stambiose pupose skaidulinių medžiagų kiekis yra panašus: stambiose pupose – 10,12 %, smulkiose – 9,73 %. Reikšmingas skaidulinių medžiagų (SM) skirtumas nustatytas tarp SF ir LF. Sunkiojoje pupų frakcijoje skaidulinių medžiagų kiekis sudarė: stambiose pupose – 2,34 %, o smulkiose pupose – 2,1 %. Lengvojoje pupų frakcijoje skaidulinių medžiagų kiekis nustatytas, atitinkamai, stambiose pupose – 30,01 % ir smulkiose pupose – 31,07 % (6 pav.).

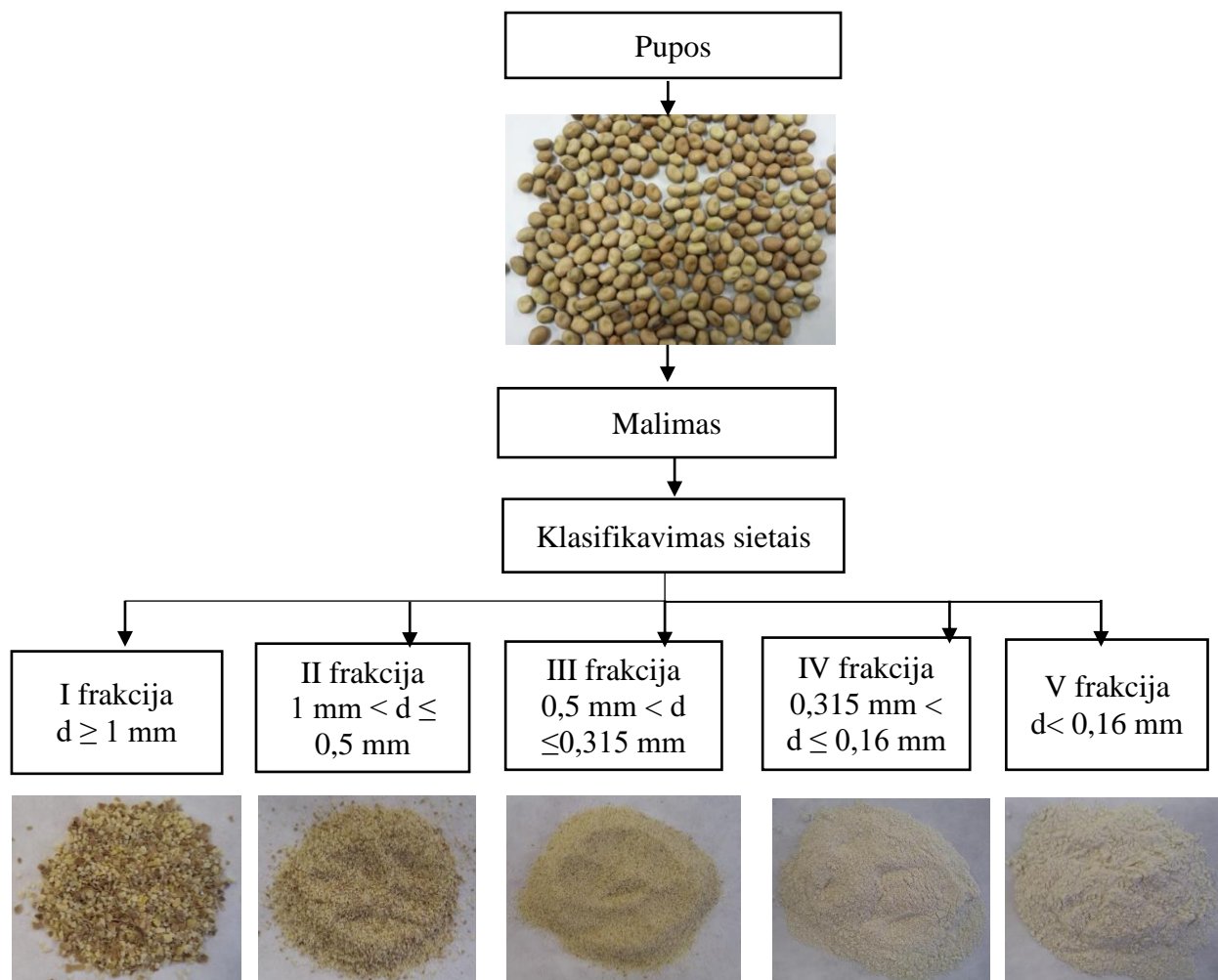


**6 pav.** Skaidulinių medžiagų kiekis atskirose pupų frakcijose po klasifikavimo oru

### 2.2.1.2. Klasifikavimas sietais

Kadangi smulkinant pupas baltymais turtingos dalelės ir krakmolu turtingos dalelės susmulkinami iki skirtingo dydžio, mėginys gali būti paruošiamas ir klasifikuojant sietais. Šiame eksperimento etape susmulkinamos pupos buvo klasifikuojamos Haver EML Digital Plus

(Vokietija) sietais į 5 frakcijas: I frakcija –  $d \geq 1$  mm; II frakcija –  $1 \text{ mm} < d \leq 0,5$  mm; III frakcija –  $0,5 \text{ mm} < d \leq 0,315$  mm; IV frakcija –  $0,315 < d \leq 0,16$  mm; V frakcija –  $d < 0,16$  mm (7 pav.).



**7 pav.** Mėginio paruošimas naudojant frakcijų atskyrimui sietus

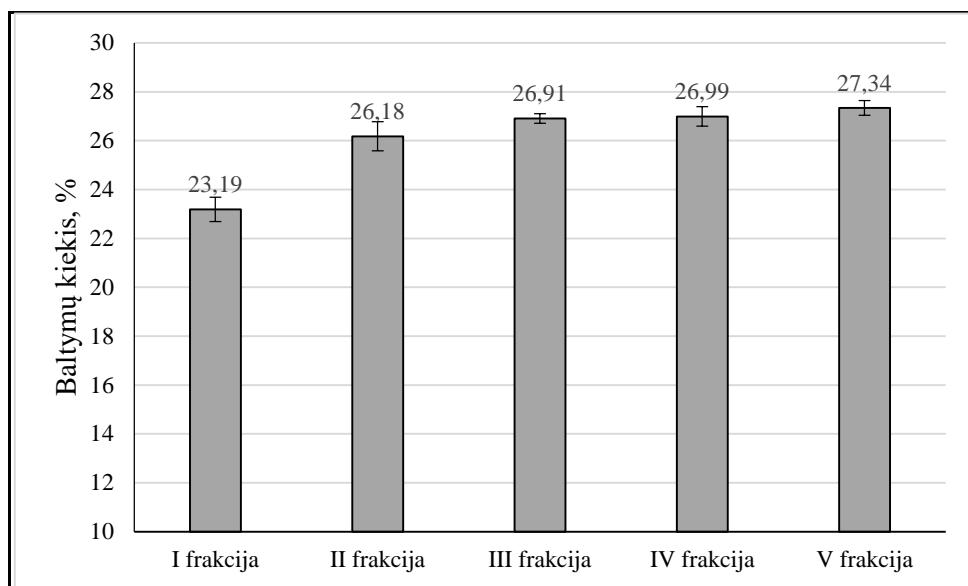
Iš 7 pav. matome, kad I – II frakcijose vyrauja pupų luobelėlių dalys, šių frakcijų kiekiai nustatyti tokie: I frakcijos – 25,12 %, II frakcijos – 30,64 %. III, IV ir V pupų frakcijoje vyrauja pupų sėklaskiltės dalys, šių frakcijų kiekiai: III – 8,51 %, IV – 23,48 %, V – 12,24 %.

**4 lentelė.** Frakcijų pasiskirstymas, pupas klasifikuojant sietais

Pavadinimas	Kiekis, g	Kiekis, %
I frakcija	671,63	25,12
II frakcija	819,32	30,64
III frakcija	227,60	8,51
IV frakcija	627,91	23,48
V frakcija	327,39	12,24

Atlikus bendro baltymų kiekio atskirose frakcijose tyrimus, nustatyta, kad didžiausi baltymų skirtumai yra I ir V pupų frakcijose: I frakcijoje baltymų kiekis nustatytas 23,19 %, V

frakcijoje – 27,34 %. Nustatytas baltymų kiekis III – V frakcijose yra panašus, šiose frakcijose yra apie 27 % baltymų (8 pav.).



**8 pav.** Baltymų kiekis atskirose pupų frakcijose po klasifikavimo sietais

Lyginant mėginio paruošimą, naudojant klasifikavimą oru ir klasifikavimą sietais, pastebėta, kad klasifikavimas oru yra tinkamesnis metodas, norint gauti pupų mėginį, kuriame būtų daug baltymų. Mėginį ruošiant klasifikuojant oru, lengvos dalelės, tarp kurių yra pupų lukštai, yra atskiriamos nuo sunkiosios frakcijos, dėl to gali būti sukoncentruojama pupų sėklaskilčių dalis. Klasifikuojant sumaltas pupas sietais, tiek pupų sėklaskilčių dalis, tiek pupų luobelės yra susmulkinamos tolygiai, todėl šios pupų dalys pasiskirsto palyginti tolygiai frakcijose.

Įvertinus gautus rezultatus, tolimesni tyrimai bus atliekami su pupų sunkiąja frakcija, kuri yra gauta po klasifikavimo oru. Ši frakcija yra sumalama, gauto pupų malinio granulimetrinė sudėtis pateikta 2.5 lentelėje. Sumaltose pupose daugiausiai yra dalelių, kurių dydis:  $0,315 < D \leq 0,2$  (22,96 %) ir  $0,2 < D \leq 0,16$  (18,65 %).

**5 lentelė.** Sumaltos sunkiosios frakcijos granulimetrinė sudėtis.

Dydis, mm	Kiekis, %
$D \geq 0,5$ (A)	$5,17 \pm 0,5$
$0,5 < D \leq 0,315$ (B)	$8,7 \pm 0,8$
$0,315 < D \leq 0,2$ (C)	$22,96 \pm 1,9$
$0,2 < D \leq 0,16$ (D)	$18,65 \pm 2,1$
$0,16 < D \leq 0,08$ (E)	$5,22 \pm 0,5$
$D < 0,08$ (F)	$6,40 \pm 0,7$

Literatūroje, taip pat, aprašomas pupų mėginio paruošimas, naudojant klasifikavimą oru, tokiu metodu ruošiant mėginį galima gauti baltymais turtingą frakciją. R. T. Tyler, C. G.

Youngs, F.W. Sosulski darbe, naudodami klasifikavimą oru, pupų mėginį suskirstė į dvi frakcijas: turtingą baltymais ir turtingą krakmolu, prieš klasifikavimą oru pupose baltymų nustatyta 31%, po klasifikavimo oru baltymais turtingoje frakcijoje baltymų kiekis sudarė 73,2 %, krakmolu turtingoje frakcijoje baltymų nustatyta 19,35% [61]. Kitų autorių (Pascalle J. M. Pelgrom & Remko M. Boom<sup>1</sup> ir Maarten A. I. Schutyser) darbe, pupų miltų baltymų kiekis, naudojant klasifikavimą oru, buvo sukonzentruotas nuo 29,8 % iki 52,8 % [62].

### **2.2.2. Pieno rūgšties bakterijos**

Tyrimo metu buvo naudotos 3 pieno rūgšties bakterijos: *Pediococcus pentosaceus* KTU 05-9, *Lactobacillus sakei* KTU 05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU 05-7. Šios pieno rūgšties bakterijos pasižymi antibakterinėmis savybėmis, jos gamina bakteriocinus (sakaciną 806, pediociną Ac807, pediociną 809).

Pieno rūgšties bakterijos yra saugomos KTU Maisto mokslo ir technologijos katedros laboratorijoje, esant -70 °C temperatūroje apsauginėje terpėje (*Microbank* sistemoje), prieš eksperimentą atgaivintos modifikuotame MRS sultinyje (Oxoid, UK).

### **2.2.3. PRB kietafazė fermentacija**

Tyrimo metu pasirinktas pupų apdorojimo metodas – kietafazė fermentacija. KF metu fermentuojamos masės drėgmė negali būti didesnė nei 50 %. Mažas drėgmės kiekis neleidžia aktyviai daugintis ir augti pašalinei mikroflorai [61].

Eksperimento metu KF fermentacijai buvo naudotas pupų mėginys, gautas klasifikuojant pupas oru, kuriame baltymų kiekis – 30,36 %. Naudojamas pieno rūgšties bakterijų *P. acidilactici* (Pa), *P. pentosaceus* 9 (Pp9), *L. sakei* (Ls) kiekis – 2 % nuo pupų miltų masės. Fermentuojamo mišinio drėgmė – 45 %. Fermentacija vykdoma 72 h 35 °C temperatūroje Renggli A.G. (Šveicarija) termostate, analizės mėginys imtas kas 24 h.

## **2.3. Tyrimų metodai**

### **2.3.1. Baltyminių medžiagų analizės metodai**

#### **Bendrojo baltymų kiekio nustatymas**

Baltymų kiekis nustatomas Kjeldalio metodu pagal standartą ISO 20483:2006 [83].

**Medžiagos.** Koncentruota sieros rūgštis; 40 % NaOH tirpalas; 3 % boro rūgšties tirpalas; 0,1 N druskos rūgšties tirpalas; Taširo indikatorius; katalizatoriaus tabletė (sudėtis: K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O; TiO<sub>2</sub>).



**Darbo eiga.** Analizei paimama apie 1 g pupų miltų. Ant mėginio Kjeldalio kolboje įpilama 20 ml koncentruotos H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, įdedama katalizatoriaus tabletė. Tuomet kolba statoma ant elektrinio kaitintuvo Behr (Labor – Technik GmbH, Vokietija) ir kaitinama (programa: 90 min. 60% temp.). Po mineralizacijos kolba atvėsinama. Toliau mėginys distiliuojamas distiliatoriuje Behr (Labor – Technik GmbH, Vokietija). Susidaręs distiliatas surenkamas į kūginę kolbą ir titruojamas 0,1 N HCl tirpalu, naudojant Taširo indikatorį (indikatorius titravimo metu žalią spalvą keičia į violetinę). Lygiagrečiai tomis pačiomis sąlygomis nudistiliuojamas ir nutitruojamas toks pat kiekis koncentruotos sieros rūgšties (tuščiasis mėginys). Iš tiriamo produkto mėginio išsiskyręs azoto (N) kiekis apskaičiuojamas taip [83]:

$$N = \frac{1,4 \times n \times K (V_1 - V_0)}{M}, \% \quad (1)$$

čia: 1,4 – azoto kiekis, kurį sujungia 1 ml 0,01N arba 0,1 N HCl;

V<sub>1</sub> – 0,01N arba 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas iš distiliuojamo mineralizato išsiskyrusiam amoniakui sujungti, ml;

V<sub>0</sub> – 0,01N arba 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas tuščiajam mėginiui nutitruoti, ml;

m – pasvertas analizei medžiagos kiekis, g. n – druskos rūgšties, naudotos titravimui, normalingumas (0,01N arba 0,1 N HCl);

K – druskos rūgšties tirpalo pataisos koeficientas (1, jei nėra atliekamas atskiras įvertinimas).

Baltymų kiekis apskaičiuojamas:

$$B_{pr} = N \cdot k \quad (2)$$

N - azoto (N) kiekis,

k - koeficientas perskaičiuoti azoto kiekį į baltymų kiekį, k=5,7.

### **Tirpiųjų baltymų kiekio nustatymas**

**Mėginio paruošimas.** 3 g pupų miltų suspenduojama 27 ml vandens. Mėginys išmaišomas ir išlaikomas 1 valandą. Mėginys centrifuguojamas centrifuga „Velocity 18R (Dynamica)“ 30 min 8000 rpm greičiu esant 8 °C temperatūrai. Susidaręs skystis nupilamas ir naudojamas analizei.

Ant likusio baltymų miltų likučio užpilama 27 ml 0,9 N NaCl. Mėginys išmaišomas ir išlaikomas 1 valanda. Mėginys centrifuguojamas „Velocity 18R (Dynamica)“ 30 min 8000 rpm greičiu esant 8 °C temperatūrai. Susidaręs skystis nupilamas ir naudojamas analizei.

**Eiga.** Analizei naudojama 10 g tirpiųjų baltymų. Analizė atliekama taip pat kaip nustatant bendrą baltymų kiekį. Tik prieš analizę papildomai įdedama antiputokšlis (sudėtis: natrio sulfatas ir silikonas).

### **Tirpių baltymų kiekis apskaičiuojamas**

$$B_{pr} = \frac{B_f \times G}{g} \quad (3)$$

čia: g – analizei paimto produkto kiekis; G– paruošto filtrate, t.y. filtrato, kuriame yra tirpūs baltymai, kiekis; B<sub>f</sub> – baltymų kiekis filtrate.

### **Baltyminių medžiagų išskyrimas ir gryninimas**

Baltyminių medžiagų išskyrimui pupų miltai sumaišomi su distiliuotu vandeniu santykiu 1:10 (miltų: vandens) ir kambario temperatūroje (20±2 °C) retkarčiais pamaišant išlaikomi 30 min. Po išlaikymo 1 M NaOH tirpalu suspensijos pH sureguliuojamas iki 9 ir išlaikoma 1 h nuolat maišant. Suspensija centrifuguojama „Velocity 18R (Dynamica)“ centrifuga 15 min, 8000 rpm greičiu, 8 °C temperatūroje. Į centrifugatą lašinamas 1 M HCl, kol pasiekiamas pH 4,5 ir išlaikoma 1 h. Nusėdę baltymai atskiriami centrifuguojant „Velocity 18R (Dynamica)“ centrifuga 15 min, 8000 rpm greičiu, 8 °C temperatūroje ir išdžiovinami „Sublimator 3x4x5 Zirbus technology“ (Vokietija) sublimatoriuje [84]. Šie baltymai panaudojami baltymų funkcinių savybių, *in vitro* virškinamumo ir proteazių inhibitorių aktyvumo nustatymuose. Analogiškai baltymų išskyrimai atliekami su 24 h, 48 h ir 72 h KF paveiktomis pupomis. Pagal šią metodiką buvo išskirtos pupų albuminų ir gliutelinų frakcijos.

**Albuminų ir globulinų išskyrimas.** Pupų miltai sumaišomi su vandeniu santykiu 1:9. Mišinys gerai išmaišomas ir išlaikomas 1 valandą. Po 1 valandos mišinys centrifuguojamas centrifuga „Velocity 18R (Dynamica)“ 30 min, 8000 rpm greičiu. Susidaręs filtratas nupilamas ir išdžiovinamas „Sublimator 3x4x5 Zirbus technology“ (Vokietija) sublimatoriuje. Ant likusios po centrifugavimo kietosios fazės užpilama toks pats kiekis, kaip vandens kiekis, kuris buvo naudojamas albuminų ekstrakcijai, 0,9 N NaCl tirpalo, globulinų išskyrimui. Mišinys išlaikomas 1 valanda. Po 1 valandos mišinys centrifuguojamas centrifuga „Velocity 18R (Dynamica)“ 30 min, 8000 rpm greičiu. Susidaręs filtratas nupilamas ir išdžiovinamas „Sublimator 3x4x5 Zirbus technology“ (Vokietija) sublimatoriuje [90]. Šie baltymai naudojami SDS-PAGE elektroforezės tyrimui.

### **Elektroforezė**

**Mėginio paruošimas.** Tyrimo metu buvo nustatinėjama pupų albuminų ir globulinų molekulinės masės. Albuminai ištirpinami vandenyje, paruošiamas baltymų tirpalas 1 mg/ml. Nuo globulinų prieš analizę atskiriamas NaCl filtruojant per „Ultra- 15, MWCO 10 kDa“ filtrus.

**Medžiagos.** 30 % akrilamido tirpalas, 4xTRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas (pH 8,8), HCl/NDS buferinis tirpalas (pH 6,8), elektroforezės TRIS – glicino buferinis tirpalas, 10 % amonio

persulfato tirpalas, tetrametiledilendiaminas (TEMED), 2 x baltymo denatūravimo buferinis tirpalas, standartinis baltymų mišinys, 10 % acto rūgštis, dažo Coomassie mėlio tirpalas, baltymams dažyti Coomassie mėliu baltymo tvirtinimo tirpalas.

**Aparatas.** Elektroforezės aparatas „CS-300 Cleaver Scientific“

**Metodo esmė.** Elektroforezės metu įkrautos molekulės juda elektriniame lauke. Įkrautųjų molekulių judrumas elektriniame lauke priklauso nuo jų dydžio, formos krūvio ir cheminės prigimties. Elektroforezės metu naudojami 2 geliai: skiriamasis ir koncentruojamasis, šie geliai turi ir skirtingą įtampos gradientą.

**Eiga.** *Skiriamąjo gelio paruošimas.* Skiriamasis gelis sudarytas: 4 ml akrilamido tirpalo, 2,5 ml 4xTRIS·HCl/NDS buferinis tirpalo (pH 8,8), 3,4 ml distiliuoto vandens, 100 µl 10 % amonio persulfato tirpalo, 4 µl TEMED. Skiriamasis gelis pilamas tarp elektroforezės aparato stiklo plokštelių ir paliekamas kol sustings.

*Koncentruojamojo gelio paruošimas.* Koncentruojamasis gelis sudarytas: 0,83 ml akrilamido tirpalo, 2,5 ml 4xTRIS·HCl/NDS buferinis tirpalo (pH 6,8), 2,9 ml distiliuoto vandens, 50 µl 10 % amonio persulfato tirpalo, 5 µl TEMED.

*Baltyminio preparato paruošimas elektroforezei.* Tiriamasis baltymų tirpalas praskiedžiamas su 2 x baltymo denatūravimo buferiu 1:2. Mišinys 3-5 min kaitinamas verdančio vandens vonioje. Analizei naudojama 10 – 40 µl paruošto baltymo preparato.

*Elektroforezė.* Į gelyje esančius tarpus įpilami mėginiai. Elektroforezės aparatas prijungiamas prie elektros srovės šaltinio. Nustatoma 40 Ma stipruvo srovė ir 220 V įtampa. Kai judantis gelyje mėlynasis bromfenolis pasiekia skiriamąjo gelio apačią, elektros srovė išjunginama.

*Gelyje esančio baltymo dažymas po elektroforezės.* Po elektroforezės poliakrilamido gelis atsargiai atskiriamas nuo stiklo plokštelių, įdedamas į plastikinę vonelę ir užpilamas baltymų tvirtinimo tirpalu tiek, kad apsemtų. Vonelė lėtai purtoma „KS 130 basic (IKA)“ purtykle kambario temperatūroje 60 min. Po 60 min nupilamas baltymo tvirtinimo tirpalas ir užpilamas Coomassie mėlio dažo tirpalas. Dažoma, kol baltymo juostelės nusidažo norimo ryškumo spalva. Baigus dažyti, dažai nupilami ir užpilama 10 % acto rūgštis. Vonelė purtoma kambario temperatūroje, kol iš gelio išsiplauna nesusirišę su baltymais dažai (1 h) [85].

### 2.3.2. Baltymų ir miltų funkcinių savybių įvertinimas

**Mėginiai:** pupų miltai, pupų baltymų izoliatai.

**Medžiagos:** 0,1 N NaOH, 0,1 N HCl, rapsų aliejus.

**Putų sudarymo pajėgumas ir stabilumas.** 1 g pupų miltų ar baltymų sumaišoma su 50 ml vandens matavimo cilindre ir plakama (homogenizuojamas) 5 min su “IKA T25 digital” (Vokietija) plakikliu. Išskirtų pupų baltymų putų sudarymo pajėgumas nustatomas esant

skirtingiems pH: 4,5; 6; 8. Reikalingas pH sureguliuojamas į pupų ir vandens suspensiją, lašinant 0,1 N NaOH arba 0,1 N HCl tirpalus. Pupų miltų susidariusių putų kiekis matuojamas po 0 min, 30 min, 60min 90 min, 120 min. Putų kiekis apskaičiuojamas [87]:

$$\text{Putų kiekis (\%)} = \frac{\text{Putų tūris, ml}}{\text{Bendras suspensijos tūris, ml}} \times 100 \quad (4)$$

**Emulsijos sudarymo pajėgumas.** 0,5 g pupų miltų/ pupų baltymų sumaišoma su 3 ml vandens ir 3 ml aliejaus. Gautas mišinys maišomas 5 min su „Vibrofix VF1 (IKA)“ vorteksu, po to centrifuguojama su „Microcen 23 (Orto alresa)“ 5000 rpm greičiu, 30 min. Pupų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumas nustatomas, esant skirtingiems terpės pH: 4.5, 6, 8. Terpės pH koreguojama su 0,1 N NaOH ir 0,1N HCl tirpalais. Emulsijos sudarymo pajėgumas apskaičiuojamas pagal formulę [86]:

$$\text{Emulsijos sluoksnis (\%)} = \frac{\text{Emulsijos sluoksnio tūris (ml)}}{\text{Bendras suspensijos tūris (ml)}} \times 100 \quad (5)$$

**Emulsijos stabilumo** tyrimui mėginiai ruošiami, taip pat, kaip ir emulsijos susidarymo pajėgumui nustatyti. Prieš centrifugavimą mėginiai išlaikomi 80 °C temperatūroje 30 min, po to atvėsunami iki kambario temperatūros (20±2°C). Atvėsinti mėginiai centrifuguojami „Microcen 23 (Orto alresa)“ centrifuga 30 min, 5000 rpm greičiu. Emulsijos stabilumas apskaičiuojamas pagal formulę [86]:

$$\text{Emulsijos sluoksnis (\%)} = \frac{\text{Emulsijos sluoksnio tūris (ml)}}{\text{Bendras suspensijos tūris (ml)}} \times 100 \quad (6)$$

**Vandens absorbcija.** 5 g pupų miltų suspenduojama 30 ml vandens. Mišinys išmaišomas ir išlaikomas kambario temperatūroje 30 min, tuomet mišinys centrifuguojamas „Velocity 18R (Dynamica)“ centrifuga 30 min, 5000 rpm greičiu. Skystoji fazė nupilama. Vandens absorbcija apskaičiuojama [91]:

$$\text{WHC} = \frac{(\text{Buteliuko svoris po dekantavimo} - \text{Sauso buteliuko svoris}) - \text{Analizei naudotas miltų kiekis}}{\text{Analizei naudotas miltų kiekis}} \quad (7)$$

### 2.3.3. Antimonybinių faktorių nustatymo metodai

#### Baltymų *in vitro* virškinamumo įvertinimas

**Mėginio paruošimas.** 62,5 mg pupų baltymų suspenduojama 10 ml distiliuoto vandens.

**Medžiagos.** Tripsinas, α – chimotripsinas, peptidazė, 0,1 M NaOH.

**Eiga.** Fermentinis mišinys, sudarytas iš tripsino (1,6 mg), α-chimotripsino (3,1 mg) ir peptidazės (1,3 mg), ištirpinamas 1 ml distiliuoto vandens. Pupų suspensijos pH prieš sumaišymą su

fermentu sureguliuojamas iki 8 su 0,1 M NaOH. Pupų baltymų suspensija sumaišoma su fermentiniu tirpalu santykiu 10:1, pamatuojamas reakcijos mišinio pH, jei reikia sureguliuojamas iki 8 ir išlaikomas 10 min. Po 10 min matuojama tirpalo pH. Baltymų virškinamumas (V, %) *in vitro* įvertintas pagal hidrolizuotų baltymų kiekį [76]:

$$V = 210,464 - 18,103 \times pH, (\%) \quad (8)$$

**Proteazių baltymuose inhibitorių aktyvumas** vertintas pagal tripsino ir chimotripsino inhibitorių aktyvumą pupų miltuose ir pupų baltymų izoliatai.

**Mėginio paruošimas.** 1 g pupų baltymų arba pupų miltų sumaišoma su 10 ml fosfatinio buferiu.

**Medžiagos.** 0,1 M fosfatinis buferis pH 7,6, proteazė, 1 Mm HCl, kazeinas, 5 % trichloroacto rūgštis.

Reakcijos mišinys sudarytas iš 1,0 ml fosfatinio buferio (0,1 M, pH 7,6), 0,5 ml proteazės tirpalo (1 mg/ml), 0,5 ml 1 mM HCl, 2 ml kazeino tirpalo (2% fosfatiniam buferyje 0.1 M pH 7,6) ir 1 ml mėginio tirpalo. Prieš įdedant į reakcijos mišinį kazeino tirpalą, reakcijos mišinys išlaikomas 30 min, kad proteazių inhibitoriai prisijungtų prie proteazių. Po 30 min į reakcijos mišinį įdedamas kazeino tirpalas ir mišinys išlaikomas 20 min 37 °C temperatūroje. Reakcija sustabdoma įpylus 6 ml 5 % trichloroacto rūgšties. Tuščias mėginys ruošiamas vietoje mėginio įpilant 1 ml fosfatinio buferio. Kontroliniai mėginiai ruošiami prieš reakciją įpilant 6 ml 5 % trichloroacto rūgšties. Tirozino kiekis nustatytas pagal tirpalo absorbciją, išmatuotą Genesys 10 UV (JAV) spektrofotometru, esant 660 nm bangos ilgiui. Inhibicinis aktyvumas (%) apskaičiuotas pagal proteolitinio aktyvumo sumažėjimą mėginiuose su inhibitoriaus tirpalu ir be jo [76].

#### 2.3.4. Spektrofotometriniai metodai

##### **Proteazių aktyvumo nustatymas**

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

**Medžiagos.** Kalio fosfato buferinis tirpalas (0,05 M; pH 7,5), 0,65 % kazeino tirpalas (pH 7,5), trichloroacetato rūgšties reagentas (0,11 M), folin-Ciocalteu fenolinis reagentas, natrio karbonato tirpalas (0,5 M), kalcio acetato (0,005 M) ir natrio acetato trihidrato (0,01 M) buferinis tirpalas, L-Tirozino etaloninis tirpalas (0,0011 M).

**Mėginio paruošimas.**  $5 \pm 0,01$  g pupų miltų sumaišoma su 50 ml (0,01 M natrio acetato ir 0,005 M kalcio acetatas) buferio tirpalo, gerai išmaišoma su „Vibrofix VF1 (IKA)“ purtykle. Gauta suspensija centrifuguojamas (8000 rpm, 10 min) „Velocity 18R“ (Dynamica) centrifuga. Analizei naudojamas centrifugatas.

**Kalibracinės kreivės sudarymas.** 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50 ml etaloninio tirozino tirpalo praskiesta vandeniu iki 2 ml. Paruošti darbiniai tirozino tirpalai sumaišomi su 5 ml 0,5 M natrio karbonato tirpalu, 1 ml Folin-Ciocalteu fenolinio reagentu ir išlaikomi 30 min 37 °C temperatūros vandens vonioje. Optinis tankis matuojamas Genesys 10 UV (JAV) spektrofotometru ( $\lambda = 660$  nm), analogiškai ruošiamas tuščias bandinys, be tirozino. Sudarant tirozino kalibracinę kreivę (I priede) nustatyta, kad tarp tirozino koncentracijos tirpale ir jo optinio tankio yra tiesinė priklausomybė, kuri aprašyta lygtimi  $y = 0,135x + 0,0161$  (čia: y – optinis tankis, x – tirozino tirpalo koncentracija,  $\mu\text{M}$ ). Korealiacijos koeficientas  $R^2$  tarp šių dydžių yra lygus 0,9983.

**Analizės atlikimas.** Į mėgintuvėlį įpilama 5 ml kazeino tirpalo ir 1 ml pupų ekstrakto. Gerai išmaišoma ir išlaikoma 30 min 37 °C temperatūros vandens vonioje. Lygiagrečiai atliekamas kontrolinis bandymas, be pupų ekstrakto. Po to į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 5 ml 0,11 M trichloracetato rūgšties, į tuščiąjį mėginį – papildomai 1 ml pupų ekstrakto, išmaišoma ir išlaikoma 30 min 37 °C temperatūros vandens vonioje. Analogiškai ruošiami kontroliniai mėginiai, tik filtratas imamas iš kontrolinio mėginio. Vėliau filtruojama per 0,45  $\mu\text{m}$  popierinį filtrą. Sumaišoma 2 ml filtrato su 5 ml 0,5 M natrio karbonato tirpalu ir 1 ml Folin-Ciocalteu fenoliniu reagentu ir išlaikius 30 min 37 °C temperatūros vandens vonioje, „Genesys 10 UV“ spektrofotometru (JAV) matuojamas tirpalo optinis tankis ( $\lambda = 660$  nm) [88].

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

$$PV = \frac{T \times PF}{1 \times 30 \times 2 \times m}, PV/g \quad (9)$$

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

### **Pieno rūgšties L(+) ir D(-) izomerų kiekio įvertinimas**

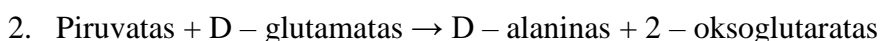
**Mėginio paruošimas.** 1 g mėginio fermentuotų pupų miltų arba pupų lukštų suspenduota 50 ml vandens.

**Medžiagos.** Buferis (pH 10,0), kuriame yra D – glutamato ir natrio azido,  $\text{NAD}^+$  tirpalas, D – glutamato – pyruvato transaminazės tirpalas, L- laktazės dehidrogenazės tirpalas, D – laktazės dehidrogenazės tirpalas, D(-)/L(+) – pieno rūgšties standartinis tirpalas.

**Metodo principas.** D(-) pieno rūgštis izomero nustatymui reikalingos 2 fermentinės reakcijos. Pirmos reakcijos metu katalizuojant D – laktazės dehidrogenazės (D – LDH) D(-) pieno rūgštis izomeras yra oksidinama iki piruvato.



Antros fermentinės reakcijos metu susidarės piruvatas, veikiant fermentui D – glutamato – piruvato transaminazei (D – GPT) ir terpėje esant D – glutamatui, paverčiamas į D – alaniną ir 2-oksoglutaratą.



Fermentinių reakcijų metų susidaręs NADH kiekis yra ekvivalentiškas D(-) pieno rūgštis izomero kiekiui, kuris nustatomas spektrofotometrinio metodu esant 340 nm bangos ilgiui.

L(+) pieno rūgštis izomero nustatymui naudojamos panašios fermentinės reakcijos, kurių metu ji oksidinama iki piruvato, katalizuojant L – laktato dehidrogenazei.



**Eiga.** Reakcijos mišinys sudaromas iš 1,6 ml distiliuoto vandens, 0,1 ml mėginio, 0,5 ml buferio, kuriame yra D – glutamato ir natrio azido, 0,1 ml NAD<sup>+</sup> tirpalo ir 0,02 ml D-GPT tirpalo. Sudarytas reakcijos mišinys išlaikomas 3 min ir matuojama absorbcija (A<sub>1</sub>) esant 340 nm bangos ilgiui. Išmatavus absorbciją į reakcijos mišinį įpilama 0,02 ml D – LDH tirpalo, išmaišoma, reakcijos mišinys išlaikomas 5 min, matuojama absorbcija esant 340 nm bangos ilgiui (A<sub>2</sub>). Pamatavus absorbciją į reakcijos mišinį įpilama 0,02 ml L – LDH tirpalo, išmaišoma, mišinys išlaikomas 10 min, matuojama absorbcija esant 340 nm bangos ilgiui (A<sub>3</sub>).

Tuščias mėginys. Ruošiamas tokia pačia eiga, kaip ir mėginys, tik vietoje mėginio į reakcijos mišinį pilamas distiliuotas vanduo [92].

#### **Pieno rūgštis D(-) ir L(+) izomerų kiekio apskaičiavimas.**

$$A_2 - A_1 = \Delta A_{D\text{-pieno rūgštis}} \quad (10)$$

$$A_3 - A_2 = \Delta A_{L\text{-pieno rūgštis}} \quad (11)$$

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{(g/l)} \quad (12)$$

Čia: V – reakcijos mišinio tūris (ml); MW – molekulinė masė pieno rūgštis (g/mol); ε – NADH ekstincijos koeficientas esant 340 nm bangos ilgiui = 6300 (l x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>); d – kiuvetės ilgis (cm); v – mėginio tūris (ml).

#### **Redukuojančių cukrų nustatymas**

**Mėginio paruošimas.** 5 g pupų lukštų ar fermentuotų pupų lukštų sumaišoma su 40 ml distiliuoto vandens, mišinys išmaišomas, išlaikomas 30 min ir centrifuguojamas 30 min 8000 rpm greičiu. Analizei naudojama skystoji fazė.

**Aparatūra ir priemonės.** Homogenizatorius Ultra – Turrax T – 25, analizinės svarstyklės (KERN&Sohn, KERN EG620, Vokietija), vandens vonia (WB-4, Vokietija), spektrofotometras (ElectronCorporationMadison, Genesys 10 UV, USA).

**Metodo esmė.** Tyrimo metu nustatomas karbonilo grupės kiekis (C=O). Aldehido grupė reakcijos metu oksiduojama iki karboksi grupės, o 3,5 – dinitrosalicilo rūgštis redukuojama iki 3 – amino, 5 – nitrosalicilo rūgšties.

**Eiga.** 500 µl mėginio sumaišoma su 1 ml 3,5 – dinitrosalicilo rūgštimi. Gautas mišinys kaitinamas 5 min, 100 °C temperatūros vandens vonioje, po to atvėsinama iki kambario temperatūros. 1 ml mėginio sumaišoma su 10 ml distiliuoto vandens. Gauta tirpalo optinis tankis matuojamas spektrofotometru ( $\lambda = 540$  nm). Redukuojančių cukrų kiekis apskaičiuojamas iš sudarytos kalibracinės kreivės.

*Kalibracinės kreivės sudarymas.* Paruošiami standartiniai gliukozės tirpalai: 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1 mg/ml. 500 µl standartinio gliukozės tirpalo sumaišoma su 1 ml 3,5 – dinitrosalicilo rūgštimi. Gautas mišinys kaitinamas 5 min, 100 °C temperatūros vandens vonioje, po to atvėsinama iki kambario temperatūros. 1 ml mėginio sumaišoma su 10 ml distiliuoto vandens. Gauta tirpalo optinis tankis matuojamas spektrofotometru ( $\lambda = 540$  nm). Tuščias mėginys ruošiamas vietoje mėginio naudojant distiliuotą vandenį [93].

### 2.3.5. PRB kietafazės fermentacijos eigos fiksavimo metodai

#### Dujinių metabolitų pokyčių nustatymas

KF metu buvo stebima, kaip keičiasi dujų sudėtis (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S) fermentuojant pupas PRB kultūromis. KF vykdoma 5 paras, dujų analizė atliekama kas 12 h. Dujų sudėtis fiksuojama „Optima7 Biogas (MRU Instruments, Inc.)“ dujų analizatoriumi [94].

#### pH, bendrojo titruojamojo rūgštingumo įvertinimas

**Mėginio paruošimas:** Mėginys pH nustatymui ruošiamas, suspenduojant 1 g pupų miltų 10 ml distiliuoto vandens.

**pH – metras:** „PB – 11 (Sartorius)“.

**BTR eiga:** 10 g pupų miltų suspenduojama 100 ml distiliuoti vandens. Mišinys gerai išmaišomas, paliekamas 30 min. Po 30 min mišinys titruojamas 0.1 N NaOH, indikatorius – fenolftaleinas. Titruojama kol atsiranda rausva tirpalo spalva [69].



### 2.3.6. Bendro mikroorganizmų kiekio nustatymas

**Bendras mikroorganizmų skaičius** nustatomas pagal standartą LST EN ISO 4833:2003.

**Bandinio paruošimas ir skiedimai.** 1 g pupų miltų sumaišoma su 9 ml 9 % NaCl tirpalu. Kiti skiedimai daromi 1 ml žemesnio skiedimo mėginio tirpalo sumaišant su 9 ml 9 % NaCl tirpalu.

**Medžiagos.** 9 % NaCl tirpalas, terpė. Prieš analize abi medžiagos autoklavuojamos.

**Eiga.** Į dvi lėkšteles pilama po 1 ml skiedinio ir sumaišoma su 12 – 15 ml ištirpintos ir atvėsintos iki 45 ° C temperatūros terpės. Maišant lėkštelė pastumdoma penkis kartus vertikaliai, penkis kartus pasukama laikrodžio rodyklės kryptimi, pastumdoma penkis kartus horizontaliai, penkis kartus pasukama prieš laikrodžio rodyklę ir paliekama sustingti ant horizontalaus paviršiaus.

Sustingus terpei, lėkštelės apverčiamos ir laikomos 72 h ± 3 h 30 °C ± 1 °C temperatūros termostate. Skaičiavimui atrenkamos lėkštelės, kuriose išaugo mažiausiai 15 ir ne daugiau kaip 300 kolonijų [89].

Kolonijas sudarančių vienetų (KSV) skaičius 1 ml (g) produkto apskaičiuojamas pagal formulę:

$$N = \frac{\Sigma c}{V \times (n_1 + (0,1 \times n_2)) \times d} \quad (13)$$

Čia:  $\Sigma c$  – suma kolonijų, suskaičiuotų visose neatmestose lėkštelėse iš dviejų vienas po kito einančių skiedinių, kai bent vienoje lėkštelėje yra 15-300 kolonijų; V – užsėtos medžiagos ar skiedinio tūris lėkštelėje mililitrais;  $N_1$  – pirmojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;  $N_2$  – antrojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius; D – pirmojo vertinamo skiedinio koeficientas

### 2.3.7. Matematinė statistinė duomenų analizė

Visi tyrimai kartojami 3 kartus, išskyrus dujų sudėties analizę ir bendrą mikroorganizmo kiekio nustatymą – kartojamumas 2 kartai. Gautų rezultatų vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai apskaičiuoti, naudojant MS Excel programinį paketą.

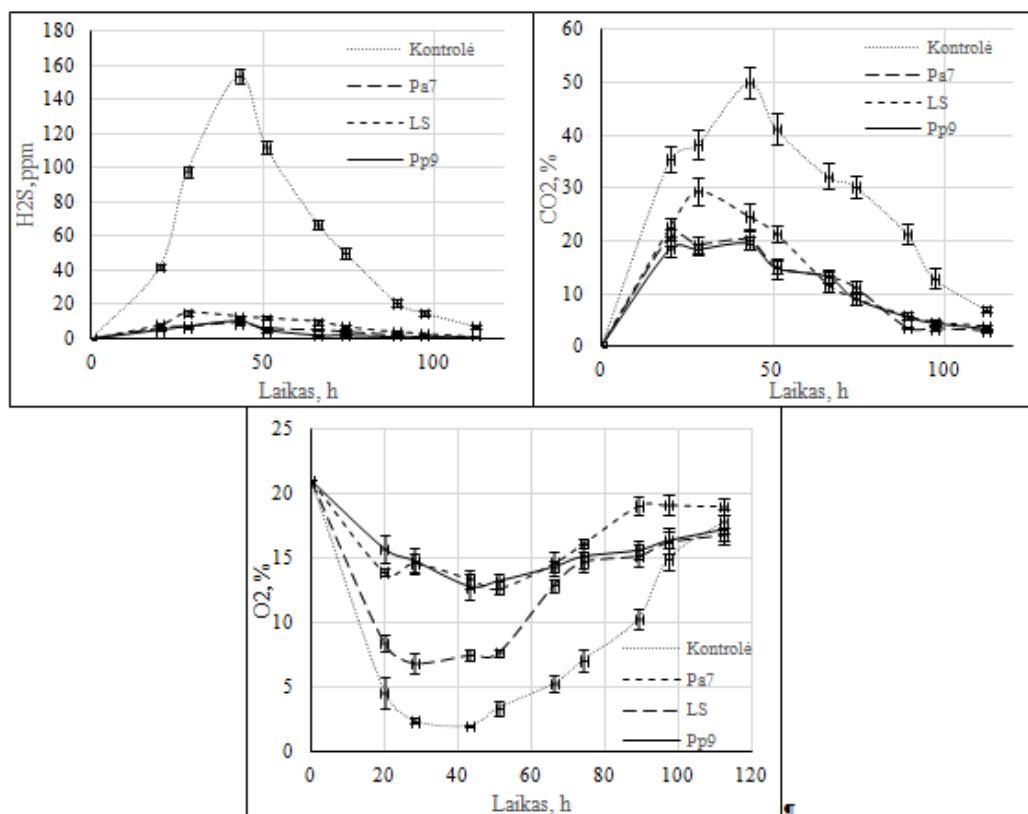
### 3. Rezultatų aptarimas

#### 3.1. Kietafazė fermentacija: ultragarso panaudojimo galimybių tyrimas fermentacijos terpių mikrobiologinės taršos mažinimui

Pupose yra daug mitybinių komponentų, kurie yra reikalingi įvairiems mikroorganizmams augti ir daugintis. Todėl vykdant kietafazę fermentaciją pupose esanti pašalinė mikroflora, pvz., pelėsiai, puvimo bakterijos, turi palankią terpę daugintis. Todėl prieš vykdant kietafazę fermentaciją reikia sumažinti pupų mikrobiologinį užterštumą.

Kietafazė fermentacija vykdyta esant 45 % pupų miltų ir vandens mišinio drėgmeniui, 35 °C temperatūroje, aerobinėmis ir anaerobinėmis sąlygomis. Pupos buvo fermentuojamos Pa7, Pp9 ir Ls pieno rūgšties bakterijų padermėmis 72 h. Vykdamas fermentaciją tiek aerobinėmis, tiek anaerobinėmis sąlygomis pupos pradėjo pelyti, atsirado nemalonūs sieros vandenilio kvapas. Aerobinėmis sąlygomis pelėsį buvo galima aptikti jau po 48 valandų fermentacijos, anaerobinėmis – po 72 valandų. Norint įvertinti pupų fermentacijos proceso efektyvumą, analizuoti dujiniai metabolitai, susidarantys PRB fermentuojamų pupų mėginiuose.

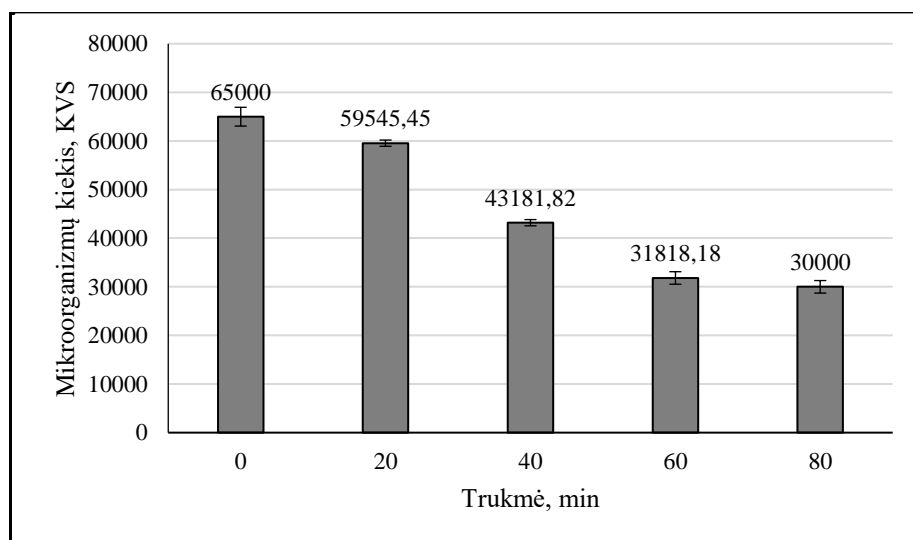
**Dujinių metabolitų sudėties pokyčiai kietafazės fermentacijos metu.** Pieno rūgšties bakterijos savo veiklos rezultate be pieno rūgšties, taip pat, išskiria ir CO<sub>2</sub>. Tyrimo metu buvo stebima, kaip kinta dujinių metabolitų sudėtis kietafazės fermentacijos metu pupų miltus paveikus PRB padermėmis. H<sub>2</sub>S, CO<sub>2</sub> ir O<sub>2</sub> pokyčiai kietafazės fermentacijos metu pateikti 9 paveiksle.



9 pav. PRB kietafazės fermentacijos metu dujinių metabolitų sudėties pokyčiai

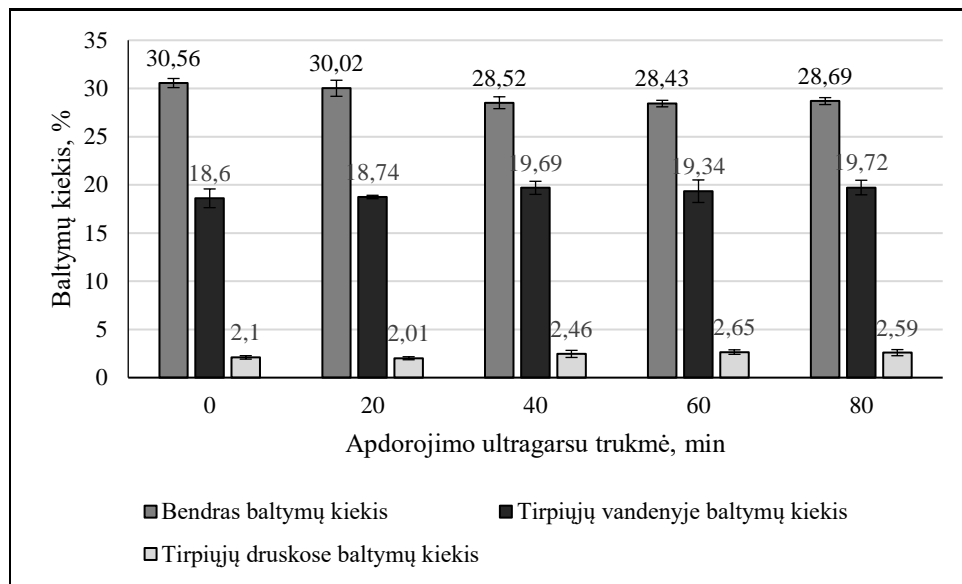
Kaip matyti iš 9 paveiksle pateiktų rezultatų, intensyviausias rūgimas vyko per 40 fermentacijos valandų, toliau susidariusio CO<sub>2</sub> kiekis mažėjo, pagrindinė priežastis – mikroorganizmams neužtenka maisto medžiagų. Taip pat, intensyvūs rūgimo procesai nustatyti ir kontroliniame mėginyje, priežastis – pupos yra užterštos pašaline mikroflora. Lyginant su pupų miltais, apdorotais ultragarsu ir PRB, pastebima, kad kontroliniame mėginyje susidaro didesni H<sub>2</sub>S kiekiai, šios dujos suteikia nemalonų aromatą fermentuotoms pupoms, todėl prieš PRB KF turi būti sumažintas pupų mikrobinis užterštumas. Vienas iš perspektyvių metodų, mikrobinės taršos mažinimui, galėtų būti ultragarsinės kavitacijos panaudojimas pupų mėginių (prieš fermentaciją) apdorojimui.

**Ultragarsinė kavitacija.** Eksperimento metu, norint sumažinti nepageidaujamų mikroorganizmų kiekį, pupos buvo apdorojamos 37 kHz ultragarsu, esant 30 – 35 °C temperatūrai. Iš 10 pav. matome, kad pupų mikrobinis užterštumas sumažėjo 2 kartus ir didžiausias mikroorganizmų pokytis nustatytas po 40 ir 60 min, pupas apdorojant ultragarsu.



**10 pav.** Ultragarso įtaka bendram mikroorganizmų kiekiui pupose

Kadangi pagrindinis tyrimų objektas yra pupų baltymai, svarbu nustatyti, kaip pakinta pupų bendras baltymų, tirpiųjų vandenyje ir tirpiųjų druskose baltymų kiekis, paveikus pupas ultragarsu. Iš 11 pav. matome, kad ultragarsas statistiškai reikšmingos įtakos neturi baltymų kiekiui, tiek bendras baltymų, tiek tirpiųjų vandenyje baltymų kiekis, tiek tirpiųjų druskose baltymų kiekis prieš apdorojimą ir po apdorojimo ultragarsu kito paklaidų ribose: bendras baltymų kiekis prieš apdorojimą ultragarsu nustatytas 30,6 %, po apdorojimo ultragarsu – 28,7 %, tirpiųjų vandenyje baltymų kiekis prieš apdorojimą – 18,6 %, po apdorojimo – 19,7 %, tirpiųjų druskose baltymų kiekis prieš apdorojimą – 2,1 %, po apdorojimo – 2,6 %.



**11 pav.** Ultragarso įtaka pupų miltų bendram ir tirpiųjų baltymų kiekiui

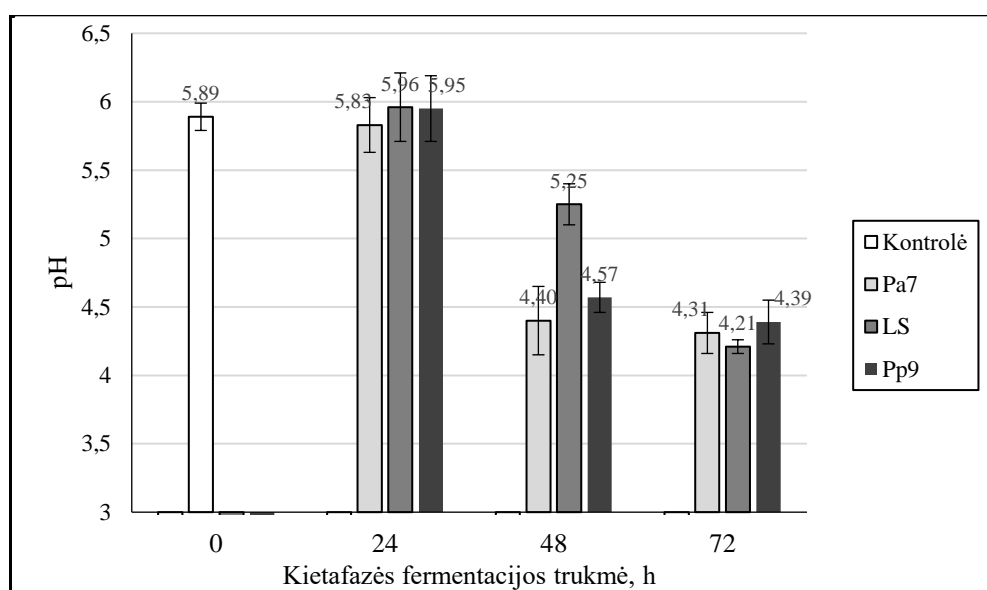
Ultragaras jau nuo seno yra naudojamas mažinti mikrobiniam užterštumui. Literatūroje yra pateikta daug pavyzdžių, kaip ultragaras veikia skirtingus mikroorganizmus, pvz. Álvarez, I., Pagán, R., Raso, J., Condón, S. ir Sala, F. J. savo darbe aprašė ultragarso poveikį *E. coli* [63]. Vienas iš svarbių faktorių ar mikroorganizmai bus inaktyvuoti yra poveikio trukmė. Shengpu Gao, Gillian D. Lewis, Muthupandian Ashokkumar, Yacine Hemar savo tyrime nustatė, kaip kito *Enterobacter aerogenes* ir *Aureobasidium pullulans* bakterijų skaičius jas apdorojant ultragarsu įvairiais laiko momentais. Kuo ilgesnė ultragarso apdorojimo trukmė, tuo daugiau buvo inaktyvuota mikroorganizmų [64]. Tačiau ultragarso poveikio trukmė turi būti optimali, S. Guerrero, A. L'opez-Malo, S.M. Alzamora savo darbe aprašė, kaip kito *Saccharomyces cerevisiae* skaičius, jas apdorojant ultragarsu tam tikrais momentais, po 15 min apdorojimo nebuvo nustatytas mikroorganizmų kiekio sumažėjimas, lyginant su apdorojimu ultragarsu po 10 min [65]. Taip pat, literatūroje yra aprašyta, kad ultragaras ne visus mikroorganizmus veikia vienodai, pvz., Shengpu Gao, Gillian D. Lewis, Muthupandian Ashokkumar, Yacine Hemar darbe aprašyta, kad ultragaras turėjo didelės įtakos *E. aerogenes* ir *B. subtilis* inaktyvavimui, tačiau *S. epidermidis* pasižymėjo atsparumu ultragarsui [64].

Taip pat, literatūroje pateikta ultragarsinio poveikio įtaka sojų baltymų izoliatams: veikiant mėginį 40 kHz ultragarsu, baltymų tirpumas padidėjo po 15 min 13,7 %, po 30 min – 17,7 % [66]. Taip pat, Anet Rezček Jambrak, Timothy J. Mason, Vesna Lelas, Zoran Herceg, Ivana Ljubic' Herceg darbe pateikta, kaip pakito išrūgų baltymų izoliatų tirpumas, lyginant su kontrole, juos veikiant 40 kHz ultragarsu laike 15 ir 30 min: po 15 min išrūgų baltymų tirpumas padidėjo 17,2 %, po 30 min – 12,2 % [67]. Kitų autorių darbe, Lianzhou Jiang, Jing Wang, Yang Li, Zhongjiang Wang, Jing Liang, Rui Wang, Yong Chen, Wenjun Ma, Baokun Qi, Min Zhang, taip pat, pateikta tendencija, kad ultragaras didina juodųjų pupų baltymų tirpumą [68].

Gauti tyrimų rezultatai rodo, kad ultragarsinė kavitacija ypač patrauklus metodas baltymingos augalinės žaliavos debakterizacijai, nes ją galima naudoti žemų temperatūrų režime ir toks apdorojimas neturi reikšmingos įtakos baltymams.

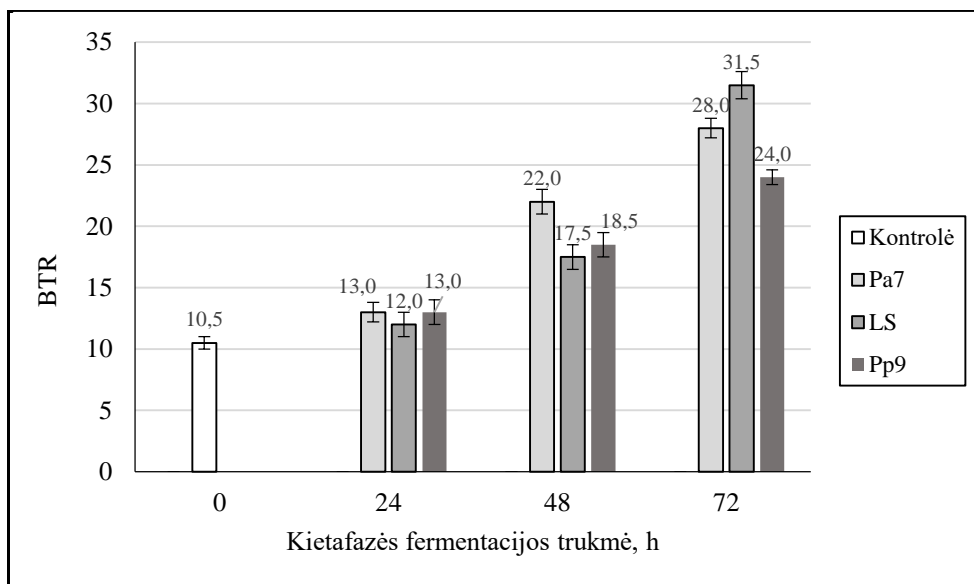
### 3.2. Kietafazė fermentacija: pH, BTR, D(-) ir L(+) pieno rūgšties izomerų įvertinimas

Vykdamas PRB kietafazę fermentaciją, buvo stebimi pH, BTR ir pieno rūgšties koncentracijos pokyčiai. pH pokyčiai pateikti 12 paveiksle. Po 24 h fermentavimo pH pokyčiai kito paklaidų ribose. Po 48 valandų fermentavimo, lyginant su kontrole, pH sumažėjo 1,15, po 72 h – 1,59. Didžiausi pH pokyčiai nustatyti po 72 h pupų miltus fermentuojant LS paderme (pH 4,21).



12 pav. Pupų miltų pH kitimas PRB kietafazės fermentacijos metu

Norint įvertinti tiksliau terpės pokyčius PRB kietafazės fermentacijos metu, buvo nustatyti pupų miltų BTR pokyčiai (13 pav.). Po 24 h fermentacijos BTR pakito mažai, lyginant su kontrole, BTR padidėjo vidutiniškai 2. Po 48 valandų didžiausias BTR nustatytas pupose, kurios fermentuotos Pa7 paderme (22,0). Po 72 valandų didžiausias PRB nustatytas pupose, kurios fermentuotos LS paderme (31,5).

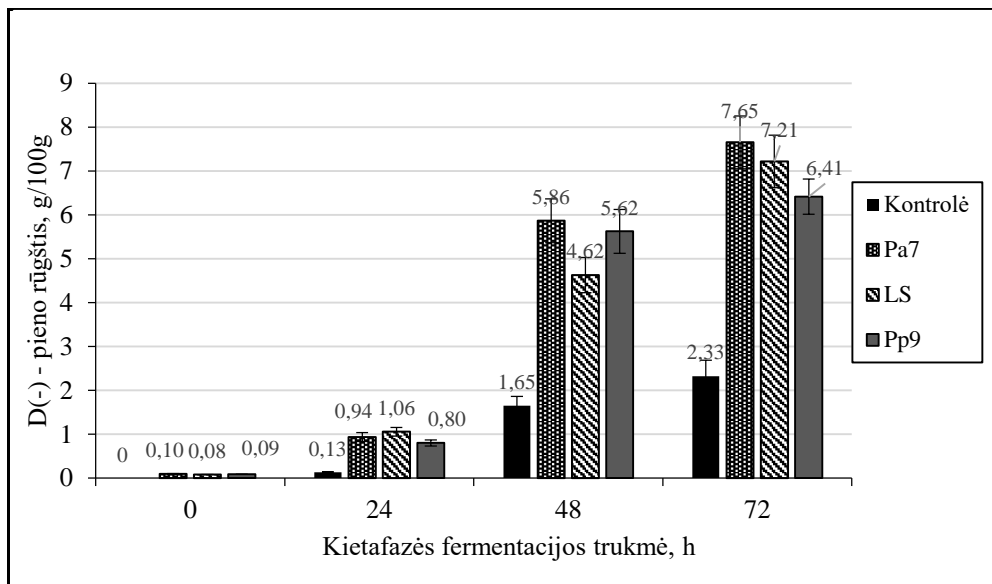


**13 pav.** Pupų miltų BTR kitimas PRB kietafazės fermentacijos metu

Apibendrinant gautus rezultatus, galime teigti, kad per pirmąsias 24 fermentacijos valandas vyko pieno rūgšties bakterijų prisitaikymo prie terpės fazė, nes pH pokytis kito paklaidų ribose ir BTR padidėjo, lyginant su kontrole, mažai, vidutiniškai 2. Toliau buvo stebimas intensyvus fermentacijos procesas: po 72 h terpės pH sumažėjo nuo 5,9 iki 4,3 bei BTR padidėjo vidutiniškai 15.

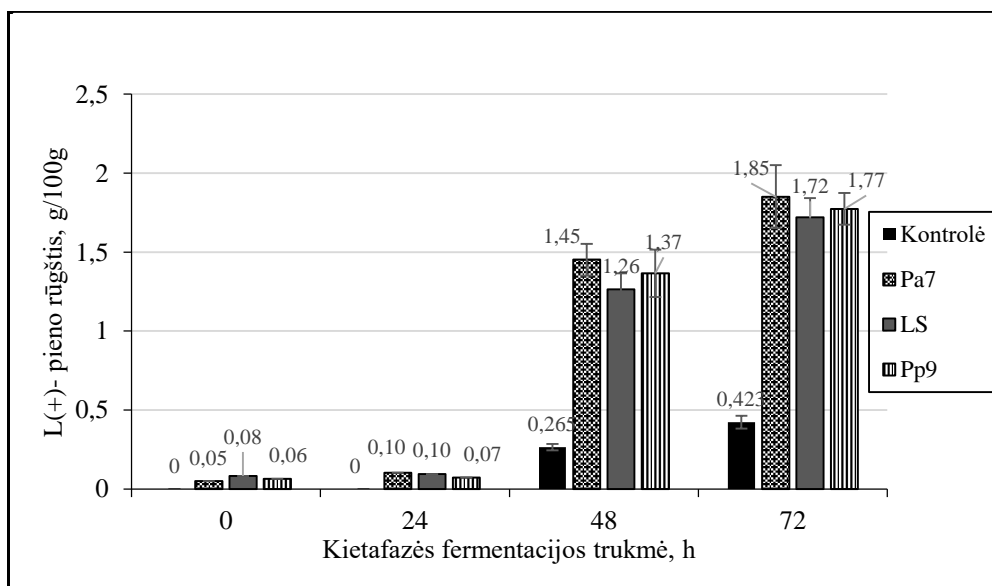
PBR kietafazės fermentacijos metu susidariusių pieno rūgšties D(-) ir L(+) izomerų kiekių rezultatai pateikti 14 ir 15 paveiksluose.

Iš gautų rezultatų matyti, kad vykdant PRB kietafazę fermentaciją, daugiau susidarė D(-) pieno rūgšties izomero nei L(+) pieno rūgšties izomero. Po 24 h fermentacijos PRB D(-) pieno rūgšties izomero susidarė apie 1 g/100g, po 48 h – 5 g/100g, po 72 h – 7 g/100g. L(+) pieno rūgšties izomero pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu nustatyti tokie: per 24 h fermentacijos L(+) pieno rūgšties izomero susidarė 0,1 g/100g, per 48 h – 1,3 g/100g, per 72 h – 1,7 g/100g.



**14 pav.** D(-) pieno rūgšties izomero pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

Per pirmąsias 24 h fermentavimo dideli D(-) pieno rūgšties izomero kiekiai nesusidarė. Didžiausi D(-) pieno rūgšties izomero pokyčiai nustatyti po 48 h fermentavimo PRB. Didžiausias D(-) pieno rūgšties izomero kiekis susidarė pupų miltus fermentuojant 72 h, Pa7 paderme (7,65 g/100g). Taip pat nustatyta, kad D(-) pieno rūgštis izomero susidarė ir fermentuojant kontrolinį mėginį be pieno rūgščių bakterijų.



**15 pav.** L(+) pieno rūgšties izomero pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

PBR kietafazės fermentacijos metu didžiausi L(+) pieno rūgšties izomero pokyčiai nustatyti po 48 h fermentavimo (1,36 g/100g). Didžiausias L(+) pieno rūgšties izomero kiekis susidarė po 72 h, pupų miltus fermentuojant Pa7 (1,85 g/100g).

Literatūroje pateikta lubinų ir sojos pH ir bendro titruojamojo rūgštingumo pokyčiai KF metu fermentuojant pieno rūgšties bakterijomis 24 h, pavyzdžiui, po 24 h fermentavimo sojų

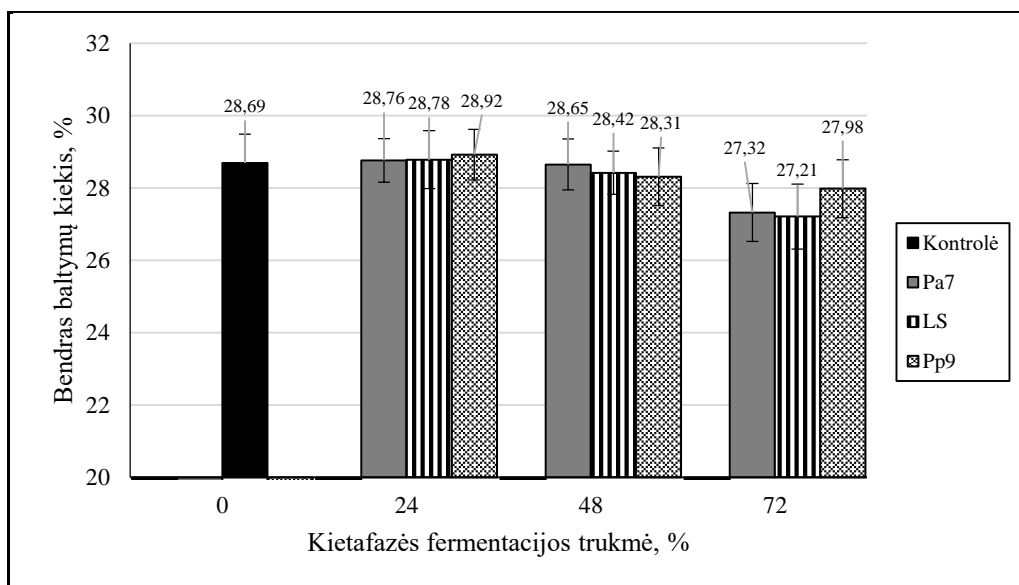
pupas veikiant *P. acidilactici* nustatytas pH – 4,36, BTR – 20,30, veikiant *L. sakei* nustatytas pH – 4,41, BTR – 19,38, veikiant *P. pentosaceus* nustatytas pH – 4,3, BTR – 23,42 [69].

Taip pat, literatūroje pateikti duomenis, pieno rūgšties D(-) ir L(+) izomerų pokyčiai fermentuojant lubinus ir sojų pupas pieno rūgščių bakterijų padermėmis, *P. acidilactici*, *L. sakei*, *P. pentosaceus*. Nustatyta, kad fermentacijos metu susidarė daugiau L(+) pieno rūgšties izomero, nei D(-) pieno rūgšties izomero tiek fermentuojant lubinus, tiek sojų pupas, pvz., fermentuojant sojų pupas *P. acidilactici* L(+) pieno rūgšties izomero susidarė 114,2 mg/kg, o D(-) pieno rūgšties izomero 50,3 mg/kg [69].

### 3.3. Kietafazė fermentacija: baltymų pokyčiai

#### 3.3.1. Baltymų pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

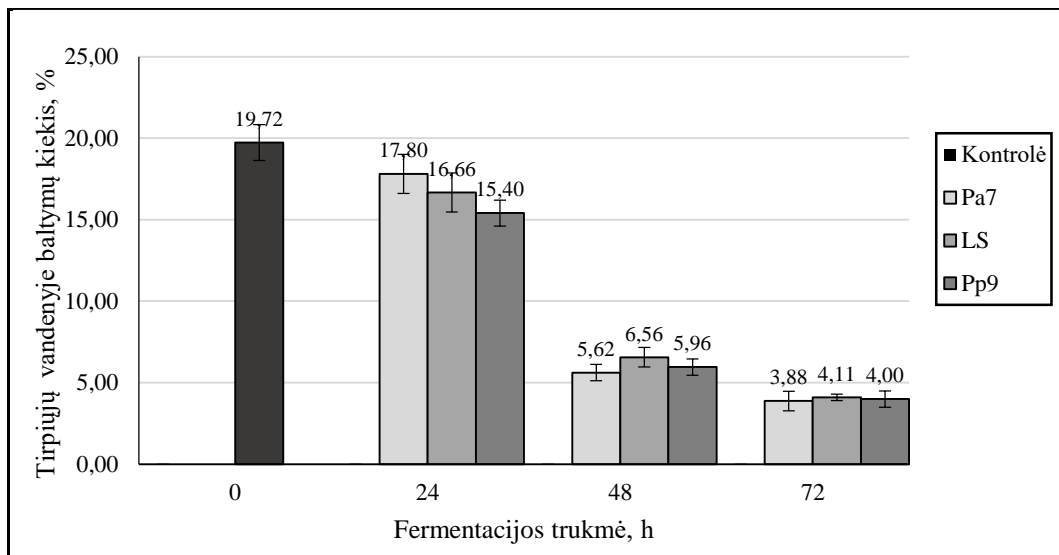
Kietafazės fermentacijos metu buvo stebimi pupų baltymų (tirpiųjų vandenyje, tirpiųjų druskose, bendro baltymų kiekio) pokyčiai (16 pav. – 18 pav.).



16 pav. PRB kietafazės fermentacijos metu bendro baltymų kiekio pokyčiai

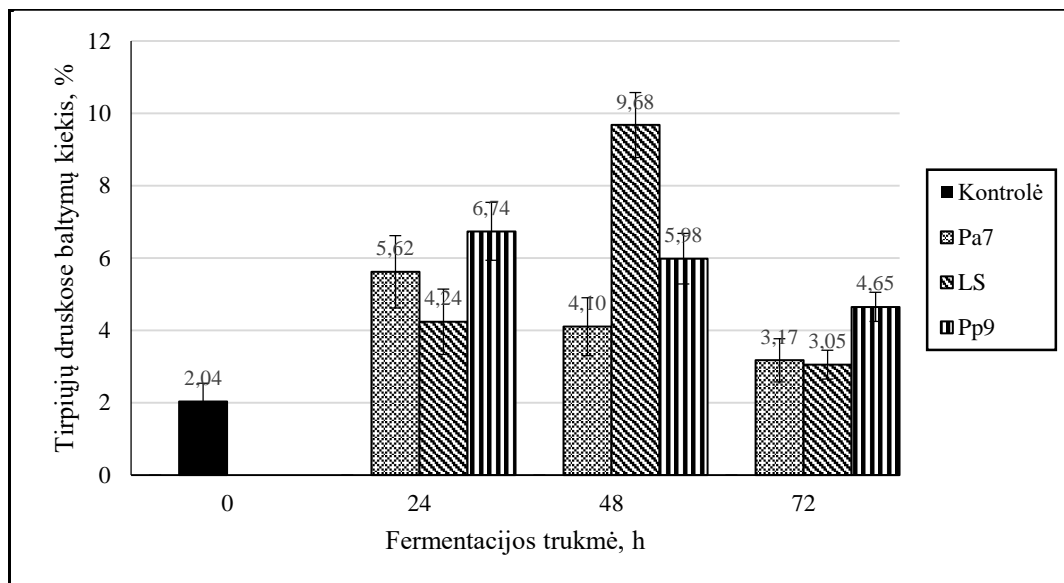
Iš pateiktų rezultatų (16 pav.) matyti, kad kietafazės fermentacijos metu bendras baltymų kiekis pupose pakito nežymiai. Po 72 h fermentavimo baltymų kiekis, lyginant su kontrole, pakito nežymiai (sumažėjo ~1 %).





**17 pav.** PRB kietafazės fermentacijos metu tirpiųjų baltymų kiekio pokyčiai

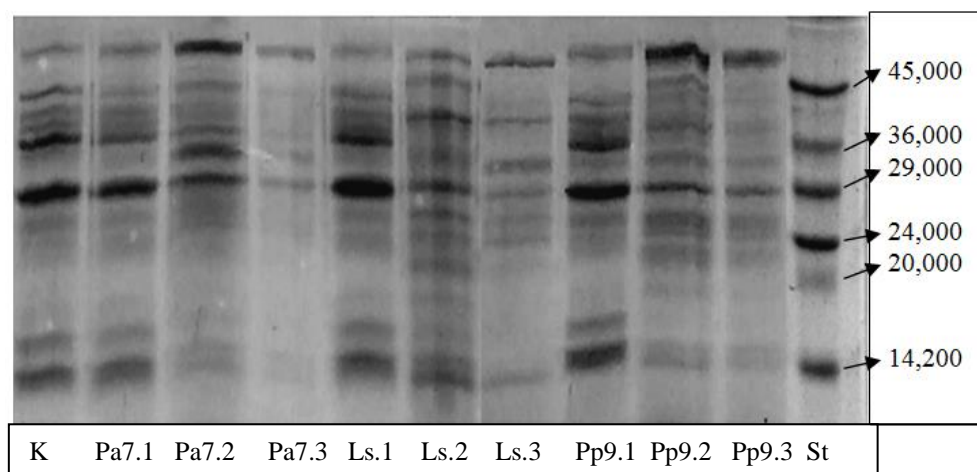
PBR kietafazės fermentacijos metu nustatytas pupų tirpiųjų vandenyje baltymų mažėjimas (17 pav.). Po 24 h PRB kietafazės fermentacijos tirpiųjų baltymų kiekis, lyginant su kontrole, sumažėjo 3,1 %. Didžiausi baltymų pokyčiai nustatyti po 48 h fermentacijos, tirpiųjų baltymų kiekis, lyginant su kontrole, sumažėjo 13,67 %. Po 72 h fermentavimo tirpiųjų baltymų pokytis, lyginant su 48 h, buvo mažesnis ir sudarė 2 %.



**18 pav.** PRB kietafazės fermentacijos metu druskose tirpiųjų baltymų kiekio pokyčiai

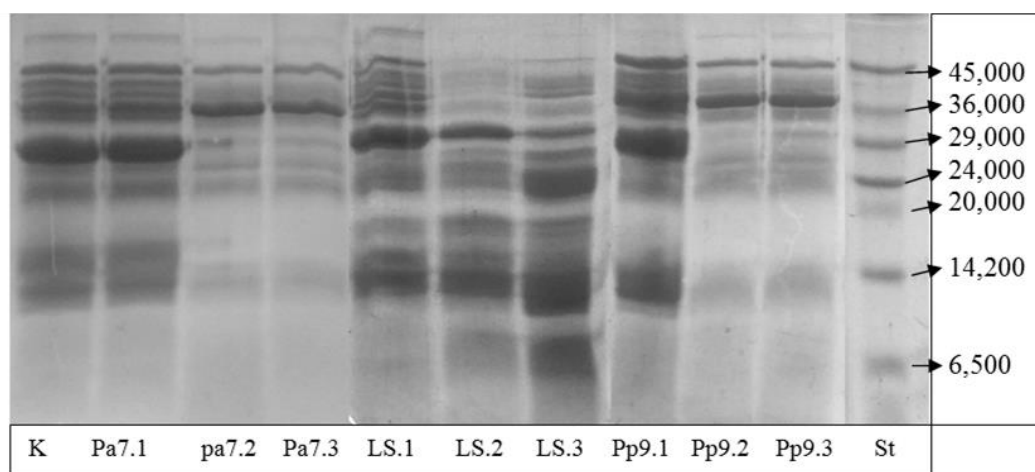
Kietafazės fermentacijos metu pupas fermentuojant PRB stebėtas druskose tirpiųjų baltymų kitimas (18 pav.). Iš pradžių, po 24 h fermentavimo, matomas vidutiniškai 3,5 % tirpiųjų druskose baltymų kiekio, lyginant su kontrole, padidėjimas. Didžiausias druskose tirpiųjų baltymų kiekis nustatytas po 48 h, fermentuojant pupas pieno rūgšties bakterijų paderme Ls (9,68 %). Ilgesnė fermentavimo trukmė turėjo didesnę įtaką druskose tirpiųjų baltymui sumažėjimui: po 72 h fermentavimo nustatytas vidutiniškai 2 % druskose tirpiųjų baltymų

sumažėjimas mėginiuose, kurie buvo fermentuoti Pa7 ir Pp9 padermėmis ir 6,6 % sumažėjimas mėginyje, kuris buvo fermentuotas Ls paderme.



**19 pav.** PRB kietafazės fermentacijos metu tirpiųjų vandenyje baltymų molekulinės masės (Da) pokyčiai

Atlikus elektroforezę, nustatyta, kad albuminų frakcijoje yra daugiausiai baltymų, kurių molekulinė masė yra ribose tarp 24,000 Da ir 45,000 Da, iš kurių didžiausią dalį sudaro baltymai, kurių molekulinė masė yra ~ 29,000 Da. Fermentuojant pupų miltus PRB, po 24 h nenustatyti baltymų albuminų frakcijos pokyčiai, po 48 h ir 72 h fermentavimo nustatytas didelės molekulinės masės baltymų padidėjimas (~ 45,000 Da) ir mažos molekulinės masės baltymų sumažėjimas (~14,200 Da).



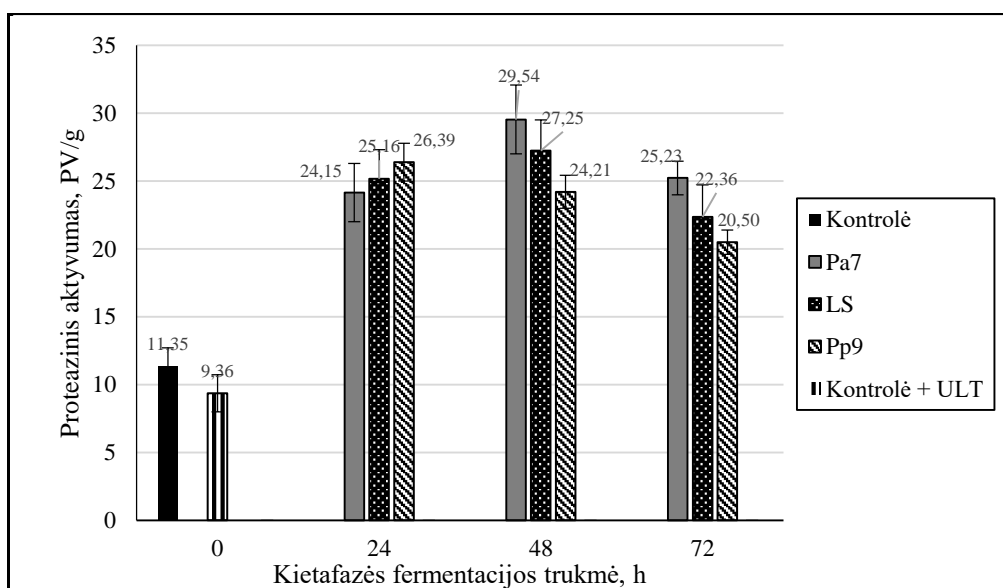
**20 pav.** PRB kietafazės fermentacijos metu tirpiųjų druskose baltymų molekulinės masės (Da) pokyčiai

Atlikus pupų baltymų globulinų frakcijos elektroforezę, nustatyta, kad šioje frakcijoje vyrauja baltymai, kurių molekulinė masė yra ribose tarp 14,200 Da ir 45,000 Da, didžiausią dalį sudaro baltymai, kurių molekulinė masė yra ~ 29,000 Da. Fermentuojant pupų miltus PRB, po 24 h nenustatyti globulinų pokyčiai, po 48 ir 72 h fermentacijos Pa7 ir Pp9 padermėmis nustatytas mažos molekulinės masės baltymų sumažėjimas, didžiausią dalį juose sudaro

baltymai, kurių molekulinė masė yra apie 36,000 Da. Fermentuojant pupas Ls paderme po 48 ir 72 h nustatytas didelės molekulinės masės baltymų sumažėjimas, po fermentacijos globulinų frakcijoje atsiranda baltymų, kurių molekulinė masė yra apie 6,500 Da, tokios molekulinės masės baltymų kontroliniame mėginyje nebuvo nustatyta.

### 3.3.2. Proteazių aktyvumo pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

Pieno rūgšties bakterijos be pagrindinės savo savybės gaminti pieno rūgštį, taip pat, pasižymi ir proteolitinio aktyvumu. Tyrimo metu buvo nustatyta, kaip kito PRB kietafazė fermentacijos metu proteinazinis aktyvumas (21 pav.).

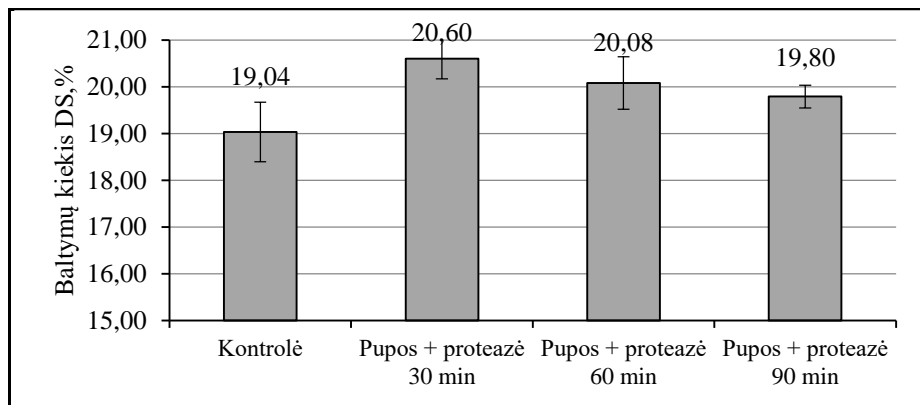


21 pav. KF įtaka proteolitinui aktyvumui, pupų miltus fermentuojant PRB

Iš gautų rezultatų matyti (21 pav.), kad PRB KF metu kito proteinazinis aktyvumas: po 24 h fermentacijos, lyginant su kontrole, proteinazinis aktyvumas padidėjo 13,9 PV/g, po 48 h fermentacijos – 15,7 PV/g, po 72 h fermentacijos, lyginat su 48 h fermentacija, proteinazinis aktyvumas sumažėjo 4,4 PV/g. Didžiausias proteinazinis aktyvumas nustatytas po 48 h fermentacijos Pa7 paderme (29,54 PV/g), fermentuojant kitomis PRB padermėmis Ls ir Pp9, proteinazinis aktyvumas buvo mažesnis ir sudarė, atitinkamai, 27,25 ir 24,21 PV/g.

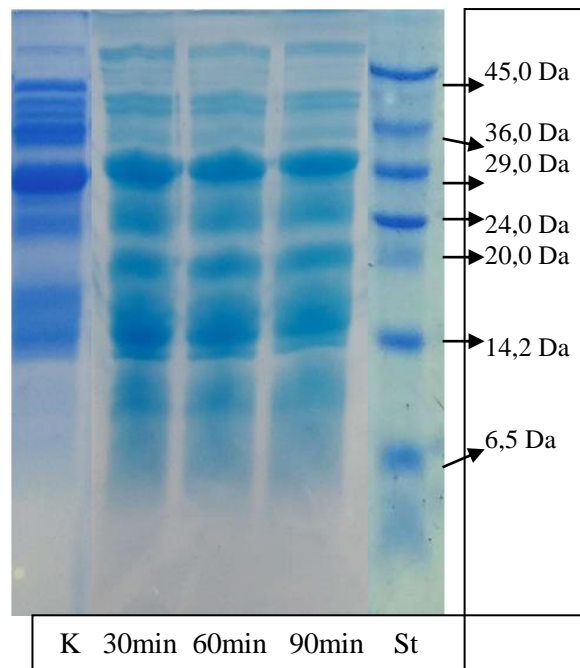
### 3.3.3. Baltymų pokyčiai pupas apdorojus proteazėmis

Taip pat, ankštinių javų sėklų funkcines savybes galima keisti jas apdorojus fermentais. Pupų miltai tyrimo metu buvo apdoroti proteazėmis. Eksperimento metu buvo analizuoti ir nustatyti tirpiųjų baltymų kiekio pokyčiai.



**22 pav.** Tirpiųjų vandenyje baltymų pokyčiai po apdorojimo proteazėmis

Paveikus pupų miltus proteazėmis, nenustatytas reikšmingas tirpiųjų vandenyje baltymų kiekio padidėjimas pupų mėginiuose (3.16 pav.). Kontroliniame mėginyje tirpiųjų baltymų kiekis fiksuotas 19,04 %, po 30 min apdorojimo proteazėmis – 20,60 %, po 60 min – 20,08 %, po 90 min – 19,80 %.



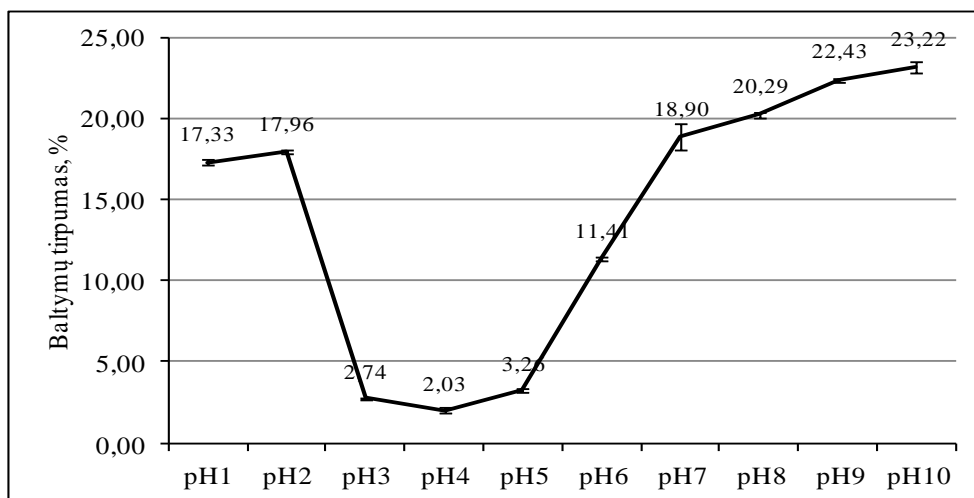
**23 pav.** Baltymų molekulinės masės pokyčiai pupų miltus apdorojus proteazėmis

23 paveiksle pateikti tirpiųjų vandenyje pupų baltymų molekulinės masės pokyčiai, apdorojant juos proteazėmis. Iš gautų rezultatų matyti, kad po apdorojimo proteazėmis, sumažėjo didelės molekulinės masės baltymų, kurių molekulinė masė yra tarp 36,000 ir 45,000 Da, kiekis, taip pat, po apdorojimo proteazėmis stebimas mažos molekulinės masės baltymų (ribose tarp 6,500 ir 14,200 Da) padidėjimas.

Kitame darbo etape buvo siekiama išsiaiškinti baltymų pokyčių fermentacijos metu priežastingumą. Vienas iš kriterijų, galinčių turėti įtakos, būtų pH.

### 3.3.4. pH įtaka pupų baltymų tirpumui vandenyje.

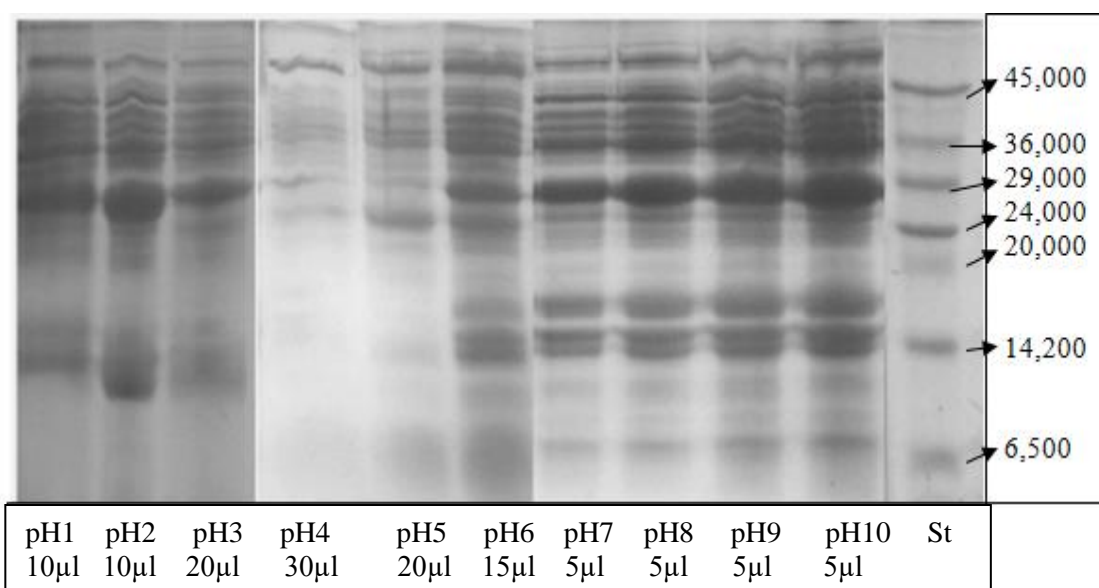
Ekspimento metu buvo nustatyta pH įtaka izoliuotų iš pupų baltymų tirpumui. Baltymų tirpumo rezultatai, kintant šio parametro vertėms nuo pH 1 iki pH10, pateikti 24 ir 25 paveiksle.



24 pav. pH įtaka baltymų tirpumui

Iš gautų rezultatų matyti (24 pav.), kad mažiausias baltymų tirpumas yra esant tarp pH 3 ir 5, esant tarp pH 4 tirpiųjų baltymų kiekis – 2,03 %. Galima teigti, kad šiose ribose (pH tarp 3 ir 5) pupų baltymai koaguliuoja. Tarp pH didėjant nuo 5 iki 10, pupų baltymų tirpumas didėja. Daugiausiai baltymų išskirta esant tarp pH 10, prie šio pH tirpiųjų baltymų kiekis yra 23,22 %.

Atlikus pupų baltymų elektroforezę, taip pat, matyti, kad baltymai ribose tarp pH 3 ir 5 koaguliuoja.



25 pav. pH įtaka pupų tirpiųjų baltymų molekuliniai masei (Da)

Literatūroje pateikta, kaip kinta lubinų bendras ir tirpiųjų baltymų kiekis kietafazės fermentacijos metu fermentuojant PRB padermėmis. Po 70 h fermentavimo bendras baltymų kiekis sumažėjo 7,5 %, o tirpiųjų vandenyje baltymų kiekis padidėjo – 9 % [70].

Laura Aguirre, Marisa S. Garro, Graciela Savoy de Giori darbe nustatinėjo pieno rūgšties bakterijų įtaka sojų baltymams, kurie paveikti *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus reuteri* ir *Lactobacillus plantarum*. Po 6 h fermentacijos nustatyti sojų baltymų molekulinės masės pokyčiai, kuriems didžiausią įtaką turėjo *L. paracasei*, po fermentacijos nebeliko didelės molekulinės masės baltymų, kitų PRB įtaka sojos baltymams nebuvo tokia ženkli [71]. Šiame darbe, skirtingai nuo pateiktų literatūroje, fermentacijai naudoti kiti substratai – pupų miltai, kurie buvo turtingesni maistinėmis medžiagomis nei vien baltymų izoliatai.

Literatūroje pateikta, kad skirtingos pieno rūgšties bakterijų padermėmis pasižymi skirtingais proteolitiniais aktyvumais. Pagal pateiktus rezultatus literatūroje, kietafazės fermentacijos metu fermentuojant lubinus didžiausiu proteolitiniu aktyvumu pasižymėjo Ls padermė, mažiausiu – Pp9 padermė [95]. Fermentuojant pupas, taip pat, mažiausiu proteolitiniu aktyvumu pasižymėjo Pp9 padermė. Lauren E. Kane, Jack P. Davis, Aaron J. Oakes, Lisa L. Dean ir Timothy H. Sanders nustatė, kad apdorojus žemės riešutų baltymus proteazėmis, sumažėjo didelės molekulinės tirpiųjų vandenyje baltymų, kurių molekulinė masė yra tarp 36,000 ir 116,000 Da [77].

Terpės pH turi didelės įtakos baltymų tirpumui. Literatūroje yra pateikta kitų ankštinių javų baltymų tirpumo priklausomybė nuo terpės pH, pvz., lęšių mažiausias baltymų tirpumas yra esant terpės pH tarp 4 ir 5 [72], taip pat, tiek sojos pupų, tiek žirnių mažiausias tirpaus azoto kiekis fiksuotas, kai terpės pH yra tarp 4 ir 5 [73].

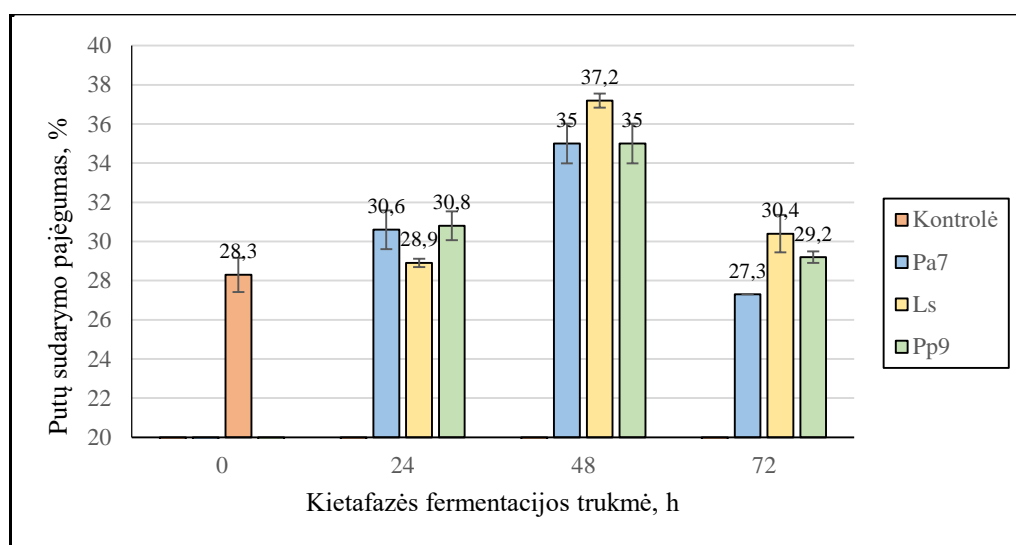
PRB KF metu vyko intensyvus organinių rūgščių susidarymas, terpės pH po 72 h fermentacijos sumažėjo iki 4,29 (12 pav), tai manoma, galėjo apspręsti baltymų agregaciją (Pa7 ir Pp9 atveju). Neatmestina koncepcija (Ls atveju), kad kai kurios PRB gali pasižymi didesniu proteolitiniu aktyvumu, galinčiu prisidėti prie baltymų hidrolizės procesų ir mažesnės molekulinės masės baltyminių medžiagų susidarymo.

### **3.4. Kietafazės fermentacija: funkcinų savybių pokyčiai**

#### **3.4.1. Pupų miltų funkcinų savybių pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu**

Eksperimento metu buvo nustatyti pupų baltymų pokyčiai (3.3 skyrius), kurie gali turėti įtakos miltų funkcinėms savybėms. Todėl šio tyrimo metu buvo nustatinėjamos pupų miltų funkcinės savybės charakterizuojantys kriterijai: emulsijos sudarymo pajėgumas, emulsijos stabilumas, putų sudarymo pajėgumas ir stabilumas.

**Putų sudarymo pajėgumas ir stabilumas.** Kietafazės fermentacijos įtakos pupų miltų putų sudarymo pajėgumui ir stabilumui tyrimų rezultatai pateikti 26 paveiksle ir 6 lentelėje.



**26 pav.** PRB kietafazės fermentacijos įtaka pupų miltų putų susidarymo pajėgumui

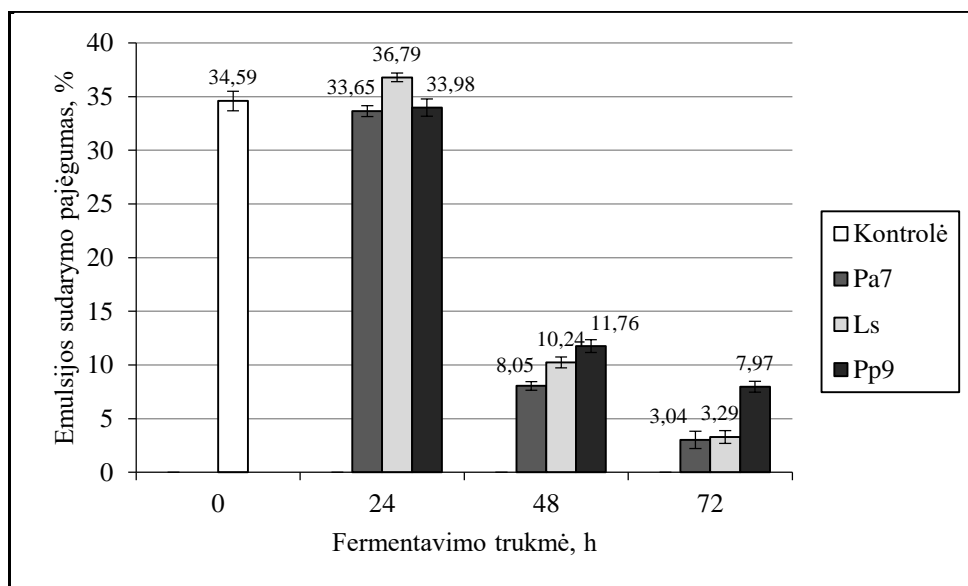
Iš gautų rezultatų (26 pav.) matyti, kad pupų miltų putų susidarymo pajėgumas fermentacijos metu kito priklausomai nuo trukmės: po 24 h padidėjo vidutiniškai 2 %, didžiausios šio parametro vertės konstatuotos po 48 h fermentacijos (lyginant su kontrole, putų sudarymo pajėgumas vidutiniškai padidėjo 8 %), ilgesnės fermentacijos metu (po 72 h) nustatytas putų susidarymo sumažėjimas, lyginant su 48 h fermentacija (7 %). Be to, PRB padermės turėjo įtakos putų susidarymo pajėgumui, didžiausias putų sudarymo pajėgumas nustatytas po 48 h fermentavimo Pa7 paderme (37,2 %), kai su kitomis Ls ir Pp9 padermėmis putų sudarymo pajėgumo vertės nustatytos vidutiniškai 2 % mažesnės.

**6 lentelė.** PRB kietafazės fermentacijos įtaka putų stabilumui

	Kontrolė	Pa7 24 h	Pa7 48 h	Pa7 72 h	LS 24 h	LS 48 h	LS 72 h	Pp9 24 h	Pp9 48 h	Pp9 72 h
0 min	28,3±0,9	30,6±1,0	35±1,0	27,3±0,0	28,9±0,2	37,2±0,4	30,4±1,0	30,8±0,7	35±1,0	29,2±0,3
30 min	27,2±0,6	29,5±1,0	33,1±1,0	19,0±2,4	27,9±0,3	35,5±0,4	19,0±2,4	29,8±0,8	33,3±1,4	24,4±0,3
60 min	26,6±0,7	28,4±0,9	31,1±1,1	8,6±2,4	26,8±0,3	33,6±0,3	12,0±1,3	28,7±0,8	31,3±1,4	19,1±0,4
90 min	25,3±0,9	27,0±0,6	28,9±1,1	-	25,6±0,3	31,6±0,3	-	27,6±0,8	28,3±0,3	13,0±0,5
120 min	22,7±0,9	25,8±0,6	26,8±0,8	-	24,4±0,3	28,7±0,8	-	26,4±0,8	26±0,3	-

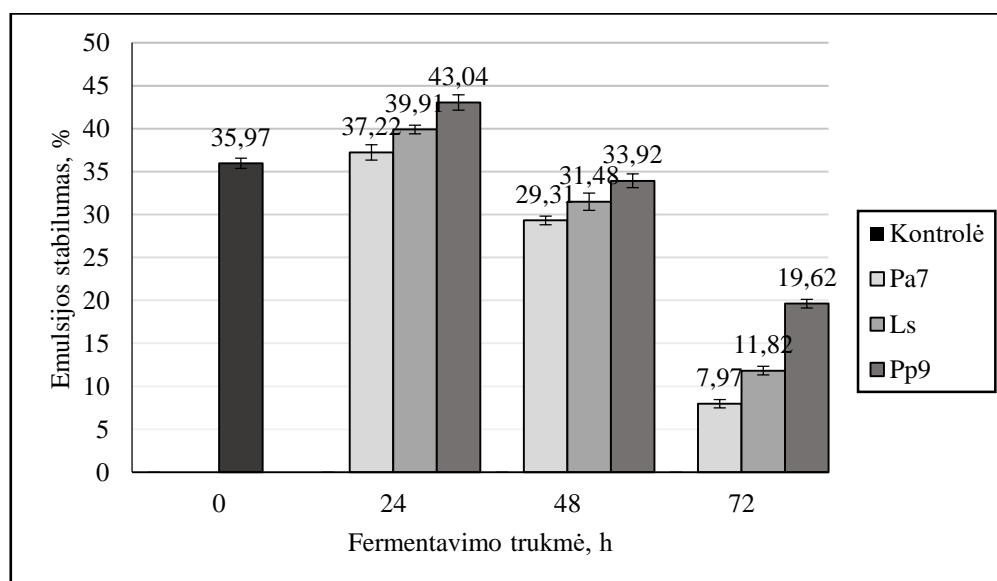
Iš gautų rezultatų matyti, kad po 24 h fermentavimo putų stabilumas, lyginant su kontrole, kito paklaidų ribose: per 120 min po išplakimo putų tūris sumažėjo vidutiniškai 5 %. Po ilgesnės fermentacijos pastebimas putų stabilumo sumažėjimas: po 48 h fermentacijos, lyginant su kontrole, nustatyta putų stabilumo sumažėjimas 3 %, po 72 h fermentavimo putas išnyko po 60 min. Mažiausiu putu stabilumu pasižymėjo pupų miltai, kurie buvo fermentuoti Pa7 paderme.

**Emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas.** Kietafazės fermentacijos įtaka pupų miltų emulsijos sudarymo pajėgumui ir stabilumui rezultatai pateikti 27 ir 28 paveiksluose.



**27 pav.** PRB kietafazės fermentacijos įtaka pupų miltų emulsijos susidarymo pajėgumui

Iš gautų rezultatų matyti (27 pav.), kad po 24 h fermentavimo emulsijos sudarymo pajėgumas nepakito. Tačiau ilgesnė fermentavimo trukmė turėjo neigiamos įtakos emulsijos sudarymo pajėgumui. Po 48 h fermentavimo emulsijos sudarymo pajėgumas, lyginant su kontrole, sumažėjo vidutiniškai 24 %. Po 72 h fermentavimo emulsijos sudarymo pajėgumas sumažėjo, lyginant su pupų miltais po 48 h fermentavimo, vidutiniškai 4,5 %. Mažiausiu emulsijos sudarymo pajėgumu pasižymėjo pupų miltais fermentuoti Pa7 ir Ls PRB padermėmis, po 72 h fermentavimo emulsijos sudarymo pajėgumas sumažėjo 31 %, o fermentuojant pupų miltus Pp9 paderme, emulsijos sudarymo pajėgumas po 72 h fermentavimo sumažėjo 26 %.



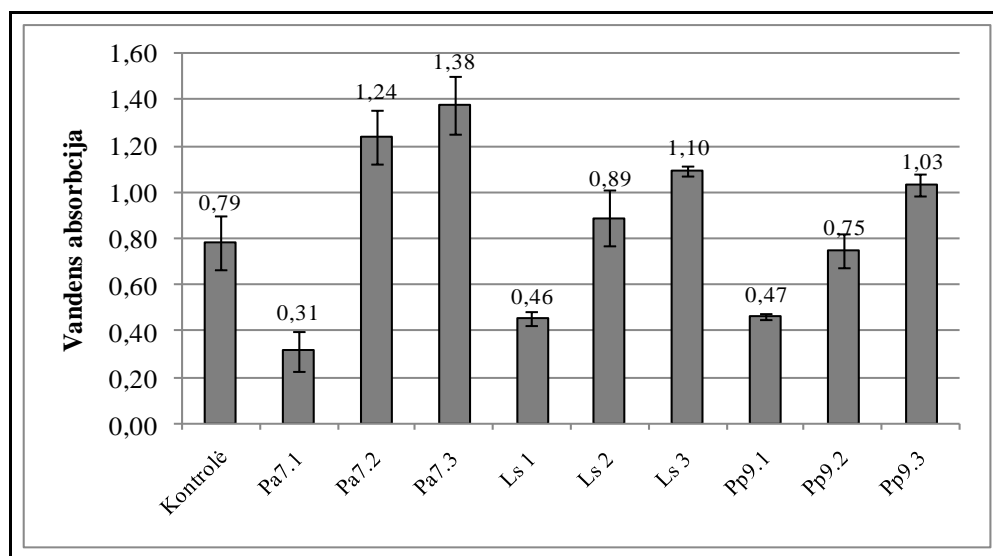
**28 pav.** PRB kietafazės fermentacijos įtaka pupų miltų emulsijos stabilumui



KF trukmė turėjo įtakos pupų miltų emulsijos stabilumui. Po 24 h fermentavimo nustatytas emulsijos stabilumo, lyginant su kontrole, padidėjimas, vidutiniškai 4,0 %. Po ilgesnės fermentavimo trukmės pastebimas emulsijos stabilumo sumažėjimas: po 48 h fermentavimo emulsijos stabilumas, lyginant su kontrole, sumažėjo 4,4 %, po 72 h – 22,8 %.

Taip pat, emulsijos stabilumui turėjo įtakos ir kietafazei fermentacijai parinkta PRB padermė. Didžiausias emulsijos stabilumas nustatytas pupų miltus fermentuojant 24 h Pp9 paderme (43,04 %), o mažiausias – pupų miltus fermentuojant 72 h Pa7 paderme (7,97 %).

**Vandens absorbcija.** Kietafazės fermentacijos įtaka pupų miltų vandens absorbcijai rezultatai pateikti 29 paveiksle.



29 pav. PRB kietafazės fermentacijos įtaka pupų miltų vandens absorbcijai

Iš gautų rezultatų (29 pav.) matyti, kad pupų miltų vandens absorbcijai turėjo įtakos fermentavimo trukmė. Po 24 h fermentavimo nustatytas vandens absorbcijos, lyginant su kontrole, sumažėjimas, vidutiniškai 0,38. Po ilgesnės fermentavimo trukmės pastebimas vandens absorbcijos padidėjimas: po 48 h fermentavimo vandens absorbcija, lyginant su kontrole, padidėjo 0,17, po 72 h – 0,38.

Taip pat, vandens absorbcijai turėjo įtakos ir kietafazei fermentacijai parinkta PRB padermė. Didžiausia vandens absorbcija nustatyta pupų miltus fermentuojant 72 h Pa7 paderme (1,38), o fermentuojant kitomis PRB padermėmis Ls ir Pp9, vandens absorbcija, atitinkamai, nustatyta 1,10 ir 1,03.

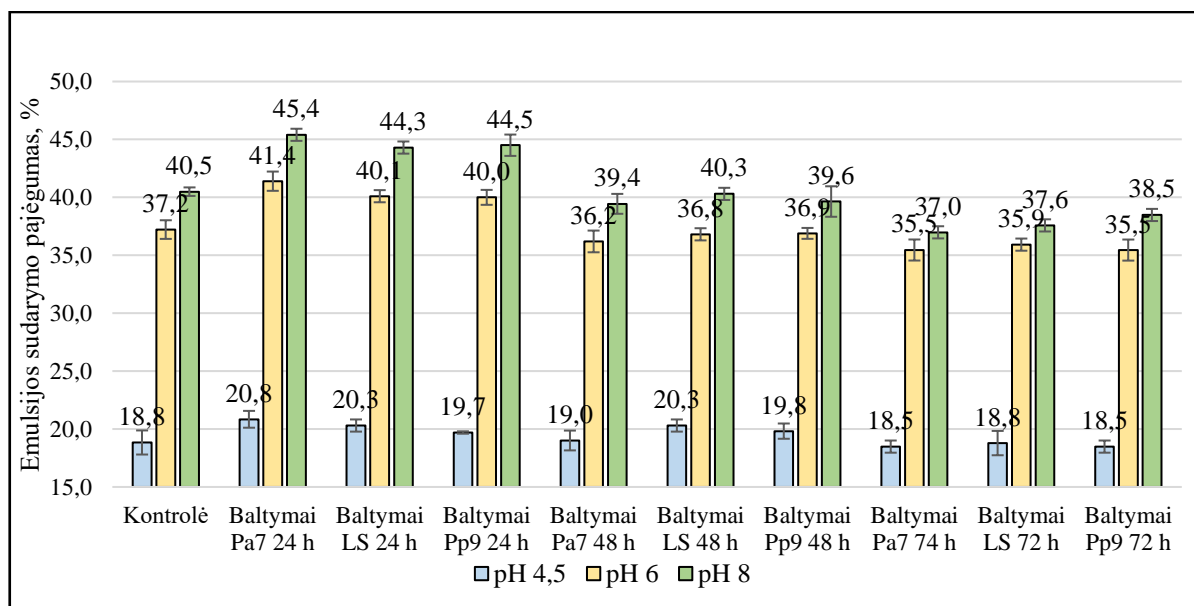
Literatūroje pateikta maniokos šaknų miltų funkcinių savybių pokyčiai po fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis *Lactobacillus plantarum* SL14 ir SL198, po fermentacijos miltų vandens absorbcija sumažėja, lyginant su nefermentuotais miltais [74]. Gauti rezultatai nesutampa su literatūroje pateiktomis tendencijomis, nes didelę įtaką pupų miltų funkcinėms

savybėms turėjo po fermentacijos PRB padermėmis Pa7, LS ir Pp9 pakitęs terpės pH, dėl kurio įvyko baltymų agregacija. Terpės pH turi didelės įtakos funkcinėms savybėms. Literatūroje yra aprašyta, kaip kinta avinžirnių miltų funkcinės savybės priklausomai nuo terpės pH, pavyzdžiui, vandens absorbcija prie pH 7 yra 3,67g/g, o prie pH 4 – 3,88 g/g, taigi vandens absorbcija, mažėjant terpės pH, didėja. Taip pat, avinžirnių emulsijos aktyvumo indeksas esant terpės pH 7 – 11,2 m<sup>2</sup>/g, o esant pH 4 – 5,94 m<sup>2</sup>/g, emulsijos stabilumas esant terpės pH 7 – 17,55 %, o esant terpės pH 4 – 12,00 % [75]. Tokios pačios tendencijos nustatytos ir po pupų fermentavimo PRB, nes KF metu sumažėjo terpės pH nuo 6 iki 4,3 (3.4 pav.), todėl padidėjo pupų miltų vandens absorbcija, bet sumažėjo emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas.

### 3.4.2. Pupų baltymų funkinių savybių pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

Kadangi KF metu pupų miltų funkinių savybių pokyčius daugiausiai lėmė fermentacijos metu pakitęs terpės pH (3.4.1 skyrius), todėl norint detaliau įvertinti PRB kietafazės fermentacijos įtaką baltymų funkcinėms savybėms, eksperimento metu buvo nustatinėjamos pupų baltymų izoliatų funkcinės savybės charakterizuojantys kriterijai: emulsijos sudarymo pajėgumas, emulsijos stabilumas, putų sudarymo pajėgumas ir jų priklausomybė nuo terpės pH.

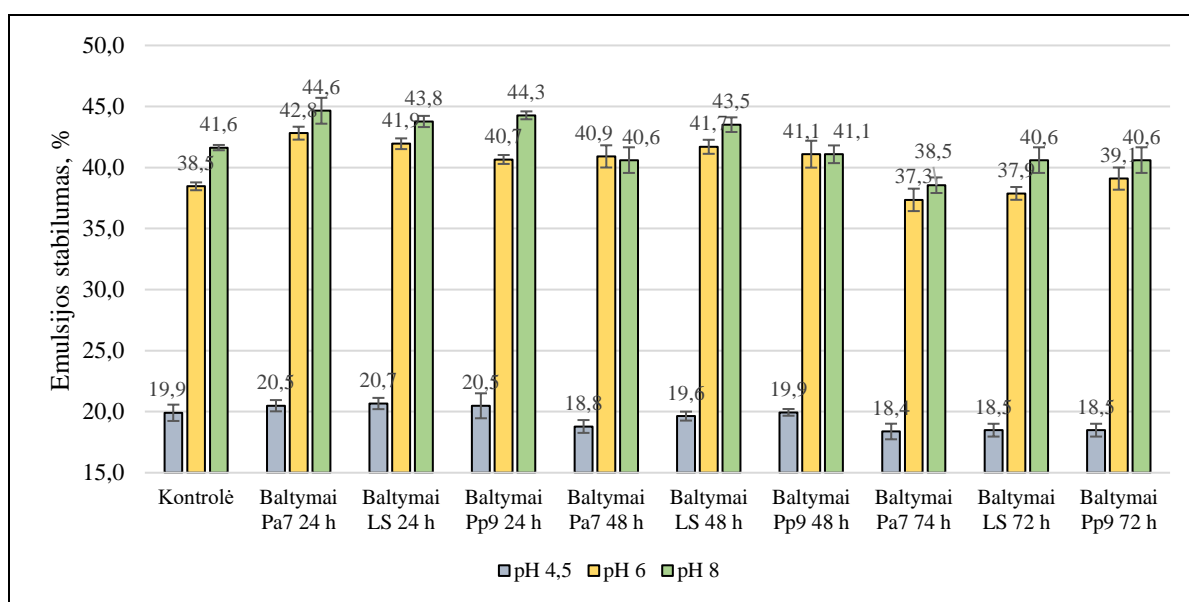
**Emulsijos sudarymo pajėgumas ir jos stabilumas.** KF ir pH įtaka pupų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumui ir stabilumui rezultatai pateikti 30 ir 31 paveiksluose.



**30 pav.** Pupų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumo priklausomybė nuo pH ir PRB kietafazės fermentacijos

Iš gautų rezultatų matome (30 pav.), kad didžiausią įtaką pupų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumui turi terpės pH: esant terpės pH 8, emulsijos sudarymo pajėgumas yra 40,5 %, esant terpės pH 6 – 37,2 %, esant terpės pH 4,5 – 18,8.

Taip pat, iš gautų rezultatų matyti PRB kietafazės fermentacijos įtaka pupų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumui, pvz., esant terpės pH 8 emulsijos sudarymo pajėgumas po 24 h fermentavimo, lyginant su kontrole, padidėjo vidutiniškai 4,2 %, o po 72 h fermentavimo, pastebimas, lyginant su kontrole, emulsijos sudarymo pajėgumo sumažėjimas (~2,8 %). Taip pat pupų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumui turėjo įtakos ir kietafazei fermentacijai parinkta PRB padermė. Didžiausias pupų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumas nustatytas esant terpės pH 8, fermentuojant pupų miltus 24 h Pa7 paderme (45,4 %), o fermentuojant kitomis PRB padermėmis, Ls ir Pp9, pupų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumas, atitinkamai, nustatyta 44,3 ir 44,5 %.

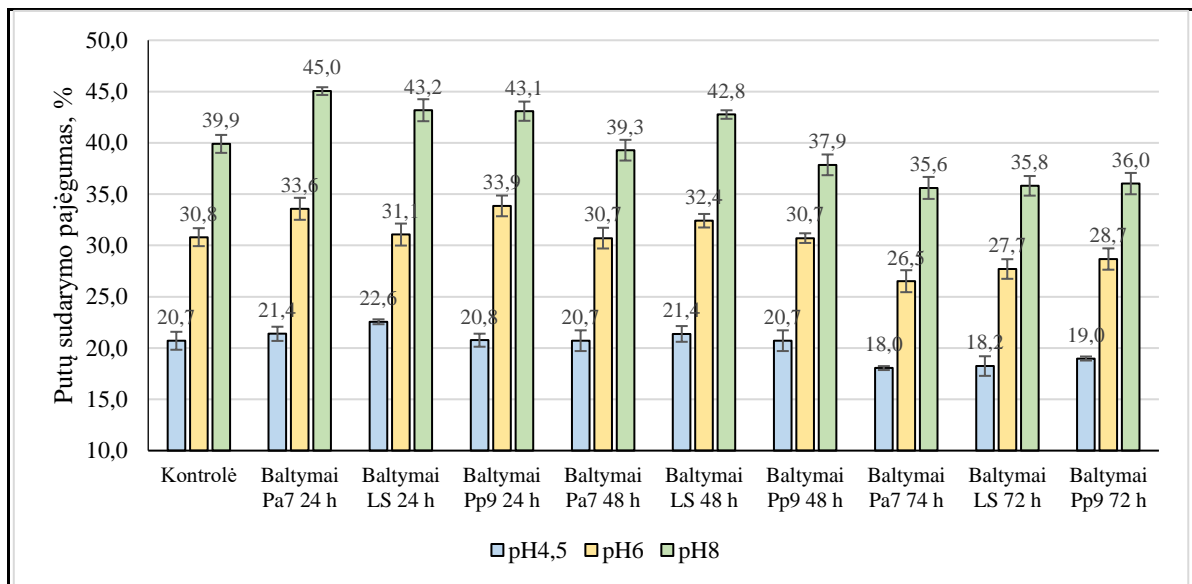


**31 pav.** Pupų baltymų emulsijos stabilumo priklausomybė nuo pH ir PRB kietafazės fermentacijos

Iš gautų rezultatų matome (31 pav.), kad didžiausią įtaką pupų baltymų emulsijos stabilumui turi terpės pH: esant terpės pH 8, emulsijos stabilumas yra 41,6 %, esant terpės pH 6 – 38,5 %, esant terpės pH 4,5 – 19,9.

Taip pat, iš gautų rezultatų matyti PRB kietafazės fermentacijos įtaka pupų baltymų emulsijos stabilumui, pvz., esant terpės pH 6 emulsijos stabilumas, lyginant su kontrole, padidėjo vidutiniškai 3,3 %, o po 72 h fermentavimo, pastebimas, lyginant su 24 h fermentavimo, emulsijos stabilumo sumažėjimas (~3,5 %). Taip pat, pupų baltymų emulsijos stabilumui turėjo įtakos ir kietafazei fermentacijai parinkta PRB padermė. Didžiausias pupų baltymų emulsijos stabilumas nustatytas esant terpės pH 8, fermentuojant pupų miltus 24 h Pa7 paderme (44,6 %), o fermentuojant kitomis PRB padermėmis, Ls ir Pp9, pupų baltymų emulsijos stabilumas, atitinkamai, nustatyta 43,8 ir 44,3 %.

**Putų sudarymo pajėgumas.** Kietafazės fermentacijos ir pH įtaka pupų baltymų putų sudarymo pajėgumui rezultatai pateikti 32 paveiksle.



**32 pav.** Pupų baltymų putų sudarymo pajėgumo priklausomybė nuo pH ir PRB kietafazės fermentacijos

Iš gautų rezultatų matyti (32 pav.), kad pupų baltymų putų sudarymo pajėgumui didžiausią įtaką turėjo terpės pH. Didžiausias putų sudarymo pajėgumas nustatytas, esant terpės pH 8 (39,9 %), mažiausias – esant terpės pH 4,5 (20,7 %).

Taip pat, nustatyta kietafazės fermentacijos įtaka pupų baltymų putų sudarymo pajėgumui. Po 24 h fermentavimo PRB putų sudarymo pajėgumas padidėjo, lyginant su kontrole, 3,9 %. Po 48 h ir 72 h fermentavimo putų susidarymo pajėgumas, lyginant su 24 h, sumažėjo, ši tendencija nustatyta esant visiems terpės pH. Didžiausias putų sudarymo pajėgumas nustatytas, fermentuojant pupas Pa7 paderme, esant terpės pH 8 (45,0 %), o fermentuojant kitomis PRB padermėmis, Ls ir Pp9, pupų baltymų putų sudarymo pajėgumas, atitinkamai, nustatyta 43,2 ir 43,1 %.

Literatūroje pateikta, kaip kinta lubinų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas priklausomai nuo terpės pH bei kietafazės fermentacijos *P. pentosaceus*. Didesnis emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas yra esant didesniai terpės pH: 1) emulsijos sudarymo pajėgumas 2,2 % didesnis, kai terpės pH 8, nei esant terpės pH 6 ir 2) emulsijos stabilumas 8,6 % didesnis, kai terpės pH 8 nei esant terpės pH 6. Taip pat, literatūroje pateikta, kaip kinta lubinų baltymų funkcinės savybės PRB KF metu: po 24 h fermentavimo emulsijos sudarymo pajėgumas, lyginant su kontrole (esant terpės pH 6), padidėjo 4,7 %, emulsijos stabilumas – 4,9 % [70]. Taip pat, terpės pH ir fermentavimas PRB turėjo įtakos lubinų putų sudarymo pajėgumui. Lubinų putų susidarymo pajėgumas yra 12 % didesnis esant terpės pH 8, lyginant su terpės pH 6. Fermentuojant lubinus pieno rūgšties bakterijomis *Pediococcus pentosaceus*, po 24 h putų tūris padidėjo 13 %, tačiau po ilgesnės fermentacijos trukmės (72 h) putų tūris sumažėjo 11 %, lyginant su putų tūriu po 48 h fermentavimo [70]. Tokios pačios tendencijos nustatytos ir šiame darbe, didesnis pH lėmė geresnes pupų baltymų funkcines

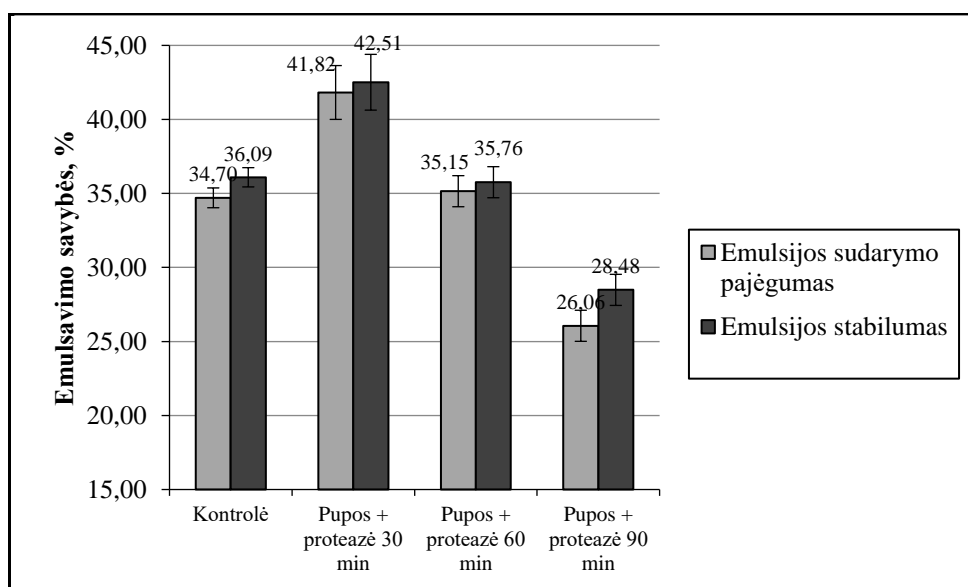
savybes, taip pat, norint pagerinti pupų baltymų funkcines savybes, turi būti parinkta optimali fermentavimo trukmė.

### 3.4.3. Pupų miltų funkcinių savybių pokyčiai po apdorojimo proteazėmis

Apdorojus pupų miltus proteazėmis, sumažėjo didelės molekulinės masės baltymų kiekis (23 pav.), todėl eksperimento metu buvo įvertinti pupų miltų funkcinių savybių (putų sudarymo pajėgumo, putų stabilumo, emulsijos sudarymo pajėgumo, emulsijos stabilumo, vandens absorbcijos) pokyčiai.

**Emulgavimo savybės.** Pupų miltų emulgavimo savybės pateiktos 33 paveiksle.

Iš pateiktų rezultatų matyti, kad ilgesnė apdorojimo trukmė turėjo neigiamos įtakos pupų miltų emulgavimo savybėms. Po 30 min apdorojimo su proteazėmis pupų miltų emulsijos sudarymo pajėgumas, lyginant su kontrole, padidėjo 7,1 %. Po ilgesnio apdorojimo proteazėmis pastebimas emulsijos sudarymo pajėgumo sumažėjimas: po 60 min emulsijos sudarymo pajėgumas, lyginant su 30 min apdorojimu, sumažėjo 6,7 %, po 90 min – 15,7 %. Taip pat, apdorojimas proteazėmis turėjo įtakos ir emulsijos stabilumui: po 30 min apdorojimo proteazėmis nustatytas, lyginant su kontrole, emulsijos stabilumo padidėjimas 6,4 %. Po ilgesnio apdorojimo proteazėmis pastebimas emulsijos stabilumo sumažėjimas: po 60 min emulsijos stabilumas, lyginant su 30 min apdorojimu, sumažėjo 6,8 %, po 90 min – 14,0 %.

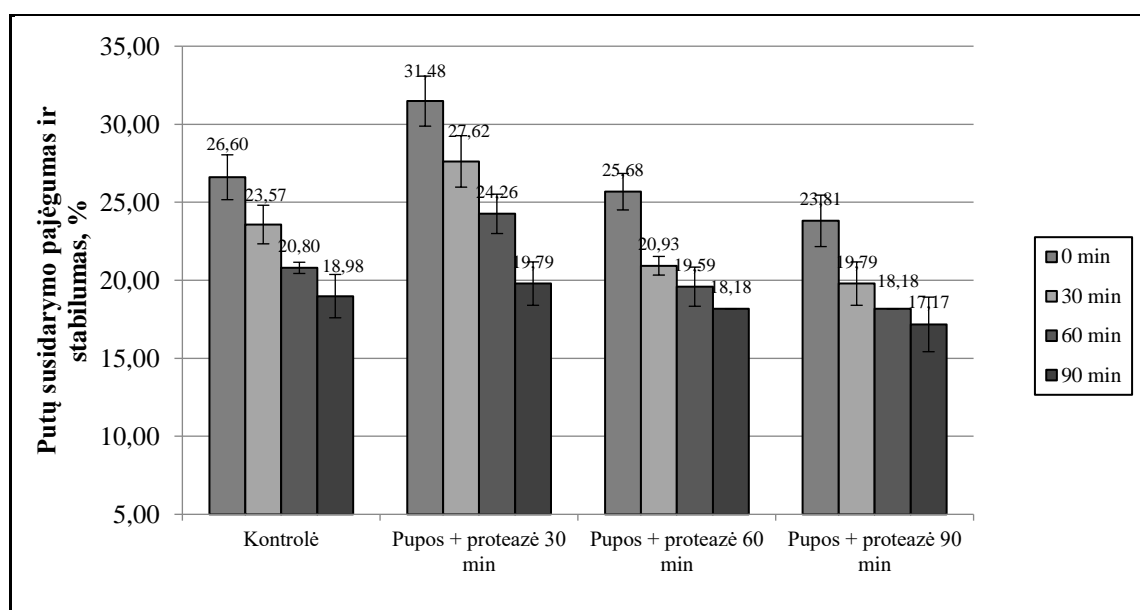


33 pav. Apdorojimo proteazėmis įtaka emulsijos sudarymo pajėgumui stabilumui

Cheruppanpullil Radha, Parigi Ramesh Kumar ir Vishweshwaraiah Prakash darbe pateikta, kad apdorojant sojos miltus su grybine proteaze laike 20 min, susidariusi emulsija buvo nestabili, nors kontrolinio mėginio susidariusi emulsija buvo stabili (134 ml) [78].

**Putų sudarymo pajėgumas.** Pupų miltų apdorotų proteazėmis putų sudarymo pajėgumo ir putų stabilumo rezultatai pateikti 34 paveiksle.

Po 30 min apdorojimo proteazėmis pupų miltų putų sudarymo pajėgumas, lyginant su kontrole, padidėjo 4,88 % (34 pav.). Apdorojus pupų miltus proteazėmis laike 60 ir 90 min, fiksuotas putų susidarymo sumažėjimas, nustatytas, atitinkamai, 0,92 ir 2,79 %. Taip pat, apdorojimas proteazėmis turėjo įtakos ir putų stabilumui: po 90 min putų išplakimo putų tūris neapdorotų pupų sumažėjo 7,6 %, apdorotų proteazėmis 30 min – 11,7 %, apdorotų 60 min – 7,5 %, apdorotų 90 min – 6,6 %.

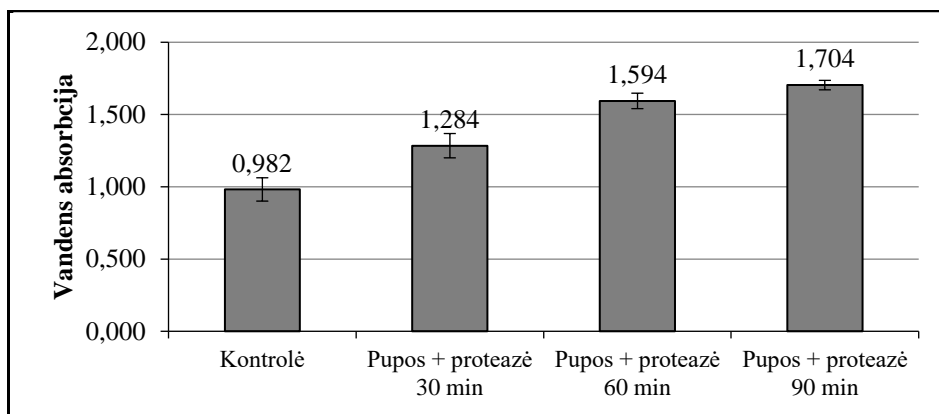


**34 pav.** Apdorojimo proteazėmis įtaka putų sudarymo pajėgumui stabilumui

Martina Hrčkova, Monika Rusnakova ir Jaroslav Zemanovič pateikė, kaip įvairios proteazės (endopeptidazė, egzopeptidazė ir endoproteinazė) paveikė sojų miltų funkcines savybes. Šiame darbe mokslininkai pateikė tokias tendencijas: fermentacija proteazėmis padidina putų tūrį, tačiau putų stabilumas sumažėja, taip pat, nustatyta, kad ilgėjant fermentavimo trukmei mažėja tiek putų tūris, tiek susidariusių putų stabilumas [79]. Kitų autorių tyrimų rezultatai rodo, kad paveikus sojų miltus 20 min grybine proteaze, putų susidarymo pajėgumas sumažėja nuo 68 % iki 56 % [78].

**Vandens absorbcija.** Apdorojimo proteazėmis įtaka miltų vandens absorbcijai pateikta 35 paveiksle.

Iš pateiktų rezultatų (35 pav.) matyti, kad paveikus pupų miltus proteazėmis, vandens absorbcija didėja. Po 30 min fermentinio apdorojimo pupų miltų absorbcija padidėjo 0,302, po 60 min – 0,612, po 90 min – 0,722.



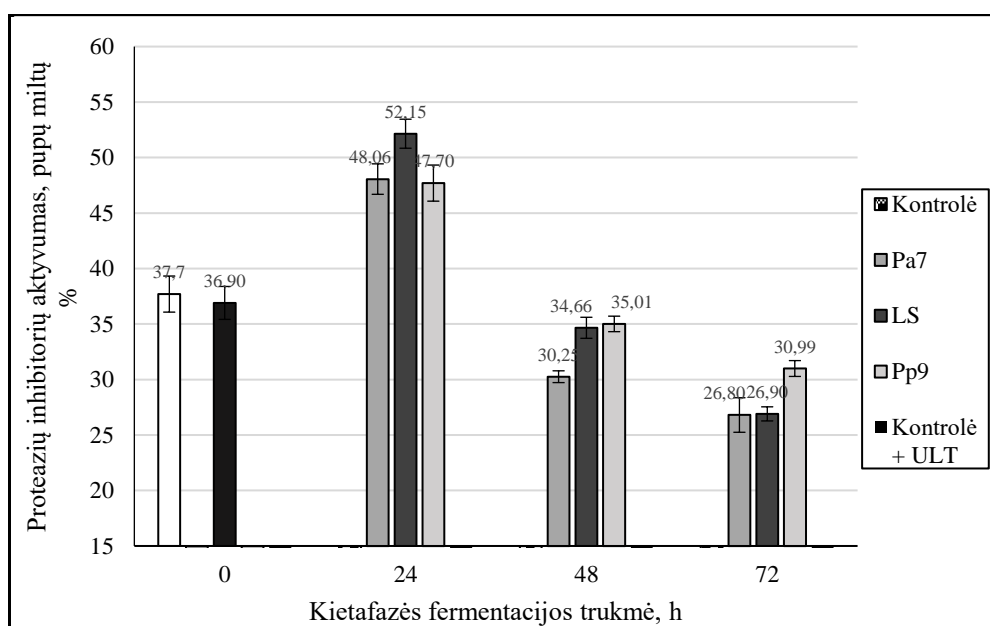
35 pav. Pupų miltų vandens absorbcijos pokyčiai po apdorojimo proteazėmis

Literatūroje pateikta, kaip pakinta kviečių glitimo vandens absorbcija po 2,5 h apdorojimo proteaze. Šiame darbe gautos tendencijos yra panašios į literatūroje pateiktus duomenis, kviečių glitimo vandens absorbcija, lyginant su kontrole, padidėjo 0,28 g/g [80].

### 3.5. Pupų miltų ir pupų baltymų proteazių inhibitorių ir virškinamumo pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

Pupos, kaip ir dauguma ankštinių javų, turi antimonybinių faktorių, todėl yra svarbu įvertinti kaip jie kinta PRB kietafazės fermentacijos metu. Tyrimo metu analizuota pupų miltų ir pupų baltymų proteinazių inhibitorių aktyvumas ir virškinamumas.

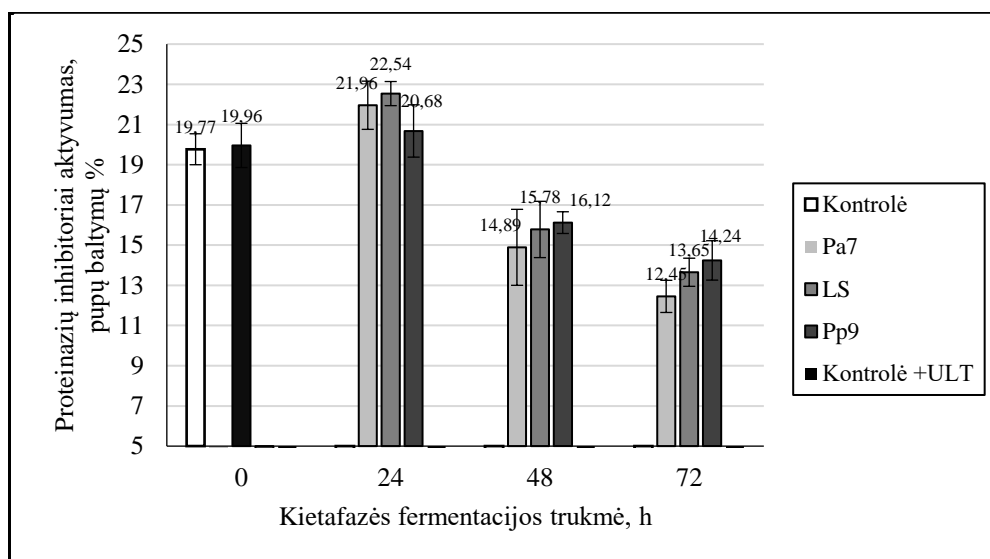
**Proteinazių inhibitorių aktyvumas.** Pupų miltų proteinazių inhibitorių pokyčių kietafazės fermentacijos metu rezultatai pateikti 36 ir 37 paveiksluose.



36 pav. Proteinazių inhibitorių aktyvumo (pupų miltuose) pokyčiai PRB KF metu

Po 24 h fermentavimo nustatyta, kad pupų miltų proteinazinis inhibitorių aktyvumas, lyginant su kontrole, padidėjo 11,6 %. Po 48 ir 72 h fermentavimo proteinazinis inhibitorių

aktyvumas sumažėjo: po 48 h fermentavimo, lyginant su kontrole, sumažėjo 4,4 %, po 72 h – 9,5 %. Mažiausiu proteinazių inhibitorių aktyvumu pasižymėjo pupų miltai fermentuoti 72 h Pa7 ir Ls padermėmis, atitinkamai, 26,8 ir 26,9 %.



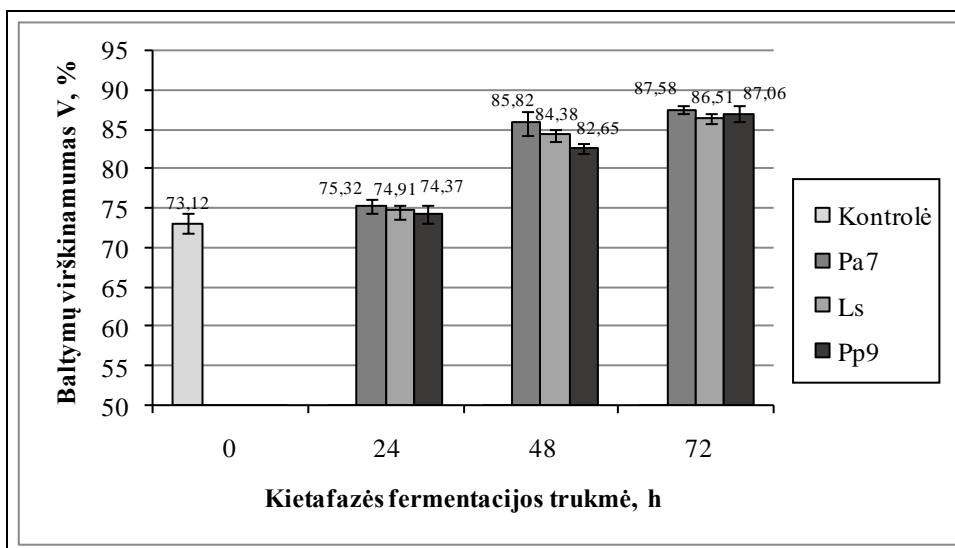
**37 pav.** Proteinazių inhibitorių aktyvumo (pupų baltymų izoliatuose) pokyčiai PRB KF metu

Tiriant pupų baltymų proteinazių inhibitorių aktyvumą, nustatyta, kad po 24 h fermentavimo PRB pupų baltymų proteinazių inhibitorių aktyvumas, lyginant su kontrole, padidėjo 2 %. Ilgėjant fermentacijos trukmei, buvo stebimas proteinazių inhibitorių aktyvumo sumažėjimas, po 48 h fermentavimo PRB proteinazių inhibitorių aktyvumas, lyginant su kontrole, sumažėjo 4,2 %, po 72 h – 6,3 %. Didžiausias proteinazių inhibitorių aktyvumo sumažėjimas nustatytas po 72 h fermentacijos Pa7 paderme, lyginant su kontrole, proteinazių inhibitorių aktyvumas sumažėjo 7,3 %.

Lyginant pupų miltų ir pupų baltymų proteinazių inhibitorių aktyvumą, nustatyta, kad pupų miltai pasižymi didesniu proteinazių inhibitorių aktyvumu nei pupų baltymai (18 %).

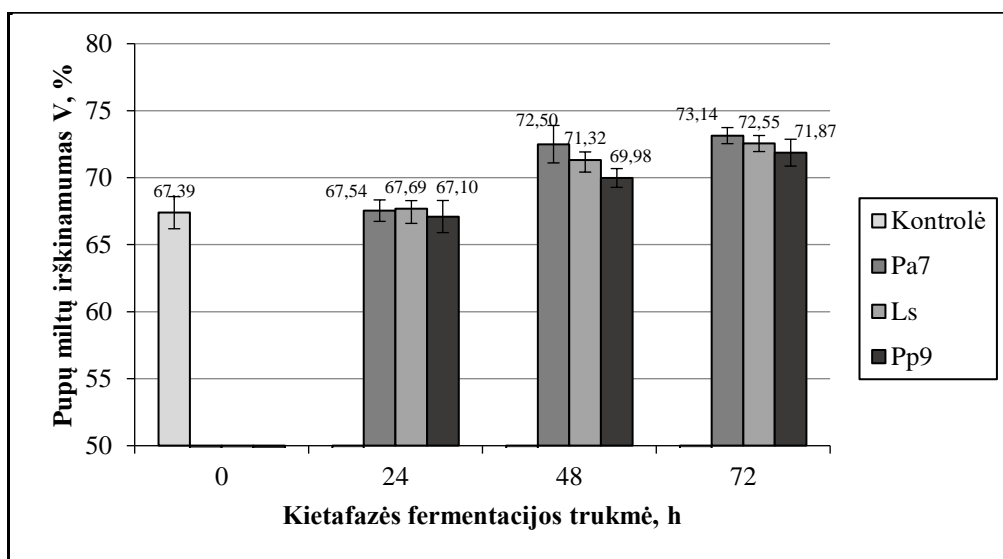
**Baltymų *in vitro* virškinamumas.** Pupų baltymų virškinamumo *in vitro* kitimo kietafazės fermentacijos metu rezultatai pateikti 38 ir 39 paveiksluose.





**38 pav.** Baltymų virškinamumo *in vitro* (pupų baltymų izoliatuose) pokyčiai PRB KF metu

Iš gautų rezultatų matyti (38 pav.), kad kietafazė fermentacija turėjo teigiamos įtakos pupų baltymų virškinamumui *in vitro*. Po 24 h baltymų virškinamumas padidėjo 1,8 %, po 48 h – 11,2 %, po 72 h – 13,9 %.



**39 pav.** Baltymų virškinamumo *in vitro* (pupų miltuose) pokyčiai PRB KF metu

Taip pat, kietafazė fermentacija PRB padermėmis turėjo teigiamos įtakos ir pupų miltų virškinamumui (39 pav.). Po 24 h fermentacijos pupų miltų virškinamumas, lyginant su kontrole, nepakito, tačiau ilgiau fermentuojant pupų miltus, pupų miltų virškinamumas, lyginant su kontrole, padidėja: po 48 h padidėja 3,9 %, po 72 h – 5,1 %. Didžiausias pupų miltų virškinamumo, lyginant su kontrole, padidėjimas nustatytas fermentuojant pupų mėginį Pa7 laike 72 h (5,8 %).

Literatūroje pateikta, kaip kinta antimybiniai pupų miltų komponentai pupas fermentuojant *Lactobacillus plantarum* 30°C laike 48 h. Prieš fermentaciją nustatyta tripsino inhibicija 2,09 Ti

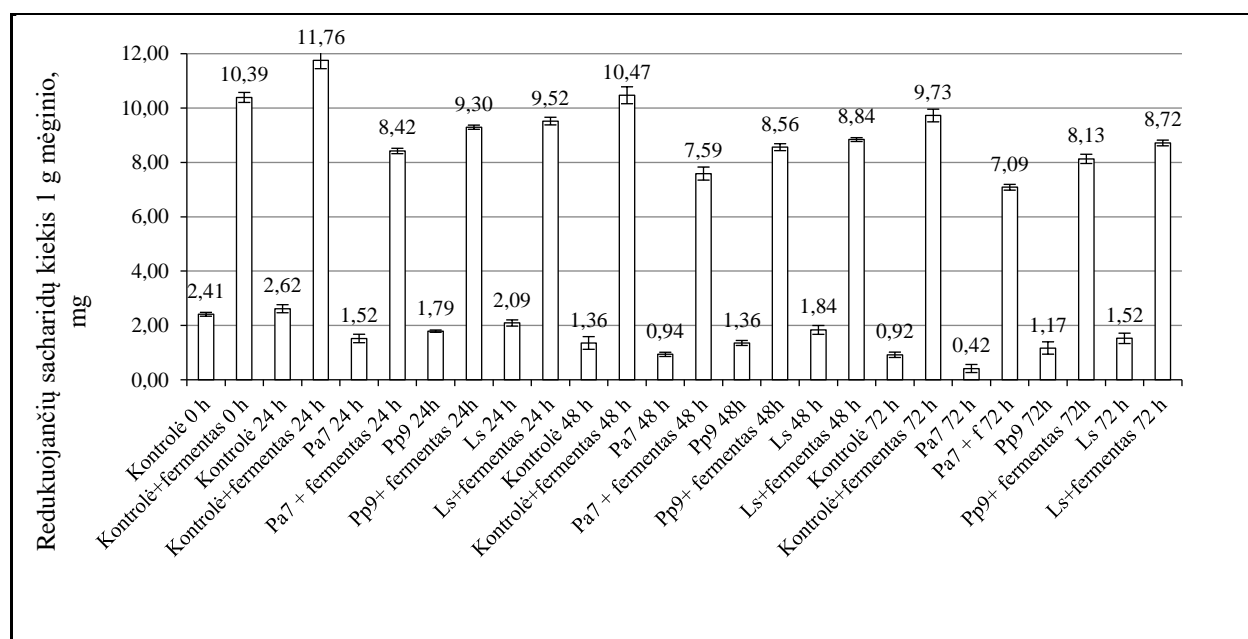
vienetai/mg dm, po fermentacijos – 0,91 Ti vienetai/mg dm. Taip pat, padidėja ir pupų miltų virškinamumas, prieš fermentaciją pupų miltų virškinamumas – 75,1 %, po fermentacijos – 75,6 % [55]. Taip pat, ši tendencija išlieka ir fermentuojant kitas žaliavas, pvz., literatūroje pateikta, kad fermentuojant sojų pupas pieno rūgšties bakterijomis *P. pentosaceus* baltymų virškinamumas *in vitro*, lyginant su nefermentuotomis sojos pupelėmis, padidėjo 13,69 % [69].

Taip pat, lyginant pupų miltų ir pupų baltymų virškinamumą *in vitro* ir proteinazių inhibitorių aktyvumą, nustatyta, kad virškinamumas *in vitro* yra mažesnis pupų miltų, nei pupų baltymų bei proteinazių inhibitorių aktyvumas yra didesnis pupų miltuose nei pupų baltymuose. Tokia pati tendencija pateikta ir H. Lqari, J. Vioque, J. Pedroche, F. Milla'n darbe, kuriame lubinų miltų virškinamumas *in vitro* yra 80,0 %, o baltymų izoliatų – 93,9 %, tripsino inhibicija lubinų miltų – 28,1 %, o baltymų izoliatų – 8,6 % [76].

### 3.6. Pupų lukštų PRB fermentavimas: BTR, pH, redukuojančių sacharidų, D(-) ir L(+) pieno rūgšties izomerų nustatymas

Išgaunant iš pupų baltymais turtingas frakcijas, susidaro, kaip atliekos, didelį lukštų kiekiai, kurių sudėtyje yra gausu lignoceliuliozės. Šio darbo metu, buvo siekiama ištirti lukštų perdirbimo į pieno rūgštį (PR) galimybes. Pirmoje stadijoje, siekiant padidinti fermentuojamų sacharidų kiekį, buvo taikomas jų apdorojimas „Vilzim NSP“ fermentiniu preparatu, kuris sudarytas iš celiulazės, ksilanazės ir  $\beta$  – gliukanazės fermentų mišinio. Antrame etape vykdyta PRB fermentacija atrinktomis padermėmis.

Apie apdorojimo fermentais efektyvumą buvo sprendžiama pagal redukuojančių sacharidų kiekį. Papildomai šie junginių pokyčiai analizuoti ir KF metu (40 pav.).

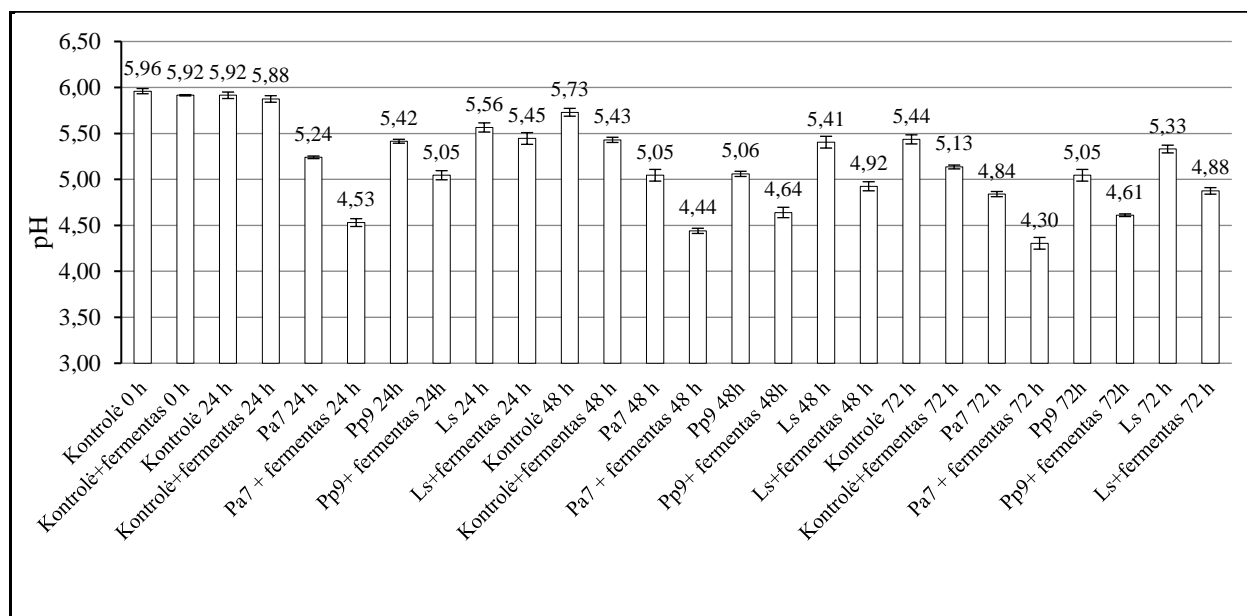


40 pav. Redukuojančių sacharidų pokyčiai apdorojus lukštus fermentais ir PRB KF metu

Iš pateiktų rezultatų (40 pav.) matyti, kad po apdorojimo fermentais redukuojančių sacharidų kiekis padidėjo nuo 2,41 iki 11,76 mg/g. Po 24 h PRB fermentacijos redukuojančių sacharidų kiekis, neapdorotuose fermentiniu preparatu pupų lukštuose, lyginant su kontrole, sumažėjo 0,88 mg/g, po 48 h fermentacijos – 1,24 mg/g, po 72 h – 1,58 mg/g. Po 24 h PRB fermentacijos redukuojančių sacharidų kiekis, apdorotuose fermentiniu preparatu pupų lukštuose, lyginant su kontrole, sumažėjo 2,68 mg/g, po 48 h fermentacijos – 3,43 mg/g, po 72 h – 3,78 mg/g. Didžiausi redukuojančių sacharidų pokyčiai KF metu nustatyti pupų lukštus fermentuojant Pa7 paderme: po 72 h fermentacijos redukuojančių sacharidų kiekis sumažėjo nuo 11,76 iki 7,09 mg/g. Mažiausias redukuojančių sacharidų pokytis nustatytas pupų lukštus fermentuojant Ls paderme: per 72 h redukuojančių sacharidų kiekis sumažėjo nuo 11,76 mg/g 8,72 mg/g.

Literatūroje yra pateikta daug pavyzdžių kaip pieno rūgštis gamybai iš antrinių produktų, šios visų pirma yra paveikiamos fermentais, kad susidarytų daugiau fermentuojamų sacharidų pieno rūgštis bakterijoms. Pavyzdžiui, paveikus bulvių atliekas gliukoamilaze, gliukozės, lyginant su kontrole, padidėjo 3 g/100g [81]. Paveikus kvietines sėlenas fermentiniu mišiniu, kurio sudėtyje yra celiuliozės, pektinazės ir kitų fermentų, gliukozės padaugėjo 35 mg<sup>-1</sup>, taip pat susidarė ir kontroliniame mėginyje nenustatytų monosacharidų, kaip ksilozės ir arabinozės [82].

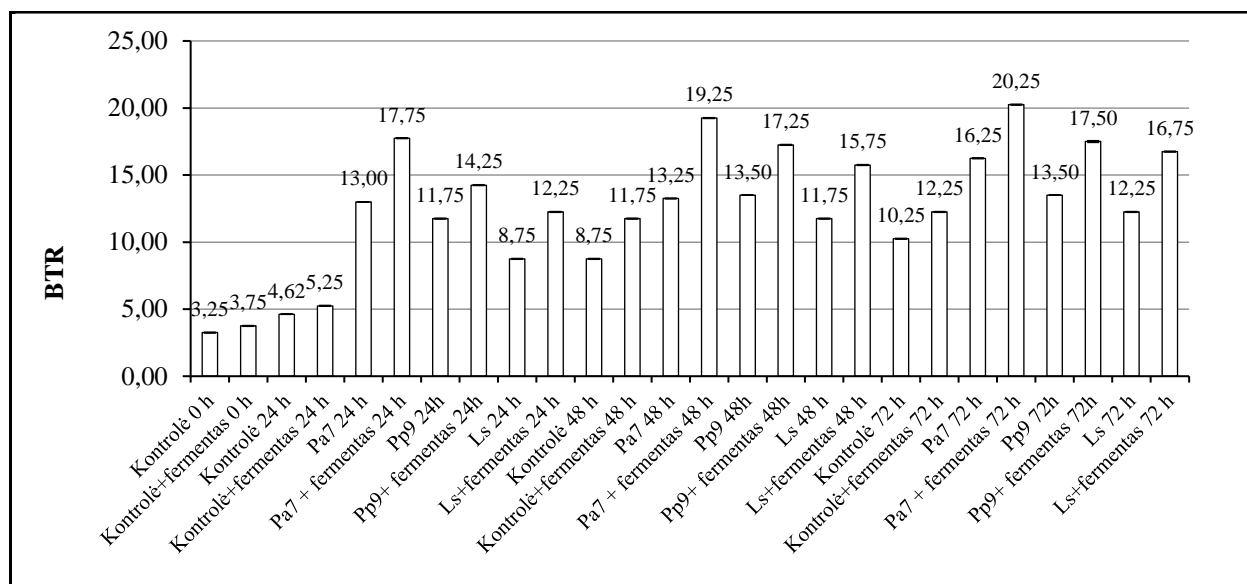
**pH ir BTR.** Pupų lukštų pH ir BTR pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu pateikti 41 ir 42 paveiksluose.



41 pav. pH pokyčiai PRB KF metu

Iš rezultatų matyti, kad po 24 h PRB fermentacijos pH, apdorotų fermentiniu preparatu pupų lukštų, lyginant su kontrole, sumažėjo 0,91, po 48 h fermentacijos – 1,29, po 72 h

fermentacijos – 1,32 (41 pav.). Po 24 h PRB fermentacijos pH, neapdorotų fermentiniu preparatu pupų lukštų, lyginant su kontrole, sumažėjo 0,55, po 48 h fermentacijos – 0,79, po 72 h fermentacijos – 0,89. Didžiausias pH pokytis KF metu nustatyti pupų lukštus fermentuojant Pa7 paderme: po 72 h pH sumažėjo nuo 5,96 iki 4,3 (pupų lukštai prieš PRB fermentaciją buvo apdoroti fermentiniu preparatu).

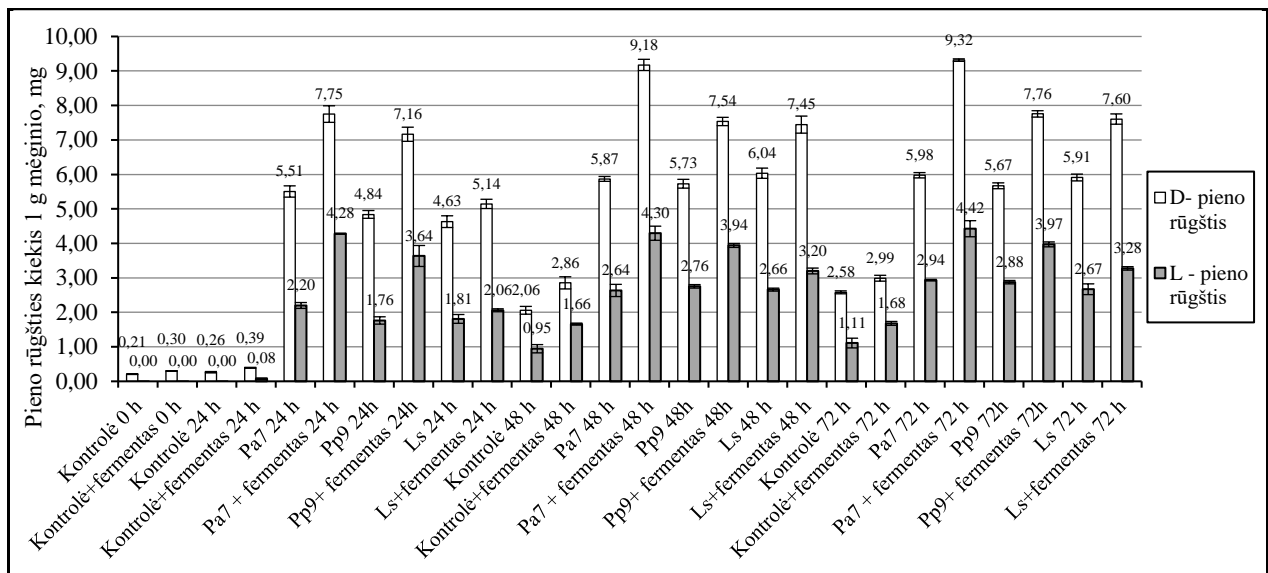


42 pav. BTR pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

Iš gautų rezultatų (42 pav.) matyti, kad didžiausios BTR reikšmės nustatytos pupų lukštus fermentuojant Pa7 paderme, kurie prieš KF buvo paveikti fermentiniu preparatu, po 24 h BTR nustatytas 17,8, po 48 h – 19,3, po 72 h – 20,3. Taip pat, nustatyta, kad fermentavimo metu, taip pat didėjo rūgštingumas ir mėginių, kurie nebuvo paveikti PRB. Tai galima paaiškinti tuo, kad KF metu buvo sudarytos palankios sąlygos augti pupų lukštų pašalinei mikroflorai.

Literatūroje yra pateikta, kaip kito pH kvietines sėlenas fermentuojant PRB padermėmis Pa7, Ls, Pp9. Nustatyta, kad pH pokyčiai buvo panašūs fermentuojant sėlenas visomis PRB padermėmis, per 50 h fermentacijos pH kito nuo 6,3 iki 4,0 [82].

**Pieno rūgšties D(-) ir L(+) izomerų nustatymas.** Pupų lukštų pieno rūgšties D(-) ir L(+) izomerų pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu rezultatai pateikti 43 paveiksle.



**43 pav.** D(-) ir L(+) izomerų pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

Iš gautų rezultatų matyti, kad po 24 h PRB fermentacijos D(-) pieno rūgšties izomero, neapdorotuose fermentiniu preparatu pupų lukštuose, susidarė 4,99 mg/g, o L(+) pieno rūgšties izomero – 1,93 mg/g, po 48 h fermentacijos D(-) pieno rūgšties izomero susidarė 5,88 mg/g, o L(+) pieno rūgšties izomero – 2,69 mg/g, po 72 h fermentacijos D(-) pieno rūgšties izomero susidarė 5,85 mg/g, o L(+) pieno rūgšties izomero – 2,83 mg/g. Po 24 h PRB fermentacijos D(-) pieno rūgšties izomero, apdorotuose fermentiniu preparatu pupų lukštuose, susidarė 6,68 mg/g, o L(+) pieno rūgšties izomero – 3,33 mg/g, po 48 h fermentacijos D(-) pieno rūgšties izomero susidarė 8,06 mg/g, o L(+) pieno rūgšties izomero – 3,81 mg/g, po 72 h fermentacijos D(-) pieno rūgšties izomero susidarė 8,23 mg/g, o L(+) pieno rūgšties izomero – 3,89 mg/g. Didžiausi D(-) ir L(+) pieno rūgšties izomerų kiekiai susidarė po 72 h fermentacijos Pa7 paderme, pupų lukštus apdorojus fermentiniu preparatu: D(-) pieno rūgšties izomero susidarė 9,32 mg/g, L(+) pieno rūgšties izomero – 4,42 mg/g.

Literatūroje pateikta, kad fermentuojant 48 h Ls paderme kvietines sėlenas, kurios prieš fermentaciją buvo paveiktos fermentiniu mišiniu, kurio sudėtyje yra celiulazių ir pektinazių, pieno rūgšties susidarė daugiau, lyginant su neapdorotomis fermentais sėlenomis, 31,06 g/kg [82]. Taip pat, literatūroje pateikta, kad priklausomai nuo naudojamos žaliavos didesniu fermentiniu aktyvumu pasižymi skirtingos pieno rūgščių bakterijų padermės, pavyzdžiui, fermentuojant kvietines sėlenas, didžiausiu fermentiniu aktyvumu pasižymėjo Ls padermė, fermentuojant alaus salyklo atliekas – Pp9 padermė, o lubinus – Pa7 padermė [82].

## Išvados

1. Pupų perdirbimo procesas, naudojant pupų malinio klasifikavimą oru, yra perspektyvus būdas, norint išgauti didesnio baltymingumo pupų miltus: šiuo būdu, lyginant su klasifikavimu oru, gaunamas 3 % didesnis baltymų kiekis, o lyginant su žaliavinėmis pupomis (be apdorojimo) - 3,6 % daugiau baltymų ir 7,8 % mažiau skaidulinių medžiagų.

2. Ultragarsinė kavitacija vandenyje yra efektyvus metodas mikrobinės taršos mažinimui pupų miltuose žemų temperatūrų režime (30 – 35 °C): po 60 min apdorojimo ultragarsu (37 kHz) bendras mikroorganizmų skaičius žaliavoje sumažėjo 2 kartus, nesant reikšmingų baltymų pokyčių.

3. PRB KF metu, lyginant su nefermentuotais pupų miltais, nustatytas po 72 h fermentacijos vandenyje tirpiųjų baltymų sumažėjimas (15 %). Elektroforezės tyrimų rezultatai rodo, kad fermentacijos metu vyksta mažos molekulinės masės baltymų pokyčiai. Be to, šio proceso metu galimas baltymų agregavimas, kuriam didžiausią įtaką turi terpės pH pokyčiai. Miltų apdorojimas proteazėmis neturėjo reikšmingos įtakos tirpiųjų baltymų kiekio pokyčiams, tačiau šio faktoriaus įtaka išryškėjo tik didelės molekulinės masės baltymų frakcijų sumažėjimui.

4. Pupų miltų ir pupų baltymų funkcinių savybių pagerinimui įtakos turi PRB KF ir apdorojimo fermentais trukmė:

(i) po 24 h PRB KF nustatytas pupų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumo, lyginant su kontrole, padidėjimas (4,2 %), tačiau ilgėjant fermentacijos trukmei (po 72 h), nustatytas pupų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumo sumažėjimas (2,8 %);

(ii) pupas veikiant proteazėmis, po 30 min apdorojimo fermentiniu preparatu putų sudarymo pajėgumas padidėjo 4,9 %, tačiau ilgėjant veikimo trukmei (po 90 min) buvo fiksuotas šio parametro sumažėjimas (2,8 %).

Tokiu būdu, norint išgauti optimalų baltymų emulsijų putų susidarymo pajėgumą, optimali PRB KF ir žaliavos apdorojimo fermentais trukmė parinkta, atitinkamai, 24 h ir 30 min.

5. PRB KF yra efektyvus būdas pupų antimonybinių faktorių mažinimui: po 72 h fermentacijos proteazių inhibitorių aktyvumas pupų miltuose sumažėjo 9,5 %, o pupų baltymuose – 6,3 %; pupų miltų virškinamumas po fermentacijos padidėjo 5 %, o pupų baltymų – 13,9 %.

6. Pupų lukštus, susidariusius pupų perdirbimo metu, galima naudoti pieno rūgšties (PR) gamybai, pritaikius jų apdorojimui prieš PRB fermentaciją, fermentinį preparatą, susidedantį iš celiulazių, ksilanazių ir  $\beta$  – gliukanazių; toks apdorojimas leido padidinti PR išeigą 39 %.

## Literatūros sąrašas

1. Faba beans [interaktyvus], 2017 [žiūrėta 2017 – 04 – 03]. Prieiga per internetą: <http://saskpulse.com/growing/faba-beans/>
2. Bivilienė Aušra, Asta Baliuckienė, Asta Blažytė, Stasė Dapkūnienė, Laima Šveistytė *Lietuvos augalų nacionaliniai genetiniai išteklių (EX SITU)*. Lietuvos Respublikos aplinkos ministerija, Augalų genų bankas, 2010.
3. Askar A. *Faba beans (Vicia faba L.) and their role in the human die*. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Suez Canal University, Ismailia, Egypt.
4. Faba Beans Markets [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 – 03]. Prieiga per internetą: <https://www.saskatchewan.ca/business/agriculture-natural-resources-and-industry/agribusiness-farmers-and-ranchers/crops-and-irrigation/pulse-crop-bean-chickpea-faba-bean-lentils/faba-bean/markets>
5. Maskus Heather *Pulse Processing, Functionality and Application, Literature Review*. 2010, pp. 146.
6. Vioque Javier, Manuel Alaiz, Julio Girón-Calle *Nutritional and functional properties of Vicia faba protein isolates and related fractions*. Food Chemistry, 2012, vol. 132, pp. 67 – 72.
7. Hong GE, Yamei MIAO, Xuejun WANG, Kaihua WANG, Manfeng CHEN, Yubin LU *Comparative Analysis on the Quality Components in Vicia faba L. of Different Genotypes*. Agricultural Science and Technology, 2016, vol. 17, pp. 338 – 340, 343.
8. Schumacher H. , H. M. Paulsen, A. E. Gau, W. Link, H. U. Ju Rgens, O. Sas and R. Dieterich *Seed protein amino acid composition of important local grain legumes Lupinus angustifolius L., Lupinus luteus L., Pisum sativum L. and Vicia faba L.* Plant Breeding, 2011, vol. 130, pp. 156 – 164.
9. Hoojjat P., Zabik, M. E. *Sugar-snap cookies prepared with wheat-navy bean-sesame seed flour blends*. Cereal Chemistry, 1984, vol. 61, pp. 41-44.
10. Welch Robert W., D. Wynne Griffiths *Variation in the oil content and fatty acid composition of field beans (Vicia faba) and peas (Pisum spp.)*. Science of Food and Agriculture, 1984, vol. 35, pp. 1282 – 1289.
11. Yoshida Hiromi, Masayuki Saiki, Naoko Yoshida, Yuka Tomiyama, Yoshiyuki Mizushina *Fatty acid distribution in triacylglycerols and phospholipids of broad beans (Vicia faba)*. Food Chemistry, 2009, vol. 112, pp. 924 – 928.
12. Gdala Jolanta, Lucyna Buraczewska *Chemical composition and carbohydrate content of several varieties of faba bean and pea seeds*. Journal of Animal and Feed Sciences, 1997, vol. 6, pp. 123 – 135.

13. Petry Sandrine, Sylviane Furlan, Earle Waghorne, Luc Saulnier, Jutta Cerning , Emmanuelle Maguin *Comparison of the thickening properties of four Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides*. FEMS Microbiology Letters, 2003, vol. 221, pp. 285 – 291.
14. Fava beans nutrition facts [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 – 03]. Prieiga per internetą: <http://www.nutrition-and-you.com/fava-beans.html>
15. Revilla Isabel *Impact of Thermal Processing on Faba Bean (Vicia faba) Composition. Processing and Impact on Active Components in Food*, 2015, pp. 337 – 343.
16. Raffinose, Stachyose and Verbascose [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 -03]. Prieiga per internetą:<http://www.nutrientsreview.com/carbs/soluble-fiber-raffinosestachyoseverbascose.html>
17. Urbano G, López-Jurado M, Aranda P, Vidal-Valverde C, Tenorio E, Porres J. *The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function?.* Journal of Physiology and Biochemistry, 2000, vol. 56, pp. 283 – 294.
18. Concepción Vidal-Valverde, Juana Frias, Cristina Sotomayor, Concepción Diaz-Pollan, Mar Fernandez, Gloria Urbano *Nutrients and antinutritional factors in faba beans as affected by processing*. European Food Research and Technology, 1998, vol. 207, p. 140 – 145.
19. Doublecz Károly *Animal nutrition*. 2011, pp. 82.
20. Cre'pon Katell, Pascal Marget, Corinne Peyronnet, Benoit Carroue'e, Paolo Arese, Ge' rard Duc *Nutritional value of faba bean (Vicia faba L.) seeds for feed and food*. Field Crops Research, 2010, vol. 115, pp. 329 – 339.
21. Yu-Wei Luo, Wei-Hua Xie *Effect of different processing methods on certain antinutritional factors and protein digestibility in green and white faba bean (Vicia faba L.)*. CyTA-Journal of Food, 2013, vol.11, pp. 43 – 49.
22. All about lectin, [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 – 03]. Prieiga per internetą <http://www.precisio nnutrition.com/all-about-lectins>
23. Benefits of Antioxidants [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 – 03]. Prieiga per internetą <http://www.nutrex-hawaii.com/benefits-of-antioxidants>
24. Pasricha Vani, Gouri Satpathy, Rajinder K Gupta *Phytochemical & Antioxidant activity of underutilized legume Vicia faba seeds and formulation of its fortified biscuits*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2014, pp. 75 – 80.
25. Yahia Yassine, Walid Elfalleh, Nizar Tlili, Hedia Hannachi li, Mohamed Loumerem, Ali Ferchichi li *Phytochemical contents and antioxidant activities of some Tunisian Faba beans populations*. Romanian Agricultural Research, No. 30, 2013, p. 66- 74.
26. L – Dopa [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 – 03]. Prieiga per internetą: <https://examine.com/supplements/l-dopa/>



27. Ramírez-Moreno J.M., I. Salguero Bodes, O. Romaskevych, M.C. Duran-Herrera *Broad bean (Vicia faba) consumption and Parkinson's disease: a natural source of L-dopa to consider*. Neurologia (English Edition), 2015, vol. 30, pp. 375 – 376.
28. Mienda Bashir Sajo, Ahmad Idi, and Abdulhamid Umar *Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview*. Research in Biotechnology, 2011, vol. 2, pp. 21-26.
29. Pandey Ashok *Solid-state fermentation*. Biochemical Engineering Journal, 2003, vol. 13, p. 81 – 84.
30. Raimbault Maurice *General and microbiological aspects of solid substrate fermentation*. Electronic Journal of Biotechnology, 1998, vol.1.
31. Shapiro M., V. Galperin *Air classification of solid particles: a review*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2005, vol. 44, pp. 279 – 285.
32. Johansson Robert *Air classification of fine aggregates*. Thesis for the degree of doctor of philosophy in product and production development, 2014, pp. 1-88.
33. Andrady Anthony L. *Plastics and the Environment*. 2003, pp. 19.
34. Salunkhe D. K., S. S. Deshpande *Foods of Plant Origin Production, Technology, and Human Nutrition*. 1991, pp. 137 – 301.
35. Vose J. R., M. J. Basterrechea, P.A.J. Gorin, A.J. Finlayson and C.G. Youngs *Air classification of field peas and horsebean flours: chemical studies of starch and protein fractions*. Cereal Chemistry, 1976, vol. 53, pp. 928 – 936.
36. Applewhite Thomas H. *Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs*. 1989, pp. 175 – 204.
37. Garba Umar, Sawinder Kaur *Review - Protein isolates: production, functional properties and application*. International Research Journal of Chemistry, 2017, vol. 4, pp. 22 – 36.
38. Aziah Noor, A. A., Mohamad Noor, A. Y. and Ho, L. H. *Physicochemical and organoleptic properties of cookies incorporated with legume flour*. International Food Research Journal 19(4),2012, pp. 1539-1543.
39. Ó'Fágáin Ciarán *Lyophilization of Proteins*. Protein Purification Protocols, 2004, vol. 244, pp. 309 – 321.
40. Multari Salvatore, Derek Stewart, Wendy R. Russell *Potential of Fava Bean as Future Protein Supply to Partially Replace Meat Intake in the Human Diet*. Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety, 2015, vol. 14, pp. 511 – 522.
41. Zayas Joseph F. *Foaming Properties of Proteins*. Functionality of Proteins in Food, 1997, p. 260 – 309.

42. Zayas Joseph F. *Emulsifying Properties of Proteins*. *Functionality of Proteins in Food*, 1997, pp. 134 – 227.
43. Zayas Joseph F. *Solubility of Proteins*. *Functionality of Proteins in Food*, 1997, pp. 6 – 75.
44. Zayas Joseph F. *Water Holding Capacity of Proteins*. *Functionality of Proteins in Food*, 1997, pp. 76 – 133.
45. Zayas Joseph F. *Water Oil and Fat Binding Properties of Proteins*. *Functionality of Proteins in Food*, 1997, pp. 228 – 259.
46. Zayas Joseph F. *Water Gelling Properties of Proteins*. *Functionality of Proteins in Food*, 1997, pp. 310 – 366.
47. Ultrasound potentially safe, effective way to kill bacteria [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 – 09]. Prieiga per internetą: <http://news.psu.edu/story/187690/2002/12/11/ultrasound-potentially-safe-effective-way-kill-bacteria>
48. Lactic Acid Bacteria (LAB) [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 – 04]. Prieiga per internetą: <http://www.metamicrobe.com/lactobacteria/>
49. Lactic Acid Bacteria [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 – 04]. Prieiga per internetą: <http://textbookofbacteriology.net/lactics.html>
50. Karsma Anni *Bioprocessing with enzymes and lactic acid bacteria for production of new functional Faba Bean ingredients*. Master's thesis for the degree of Master of Science in Technology submitted for inspection, Espoo, 19 October, 2015.
51. New functional faba bean ingredients with fermentation [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 – 04], prieiga per internetą: <http://www.vtt.fi/inf/julkaisut/muut/2015/OA-New-functional-faba.pdf>
52. Proteases in the Food Industry [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 – 04]. Prieiga per internetą: [http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/meetings/workshops/birschbach.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/meetings/workshops/birschbach.pdf)
53. Chandra-Hioe Maria V., Christina H. M. Wong, Jayashree Arcot *The Potential Use of Fermented Chickpea and Faba Bean Flour as Food Ingredients*. *Plants Foods Human Nutrition*, 2016, vol. 71, pp. 90 – 95.
54. SOZER AYKAL Nesli, Leena MELAMA, Rossana CODA, Leena FLANDER, Juhani SIBAKOV *Method for converting faba beans, nutritionally valuable faba bean ingredients, and their uses*. 2016, WO 2015158959 A1.
55. Coda Rossana, LeenaMelama, Carlo Giuseppe Rizzello, José Antonio Curiel, Juhani Sibakov,Ulla Holopainen, Marjo Pulkkinen, Nesli Sozer *Effect of air classification and fermentation by Lactobacillus plantarum VTT E-133328 on faba bean (Vicia faba L.) flour nutritional properties*. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, vol. 193, pp. 34 – 42.

- 56.** Akibode Sitou, Mywish Maredia *Global and Regional Trends in Production, Trade and Consumption of Food Legume Crops*. Department of Agricultural, Food and Resource Economics Michigan State University, 2017, pp. 87.
- 57.** Gueguen J. *Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristics*. Plant Foods for Human Nutrition, 1983, vol. 32, pp. 267 – 303.
- 58.** Akande K.E., E.F. Fabiyi *Effect of Processing Methods on Some Antinutritional Factors in Legume Seeds for Poultry Feeding*. International Journal of Poultry Science, 2010, vol. 9, pp. 996 – 1001.
- 59.** Tempe part 1: traditional fermentation, fungal trials, and regional seeds [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 – 07]. Prieiga per internetą: <http://nordicfoodlab.org/blog/2015/11/20/tempe-part-1-traditional-fermentation-fungal-trials-and-regional-seeds>
- 60.** Pupos „Fuego“ [interaktyvus], [žiūrėta 2017 – 04 – 07]. Prieiga per internetą: <http://www.rapsai.lt/produktai/seklos/ankstiniai/pupos-fuego/>
- 61.** Tyler R.T., C. G. Youngs ir F.W. Sosulski *Air Classification of Legumes. I. Separation Efficiency, Yield, and Composition of the Starch and Protein Fractions*. Cereal Chemistry, 1981, vol. 58, pp. 144 – 148.
- 62.** Pascalle J. M. Pelgro, Remko M. Boom ir Maarten A. I. Schutyser *Method Development to Increase Protein Enrichment During Dry Fractionation of Starch-Rich Legumes*. Food and Bioprocess Technology, 2015, vol. 8, pp. 1495 – 1502.
- 63.** Álvarez, I., Pagán, R., Raso, J., Condón, S. and Sala, F. J. *Microbial inactivation by ultrasound. Food Technology. University of Zaragoza*. Food Technology. University of Zaragoza, pp. 1-7.
- 64.** Gao Shengpu, Gillian D. Lewis, Muthupandian Ashokkumar, Yacine Hemar *Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria*. Ultrasonics Sonochemistry, 2014, vol. 21, pp. 446 – 453.
- 65.** Guerreroa S., A. L'opez-Malob, S.M. Alzamora *Effect of ultrasound on the survival of Saccharomyces cere\_isiae: influence of temperature, pH and amplitude*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2001, vol. 2, pp. 31 – 39.
- 66.** Jambrak Anet Rezček, Vesna Lelas, Timothy J. Mason, Greta Krešič', Marija Badanjak *Physical properties of ultrasound treated soy proteins*. Journal of Food Engineering, 2009, vol. 93, pp. 386 – 393.
- 67.** Jambrak Anet Rezček, Timothy J. Mason, Vesna Lelas, Zoran Herceg, Ivana Ljubic' Herceg *Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions*. Journal of Food Engineering, 2008, vol. 86, pp. 281 – 287.
- 68.** Jiang Lianzhou, JingWang, Yang Li, ZhongjiangWang, Jing Liang, RuiWang, Yong Chen,

Wenjun Ma, Baokun Qi, Min Zhang *Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates*. Food Research International, 2014, vol. 62, pp. 595 – 601.

**69.** Bartkiene Elena, Vita Krungleviciute, Grazina Juodeikiene, Daiva Vidmantiene ir Zita Maknickiene *Solid state fermentation with lactic acid bacteria to improve the nutritional quality of lupin and soya bean*. Science of Food and Agriculture, 2015, vol. 95, pp. 1336 – 1342.

**70.** Klupsaite Dovile, Grazina Juodeikiene, Daiva Zadeike, Elena Bartkiene, Zita Maknickiene, Greta Liutkute. *The influence of lactic acid fermentation on functional properties of narrow-leaved lupine protein as functional additive for higher value wheat bread*. LWT - Food Science and Technology, 2017, vol. 75, pp. 180 – 186.

**71.** Aguirre Laura, Marisa S. Garro, Graciela Savoy de Giori. *Enzymatic hydrolysis of soybean protein using lactic acid bacteria*. Food Chemistry, 2008, vol. 111, pp 976 – 982.

**72.** Jarpa-Parra M., F. Bamdad, Z. Tian, Hongbo Zeng, Feral Temelli, L. Chen. *Impact of pH on molecular structure and surface properties of lentillegumin-like protein and its application as foam stabilizer*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2015, pp 45 – 53.

**73.** HSU D. L., H.K. LEUNG, M.M. MORAD, P.L. FINNEY ir C.T. LEUNG *Effect of Germination on Electrophoretic, Functional, and Bread-Baking Properties OF Yellow Pea, Lentil, and Faba Bean Protein Isolates*. Cereal Chemistry, 1982, vol. 59, pp. 344 – 350.

**74.** Gunawan, S., Widjaja, T., Zullaikah, S., Ernawati, L., Istianah, N., Aparamarta, H.W. ir Prasetyoko, D. *Effect of fermenting cassava with Lactobacillus plantarum, Saccharomyces cerevisiae, and Rhizopus oryzae on the chemical composition of their flour*. International Food Research Journal, 2015, vol. 22, pp. 1280 – 1287.

**75.** Xiao Yu, Guangliang Xing, Xin Rui, Wei Li, Xiaohong Chen, Mei Jiang, Mingsheng Dong *Effect of solid-state fermentation with Cordyceps militaris SN-18 on physicochemical and functional properties of chickpea (Cicerarietinum L.) flour*. LWT - Food Science and Technology, 2015, vol. 63, pp. 1317 – 1324.

**76.** Lqari H., J. Vioque, J. Pedroche, F. Milla'n. *Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization*. Food Chemistry. 2002, vol 76, pp. 349–356.

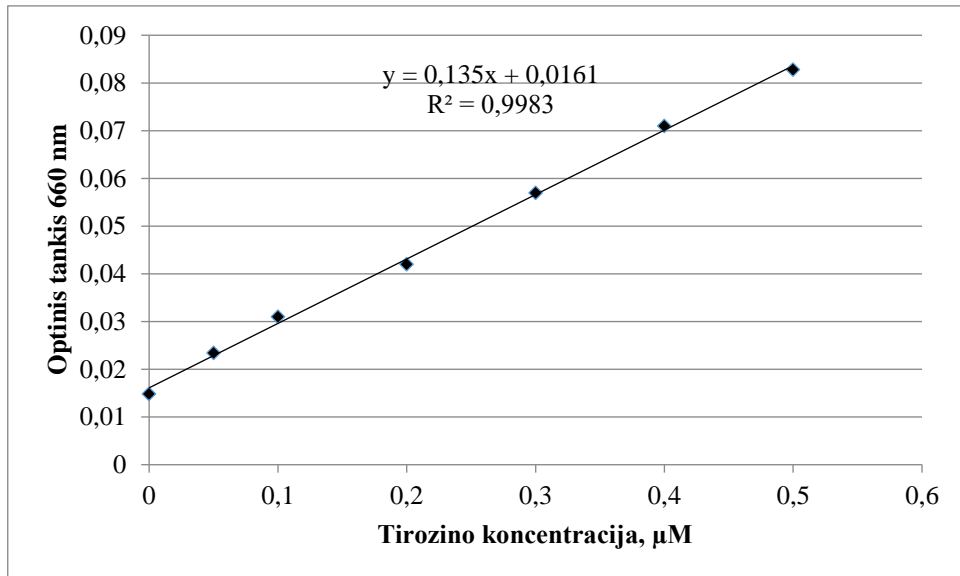
**77.** Kane Lauren E., Jack P. Davis, Aaron J. Oakes, Lisa L. Dean ir Timothy H. Sanders *Value - Added Processing of Peanut Meal: Enzymatic Hydrolysis to Improve Functional and Nutritional Properties of Water Soluble Extracts*. Journal of Food Biochemistry, 2012, vol. 36, pp. 520 – 531.

- 78.** Cheruppanpullil Radha, Parigi Ramesh Kumar and Vishweshwaraiah Prakash *Enzymatic modification as a tool to improve the functional properties of heat-processed soy flour*. Science of Food and Agriculture, 2008, vol. 88, pp. 336 – 343.
- 79.** HRČKOVÁ MARTINA, MONIKA RUSŇÁKOVÁ ir JAROSLAV ZEMANOVIČ *Enzymatic Hydrolysis of Defatted Soy Flour by Three Different Proteases and their Effect on the Functional Properties of Resulting Protein Hydrolysates*. Czech J. Food Sci, 2002, vol. 20, pp. 7 – 14.
- 80.** Deng Lingli, Zhaoxia Wang, Sheng Yang, Junmei Song, Fei Que, Hui Zhang, Fengqin Feng *Improvement of Functional Properties of Wheat Gluten Using Acid Protease from Aspergillus usamii*. PLoS One, 2016, vol. 11, pp. 1 – 6.
- 81.** Pagana Irene, Ruben Morawick ir Tiffany J. Hager *Lactic acid production using waste generated from sweet potato processing*. International Journal of Food Science + Technology, 2013, vol. 49, pp. 641 – 649.
- 82.** Juodeikiene Grazina, Dovile Klupsaite, Daiva Zadeike, Dalia Cizeikiene, Ieva Vidziunaite, Elena Bartkiene2 & Darius Cernauskas *Bioconversion of agro-industrial by-products to lactic acid using Lactobacillus sakei and two Pediococcus spp. Strains*. International Journal of Food Science + Technology, 2016, vol. 51, pp. 2682 – 2691.
- 83.** Lietuvos standartizacijos departamentas [LST EN ISO 20483:2007]. *Varpinių ir ankštinių javų grūdai. Azoto kiekio nustatymas ir žalių baltymų kiekio apskaičiavimas*, 2007.
- 84.** Jayasena, V., H.J. Chih ir S.M. Nasar-Abbas. *Functional Properties of Sweet Lupin Protein Isolated and Tested at Various pH Levels*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2010, vol. 6(2), pp. 130-137.
- 85.** Vidmantienė D., G. Juodeikienė „Kai kurie biologiniai grūdinės žaliavos fermentacijos procesų inhibitoriai ir jų vertinimo aspektai“. Baltymų elektroforezė, 2012, pp 97 – 104.
- 86.** Naczka, M., L.J. Rubin ir F. Shahidi, *Functional properties and phytate content of pea protein preparations*. Journal of Food Science, 1986, vol. 51, pp. 1245-1247.
- 87.** Sathe, S.K., S.S. Desphande ir D.K. Salunkhe, *Functional properties of lupin seed (Lupinus mutabilis) proteins and protein concentrates*. Journal of Food Science. 1982, vol. 47, pp. 491-497.
- 88.** Anwar, A. ir M. Saleemuddin. *Regulation of digestive proteolytic activity in the larvae of Spilosoma obliqua (Lep., Arctiidae)*. Journal of Applied Entomology. 2001, vol. 125, pp. 577-582.
- 89.** Lietuvos standartizacijos departamentas [LST EN ISO 4833:2003]. *Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis metodas. Kolonijų skaičiavimo 30 °C temperatūroje metodas*, 2003.
- 90.** Eliana P. Chagas. Luiz G. Santoro *Globulin and albumin proteins in dehulled seeds of three Phaseolus vulgaris cultivars*. Plant Foods for Human Nutrition, 1997, vol 51, pp. 17 – 26.

- 91.** Sosulski FW, McCurdy AR.. *Functionality of flours, protein fractions and isolates from field peas and faba bean*. Journal of Food Science, 1987, vol. 52, pp. 1010-1014.
- 92.** Megazyme International Ireland, Wicklow, Ireland. D – Lactic acid and L –Lactic acid assay procedures.
- 93.** Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959 vol. 31(3), pp. 426–428.
- 94.** Optima 7 User Manual, MRU GmbH, Vokietija.
- 95.** Bartkiene Elena, Ida Jakobsonsone, Iveta Pugajeva, Vadims Bartkevics, Daiva Zadeike, Grazina Juodeikiene *Reducing of acrylamide formation in wheat biscuits supplemented with flaxseed and lupine*. Food Science and Technology. 2016, vol. 65, pp. 275-282.

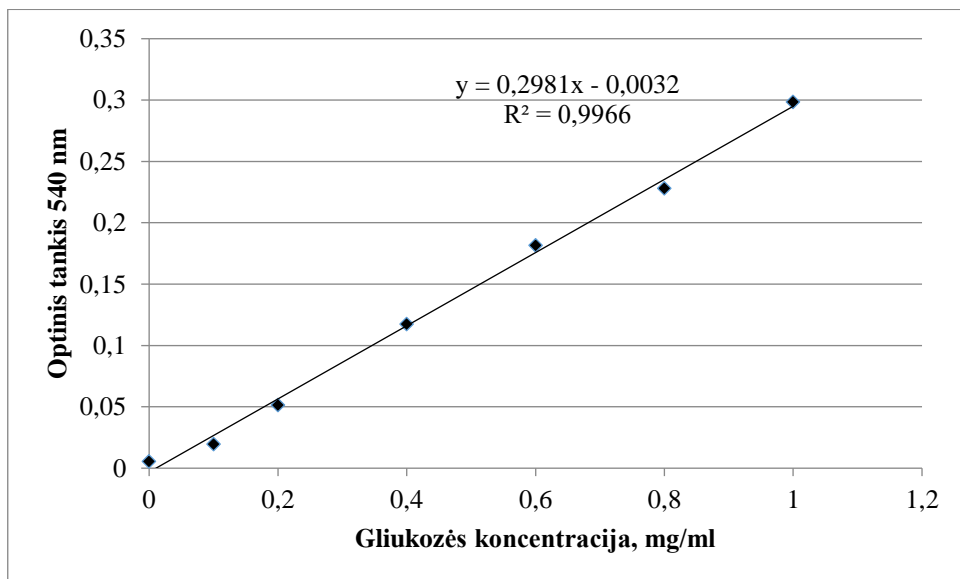
## Priedai

### I priedas



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

### II priedas



45 pav. Standartinė kreivė. Absorbcijos verčių priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos tirpale