



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Rūta Baurėnaitė

**ULTRAGARSINIO POVEIKIO ĮTAKA ŽIRNIŲ SĖKLŲ
BALTYMINĖMS MEDŽIAGOMS IR FUNKCINĖMS
SAVYBĖMS KIETAFAZĖS FERMENTACIJOS SĄLYGOSE**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Prof. Habil. Dr. Gražina Juodeikienė

KAUNAS, 2018

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**ULTRAGARSINIO POVEIKIO ĮTAKA ŽIRNIŲ BALTYMINĖMS
MEDŽIAGOMS IR FUNKCINĖMS SAVYBĖMS KIETAFAZĖS
FERMENTACIJOS SĄLYGOSE**

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

Vadovas

(parašas) Prof. Habil. Dr. Gražina Juodeikienė
(data)

Recenzentas

(parašas) Dr. Daiva Žadeikė
(data)

Projektą atliko

(parašas) Rūta Baurėnaitė
(data)

KAUNAS, 2018



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Rūta Baurėnaitė

(Studento vardas, pavardė)

Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių sėklų baltyminėms medžiagoms ir funkcinėms savybėms kietafazės fermentacijos sąlygose“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 18 m. birželio _____ d.
Kaunas

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

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Turinys

Santrumpos.....	9
Įvadas	10
1. Literatūros apžvalga	12
1.1. Žirnių chemijos savitumas	12
1.1.1. Žirnių panaudojimas maisto pramonėje	13
1.1.2. Baltyminių medžiagų funkcinės savybės	14
1.1.3. Baltyminių medžiagų išskyrimas ir panaudojimas.....	17
1.2. PRB kietafazės fermentacijos panaudojimo galimybės	19
1.2.1. Pieno rūgšties bakterijos, jų charakteristika	19
1.2.2. Žirnių cheminės sudėties pokyčiai fermentacijos metu	21
1.3. Ultragarso panaudojimo galimybės fermentacijos procesuose	22
2. Tyrimo objektai ir metodai.....	24
2.1. Tyrimų kryptys.....	24
2.2. Tyrimo objektai	26
2.3. Tyrimų metodai	29
2.3.1. pH ir BTR įvertinimas.....	29
2.3.2. Spektrofotometriniai metodai.....	29
2.3.3. Antimonybinių faktorių nustatymo metodai	31
2.3.4. Baltyminių medžiagų analizės metodai.....	32
2.3.5. Baltymų/miltų funkcinų savybių įvertinimas.....	35
2.3.6. Bendro mikroorganizmų skaičiaus (BMS) nustatymas.....	37
2.3.7. Matematinė statistinė duomenų analizė	38
3. Rezultatai ir jų aptarimas.....	39
3.1. Žirnių produktų panaudojimas PRB kietafazės fermentacijos procesuose	39
3.1.1. Terpės pH ir BTR pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu.....	39
3.1.2. Pieno rūgšties D(-) ir L(+) izomerų įvertinimas PRB kietafazės fermentacijos metu	41
3.2. Proteazių aktyvumo pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu.....	43
3.3. Žirnių produktų baltyminių medžiagų, funkcinų savybių ir pasisavinamumo pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu	43
3.3.1. Baltyminių medžiagų pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu	43
3.3.2. Baltymų proteazių inhibitorių aktyvumo ir virškinamumo pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu	46
3.3.3. Baltyminių medžiagų funkcinų savybių pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu	48

3.4. Gelių klamos analizė PRB kietafazės fermentacijos metu.....	53
3.5. Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių produktų sudėčiai ir technologinėms savybėms PRB KF sąlygose	54
3.5.1. Ultragarsinio apdorojimo įtaka mikrobiologinės taršos mažinimui	54
3.5.2. Ultragarsinio poveikio įtaka proteazių aktyvumų pokyčiams PRB KF sąlygose	55
3.5.3. Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių produktų baltyminių medžiagų, funkcinių savybių ir antimonybiniams pokyčiams PRB KF sąlygose	56
3.5.3.1. Ultragarsinio poveikio įtaka baltyminių medžiagų pokyčiams PRB KF sąlygose	56
3.5.3.2. Ultragarsinio poveikio įtaka baltymų virškinamumo ir proteazių inhibitorių aktyvumui PRB KF sąlygose.....	58
3.5.3.3. Ultragarsinio poveikio įtaka baltyminių medžiagų funkcinėms savybėms PRB KF metu	59
3.5.4. Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių baltyminių medžiagų gelių klampumui PRB KF sąlygose	63
Išvados.....	64
Literatūros sąrašas	66
Priedai.....	73

Bautrėnaitė, Rūta. Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių sėklų baltyminėms medžiagoms ir funkcinėms savybėms kietafazės fermentacijos sąlygose. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovė prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: *žirnių miltai, ultragarsinis apdorojimas, pieno rūgšties bakterijos, kietafazė fermentacija, mikrobiologinė tarša, baltyminės medžiagos, funkcinės savybės*

Kaunas, 2018. 73 p.

SANTRAUKA

Darbo tikslas – ištirti vietinėse sąlygose auginamų žirnių (*Pisum savitum*) genotipus, atrenkant didžiausiu baltymų kiekiu pasižyminčią žaliavą ir įvertinti ultragarso įtaką žirnių produktų baltyminėms medžiagoms, funkcinėms savybėms ir maistinei vertei PRB KF sąlygose.

Nustatyta, jog žirnių produktų frakcionavimas pagal geometrinius požymius yra efektyvi priemonė, siekiant išgauti didžiausiu baltymų kiekiu pasižyminčią frakciją: po klasifikavimo sietais V frakcijoje ($\varnothing < 0,5$ mm) žirnių produktų baltymų kiekis nustatytas 3,44 % didesnis, nei I frakcijoje ($\varnothing \geq 2$ mm). Eksperimento metu nustatyta reikšminga ultragarsinio poveikio įtaka žirnių produktų mikrobiologinės taršos mažinimui: po 60 min. apdorojimo ultragarsu (37 kHz) bendras mikroorganizmų skaičius sumažėjo ~5 kartus. Ultragarsu paveiktuose žirnių produktuose prieš PRB KF bendrų baltymų kiekis nustatytas vidutiniškai 3 % mažesnis, o tirpiųjų baltymų kiekis 2 % didesnis, nei PRB KF mėginiuose be ultragarsinio apdorojimo.

Vertinant žirnių produktų antimonybinius faktorius nustatyta, jog PRB KF, lyginant su kontrole, padidimo žirnių baltymų *in vitro* virškinamumą (13 %), o proteazių inhibitorių aktyvumą sumažino (5 %), kai tuo tarpu ultragarsinis poveikis analizuojamiems kriterijams įtakos neturėjo. Pastebėta, jog ultragarsinis apdorojimas PRB KF sąlygose sumažino proteazių aktyvumą 2 kartus, skirtingai nei PRB KF mėginiuose be ultragarsinio apdorojimo – proteazių aktyvumas didėjo tokiu pačiu laipsniu. Nustatyta, kad tiek PRB KF, tiek ultragarsas turėjo teigiamos įtakos žirnių produktų emulgavimo ir putų sudarymo pajėgumui. Tačiau gelių, ruošiamų iš ultragarsu apdorotos žaliavos, susidarymui reikėjo mažesnės baltymų koncentracijos (10 %), nei be ultragarsinio apdorojimo (12 %). Ultragarsu paveiktuose žirnių produktuose prieš PRB KF gelių klampumas nustatytas vidutiniškai 3 % didesnis, nei PRB KF mėginiuose be ultragarsinio apdorojimo.

Tokiu būdu, atlikti tyrimai įrodo, jog ultragarsinis poveikis galėtų būti svarbi technologinė priemonė siekiant sumažinti fermentuojamos augalinės žaliavos mikrobiologinę taršą ir pagerinti baltymų funkcinės savybes.

Bautrėnaitė, Rūta. Effect of ultrasound on pea seed protein substances and functional properties during solid state fermentation. 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: *peas, ultrasonic treatment, lactic acid bacteria, solid state fermentation, microbiological contamination, protein substances, functional properties*

Kaunas, 2018. 73 p.

SUMMARY

The aim of this thesis is to investigate genotypes of peas (*Pisum sativum*) cultivated in local conditions by selecting the most protein-rich raw materials and by analysing ultrasound impact on protein substances in peas, their functional properties and nutrition value under LAB solid state fermentation conditions.

It was found out that fractioning of pea products on the basis of their geometrical characteristics is an effective way to obtain the fraction with the highest protein content: in the V fraction ($\varnothing < 0,5$ mm) pea products protein content was higher by 3,44 % if compared to the I fraction ($\varnothing \geq 2$ mm). The experiment results show a significant ultrasound impact on the reduction of microbiologic pollution in pea products: after ultrasound treatment for 60 minutes (37 kHz), the total count of microorganisms reduced five times. The amount of total protein in the ultrasound treated LAB solid state fermentation pea products was found to decrease on average by 3 % and the amount of soluble protein to increase by 2 % comparing to the LAB solid state fermentation samples that received no ultrasound treatment.

Evaluation the anti-nutritional factors of the pea products helped determine that in comparison to the control group LAB solid state fermentation has increased digestibility of the pea proteins *in vitro* by 13 % and reduced the activity of protease inhibitors by 5 %, whereas the ultrasound treatment had no significant effect on the analyzed criteria. It was noticed that the ultrasound treatment under the LAB solid state conditions has decreased the protease activity by half, as opposed to the LAB solid state fermentation samples with no ultrasonic exposure, where the protease activity has been increasing at the same pace. It has also been determined that both LAB solid state fermentation and the ultrasound treatment had positive effects on the emulsification and foam formation potentials of the pea products. However, formation of gels from ultrasonic treated raw materials required a lower protein concentration (10 %) if compared to LAB solid state fermentation pea samples without ultrasonic treatment (12 %). The average gel viscosity of the ultrasound treated LAB solid state fermentation pea products has been

determined to be on average 3 % higher than the viscosity of the LAB solid state fermentation samples with no ultrasonic exposure.

In this way, the studies suggest that ultrasonic treatment is an important measure in reducing microbiological contamination of fermented raw materials of vegetable origin and functional characteristics of proteins.

Santrumpos

BMS – bendras mikroorganizmų skaičius;

KF – kietafazė fermentacija;

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;

Pp – *Pediococcus pentosaceus* KTU 05-9;

PRB – pieno rūgšties bakterijos;

PV – proteazinio aktyvumo vienetai;

SDS – PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė;

s.m. – sausosios medžiagos;

TEMED – tetrametiledilendiaminas;

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometanas;

ULT – ultragarsinis poveikis;

ULT + KF – ultragarsinis poveikis kietafazės fermentacijos sąlygose.

Ivadas

Pastaraisiais metais keičiantis žmonių įpročiams, gyvenimo būdui, pasauliniu mastu plintant sveikos gyvensenos idėjoms, vartotojai vis labiau linksta prie sveikų ir ekologiškų maisto produktų naudojimo. Gamintojai, pardavėjai, o ypač maisto gamybos bei perdirbimo įmonės privalo imtis atitinkamų veiksmų bei reaguoti į šiuos pokyčius, nes priešingu atveju bus nepajėgūs sėkmingai konkuruoti ir išsilaikyti rinkoje. Atsižvelgdamos į šių dienų vartotojų poreikių kaitą maisto pramonės įmonės didesnę dėmesį turėtų skirti augalinių produktų kokybei, įtraukiant į jų sudėtį vietinėse sąlygose auginamus pupinius augalus, pvz., žirnius.

Žirniai vietos ūkininkų yra mėgiami dėl jų nereiklumo dirvai ir klimatinėms sąlygoms, taip pat dėl to, kad jų auginimas teigiamai veikia dirvos struktūrą. Maisto pramonėje žirniai itin vertinami dėl savo gebėjimo sukaupti daug vertingų baltymų bei sudėtyje turimų naudingų organizmui maistinių ir mineralinių medžiagų, angliavandenių, vitaminų, amino ir riebalų rūgščių. Žirniuose esančios medžiagos yra svarbios ląstelių gyvybingumui, teigiamai veikia nervų sistemą, gerina medžiagų apykaitą ląstelėse, mažina riebalų bei cholesterolio kiekį kraujyje, šalina virškinimo metu susikaupusius toksinus, suteikia sotumo pojūtį.

Šalies maisto pramonės įmonės suinteresuotos perdirbti vietinę augalinę žaliavą, nes ją lengviau įsigyti, kontroliuoti kokybę, mažesnės su žaliavos transportavimu susijos išlaidos. Lietuvos dirvožemio ir klimato sąlygos yra palankios žirnių auginimui, tačiau jų baltyminės medžiagos išnaudojamos nepakankamai efektyviai. Iki šiol žirnių sėklos perdirbamos konservuotų produktų ir kruopų gamybai, tuo tarpu didžioji jų dalis yra eksportuojama arba naudojama pašarams.

Nepriklausomai nuo žirnių naudingumo sveikatai, šių augalų ir jų ingredientų panaudojimo maiste sėkmingumas priklauso nuo žirnių baltyminių medžiagų funkcinių savybių, tokių kaip tirpumas, klampumas, tekstūra, putojimas ir kt. Kita vertus šiuose augalų produktuose esti fermentų inhibitorių, kurių inaktyvavimas yra aktuali ir spręstina problema. Tarptautinėje praktikoje, pvz., sojos sėklų perdirbimui, taikomi fermentacijos procesai. Fermentacijos procesas ne tik padeda ilgiau išlaikyti maisto produktų kokybę, bet ir leidžia praturtinti produktus vertingais maistiniais komponentais ir padidinti baltyminių medžiagų pasisavinamumą. Analogiškos biopriemonės galėtų būti parinktos ir pritaikytos žirnių baltyminių medžiagų funkcionalumo didinimui. Jau pačiame žirnių perdirbimo technologiniame procese būtų tikslinga taikyti malinio frakcionavimo principą, siekiant padidinti gautų produktų pridėtinę vertę ir nukreipti juos tikslingai tolimesniam bioapdorojimui.

Pastaruoju metu vis didesnis dėmesys skiriamas sausiesiems baltyminių medžiagų koncentravimo metodams, kurie yra ekonomiškai pranašesni ir labiau priimtini maisto pramonės sektoriui. Pasitelkiant fermentacijos procesus žirnių sėklų antimitybinių komponentų mažinimui

ir jų pasisavinamumo didinimui siektina orientuotis į vietinėse sąlygose paplitusį ir vartotojui priimtina pieno rūgšties bakterijų sąlygojamą fermentacijos procesą. Jo realizavimui tikslinga išnaudoti Respublikos mokslininkų patirtį kietafazės fermentacijos vystymo srityje bei turimas antimikrobinų pieno rūgšties bakterijų kolekcijas. Pažymėtina, kad kietafazės fermentacijos procesų trukmė, esant drėgmės trūkumui fermentacijos terpėje, yra ilgesnė nei tradiciniu atveju. Tokiu būdu spręstina kietafazės fermentacijos efektyvumo didinimo problema, taikant alternatyvius terminius augalinės žaliavos apdorojimo būdus. Vienas iš jų galėtų būti žaliavos apdorojimas ultragarso.

Visgi ultragarso panaudojimo fermentacijos procesuose galimybės iki šių dienų dar nėra galutinai ištytos, todėl tampa labai svarbu ir aktualu toliau nagrinėti ir vertinti ultragarso poveikį žirnių baltyminių medžiagų savybėms, nes nuo atliktų tyrimų rezultatų priklausys, kokiomis kryptimis bus galima plėsti esamas ir identifikuoti naujas žirnių baltymų panaudojimo maisto pramonėje sritis.

Tyrimo tikslas – įvertinti ultragarsinio poveikio įtaką mikrobiologinei taršai, žirnių baltyminėms medžiagoms ir funkcinėms savybėms kietafazės fermentacijos sąlygose.

Spręstini pagrindiniai uždaviniai:

1. Iširti vietinėse sąlygose auginamų žirnių genotipus, atrenkant bioapdorojimui didžiausiu baltymų kiekiu pasižyminčią žaliavą.
2. Įvertinti žirnių produktų frakcionavimo pagal geometrinius požymius įtaką baltymų pasiskirstymui atskirose frakcijose.
3. Įvertinti ultragarsinio poveikio įtaką žirnių produktų mikrobinei taršai.
4. Įvertinti ultragarsinio poveikio įtaką žirnių produktų baltymų (bendrajam bei tirpiųjų baltymų) kiekiui ir proteolitinio aktyvumo pokyčiams KF sąlygose.
5. Įvertinti ultragarsinio poveikio įtaką žirnių sėklų baltyminių medžiagų antimonybinių faktorių pokyčiams KF sąlygose.
6. Įvertinti ultragarsinio poveikio įtaką žirnių produktų baltyminių medžiagų funkcinėms savybėms (emulgavimui, putų stabilumui ir gelių sudarymui) KF sąlygose.
7. Įvertinti ultragarsinės įrangos panaudojimo galimybes baltymingų gelių iš žirnių izoliato susidarymui, kontroliuojamam akustiniu klamos fiksavimo prietaisu.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Žirnių chemijos savitumas

Žirniai – vieni iš pirmųjų žmonių augintų augalų, šiomis dienomis plačiai išplitusių visame pasaulyje [1], o pastaraisiais metais dėl žalinimo reikalavimų pradėti plačiai auginti ir Lietuvoje – ne tik ekologiniuose, bet ir intensyvios gamybos ūkiuose [2].

Žirniai (*Pisum sativum L.*) – tai vienmetis žolinis pupinių (*Fabaceae*) šeimos augalas. Žirnio stiebas netvirtas, laipiojantis arba gulščias, 30 - 100 cm ilgio, kylančia viršūne. Žirnio lapai žalsvi, su pilkomis apnašomis, su dviem dideliais prielapiais, prie pagrindo užsibaigia ūseliais. Žiedai balti, kartais – rožiniai su purpuriniais sparneliais. Kekės paprastai būna dvižiedės. Augalas žydi birželį – liepą. Ankštyse sėklos gali būti baltos, gelsvos arba žalsvos, apvalios arba kampuotos – formą gali pakeisti nokstant. [3].

Žirniai itin vertinami todėl, kad sukaupia daug vertingų baltymų. Be to, jie nėra reiklūs temperatūrai, nors ekstremali temperatūra ir netinkamas drėgmės režimas gali neigiamai sąlygoti žirnių fiziologinius procesus ir derlių [4]. Taigi galima teigti, kad žirniai – tai klimatinėms sąlygoms ir dirvai pernelyg nereiklūs vienmečiai ankštiniai augalai, teigiamai vertinami dėl savo sudėtyje turimų maistinių medžiagų. Būtent žirnių maistinės, biologinės ir pašarinės savybės lėmė platų šių augalų paplitimą pasaulyje ir Lietuvoje.

Žirniai priklausomai nuo genotipo gali būti cukriniai (šparaginiai) ir raukšlėtieji (gliudomieji). Šparaginių žirnių valgoma visa ankštis su sėklomis, o gliudomieji turi kietą plėvelę ankšties viduje, todėl jų vartojami tik grūdai. Pagal brandimo laiką žirniai skirstomi į ankstyvuosius, vidutinio ankstyvumo ir vėlyvuosius. Pagal aukštį žirniai gali būti žemi, vidutinio aukščio ir aukšti [5].

Žirniai pagal paskirtį taip pat gali būti skirstomi į maistinius ir pašarinius, iš kurių dažniausiai sėjami valgomieji, arba sėjamieji (*Pisum Sativum L.*) ir pašariniai (*Pisum arvense L.*) žirniai. Sėjamieji valgomieji žirniai tinka tiek maistui, tiek ir pašarui, o pašariniai – tik pašarui, dažniausiai žaliajai masei [6], [7].

Taigi žirniai turi platų taikymo spektrą. Jie taip pat yra vertingas priešsėlis kitiems žemės ūkio augalams dėl azoto iš oro fiksacijos, dalyvaujant šiame procese gumbelinėms bakterijoms *Rhizobium spp.* Pupiniai augalai, priklausomai nuo *Rhizobium spp.* ir dirvos pH ir/ar KCl, dirvoje gali sukaupti azoto nuo 160 iki 264 kg/ha⁻¹. Apie 75 % sutelkto azoto augalai kaupia sėklose ir sunaudoja savo reikmėms, o su augalų likučiais bei šaknimis palieka surišto azoto > 50 kg/ha⁻¹. Žirniai, kaip ir kiti pupiniai augalai, yra puikus priešsėlis migliniams augalams. Javai, auginami po žirnių, duoda 10 – 43 % derliaus padidėjimą. Be to, naudingos yra ir gumbelinės bakterijos, kurios pasižymi antimikrobinėmis savybėmis, slopina patogeninių mikromicetų vystymąsi [1]. Kaip matyti, žirnių auginimas reikšmingas ne tik maisto ar pašarų gamyboje, bet

ir žemės ūkio produktyvumo didinimui. Šis augalas teigiamai veikia dirvos struktūrą, todėl gali pasitarnauti kaip puikus priešsėlis kitiems toje dirvoje auginamiems augalams [8].

Žirniai turi didelę maistinę vertę. Žirniuose yra daugiau nei mėsoje vertingų baltymų (22 – 26 %), angliavandenių (ypač gausu balastinių medžiagų), mineralinių medžiagų (K, Ca, P, Mg, Mn, Cu, Co, Ni, As, I, F ir kt.), karoteno, vitaminų B₁, B₂, B₆, PP, C, K, E, inozito, cholino, niacino, svarbių komponentų medžiagų apykaitai [3]. Žirniuose gausu baltymų, kuriuose yra ne tik beveik visos nepakeičiamos aminorūgštys (cistinas, lizinas, triptofanas, argininas, metioninas), bet ir riebalų rūgštys, vitaminai bei mineralinės medžiagos, nulemiančios grūdų visavertiškumą, todėl žirnių sėklos yra itin vertingos [9]. Baltymų kiekis, esantis žirnių augalų sėklose, pateiktas 1 lentelėje:

1.1 lentelė. Žirnių cheminė sudėtis

Rodiklis	Žirniai
Sausosios medžiagos, g	880
Žali baltymai, g	251
Žali riebalai, g	15
Lašteliena, g	67
Ca, g	1,2
P, g	4,4
Na, g	0,4
Krakmolas, g	478
Cukrus, g	61
Karotinas, mg	-
Lizinas, g	61
Triptofanas, g	2,9
Metioninas + cistinas, g	5,8
Cu, mg	7,53
Zn, mg	38,3

Žirniui būdingas pakankamas lizino ir treonino virškinamumas, tačiau santykinai prastas sieros turinčių amino rūgščių virškinamumas. Pažymėtina, kad kol kas gana mažai žinoma apie kiekvieno ankštinio augalo sėklų baltymų virškinamumą [24].

1.1.1. Žirnių panaudojimas maisto pramonėje

Žirnių panaudojimas maisto gamyboje gali būti labai įvairus. Jie gali būti valgomi žali, virti (sriubos, garnyrai, salotos, košės ir kt.), iš žirnių gaminamos tyrės bei dauguma vegetariškų patiekalų. Ypač yra vertinamas žaliųjų žirnelių porūšis, kadangi jų ankštyse nėra kieto ir nevirškinamo pergamentinio sluoksnio, o ankštys išlieka sultingos iki pat sunokimo. Tad tokie žirniai vartojami su ankštimis. Žirniai yra pakankamai kaloringi: 100 g žalių žirnelių teikia 70 kcal., džiovintų – 300 kcal. Būtina žinoti, kad namų sąlygomis konservuojant žiemai žirnius,

juos būtina du kartus pasterizuoti +85 – 90 °C temperatūroje, kadangi pasterizuojant pirmą kartą žūva mikroorganizmai, bet išlieka jų sporos, iš kurių vėl gali išsivystyti bakterijos [3].

Žirnių miltai ar baltymai gali būti panaudoti košių, dribsnių, duonos ir kitų kepinių gaminiuose, mėsos ir pieno produktuose. Žirnių miltai, kaip baltymų priedai, naudojami daugelio produktų (makaronų, duonos, sausainių) gamybai. Žirnių miltais (arba 15 % jų koncentratu) mielinėje duonoje galima keisti kvietinius miltus. Kepti gaminiai, makaronų produktai, kurie yra pagaminti vien tik iš kvietinių miltų, neturi reikiamo, pagal racionalios mitybos reikalavimus, baltymų kiekio, todėl šių produktų gamyboje gali būti naudojami žirnių baltymai. Žirnių baltymais papildytus makaronus lengviau gaminti, jie turi geresnį baltymų kiekį ir yra šiek tiek kietesni nei tie, kurie pagaminti vien tik iš kviečių. Tačiau žirniais papildyti makaronai gali būti geltonesnės spalvos ir kiek kitokio kvapo, nei vien tik pagaminti iš kviečių, ko kai kurie vartotojai gali nepageidauti ir laikyti nepriimtiniu. Žirnių baltymai, kaip pieno baltymų pakaitalas, gali būti naudojami gaminant miltų mišinius, skirtus sausainių gamybai. Tešla, kurioje yra žirnių miltų ar žirnių baltymų koncentrato, dažniausiai yra lipnesnė, ją sunkiau apdoroti. Be to, kepinių gamyboje naudojami žirnių miltai gali turėti neigiamos įtakos gatavų kepinių skoninėms savybėms. Žirniai sėkmingai gali būti panaudojami ir mėsos gaminiuose: mėsos padažų, mėsainių, dešrelių, dešrų gamyboje. Žirnių baltymų įtraukimas į mėsos produktų sudėtį pagerina gaminių maistinę vertę, palengvina kai kurių tradicinių priedų išskyrimą. Tyrimais įrodyta, kad žirnių baltymų panaudojimas mėsos pramonėje teigiamai veikia visus kokybinius gaminių požymius, nors nežymiai keičia produkcijos skonį ir aromatą. Be minėtų sričių, žirnių baltymai taip pat gali būti panaudoti dirbtinio pieno ir pieno pakaitalų gamyboje. Žirnių miltai ir baltymai gali būti naudojami gaminant varškę, sriubas, užkandžius ir kitus maisto produktus [10], [11].

1.1.2. Baltyminių medžiagų funkcinės savybės

Vieni svarbiausių augalinių baltymų platesnio naudojimo aspektų – tai jų funkcinės savybės, nuo kurių priklauso pritaikymo sritis ir/ar naujas baltyminis ingredientas bus konkurencingas rinkoje. Būtent nuo funkcinių savybių, kurios keičiasi dėl baltymų biocheminių, struktūros ir perdirbimo sąlygų bei aplinkos pokyčių, priklauso sėkmingas žirnių baltymų ingredientų panaudojimas maisto gamyboje [12].

Maisto baltymų funkcinės savybės galima apibūdinti kaip fizikinių ir cheminių savybių visumą, kuri suteikia informacijos apie baltymų funkcionalumą, t.y., kokia bus jų įtaka maisto perdirbimo, saugojimo, paruošimo ir vartojimo metu. Nuo žirnių baltyminių medžiagų funkcinių savybių priklauso maisto ar maisto komponento savybės (išskyrus jo maistingumą), turinčios įtakos maisto produkto priimtinumui. Svarbu pažymėti, kad ypač svarbios žirnių baltyminių

medžiagų funkcinės savybės yra tirpumas, brinkimas, klampumas, tekstūra, vandens ir riebalų absorbcija, emulsijos ir putų sudarymo pajėgumas bei jų stabilumas [13]. Svarbiausios žirnių baltyminių medžiagų funkcinių savybių charakteristikos pateiktos 1.2 lentelėje:

1.2. Žirnių baltyminių medžiagų funkcinių savybių charakteristikos

Savybės	Funkcinės charakteristikos
Juslinės	Spalva, aromatas, kvapas, tekstūra, skonis
Hidratinės	Tirpumas, brinkimas, drėgmės sugeriamumas, vandens absorbcija, tirštėjimas, gelių susidarymas, sinerezė
Paviršinės	Emulsavimas, putų susidarymas (prisotinimas dujomis – plakimas), lipidų surišimas, skonio ir aromato formavimasis
Struktūrinės	Elastingumas, kohezija klampa, adhezija, agregacija, lipnumas/glitumas, tekstūravimasis
Kitos	Suderinamumas su priedais, fermentinis ir oksidacinis aktyvumas

Putų susidarymo pajėgumas ir stabilumas. Baltymų putos yra labai svarbios įvairių maisto produktų gamyboje, pvz., gaminant morengus, sufle, plaktus garnyrus, desertus, fermentuotus kepinius. Putų susidarymo ar plakimo savybės parodo baltyminių medžiagų gebėjimą sudaryti smulkiadispersines sistemas, gebančias įterpti orą ir suformuoti stabilias putas. Baltyminių medžiagų gebėjimas putoti paprastai vertinamas pagal plakamos masės tūrinės apimtys padidėjimą, o putų stabilumas – gebėjimą išlaikyti tūrinę apimtį. Putų stabilumas siejamas su sinerezės procesu, kuris vertinamas pagal išsiskyrusio skysčio kiekį iš laikomos putinės masės [13].

Žirnių baltymų frakcijos (turinčios daug albuminų) pasižymi geromis putojimo savybėmis ir yra panašios su kiaušinio baltymu [14]. Lyginant su kitais augaliniais baltymais, sojos baltymų putojimo savybės yra ištyrinėtos geriausiai, kai tuo tarpu duomenų apie vietinėse sąlygose auginamų žirnių genotipų putojimo savybes pateikiama mažai.

Tyrimais įrodyta, kad žirnių baltymų putų funkcionalumui įtakos turi daugelis veiksnių, tokių kaip pH, temperatūra, druskų priemaišos, cukrus, o taip pat gamybos būdas bei baltyminių medžiagų kilmė. Nustatyta, kad purkštuvinėje džiovykloje pagaminti žirnių baltymų izoliatai sąlygoja didesnį putų susidarymą nei sojų baltymų izoliatai. Žirnių baltymų koncentratai išgauti klasifikuojant oru pasižymi geru putų susidarymo pajėgumu, tačiau putos yra mažiau stabilios. Įrodyta, kad sudygusių žirnių baltymų izoliatai pasižymi geresnėmis putų susidarymo savybėmis. Be to, iš tokios žaliavos pagamintų baltymų preparatų, putų susidarymo pajėgumas yra didesnis nei vicilino (7S globulinas), tačiau putoms ši baltyminė medžiaga suteikia daugiau stabilumo [15]. Taip pat β -konglicininas dėl mažesnės molekulės ir lankstesnės struktūros pasižymi geresnėmis putojimo savybėmis nei glicininas [16]. Tam, kad augaliniai baltymai būtų aktyvūs putojimo agentai, būtinos struktūrinės modifikacijos, kurias galima pasiekti keičiant pH arba taikant fermentinę hidrolizę.

Emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas. Emulsijos – tai dispersinė dviejų nesimaišančių skysčių sistema, iš kurių viena smulkių lašelių pavidalu yra disperguota kitoje. Emulsija nėra stabili, jei jos gamybai nėra naudojamos stabilizuojančios medžiagos. Kai riebalų lašeliai yra apgaubti vandeniu, šių fazių skiriamoje riboje susidaro dideli įtempimai. Jiems sumažinti yra naudojami emulsikliai. Emulsiklių molekulėms būdinga, kad vienas jų poliūs pasižymi hidrofilinėmis savybėmis, kitas - hidrofobinėmis arba lipofilinėmis savybėmis. Kai emulsiklio yra pakankamai, jis apgaubia riebalų lašelius; jų hidrofiliniai poliai būna nukreipti į išorę (link vandens molekulių), o lipofiliniai - į riebalų lašelio pusę [17].

Emulsuojančiomis baltymų savybėmis paprastai įvardijama: (i) gebėjimas emulsuotis arba emulsavimosi aktyvumas ir (ii) emulsijos stabilumas [13]. Baltymų emulsavimosi savybės yra susijusios su gebėjimu stabilizuoti aliejaus ir vandens emulsiją. Ši savybė labai svarbi daugelio maisto produktų, tokių kaip mėsos, sriubų, pyragų, majonezų, salotų padažų, gamyboje [15].

Emulsijos sudarymo pajėgumas apibūdina baltymų gebėjimą sudaryti emulsiją, kuri esant atitinkamoms sąlygoms, tam tikrą laiko tarpą išlieka nepakitusi. Žirnių baltymų emulsijos susidarymo pajėgumui įtakos turi baltymų koncentracija, tirpumas, terpės pH ir druskų priemaišos. Taip pat didelę reikšmę emulsijos susidarymo pajėgumui turi įrangos, naudojamos emulsijos ruošimui, modelis, talpyklos forma, aliejaus priedo kiekis, naudojamo aliejaus rūšis ir baltymų savybės. Taigi emulsijos susidarymo savybės priklauso ne tik nuo tiriamų baltymų savybių, bet ir nuo kitų faktorių, tokių kaip gamybos būdo ir įrangos [13].

Atliktais tyrimais, nustatyta, jog žirnių baltymų izoliato emulsijos sudarymo aktyvumas yra panašus į sojos pupelių baltymų izoliatą. Pažymėtina, kad žirnių baltymų emulsijos sudarymo pajėgumas yra didesnis, kai žirniai prieš apdorojant baltymus jau būna sudygę [18].

Baltymų tirpumas. Geras baltymų tirpumas – tai viena iš būtinų baltymų funkcionalumo sąlygų, vertinamų taikant juos maisto produktų gamyboje, kur svarbus gelių formavimasis ar putų susidarymas [15].

Baltymų tirpumui įtakos turi pH, jonų tipai, tirpiklio poliškumas, ir apdorojimo sąlygos, pvz., temperatūra. Tyrimais įrodyta, kad žirnių baltymų preparatai turi didesnę tirpumą vandenyje nei kiti baltymų produktai, tokie kaip sojų baltymų izoliatas ar kviečių glitimas. Žirnių baltymai labai gerai tirpsta, esant rūgštinei terpei (pH 2) ir greitai jų tirpumas mažėja, kai pH didėja link izoelektrinio taško – pH 4-6. Tačiau faktinis žirnių baltyminių medžiagų tirpumas pH 5-9 srityje gali labai skirtis, priklausomai nuo specifinių baltymų savybių ir paruošimo būdo. Be to nustatyta, jog būgninėje džiovykloje išgauti baltymai paprastai yra mažiau tirpūs nei džiovinti purkštukinėje džiovykloje ar pagaminti liofilizuojant [13].

Vandenyje tirpiuose baltymuose didžioji dalis hidrofilinių sričių yra išsidėstę paviršiuje, tuo tarpu hidrofobinės sritys aptinkamos baltymų viduje. Baltymų tirpumui įtakos turi tirpikliai ir

apdoravimo sąlygos, kurios baltymuose sukelia hidrofilinių ir hidrofobinių sąveikų pokyčius [15].

Dar viena svarbi baltymų savybė – formuoti **gelius**. Gelių formavimosi metu baltymo molekulė išsivynioja, todėl hidrofobinės aminorūgščių dalys tampa labiau atviros. Jos persitvarko ir negrįžtamai jungiasi disulfidiniais ir vandenilniais ryšiais, sudaro hidrofobines ar van der Valso sąveikas. Jei baltymų koncentracija pakankama, formuojasi trimatė tinklinė struktūra, kurią stabilizuoja vandeniliniai ryšiai ir hidrofobinės sąveikos. Geliai pasižymi santykinai didele klampa, plastiškumu ir elastingumu. Svarbiausias veiksnys, turintis įtakos gelio formavimuisi yra baltymų koncentracija, nes gelių susidarymui nėra reikalingas didesnis jų tirpumas [18]. Esant didesnei baltymų koncentracijai, geliai, paprastai, susidaro stipresni. Gelių gali formuoti sferiniai baltymai, pvz. žirnių baltymai, esant tam tikroms sąlygoms (po kaitinimo ir denatūravimo). Paprastai tokio tipo gelis apibūdinamas kaip agreguota dispersinė sistema. Būtent po denatūravimo ir tolesnio šildymo baltymai sąveikauja su kitais baltymais bei formuoja gelių/ar koaguliavusią baltymų struktūrą. Kuri iš jų susiformuos priklauso nuo pradinės žaliavos ir gelių gamybos sąlygų: molekulinės masės, baltymų koncentracijos ir šildymo trukmės.

Žirnių baltymai daugiausiai formuoja silpnus, temperatūrinio poveikio rezultate sudarytus gelius. Jei baltymų denatūracijos laipsnis yra mažesnis, tuomet susidarys stipresni geliai. Šildymo ir aušinimo sąlygos turi mažesnę įtaką žirnių baltymų savybei susidaryti gelius, tačiau intensyvesnis šildymas (aukštesnė temperatūra) sąlygoja uždelstą gelių formavimąsi. Be to, intensyvesnis šildymas ir aušinimas mažina gelių elastingumą [13].

1.1.3. Baltyminių medžiagų išskyrimas ir panaudojimas

Žirniai – tai vienas svarbiausių “šaltojo sezono” metu vartojamų ankštinių augalų, paplitusių viso pasaulio sausumos regionuose. Pastaraisiais dešimtmečiais įvykę teigiami perdirbimo technologijų pokyčiai suteikė galimybę žirnius perdirbti į baltymų koncentratų arba izoliatus [11].

Pagrindinės žirnių sudedamosios dalys yra krakmolas ir baltymai, tačiau iš esmės žirnių sudėtis priklauso nuo konkretaus genotipo. Skirtingi žirnių genotipai gali turėti įtakos baltymų, riebalų, angliavandenių (skaidulinių medžiagų ir krakmolo) bei mineralinių medžiagų (angl. – „ash“) kiekiams. Baltymų kiekis žirniuose svyruoja nuo 13,3 % iki 39,7 % [13]. Baltyminės medžiagos iš žirnių gali būti išskiriamos sausuoju ir šlapiuoju būdu. Išskiriant baltymines medžiagas sausuoju būdu, gali būti naudojami sauso malimo arba aerodinaminio separavimo principai. Pilnos arba išlukštentos žirnių sėklos sumalamos tam, kad būtų galima gauti tam tikrą miltų išėigą ir toliau, panaudojant separavimą, išskirti baltymais turtingas frakcijas (“smulkesnes frakcijas“) ir turinčias didesnius krakmolo kiekius (“stambiasnes frakcijas“).

Daugelis žirnių baltyminių medžiagų išskyrimą tyrinėjusių mokslininkų nustatė, kad oro klasifikacijos metodas yra veiksmingas būdas išgauti baltymines medžiagas iš žirnių sėklų [19]. Svarbu pažymėti, kad baltymų ir krakmolo frakcijų sudėtis, susidariusi sauso malimo ir klasifikavimo oru metu, priklauso nuo technologinių parametrų, o taip pat nuo žirnių genotipo bei jų cheminės sudėties.

Nustatyta, kad mažesnis žaliavos drėgnis gali padidinti baltymų išeigą ir baltymų išsiskyrimo efektyvumą, tačiau sumažinti krakmolo išeigas (padidinti krakmolo kiekį baltymų frakcijoje). Manoma, kad tai sąlygoja smulkinimo metu padidintas sėklos trapumas. Nustatyta, kad pageidautinas žirnių drėgnis baltymų išsiskyrimui sausuoju būdu, turėtų būti ribose nuo 7 % iki 9 %. Tačiau sausuoju būdu negalima išskirti tokią baltymų koncentraciją, kokią leidžia pasiekti šlapieji baltymų išgavimo metodai, o taip pat gauti norimas funkcionaliąsias baltymų savybes [20].

Baltyminiai žirnių produktai (baltymų koncentratai, turintys apie 70 % baltymų ir baltymų izoliatai – apie 90 % baltymų) gali būti pagaminti, naudojant tiek sausuosius, tiek šlapiuosius būdus, kurie pradžioje buvo sukurti sojos pupelių perdirbimui, o pastaruoju metu taikomi ir žirnių perdirbimui.

Žemiau pateikiami šlapieji baltymų ekstrahavimo būdai ir jų charakteristikos.

Izoelektrinis baltymų nusodinimas. Norint pagaminti žirnių baltymų izoliatus, dažniausiai naudojamas Anson ir Pader (1957) patentuotas procesas. Po šarminio, vandeninio ar rūgštinio baltymų tirpinimo, netirpi medžiaga atskiriama centrifuguojant. Baltymų izoliatas nusodinamas izoelektriškai, kai i supernatantą pridedama rūgšties. Baltymų izoliato, išskirto izoelektriniu būdu, išeigai įtakos turi tokie veiksniai kaip miltų dalelių dydis, tirpinimo medžiaga ir pH. Įrodyta, kad didesnis dalelių dydis mažina baltymų kiekį. Naudojant natrio ir kalio hidroksidą baltymų tirpinimui, gaunama panaši baltymų išeiga. Tačiau nustatyta, kad naudojant kalcio hidroksidą, išgaunama mažiau žirnių tirpiųjų baltymų (apie 10 %) nei naudojant natrio hidroksidą. Įvertinant tai, augalinių baltymų išgavimui dažniausiai naudojamas natrio hidroksidas. Baltyminis produktas gali būti išdžiovintas purkštuvinėse džiovyklėse, būgninėse ar šaldymo būdu liofilizuojant. Išdžiovintas purkštuvinėse džiovyklose produktas turi šviesiausią spalvą ir pasižymi geriausiomis skoninėmis savybėmis nei išdžiovinti būgninėse džiovyklose ar šaldymo būdu. Šiuos reiškinius sąlygoja polifenolių oksidacija, kuri suteikia produktui tamsesnę spalvą [20].

Ultrafiltracija. Tai procesas, kurio metu baltymų atskyrimui naudojamos membranos [21]. Didelės molekulinės masės medžiagos sulaikomos, o vanduo ir mažos molekulinės masės medžiagos prasiskverbia pro membraną [22]. Šis procesas buvo pradėtas naudoti baltymų iš sojos pupelių išskyrimui. Nustatyta, kad ultrafiltracijos proceso metu gauta baltymų išeiga yra panaši

kaip ir naudojant izoelektrinį baltymų nusodinimo būdą, tačiau pagrindinis trūkumas, ribojantis šio proceso taikymą gamyboje, yra mažas srauto greitis ir nedidelis membranų pralaidumas, ypač esant didesnėms baltymų koncentracijoms [20].

Hidrofobinis procesas. Šis metodas (patentuotas Kanadoje) yra pagrįstas hidrofobinių ligandų ir baltymų molekulių hidrofobinių grupių sąveika. Didelės koncentracijos druskos tirpalas padeda geriau atskirti reikiamus baltymus [23]. Šio proceso metu, žirnių miltai ekstrahuojami druskos tirpalu, o netirpios baltymingos medžiagos pašalinamos centrifuguojant. Teigiama, kad norit išgauti labai didelį baltymų kiekį (95 %), gali būti kombinuojamas keletos ankštinių kultūrų rūšių perdirbimas [20].

1.2. PRB kietafazės fermentacijos panaudojimo galimybės

Ankštinių javų grūdų perdirbimo metu siekiama pagerinti sėklų maistinę vertę ir tam tikslui vienas efektyviausių technologinių sprendimų yra fermentacija. Fermentacija leidžia sumažinti antimonybinius faktorius ir tuo pačiu leidžia pagerinti produkto baltyminių medžiagų pasisavinamumą, praturtina produktus vertingais komponentais, pvz., vitaminais. Ankštinių augalų sėklos, įskaitant žirnių, gali būti fermentuojamos įvairiais mikroorganizmais tokiais kaip bakterijos ir grybai ir/ar jų mišiniais. Be to, maisto pramonėje fermentacija yra naudojama ne tik siekiant pagerinti gaminių maistinę vertę, bet ir juslines savybes [25].

Žirnių produktų, kaip maisto priedų panaudojimas, yra ribojamas dėl specifinių skoninių savybių [26]. Žirnių produktų fermentacija, naudojant pieno rūgšties bakterijas, gali pagerinti juslines savybes ir rasti platesnį pritaikymą maisto pramonėje. Pagal Stanisavljevic ir kt. [27] žirnių fermentacija (žirniai 4 valandas mirkyti ir 15 minučių virti, o po to fermentuoti 40 valandų prie 29 °C temperatūros) padidino baltymų ir lipidų kiekį galutinio mišinio sudėtyje, o skoninės savybės priklausė nuo žirnių mišinio sudėties.

Pastaruoju metu didelis dėmesys skiriamas probiotinėmis savybėmis pasižyminčioms PRB padermėms, padedančioms spręsti daugelį sveikatos problemų, tokių kaip dirgliosios žarnos sindromas, uždegiminė vidurių liga, bakterijų, parazitų ar antibiotikų sukeltas viduriavimas ir kt. [26].

Pienarūgštė fermentacija gali būti savaiminė arba kryptinga, sąlygota žinomų PRB padermių, ir ji gali būti taikoma žirnių produktų apdorojimui.

1.2.1. Pieno rūgšties bakterijos, jų charakteristika

Pieno rūgšties bakterijos (PRB) gali būti apibrėžiamos kaip gramteigiamos, nesudarančios sporų kokos ar lazdelės, kurios pasižymi anaerobinėmis ir aerotolerancinėmis ypatybėmis bei angliavandenių fermentavimo metu kaip pagrindinį galutinį produktą gamina pieno rūgštį. PRB

pagal morfologiją skirstomos į lazdeles (*Lactobacillus* ir *Carnobacterium*) ir kokus (visos kitos giminės). Kita svarbi charakteristika, naudojama PRB genties diferencijavimui yra gliukozės fermentacijos būdas esant standartinėms sąlygoms (neribotas gliukozės kiekis, augimo faktoriai, tokie kaip aminorūgštys, vitaminai ir nukleorūgščių prekursoriai bei ribotas deguonies prieinamumas). Pagal gliukozės fermentacijos būdą standartinėmis sąlygomis skiriamos dvi PRB grupės – tai homofermentacinės ir heterofermentacinės bakterijos. Homofermentinės pieno rūgšties bakterijos daugiausiai iš sacharidų gamina pieno rūgštį, tuo tarpu heterofermentinės bakterijos be pieno rūgšties gamina daugiau acto rūgšties ir alkoholio. Dėl sudėtingos kontrolės šiuolaikiniuose gamybos procesuose siekiant užtikrinti stabilią produkto kokybę, PRB padermės su norimomis savybėmis yra išskiriamos ir naudojamos kaip pradinės/startinės kultūros. Kaip pagrindines maisto pramonėje naudojamas PRB rūšis galima išskirti: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ir *Streptococcus* [28].

PRB yra aptinkamos daugelyje biologinių sistemų. Šios bakterijos pirmą kartą buvo aptiktos piene, vėliau biologinių tyrimų dėka fiksuotos tokiuose produktuose kaip mėsoje, pieno produktuose (kefyre, jogurte, sūryje, pasukose ir kt.), daržovėse, gėrimuose bei kepinuose [29]. Taip pat didelę reikšmę turi duonos, ypač ruginės, gamyboje, daržovių konservavime. Pieno rūgšties bakterijos naudojamos gaminant ir kai kurių rūšių dešras, ruošiant marinuotus agurkus, raugintus kopūstus, alyvuoges ir kt. [30]. Be to, PRB buvimas yra fiksuojamas ir natūraliojoje aplinkose – dirvožemyje, vandenyje, dumble. Pieno bakterijos aptinkamos ir žmonių (burnos ertmėje, virškinamajame trakte) bei gyvūnų organizmuose [29].

Nors PRB fermentacija maisto konservavimui žinoma ir plačiai naudojama, tačiau mikrobiologinis naujų PRB išskyrimas, genetinis identifikavimas ir pritaikymas maisto pramonėje iki šiol yra aktualus [31].

PRB perspektyvumo pagrindinės priežastys:

1. GRAS statusas,
2. Metabolitai, pvz., bakteriocinai, pakankamai atsparūs šilumos poveikiui, išlaiko antibakterines savybes pasterizuojant ir sterilizuojant,
3. PRB pasižymi tam tikromis genetinėmis ir struktūrinėmis savybėmis, kurios leidžia taikyti įvairesnę genetinę variaciją, o taip pat leidžia padidinti šių organizmų analogų skaičių, išgaunant padermes su norimomis charakteristikomis ir metabolitų susidarymu [32].

Pieno rūgšties bakterijos, gaminančios bakteriocinus, yra viena iš technologinių priemonių, galinčių sulėtinti maisto gedimą ir patogeninių bakterijų dauginimąsi [30], [31]. Šiame eksperimente antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčios PRB, išskirtos iš ruginių raugų, bus taikomos žirnių produktų fermentacijai.

1.2.2. Žirnių cheminės sudėties pokyčiai fermentacijos metu

Fermentacijos taikymas maisto pramonėje turi galias tradicijas. PRB fermentacija pagrįsta biocheminėmis reakcijomis, kurių metu PRB ir jų fermentai metabolizuoja terpėje esančius fermentuojamus sacharidus į junginius, pvz., antimikrobinius, kurie padeda ilgiau išlaikyti mikrobiologiškai saugius maisto produktus.

Pagal Janiszewska ir Stodolak fermentacija leidžia pagerinti žirnių baltymų maistinę vertę ir juslines savybes. Atliktais tyrimais įrodyti žirnių cheminės sudėties pokyčiai PRB fermentacijos metu. PRB fermentacijos metu (24 h) ženkliai sumažėjo β -N-oksalilio-L- α - β -diaminopropiono rūgšties, tripsino inhibitorių ir inozitolio fosfatų kiekis [33]. Be to, fermentacija turėjo įtakos baltyminių medžiagų pokyčiams: didėjant fermentacijos trukmei žaliavinių baltymų ir mineralinių medžiagų kiekis laipsniškai didėjo: žirnių miltų mėginys, kuris buvo fermentuotas 5 dienas, turėjo didžiausią baltymų kiekį (23,9 %), o mažiausias baltymų kiekis aptiktas pirmąją fermentacijos dieną (22,6 %). Tokie baltymų pokyčiai siejami su galima baltymų sinteze fermentacijos metu. Fermentacijos metu taip pat keičiasi ir mineralinės medžiagos, kurių kiekis palaipsniui didėja ilgėjant fermentacijos trukmei (pirmąją fermentacijos dieną mineralinių medžiagų kiekis sudarė 4,61 %, o po penkių fermentacijos dienų mineralinių medžiagų kiekis nustatytas 5,52 %). Žirnių fermentacijos metu stebimi drėgmės pokyčiai. Ilgėjant žirnių fermentacijai, drėgmės kiekis didėja: pirmąją fermentacijos dieną drėgmės kiekis sudarė 10,2 %, o penktąją dieną fiksuojamas padidėjimas iki 13,24 %. Tokie drėgmės pokyčiai siejami su tirpiosios frakcijos kiekio padidėjimu. Tyrimais įrodyta, kad fermentacija turi įtakos lipidų frakcijai: fermentuotų žirnių miltuose lipidų kiekis buvo aptiktas ženkliai mažesnis nei nefermentuotuose miltuose. Kintant žirnių cheminei sudėčiai fermentacijos metu, stebimi ir energetinės vertės pokyčiai: nefermentuotų žirnių sėklų miltų energetinė vertė sudarė 325,46 kcal/100 g, o tuo tarpu fermentuotų žirnių sėklų miltai penktąją fermentacijos dieną turėjo mažiausią energetinę vertę (9315,33 kcal/100 g). Toks energetinės vertės sumažėjimas aiškinamas tiek su lipidų, tiek su beazotinio ekstrakto kiekio fermentuotose žirnių mėginiuose sumažėjimu [34].

Be minėtų fermentacijos metu žirnių cheminės sudėties pokyčių, literatūroje pateikti tyrimų rezultatai apie fermentacijos įtaką žirnių produktų funkcinėms savybėms. Pažymima, kad fermentacijos metu palaipsniui mažėja fermentuojamos masės savitasis tankis (kinta nuo 0,80 g/m³ iki 0,63 g/m³), kuris yra svarbus parametras, nes nuo jo priklauso produkto juslinės savybės ir pagaminto produkto taros ar pakuotės charakteristikos. Žirnių fermentacijos metu vyksta ir vandens absorbcijos pokyčiai: fermentacijos metu žirnių vandens absorbcijos pajėgumas kinta nuo 113,0 g/100 g (pirmąją fermentacijos dieną) iki 142,0 g/100 g (penktąją fermentacijos dieną). Svarbu pažymėti, kad ilgėjant fermentacijos trukmei, žirnių produktų vandens

absorbcijos geba mažėja (nuo 6,5 % – pirmąją dieną iki 5,5 % – penktąją fermentacijos dieną). Žirnių putų susidarymo pajėgumas didėjant fermentacijos trukmei mažėjo ir kito nuo 8,16 % iki 4,39 %. Panašios tendencijos buvo stebimos tiriant ir putų stabilumą, kuris ilgėjant fermentacijos laikotarpiui taip pat mažėjo ir kito nuo 1,97 % iki 2,45 %. Nefermentuoti žirnių sėklų miltai turėjo didžiausią putų susidarymo pajėgumą. Dar viena svarbi žirnių savybė daugelio maisto produktų gamyboje – gelių susidarymo pajėgumas. Fermentacijos metu gelių susidarymo pajėgumas kito nuo 43,8 % iki 56,2 %, o didžiausias gelių susidarymo pajėgumas fiksuotas nefermentuotuose žirnių sėklų miltuose [34].

Pažymėtina, kad žirnių fermentacijos metu konstatuota teigiama fermentacijos įtaka antimonybinių faktorių mažėjimui ir skoninių savybių pokyčiams, tačiau naudojant naujas PRB padermes tikslinga įvertinti funkcinį savybių pokyčius, parenkant jų realizavimui optimalias KF sąlygas.

1.3. Ultragarso panaudojimo galimybės fermentacijos procesuose

Pastaruoju metu ultragaras naudojamas įvairiuose sektoriuose, tokiuose kaip biochemijos, chemijos, farmacijos, medicinos, įskaitant ir maisto pramonę. Ultragaras naudojamas atliekant maisto produktų bekontaktę analizę, siekiant užtikrinant maisto gaminių kokybę [35]. Ultragarsiniai matavimai gali būti pasitelkti tikrinant tirpalų koncentracijas, taip pat maisto sudėtį, struktūrą, fizinę būklę ir molekulinę savybę [36].

Ultragaras apibrėžiamas kaip garsas, kurio dažnis aukštesnis, nei gali girdėti žmogaus ausis. Ultragaras, priklausomai nuo dažnių diapazono, gali būti suskirstytas į tris kategorijas: galingas ultragaras (20 – 100 kHz), aukšto dažnio arba sonocheminis (20 kHz – 2 MHz) ir diagnostinis (>1 MHz) ultragaras. Pagal taikymo perspektyvas ultragaras skirstomas į žemo intensyvumo (<1 W/cm²) ir aukšto intensyvumo (10 – 1,000 W/cm²) [35]. Pradedant taikyti ultragarą maisto pramonėje, svarbiausias dėmesys buvo skiriamas jo debakterizuojančiam poveikiui, tačiau pastaruoju metu jis naudojamas lanksčiai, siekiant kontroliuoti mikroorganizmų veiklą t. y. skatinti ar slopinti. Tam tikslui paprastai naudojamas 20 - 40 kHz stiprumo ultragaras.

Fermentacijos pramonėje taikomas tiek aukšto, tiek žemo dažnio ultragaras. Aukšto dažnio ultragaras paprastai naudojamas kaip neardanti analitinė technika fermentacijos procesų kontrolei. Žemo dažnio ultragaras pasitelkiamas, norint padidinti fermentacijos greitį, pvz., pasterizacijos metu, norint pagerinti alkoholinių gėrimų degazavimą ir dearaciją, pagreitinti vyno brendimą ir kt. Atliktais tyrimais nustatyta, kad akustinės matavimo sistemos yra neinvazinės, higieniškos, tikslios, greitos, pigios ir tinkamos automatizuotai gamybos kontrolei [36].

Aukšto dažnio ultragarsu galima stebėti ne tik fermentacijos procesus ir įvertinti tolydinėje gamyboje pagrindinius fermentacijos parametrus, pvz., mikroorganizmų dauginimąsi, bet ir pH, rūgštingumo, drumstumo ir cheminės sudėties pokyčius. Tuo tarpu klasikinė cheminė analizė reikalauja daug laiko ir neleidžia atlikti kontrolės realiame laike. Aukšto dažnio ultragarso panaudojimas gali suteikti naudingos informacijos, siekiant charakterizuoti fermentacijos procesų eigą bei gali būti pritaikytas tiek vienalytėms, tiek daugiafazėms sistemoms. Toks ultragarso panaudojimas neiššaukia fermentuojamose produktuose cheminių pokyčių. Be to, didesnio dažnio ultragarsą (>15 MHz) galima panaudoti mielių ląstelių koncentracijos skystose suspensijose nustatymui [35].

Tokiu būdu, fermentacijos procesuose gali būti panaudotas ne tik aukšto, bet ir žemo dažnio ultragarsas. Žemo dažnio ultragarsas paprastai naudojamas maisto produktų apdorojimo srityje – maisto fermentavimui, kuriuo siekiama padidinti fermentacinių procesų efektyvumą, sumažinti putojimą, padidinti emulsifikavimą ir pagerinti galutinio produkto kokybę bei saugą. Moksliniais tyrimais nustatyta, kad ultragarso bangos gali būti taikomos ląstelių ir fermentų aktyvavimui. Buvo įrodyta, kad mažo intensyvumo ultragarso bangos gali modifikuoti ląstelių metabolizmą ar pagerinti maistinių medžiagų perdavimą per ląstelių membraną [37].

Ultragarsas gali būti naudojamas įvairiose maisto pramonės srityse. Iki šiol didžiausia patirits sukaupta, taikant ultragarsą pieno produktų fermentacijoje. Pieno produktų apdorojimas žemo dažnio ultragarsu sąlygoja naudingus pokyčius makromolekulėse (fizinius ir cheminius), įskaitant fermentų modifikaciją, homogenizavimą, pasterizavimą, sumažina jogurto fermentacijos trukmę ir pagerina tekstūros savybes (pvz., konsistenciją). Pieno apdorojimas ultragarsu leidžia padidinti vandens sulaikymo pajėgumą, klampumą, sumažėja sinerezės sąlygojamus procesus. Ultragarsas taip pat gali būti panaudotas probiotikų gamyboje: žemo dažnio ultragarsu galima intensyvinti probiotinių padermių dauginimąsi, pagreitinti bifido bakterijų sąlygojamą laktozės hidrolizės procesą, sutrumpinti (priklausomai nuo probiotinės bakterijos padermės) fermentacijos trukmę [37].

2. Tyrimo objektai ir metodai

2.1. Tyrimų kryptys

Ekspertas, skirtas įvertinti ultragarsinio poveikio įtaką žirnių sėklų baltyminėms medžiagoms ir funkcinėms savybėms kietafazės fermentacijos (KF) sąlygose, vykdytas trimis etapais (2.1 pav.).

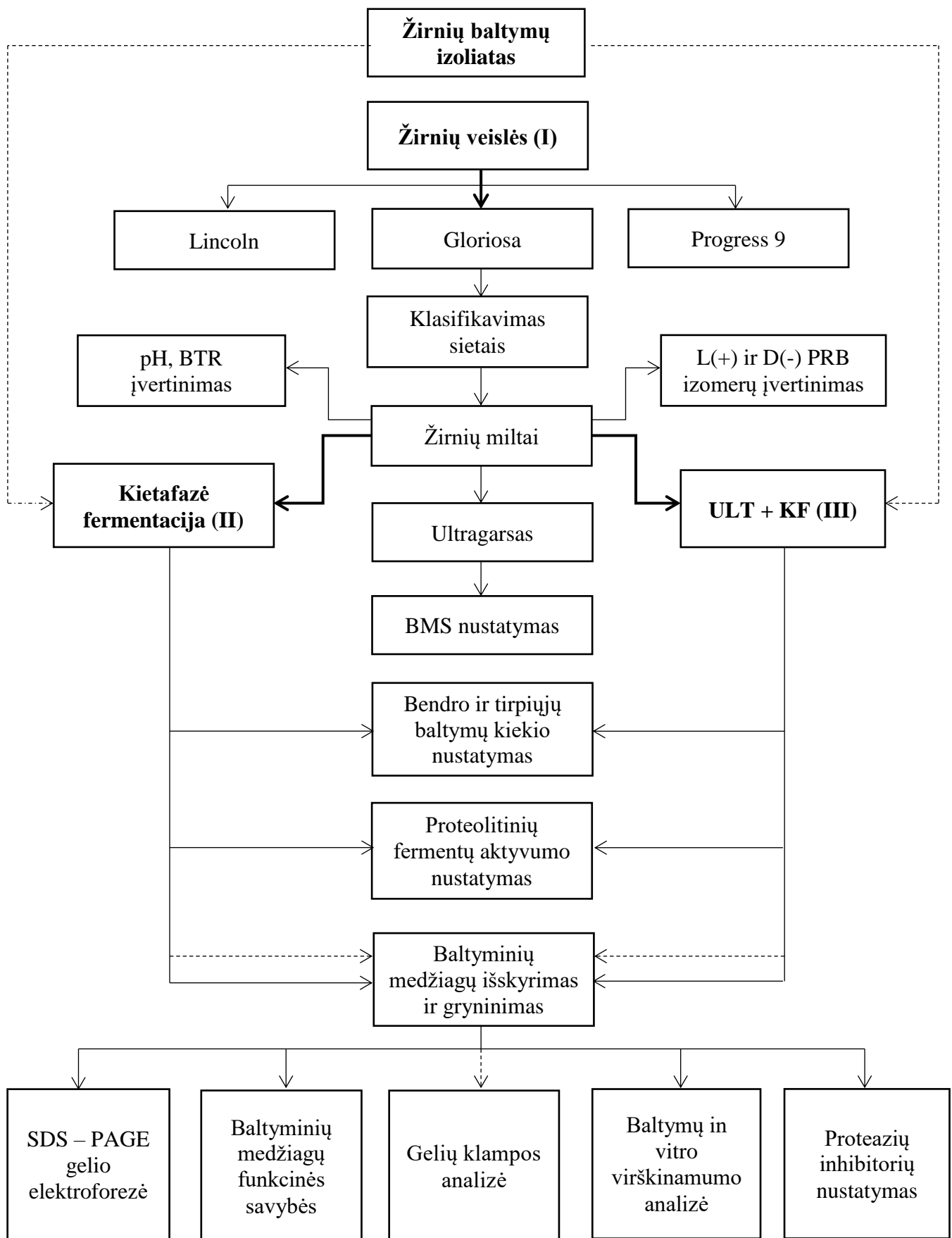
Pirmojo etapo metu (I) tirti skirtingi žirnių (*Pisum sativum L.*) genotipai siekiant nustatyti didžiausiu baltymų kiekiu pasižyminčią augalinę žaliavą.

Antrojo etapo metu (II) nustatyti žirnių pokyčiai PRB KF metu. Šiame etape tirta:

1. Bendras ir tirpiųjų baltymų kiekis;
2. pH, BTR, L(+) ir D(-) pieno rūgšties izomerų kiekis;
3. Proteazių aktyvumas;
4. Baltyminių medžiagų *in vitro* virškinamumas ir proteazių inhibitorių aktyvumas;
5. Baltyminių medžiagų funkcinės savybės (emulgavimas, putojimas, gelių sudarymas), vandens absorbcija;
6. Baltyminių medžiagų proteomika SDS-PAGE gelio elektroforezės metodu;
7. Ultragarinės technikos panaudojimas baltymingų gelių susidarymui, kontroliuojamam akustiniu klamos fiksavimo prietaisu.

Trečiojo etapo metu (III) vertinta žirnių produktų ultragarsinio apdorojimo įtaka PRB KF metu vykstantiems pokyčiams. Šiame etape tirta:

1. Bendras mikroorganizmų skaičiaus (BMS);
2. Proteazių aktyvumas;
3. Baltyminių medžiagų *in vitro* virškinamumas ir proteazių inhibitorių aktyvumas;
4. Bendras ir tirpiųjų baltymų kiekis;
5. Baltyminių medžiagų funkcinės savybės (emulgavimas, putojimas, gelių sudarymas), vandens absorbcija;
6. Ultragarinio poveikio įtaka KF sąlygose baltymingų gelių (iš žirnių baltymų izoliato) susidarymui, kontroliuojamam akustiniu klamos analizatoriumi.



2.1 pav. Pagrindinės tyrimų kryptys

2.2. Tyrimo objektai

Mėginio paruošimas

Žirnių genotipų charakteristika. Eksperimento metu tirti žirnių (*Pisum savitum*) Lincoln, Progress N.9, Gloriosa genotipai.

Lincoln genotipo žirniai. Vidutiniškai vėlyva veislė. Derėti pradeda po 68 – 73 dienų nuo sėjos. Augalai 70 – 75 cm aukščio. Ankštys 9 cm ilgio, smailėjančiais lenktais galais, jose subręsta 6 – 8 raukšlėtos sėklos [38].

Progress N.9 genotipo žirniai. Vidutiniškai vėlyva veislė, derėti pradeda po 62 – 67 dienų nuo sėjos. Augalai žemi, 50 – 55 cm aukščio. Ankštys tiesios, apie 10 cm ilgio, jose subręsta 8 – 9 raukšlėtos sėklos [39].

Gloriosa genotipo žirniai. Tai vokiška vidutinio ankstyvumo gliaudomų žirnių veislė. Ankštys ilgos, žalios, jose subręsta po 7 – 8 stambius žirnelius. Nuo sudygimo iki vartojimo praeina 65 dienos. Užauga iki 60 - 70 cm aukščio. Sunokusios sėklos raukšlėtos, žalsvai baltos. Geriausiai auga vidutinio sunkumo, laidžiose orui ir vandeniui dirvose. Maistui gali būti vartojami švieži, šaldyti ir konservuoti [40].

Tolimesniam tyrimui atrinkta baltymingiausia žirnių veislė – Gloriosa. Šioje veislėje baltymų kiekis sudarė 25,00 %, tuo tarpu mažiausiu baltymų kiekiu pasižymėjo Lincol veislės žirniai (17,36 %) (2.1. lentelė).

2.1 lentelė. Žirnių baltymų kiekis skirtingose veislėse.

Žirnių veislės	Baltymų kiekis, %
Lincoln	17,36
Progress N.9	19,80
Gloriosa	25,00

Siekiant gauti dideliu baltymų kiekiu turtingą žirnių frakciją, žirnių mėginiai ruošti naudojant malinio klasifikavimą pagal geometrinius požymius (sietais).

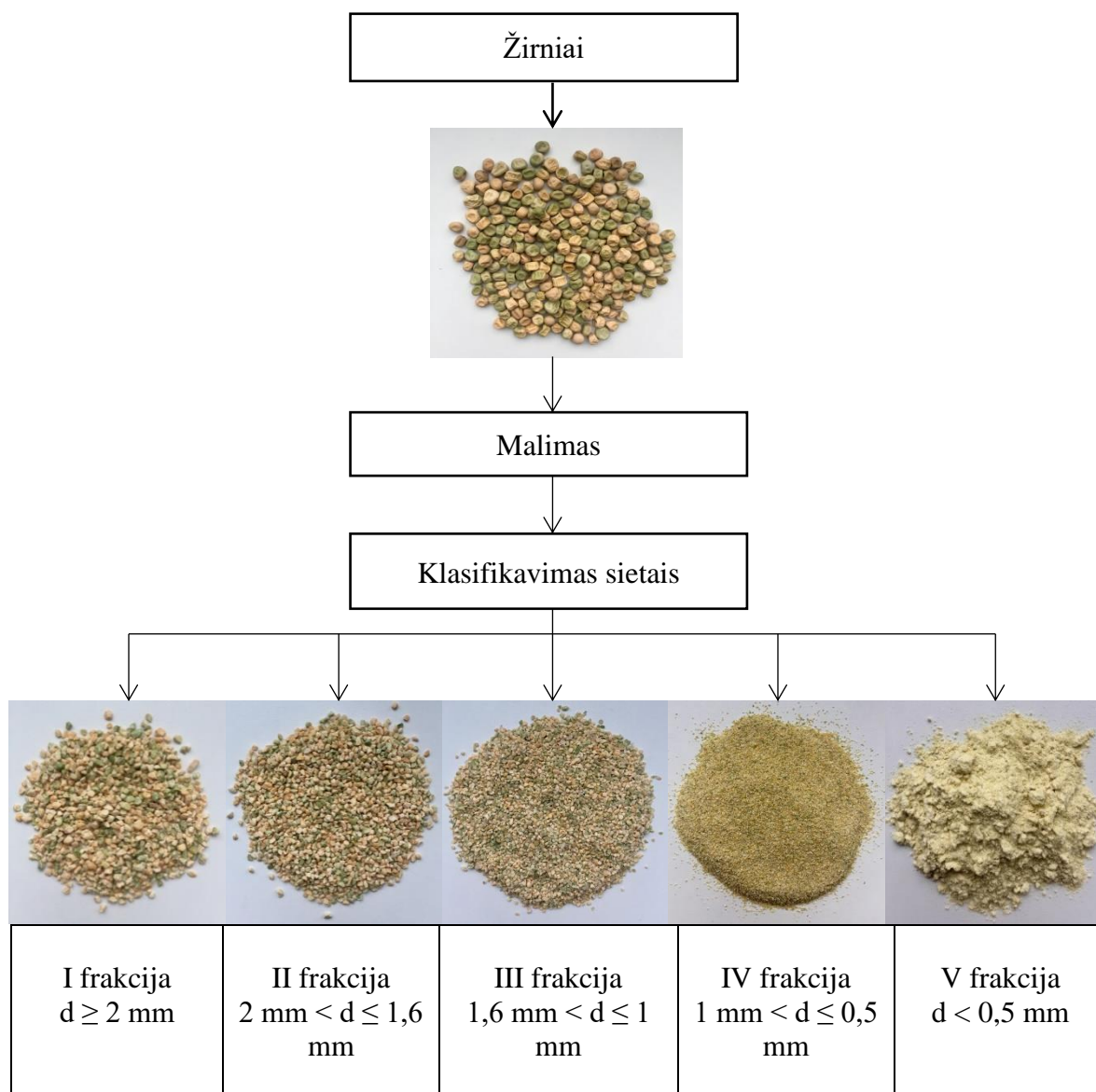
Gelių klampumui nustatyti ultragarsinėje įrangoje, kontroliuojamoje akustiniu klampos analizatoriumi, naudotas žirnių baltymų izoliatas gautas iš UAB “Baltasis pyragas”.

Frakcionavimas sietais

Žirnių mėginių paruošimas analizei. Žirniai sumalti Pranciškaus Jokubausko malūne. Žirnių malinys suskirstytas į frakcijas pagal geometrinius požymius naudojant 400 mm skersmens sietų komplektą (KTU, Cheminės technologijos fakultetas, Silikatų technologijos katedra), kuriame vienas ant kito sudėti apvalių akučių sietai (eilės tvarka nuo viršutinio sieto): 63 mm, 45 mm, 16 mm, 8 mm, 3,15 mm ir 1 mm skersmens. Žirnių masės ėminys sijojamas specialiu sietų kratytuvu *Haver EML Digital plus* (Vokietija). Sietų komplektas horizontalioje

plokštumoje pusapskritimi sukiojamas 2 minutes, 2,0 amplitude. Ant sietų likusi masė pasverta ir apskaičiuojamas kiekvienos frakcijos ėminio dalis procentais [41].

Šiame eksperimento etape susmulkintas žirnių bandinys klasifikuojamas sietais ir suskirstomas į 5 frakcijas: I frakcija – $d \geq 2$ mm; II frakcija – $2 \text{ mm} < d \leq 1,6$ mm; III frakcija – $1,6 \text{ mm} < d \leq 1$ mm; IV frakcija – $1 \text{ mm} < d \leq 0,5$ mm; V frakcija – $d < 0,5$ mm (2.2 pav.).



2.2 pav. Mėginio klasifikavimas sietais

Įvertinus mėginio frakcinę sudėtį, iš 2.2 lentelės matome, kad didžiausia žirnių miltų frakcija susikaupė kaip nuosijos ant 0,5 mm skersmens skylių sieto (872,1 g). Didėjant sieto skylių skersmeniui, gautų nuosijų kiekis ant sieto mažėjo: IV frakcija – 639,9 g, III – 567,0 g, II – 337,5 g, I – 283,5 g.

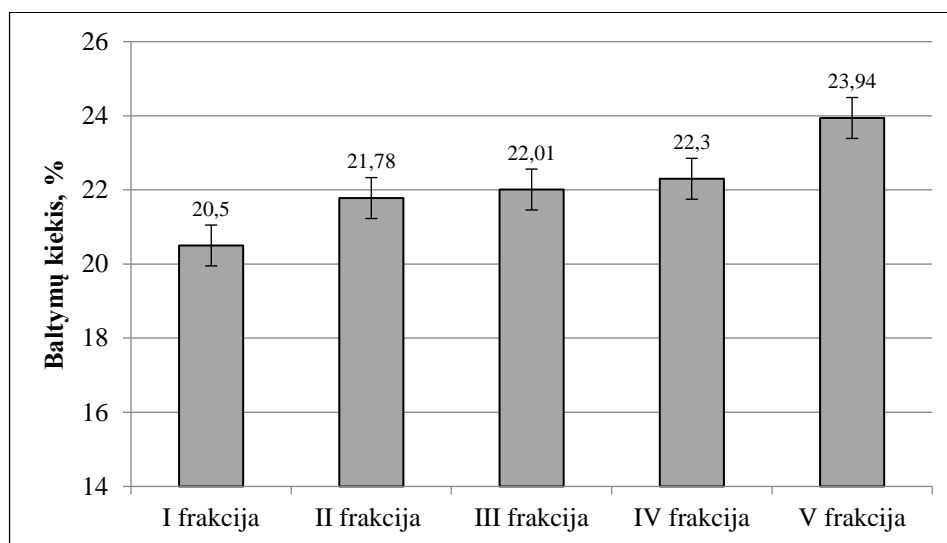
Atlikus bendro baltymų kiekio atskirose frakcijose tyrimus (2.3 pav.) nustatyta, kad mažėjant frakcijoje vidutiniam dalelių dydžiui baltymų kiekis didėja: I frakcijoje ($d \geq 2$ mm) baltymų kiekis – 20,5 %, o V frakcijoje ($d < 0,5$ mm) – 23,94 %. Nustatytas baltymų kiekis II (2

mm < d ≤ 1,6 mm), III (1,6 mm < d ≤ 1 mm) ir IV frakcijose (1 mm < d ≤ 0,5 mm) yra panašus, šiose frakcijose yra apie 22 % baltymų.

2.2 lentelė. Frakcijų pasiskirstymas klasifikuojant sietais

Pavadinimas	Dalelių dydis, mm	Kiekis, g
I frakcija	d ≥ 2 mm	283,5
II frakcija	2 mm < d ≤ 1,6 mm	337,5
III frakcija	1,6 mm < d ≤ 1 mm	567,0
IV frakcija	1 mm < d ≤ 0,5 mm	639,9
V frakcija	d < 0,5 mm	872,1

Tolimesni eksperimento etapai vykdomi su V frakcija, kurioje bendras baltymų kiekis nustatytas didžiausias – 23,94 %.



2.3 pav. Baltymų kiekis atskirose žirnių frakcijose (po frakcionavimo sietais)

Kietafazei fermentacijai naudotas žirnių mėginių drėgnis – 50 %. KF atlikti naudotos trys pieno rūgšties bakterijos: *Pediococcus acidilactici* KTU 05-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU 05-9 ir *Lactobacillus sakei* KTU 05-6. Šios pieno rūgšties bakterijos sintetina ir į mitybos terpę išskiria baltymus (bakteriocinus), kurie pasižymi antibakteriniu poveikiu prieš giminingas producentui bakterijų rūšis [42].

PRB saugotos KTU Maisto mokslo ir technologijos katedros laboratorijoje minus 70 °C temperatūroje apsauginėje terpėje (Microbank sistemoje) ir atgaivintos modifikuotame MRS sultinyje (Oxoid, UK). PRB ruošimo substratų fermentacijai sąlygos pateiktos 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. PRB ruošimo substratų fermentacijai sąlygos

PRB	Kultivavimo temperatūra, °C	Kultivavimo trukmė, h	Terpė*	Koncentracija, log KSV/ml
<i>P. acidilactici</i> , KTU 05-7	32±2	36	MRS	9,2±2
<i>P. pentosaceus</i> KTU 05-9	25±2	36	MRS	9,1±4
<i>L. sakei</i> KTU 05-6	30±2	36	MRS	9,2±2

*De Mar Ragosa ir Shape terpė (Biolife, Italija)

Fermentacijai naudota – 2 % PRB nuo žirnių miltų masės. KF vykdoma 72 h 35 °C temperatūroje Renggli A.G. termostate „Šveicarija“, mėginys nuimamas 24 h periodiškumu.

Apdorojimas ultragarsu. Žirnių mėginiai ultragarsu apdorojami naudojant proclean 3.0DSP (Vokietija) ultragarso vonelę. Mėginiai ruošiami pagal 2.3.4. skyriuje aprašytą metodiką. Visi mėginiai veikiami 37 kHz dažnio bangomis 60 min. Šis laikas pasirinktas atsižvelgiant į bendrą mikroorganizmų skaičiaus mažėjimą.

2.3. Tyrimų metodai

2.3.1. pH ir BTR įvertinimas

pH įvertinimas

Tiriamą mėginio pH išmatuojamas pH – metru „Sartorius PB – 11“. Prieš tai 1 g žirnių miltų sumaišomas su 10 ml distiliuoto vandens. Iki matavimų ir tarp matavimų elektrodas laikomas 3 mol/l KCl tirpale [54].

BTR įvertinimas

Mėginių bendras titruojamas rūgštingumas matuotas 10 g žirnių miltų užpilant 100 ml distiliuoto vandens. Gautas mišinys išmaišomas ir paliekamas stovėti 30 min. Vėliau į mišinį įlašinami 3-5 lašai fenolftaleino ir titruojama 0.1 N NaOH tol, kol tirpalo spalva tampa rusva [54].

2.3.2. Spektrofotometriniai metodai

Proteazės aktyvumo nustatymas

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

5 g žirnių miltų sumaišoma su 50 ml (0,01 M natrio acetato ir 0,005 M kalcio acetatas) buferio tirpalo ir išmaišoma su „Vibrofix VF1 (IKA)“ purtykle. Centrifuguojama 10 min., 8000 rpm, „Velocity 18R“ (Dynamica) centrifuga. Analizei naudojamas centrifugatas.

Kalibracinės keivės sudarymui 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,5 ml etaloninio tirozino tirpalo praskiedžiama vandeniu iki 2 ml. Paruošti darbiniai tirozino tirpalai sumaišyti su 5 ml 0,5 M natrio karbonato tirpalu, 1 ml Folin-Ciocalteu fenolinio reagentu ir išlaikoma 30 min 37 °C temperatūros vandens vonioje. Vėliau Genesys 10 UV (JAV) spektrofotometru ($\lambda = 660$

nm) išmatuotas jų optinis tankis. Analogiškai ruošiamas tuščias bandinys, be tirozino. Sudarant tirozino kalibracinę kreivę (pateikta 1 priede) nustatyta, kad tarp tirozino koncentracijos tirpale ir jo optinio tankio yra tiesinė priklausomybė, kuri aprašyta lygtimi $y=0,1314x + 0,0176$ (čia: y – optinis tankis, x – tirozino tirpalo koncentracija, μM). Determinacijos koeficientas R^2 tarp šių dydžių yra lygus 0,9945. Tai rodo, kad kalibracinė kreivė yra tiksli ir gali būti taikoma tirozino kiekiui nustatyti.

Analizei atlikti į mėgintuvėlį įpilama 5 ml kazeino tirpalo ir 1 ml žirnių ekstrakto. Mėginys išmaišomas ir paliekamas stovėti 37 °C temperatūroje termostate 30 min. Lygiagrečiai atliekamas kontrolinis bandymas, be žirnių ekstrakto. Sekančiame etape į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 5 ml 0,11 M trichloracetato rūgšties, į tuščią mėginį – papildomai 1 ml žirnių ekstrakto, išmaišoma ir paliekama stovėti 37 °C temperatūroje termostate 30 min. Analogiškai ruošiami kontroliniai mėginiai, tik filtratas imamas iš kontrolinio mėginio. Vėliau filtruojama per 0,45 μm popierinį filtrą. Sumaišoma 2 ml filtrato su 5 ml 0,5 M natrio karbonato tirpalu ir 1 ml Folin-Ciocalteu fenoliniu reagentu, išmaišoma ir paliekama stovėti 37 °C temperatūroje termostate 30 min. „Genesys 10 UV“ spektrofotometru (JAV) matuojamas tirpalo optinis tankis ($\lambda = 660 \text{ nm}$) [52].

Iš kalibracinės kreivės (1 priedas), nustačius tirozino kiekį (T), proteazės aktyvumas žirnių ekstrakto apskaičiuojamas pagal formulę:

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

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

Pasveriamas 5 g fermentuotų žirnių miltų mėginio ir įpilama 20 ml distiliuoto vandens. Mišinys maišomas 10 min. Mėginys centrifuguojamas 10 min., 8000 rpm „Velocity 18R“ (Dynamica) centrifuga. Supernatantas praskiedžiamas su distiliuotu vandeniu iki 50 ml, filtruojamas per filtro popierių ir naudojamas L(+) ir D(-) izomerų kiekio nustatymui. L(+)- ir D(-)-pieno rūgšties izomerų susidarymas žirnių biomasės PRB fermentacijos metu įvertintas fermentiniu Megazyme K-DLATE testu (Megazyme International, Airija).

D(-) pieno rūgšties izomerai nustatyti spektrofotometriniu būdu, šiam procesui reikalingos 2 fermentinės reakcijos: 1. Pirmosios fermentinės reakcijos metu katalizuojama D-laktato dehidrogenazės (D-LDH), D(-) izomerai oksiduojasi iki piruvato. Šios reakcijos metu susidaro nikotinamido – adenino dinukleotidas (NAD⁺). 2. Antrosios fermentinės reakcijos metu veikiant fermentui D-glutamato-piruvato transaminazei (D-GPT) vyksta piruvato konversijos į

D-alaniną ir 2-oksoglutaratą. Šių reakcijų metu susidaręs NADH kiekis koreliuoja su D(-) pieno rūgšties izomerų kiekiu ir yra išmatuojamas spektrofotometriškai esant 3400 nm bangos ilgiui.

L(+) pieno rūgšties izomerų nustatymui vykdoma oksidacija iki piruvatosu L-laktato dehidrogenaze (L-LDH). Šios reakcijos metu susidaro nikotinamido – adenino dinukleotidas (NAD⁺). Sekančiame etape veikiant D-GPT matuojama NADH absorbcija esant 340 nm bangos ilgiui.

Reakcijos mišinys sudarytas 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⁺ tirpalo ir 0,02 ml D-GPT tirpalo. Susidaręs mišinys laikomas 5 minutes ir matuojama absorbcija (A₁). Išmatavus absorbciją į tą patį mišinį įpilama 0,02 ml D – LDH. Mėginys išmaišomas ir laikomas 10 min, matuojama absorbcija (A₂). Išmatavus absorbciją į tą patį mišinį įpilama 0,02 ml D – LDH. Mėginys išmaišomas ir laikomas 15 min, matuojama absorbcija (A₃).

Ruošiant tuščią mėginį į jį įpilama distiliuoto vandens. Pieno rūgšties D(-) ir L(+) izomerų kiekio apskaičiavimas pagal formulę [53]:

$$A_2 - A_1 = \Delta A_{D\text{-pieno rūgštis}}$$

$$A_3 - A_2 = \Delta A_{L\text{-pieno rūgštis}}$$

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

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

2.3.3. Antimonybinių faktorių nustatymo metodai

Baltymų virškinamumas

Baltymų virškinamumui nustatyti yra tiriamos žirnių visų dalių malimo sėklų albuminų ir gliutelinų frakcijos. Šios frakcijos išskirtos pagal 2.3.4. skyriuje aprašytą metodiką (baltyminių medžiagų išskyrimas ir gryninimas).

Mėginiui paruošti 62,5 g žirnių baltymų yra sumaišoma su 10 ml distiliuoto vandens. Mišinys centrifuguojamas 5 min, 2000 aps/min “Heraeus labofuge 200“ (JAV) centrifūgoje. Naudojant 0,1 M NaOH gauto tirpalo pH sureguliuojamas iki 8. Žirnių baltymų suspensija sumaišoma su fermentiniu mišiniu (1 ml distiliuoto vandens ištirpinta 1,6 mg tripsino ir 3,1 mg α -chimotoripsino) santykiu 10:1. Po 10 min. matuojamas tirpalo pH. Baltymų virškinamumas (V, %) *in vitro* įvertinamas pagal hidrolizuotų baltymų kiekį [51]:

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

Proteazių inhibitorių aktyvumas

Vertinamas pagal tripsino ir chimotripsino inhibitorių aktyvumą. Tiriamos žirnių visų dalių malimo sėklų albuminų ir gliutelinų frakcijos. Šios frakcijos išskirtos pagal 2.3.4 skyriuje aprašytą metodiką (baltyminių medžiagų išskyrimas ir gryninimas).

Reakcijos mišinį sudaro: 1,0 ml fosfatinis buferis, 0,5 ml proteazės tirpalas (1 mg/ml), 0,5 ml 1mM HCl, 1 ml mėginio tirpalo (1g/10ml fosfatinio buferio). 1 ml mėginio tirpalo inkubuojamas 30 min ir įpilama 2 ml kazeino tirpalo (2%). Reakcija vyksta 37 °C temperatūroje 20 min. Reakcija sustabdoma įpylus 6 ml 5 % trichloracto rūgšties. Tuščias mėginys ruošiamas vietoje mėginio įpilant 1 ml fosfatinio buferio. Kontroliniai mėginiai ruošiami prieš reakciją įpilant 6 ml 5 % trichloracto rūgšties. Tirozino kiekis nustatytas pagal tirpalo absorbciją, išmatuotą Genesys 10 UV (JAV) spektrofotometru, esant 660 nm bangos ilgiui. Inhibicinis aktyvumas (%) apskaičiuotas pagal proteolitinio aktyvumo sumažėjimą mėginiuose su inhibitoriaus tirpalu ir be jo [51].

2.3.4. Baltyminių medžiagų analizės metodai

Bendro baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu

Bendram baltymų kiekiui žirnių sėklose nustatyti taikomas Kjeldalio metodas pagal ISO 20483:2013 standartą [43]. Metodo esmė ta, kad kaitinant mėginius su koncentruota sieros rūgštimi ir katalizatoriumi, azotinės medžiagos oksiduojasi. Išsiskyręs amoniako pavidalo azotas jungiasi su sieros rūgštimi, sudarydamas amonio sulfatą. Pašarminus reakcijos mišinį, susidaro amonio hidroksidas, kuris kaitinamas suskyla ir susidaro amoniakas [44].

Analizei pasveriamas 1 g žirnių miltų. Mėginys sudedamas į Kjeldalio kolbą, kurioje vyksta mineralizavimas. Proceso metu įpilama 20 ml koncentruotos H₂SO₄ ir įdedama katalizatoriaus tabletė. Kjeldalio kolbos „Behr Labor Technik“ (Vokietija) mineralizavimo aparate kaitinamos 100 min. Skystis laisvai garuoja, o garai kondensuojasi ant piltuvėlio ir laša į kolbą. Proceso pabaigoje tirpalas kolboje tampa skaidrus ir bespalvis. Tai rodo, kad produkto organinės medžiagos jau suskilo ir kolboje liko tik mineraliniai junginiai. Po mineralizacijos kolbos atvėsina. Vėliau tiriamas mėginys distilijuojamas distiliatoriuje Behr (Labor – Technik GmbH, Vokietija). Distiliavimui naudojamas boro rūgšties tirpalas, įlašinama 2-3 lašai Taširo indikatorius. Skiriantis amoniakui, borato spalva kinta iš violetinės į žalią. Vėliau distiliatas nutitruojamas 0,1N HCl tirpalu (indikatorius titravimo metu žalią spalvą keičia į violetinę). Lygiagrečiai tomis pačiomis sąlygomis nudistilijuojamas ir nutitruojamas toks pat kiekis koncentruotos sieros rūgšties (tuščias mėginys).

Iš tiriamo produkto mėginio išsiskyręs azoto (N) kiekis apskaičiuojamas pagal formulę [43]:

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

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

V1 – 0,01N arba 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas iš distiliuojamo mineralizato išsiskyrusiam amoniakui sujungti, ml;

V0 – 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:

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

N - azoto (N) kiekis,

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

Tirpiųjų baltymų kiekio nustatymas

Tirpiųjų baltymų kiekio nustatymui svarstyklėmis pasveriami 3 g žirnių, užpilama 27 ml vandens, mišinys suplakamas ir paliekamas stovėti 15 minučių. Mėginys 30 min 8000 rpm centrifuguojamas centrifūga. Eksperimento pradžioje susidaręs skystis yra nupilamas, o ant likusių baltymų miltų likučio užpilama 27 ml 0,9 N NaCl. Mėginys suplakamas, pamaišomas ir paliekamas stovėti 1 valandą. Vėliau centrifuguojamas centrifūga 30 min., 8000 rpm greičiu. Mėginyje susidaręs skystis nupilamas ir naudojamas tolimesnei analizei.

Analizei naudojama 10 g tirpiųjų baltymų. Tolimesnis tyrimas atliekamas lygiai taip pat kaip ir nustatant bendrą baltymų kiekį tik papildomai įdedama antiputokšlių.

Tirpiųjų baltymų kiekis mėginiuose yra apskaičiuojamas pagal paimtą tyrimui kiekį ir praskiedimo tūrį [43]:

$$B_{pr} = \frac{Bf \times G}{g}$$

čia: g – analizei paimto produkto kiekis;

G – paruošto filtrate, t.y. filtrato, kuriame yra tirpūs baltymai, kiekis.

Baltyminių medžiagų išskyrimas ir gryninimas

Baltyminių medžiagų išskyrimui žirnių miltai (fermentuoti ir/ar ultragarsu apdoroti) sumaišomi su distiliuotu vandeniu santykiu 1:10 (miltų:vandens) ir kambario temperatūroje (20±2 °C) retkarčiais pamaišant išlaikomi 30 min. Vėliau 1 M NaOH tirpalu suspensijos pH sureguliuojamas iki 9 ir išlaikoma 1 h. 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 [45]. Gauti baltymai

naudojami tolimesniuose eksperimento tyrimo etapuose siekiant nustatyti baltymų funkcines savybes bei *in vitro* virškinamumą ir proteazių inhibitorių aktyvumą.

Analogiškai baltymų išskyrimai atliekami su 24 h, 48 h ir 72 h KF paveiktais žirniais. Gauti baltymai taip pat naudojami ir SDS-PAGE elektroforezės tyrimui prieš tai juos vėl ištirpinus 0,1 N NaOH tirpale. Pagal šią metodiką buvo išskirtos žirnių albuminų ir gliutelinų frakcijos.

Baltyminių medžiagų analizė SDS-PAGE elektroforezės metodu

Šio tyrimo metu nustatinėjama žirnių albuminų ir globulinų molekulinės masės. Albuminai ištirpinami vandenyje ir paruošiamas baltymų tirpalas 1 mg/ml. Siekiant nuo globulinų atskirti NaCl mėginys filtruojamas per „Ultra- 15, MWCO 10 kDa“ filtrus.

Baltyminių medžiagų analizei naudojamas elektroforezės aparatas „CS-300 Cleaver Scientific“. SDS-PAGE analizei naudoti tirpalai ir jų paruošimas:

1. 30 % akrilamido/0,8 % *N,N'*-metilenbisakrilamido tirpalas. Ištirpinama 30 g akrilamido ir 0,8 g *N,N'*-metilenbisakrilamido ir pripilama H₂O iki 100 ml.
2. 4×TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas, kai pH 8,8. 36,4 g TRIS ištirpinama 110 ml vandens. Į gautą tirpalą įpilama 8 ml 10 % NDS tirpalo. Sureguliuojamas tirpalo pH iki 8,8 su 1N HCl.
3. 4×TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas, kai pH 6,8. 12,12 g TRIS ištirpinama 110 ml vandens. Į gautą tirpalą įpilama 8 ml 10 % NDS tirpalo. Sureguliuojamas tirpalo pH iki 6,8 su 1N HCl.
4. Elektroforezės TRIS-glicino buferinis tirpalas. 3,02 g TRIS, 14,4 g glicino, 1g NDS ir pripilama iki 1000 ml vandens.
5. 10 % amonio persulfato [(NH₄)₂S₂O₈] tirpalas. 0,1 g amonio persulfato ištirpinama 1 ml vandens. Tirpalas ruošiamas prieš pat naudojimą.
6. Tetrametiledilendiaminas (TEMED).
7. 2×baltymo denatūravimo buferinis tirpalas: 5 ml 4×TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas, kai pH 6,8, 4 ml glicerolio, 1,2 g NDS, 2 ml 2-merkaptoetanolio, 1 mg mėlynojo bromfenolio ir pripilama iki 100 ml vandens.
8. Standartinis baltymų mišinys: SIGMA colorburst „Electrophoresis marker“.
9. Tiriamojo baltymo pavyzdžiai. 10 mg tiriamojo lubinų baltymo ištirpinama 100 μl 1 N NaOH ir praskiedžiama iki 1 ml vandens.
10. Dažo Coomasie mėlio tirpalas: 10 % acto rūgšties, 0,006 % Coomassie mėlio G-250, 90 % vandens.

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.

Skiriamąjo gelio paruošimas. Skiriamasis gelis sudarytas: 4 ml akrilamido tirpalo, 2,5 ml 4xTRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas (pH 8,8), 3,4 ml distiliuoto vandens, 100 µl 10 % amonio persulfato tirpalas, 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 tirpalas (pH 6,8), 2,9 ml distiliuoto vandens, 50 µl 10 % amonio persulfato tirpalas, 5 µl TEMED.

Būtina tiriamąjį baltymą paruošti elektroforezei, tam tiriamasis baltymo tirpalas santykiu 1:1 skiedžiamas su 2×baltymo denatūravimo buferiniu tirpalu ir kaitinamas 5 min verdančio vandens vonioje. Analizei naudojama 10 – 40 µl paruošto baltymo preparato.

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 išjungiamą. 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 rūgšties. Vonelė purtoma kambario temperatūroje, kol iš gelio išsiplauna nesusirišę su baltymais dažai (1 h) [46].

2.3.5. Baltymų/miltų funkcinių savybių įvertinimas

Emulsijos sudarymo pajėgumas

Emulsijos sudarymo pajėgumui nustatyti ruošiamos 1% baltymų (pagal 2.3.4. skyriuje aprašytą baltyminių medžiagų išskyrimo metodiką) ir vandens suspensijos. 0,3 g žirnių baltymų sumaišoma su 10 ml vandens ir 5 ml „Floriol“ rapsų aliejumi. Gautas mišinys maišomas 5 min su „Vibrofix VF1 (IKA)“ vorteksu, vėliau centrifuguojama su „Microcen 23 (Orto alresa)“ 5000 rpm greičiu, 30 min. Žirnių baltymų emulsijos sudarymo pajėgumas nustatomas, esant skirtingiems terpės pH – 4, 6, 8. Suspensijos pH reguliuojamas su 0,1 N NaOH ir 0,1N HCl tirpalais. Emulsijos sudarymo pajėgumas apskaičiuojamas pagal formulę [43]:

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

Emulsijos stabilumo nustatymas

Šiam tyrimui mėginiai ruošiami taip pat, kaip ir emulsijos susidarymo pajėgumui nustatyti. Skirtumas tas jog prieš centrifugavimą mėginiai išlaikomi 80 °C temperatūroje 30 min, po to atvėsunami iki kambario temperatūros (20±2°C), 4 min. laikant mėgintuvėlius šaltame vandenyje. Atvėsinti mėginiai centrifuguojami „Microcen 23 (Orto alresa)“ centrifuga 30 min, 5000 rpm greičiu. Emulsijos stabilumas apskaičiuojamas pagal formulę [43]:

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

Putų sudarymo pajėgumas

Šiam tyrimui ruošiamos trys 1% baltymų (pagal 2.3.4. skyriuje aprašytą baltyminių medžiagų išskyrimo metodiką) suspensijos: 0,3 g baltymų sumaišoma su 10 ml vandens. Vėliau į suspensiją įlašinama 0,1 M NaOH arba 0,1 M HCl tirpalai, siekiant sureguliuoti pH iki 4, 6 ir 8. Gauta suspensija supilama į tris skirtingas matavimo kolbutes, nupilama 10 ml ir homogenizuojama 5 min su “IKA T25 digital” (Vokietija) plakikliu. Putų sudarymo pajėgumas (PP) apskaičiuojamas pagal formulę [47]:

$$\text{Putų sudarymo pajėgumas (\%)} = \frac{\text{Putų tūris (ml)}}{\text{Bendras suspensijos tūris (ml)}} \times 100$$

Gelių sudarymo pajėgumas

Šiam tyrimui ruošiamos keturios 6 %, 8 %, 10 % ir 12 % žirnių baltymų suspensijos, kurios sumaišomas su 100 ml distiliuoto vandens. Mėginių pH sureguliuojamas iki 7 su 0,5 N NaOH tirpalu. Gauta suspensija, homogenizuojama 2 min. su “IKA T25 digital” (Vokietija) plakikliu. Mišinys centrifuguojamas 15 min, 2000 aps/min “Heraeus labofuge 200“ (JAV) centrifūgoje siekiant iš mėginių pašalinti susidariusį orą. Mėginiai suskirstomi į 10 ml talpos mėgintuvėlius ir vonelėje išlaikomi 80 °C temperatūroje 10 min. Po kaitinimo mėginiai vėsunami šaltu vandeniu ir 2 valandas paliekami stovėti šaldytuve. Susidariusio gelio stiprumas įvertinamas apverčiant mėgintuvėlį (bandinys negali išbėgti arba slysti mėgintuvelio šonu) [48].

Vandens absorbcijos įvertinimas

Mėginiui paruošti 5 g žirnių miltų sumaišomi su 30 ml vandens. Gautas mišinys išmaišomas ir paliekamas stovėti 30 min. Vėliau mišinys centrifuguojamas „Velocity 18R

(Dynamica)“ centrifuga 30 min, 5000 rpm greičiu. Skystoji fazė nupilama. Vandens absorbcija apskaičiuojama pagal formulę [49]:

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

Gelių klampos analizė

Gelių klampos įvertinimui naudojamas akustinis prietaisas su specialiais jutikliais. Akustinio matavimo veikimo principas grindžiamas žemės svoriu (pastovi jėga) ir stūmoklio nusileidimo greičio į tiriamąją klampią medžiagą matavimu. Analizuojant stūmoklio nusileidimo greitį įvertinama tiriamosios medžiagos klampa. Stūmoklio nusileidimo greitis nustatomas naudojant bekontaktį matavimą, apimantį ultragarso bangos sklidimą per orą. Akustinio prietaiso techniniai parametrai: matavimo paklaida $\pm 5 \mu\text{m}$, laisvas kritimo atstumas tarp analizuojamo mėginio 20 mm, ultragarso veikimo dažnis 800 kHz, matavimo impulsų dažnis 1 kHz. Trys kiekvieno mėginio matavimai buvo atliekami milisekundžių (ms) tikslumu per 300 ms laikotarpį.

Mėginiui paruošti 17 g fermentuotų žirnių miltų suspenduojama su 83 ml distiliuoto vandens. Mišinys išmaišomas ir paliekamas stovėti 15 min. Mėginiai suskirstomi į 10 ml talpos mėgintuvėlius ir vonelėje išlaikomi 80 °C temperatūroje 60 min. Po kaitinimo mėginiai vėsunami šaltu vandeniu ir 2 valandas paliekami stovėti šaldytuve. Analizuojami mėginiai dedami į plastikines matavimo kiuvetes (90 mm skersmuo ir 120 mm aukštis) [50].

2.3.6. Bendro mikroorganizmų skaičiaus (BMS) nustatymas

Bendras mikroorganizmų skaičius (BMS) nustatomas pagal standartą LST EN ISO 4833:2003 Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis metodas. Kolonijų skaičiavimo 30 laipsnių temperatūroje metodas.

Tyrimo eiga: tiriamoji mėginio dalis yra pasverama svarstyklėmis ir praskiedžiama NaCl tirpalu, santykiu 1:9. Gautas mišinys išmaišomas purtykle Tomson. Pipete atmatuojama po 1 ml skiedinio ir supilama į dvi sterilas Petri lėkšteles, sumaišoma su 15 ml ištirpintos ir atvėsintos iki 45° C temperatūros terpės. Vėliau užsėjamos kitos Petri lėkštelės. Pasėlis su terpe išmaišomas sukant horizontaliais ir vertikaliais judesiais ir paliekama sustingti. Inkubuojama 72 h \pm 3 h 30 °C \pm 1 °C temperatūros termostate. Skaičiavimui atrenkamos tos lėkštelės, kuriose išaugo ne mažiau nei 15 ir ne daugiau kaip 300 kolonijų.

Siekiant įvertinti ultragarsinio poveikio įtaką antimikrobiniam aktyvumui, žirnių sėklos buvo paveiktos 20, 40, 60 ir 80 min. 37 kHz ultragarsu 18 - 20° C temperatūroje. Bandymas kartotas 2 kartus, vidutinei vertei apskaičiuoti lyginamos 4 lėkštelės. Bendram mikroorganizmų skaičiui išreikšti paimtas aritmetinis vidurkis.

Kolonijas sudarančių vienetų (KSV) skaičius 1 g žirnių mėginiuose apskaičiuojamas pagal formulę [55]:

$$N = \frac{\sum c}{V * (n^1 + 0,1 * n^2) * d}$$

ΣC – suma kolonijų, suskaičiuotų visose neatmestose lėkštelėse iš dviejų vienas po kito einančių skienidių, kai bent vienoje lėkštelėje yra mažiausiai 15 kolonijų;

V – užsėtos medžiagos (pasėlio) tūris lėkštelėje mililitrais;

n1 – pirmojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;

n2 – antrojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;

d – pirmojo vertinamo skiedinio skiedimo koeficientas.

2.3.7. Matematinė statistinė duomenų analizė

Eksperimentai kartoti mažiausiai tris kartus, išskyrus bendrą mikroorganizmų kiekio nustatymą (kartojamumas – 2 kartai). Rezultatų vidurkiai ir standartiniais nuokrypiais apskaičiuoti *Microsoft Excel* programine įranga. Statistiškai reikšmingais skirtumai tarp mėginių buvo laikomi, kai reikšmingumo lygis $p < 0,05$.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

Šiame darbe atlikti tyrimai siekiant įvertinti kietafazės fermentacijos ir ultragarsinio poveikio įtaką žirnių produktų cheminei sudėčiai ir funkcinėms savybėms.

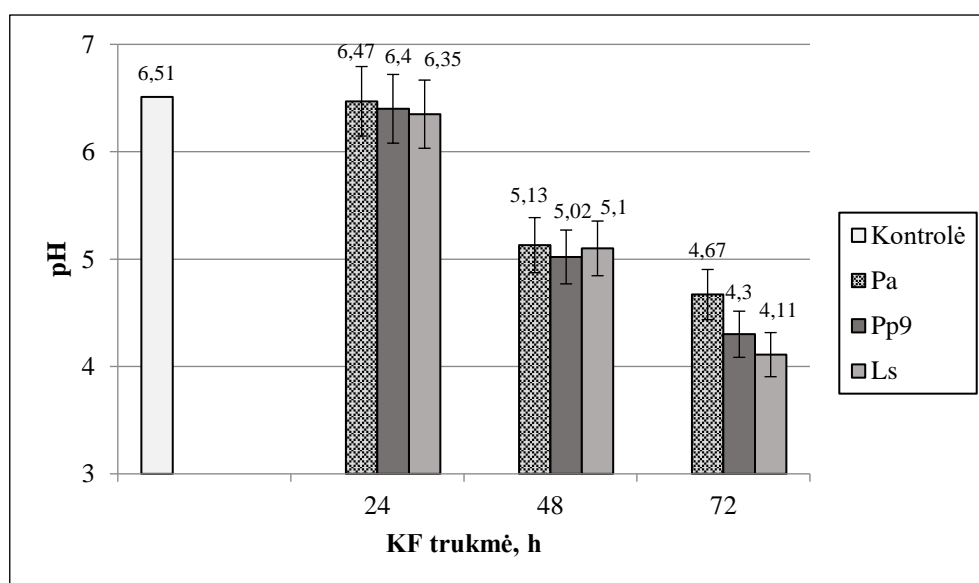
3.1. Žirnių produktų panaudojimas PRB kietafazės fermentacijos procesuose

Kietafazė fermentacija (KF) pastaruoju metu susilaukė ypatingo mokslininkų dėmesio, nes yra ekonomiškesnė ir saugesnė technologija nei įprasta fermentacija skystoje terpėje [56]. KF apibrėžiama kaip fermentacijos procesas, kuris vyksta kietoje fazėje ir yra atliekamas nesant dideliame vandens kiekiui (drėgnis <50 %) [57]. Pagrindiniai KF privalumai: esant mažam substrato vandens aktyvumui fermentacijos metu sumažėja mikrobiologinė tarša, naudojama paprastesnė įranga, fermentacijos procesams gali būti naudojami įvairūs mikroorganizmai (pelėsiai, bakterijos, mielės) ir substratai [58]. Siekiant didesnio KF efektyvumo, tikslinga tinkamai parinkti substrato dalelių dydį, pH, temperatūrą, vandens kiekį, terpės sudedamąsias dalis ir kt. [59].

3.1.1. Terpės pH ir BTR pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

Pradiniame eksperimento etape tirti pH pokyčiai žirnių produktų PRB KF metu (3.1 pav.). Žirnių produktai fermentuoti skirtingomis pieno rūgšties bakterijų padermėmis (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus* 9, *L. sakei*).

Iš pateiktų rezultatų matyti, jog žirnių produktų PRB KF metu pH kito vidutiniškai nuo 6,40 iki 4,36. Pradiniame fermentacijos etape (24 h) pH pokyčiai buvo nežymūs ir tai buvo fiksuojama su visomis PRB padermėmis.

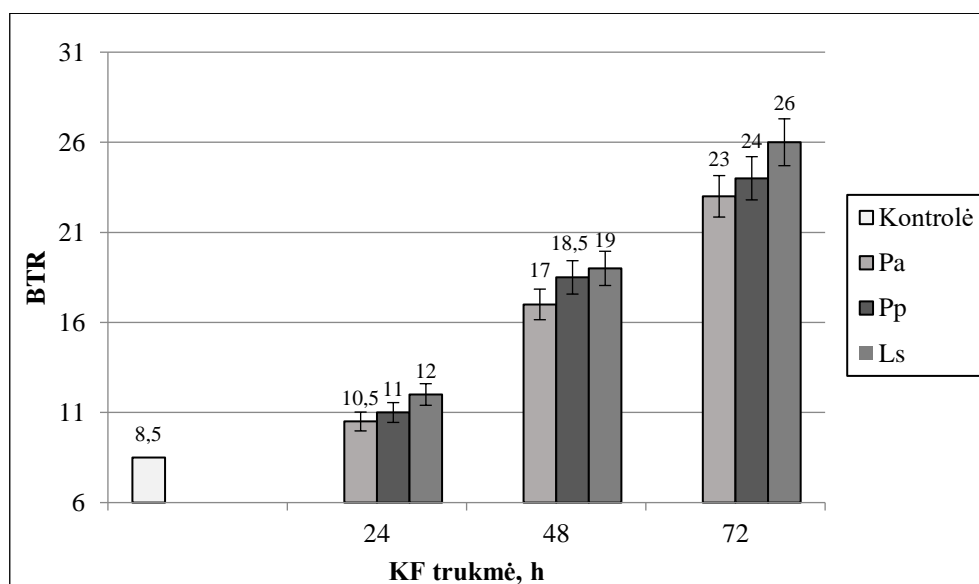


3.1 pav. Žirnių produktų terpės pH pokyčiai PRB KF metu

Tolesnės fermentacijos metu (48 h) PRB metabolitų susidarymo intensyvumas, lyginant su pirmuoju fermentacijos periodu (24 h), buvo didesnis ir pH vidutiniškai sumažėjo iki 5,08. Didžiausi pH pokyčiai visais atvejais (pH vidutiniškai sumažėjo iki 4,36) nustatyti, fermentuojant mėginius 72 h. Vertinant skirtingų PRB padermių įtaką pH pokyčiams, pastebėta, kad *P. acidilactici* intensyviau produkuoja rūgštinančius aplinką metabolitus, nei *P. pentosaceus* ar *L. sakei*.

PRB KF metu papildomai vertintas žirnių produktų bendras titruojamas rūgštingumas (BTR) (3.2 pav.).

Iš gautų rezultatų matyti skirtingi BTR pokyčiai žirnių produktų rūgštingumui, priklausomai nuo PRB ir KF trukmės. Kontroliniame mėginyje (savaiminė fermentacija be PRB) BTR nustatytas 8,5. Visais fermentacijos etapais buvo stebimas BTR verčių didėjimas: po 24 h fermentacijos BTR padidėjo, lyginant su kontrole, vidutiniškai 2,66 po 48 h fermentacijos – vidutiniškai 9,66. Didžiausias BTR vertės didėjimas nustatytas mėginius fermentuojant 72 h (BTR padidėjo apie 3 kartus).



3.2 pav. Žirnių produktų BTR pokyčiai PRB KF metu

Vertinant skirtingų PRB įtaką BTR, didžiausias analizuojamo kriterijaus didėjimas nustatytas mėginiuose, fermentuotuose (72 h) su *L. sakei* (vidutiniškai 10,50), kai su *P. pentosaceus* ir *P. acidilactici* atitinkamai 9,33 ir 8,33.

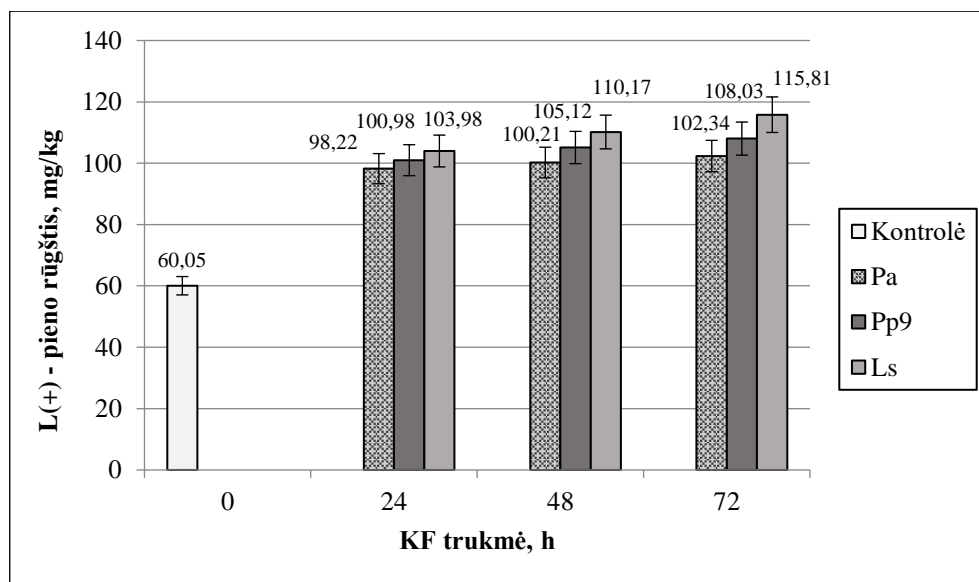
Iš gautų tyrimo rezultatų matoma, kad žirnių PRB KF (priklausomai nuo padermės) mažina pH ir didina BTR. Pagal H. García, A. López-Malo ir kt. didelis rūgštingumas ir žemos pH vertės fermentacijos metu turi įtakos lipidų tirpumui. Taip pat mažina molekulių poliškumą, padidinat maistinių medžiagų difuziją per mikroorganizmų ląstelių membraną į citoplazmą, tuo pagerindamos fermentacijos sąlygas ir metabolizmo produktų susidarymą fermentacijos metu [60].

Literatūroje pateikiama informacija apie kitos baltymingos augalinės žaliavos – lubinų (*L. luteus*) pH ir BTR pokyčius PRB KF metu (24 h), kurie sutampa su šiame eksperimente gautais duomenimis. *P. acidilactici* fermentuotuose mėginiuose pH nustatytas 4,21, BTR – 20,05; fermentacijai naudojant *P. pentosaceus* pH nustatytas 4,13, BTR – 23,42; mėginius fermentuojant su *L. sakei* pH nustatytas 4,24, BTR – 21,00 [54].

3.1.2. Pieno rūgšties D(-) ir L(+) izomerų įvertinimas PRB kietafazės fermentacijos metu

PRB plačiai naudojamos kaip starterinės kultūros įvairių fermentuotų maisto produktų gamyboje. Pagrindinis fermentacijos metabolitas yra pieno rūgštis, kuri dažniausiai naudojama kaip konservantas arba kaip produkto skonį formuojanti medžiaga [54]. Susidariusi pieno rūgštis ne tik gerina produkto juslines savybes, bet ir padeda apsaugoti maisto produktus nuo gedimą sukeliančių mikroorganizmų dauginimosi taip prailginant jų realizavimo laiką. Fermentacijos metu PRB produkuoja pieno rūgšties optinius izomerus L(+) ir D(-) [62]. Kadangi D(-) izomero žmogaus organizmas nemetabolizuoja ir gali sukelti acidozę ir dekalifikaciją, todėl tikslinga įvertinti pieno rūgšties izomerus ir jų kiekį, susidarantį žirnių produktų fermentacijos metu [62].

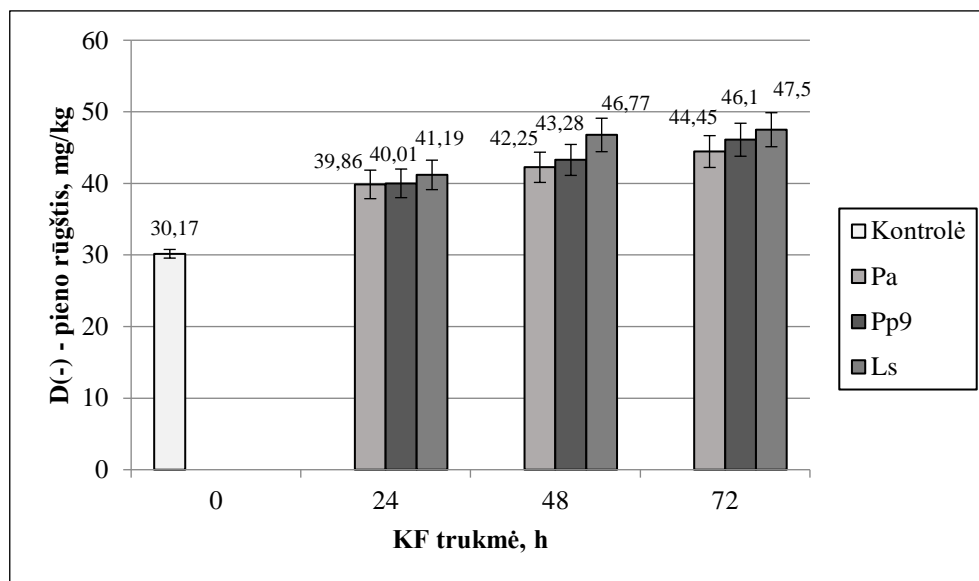
Žirnių produktų PRB KF metu susidariusių L(+) ir D(-) pieno rūgšties izomerų kiekio įvertinimo rezultatai pateikti 3.3 pav. ir 3.4 pav.



3.3 pav. L(+) pieno rūgšties izomero pokyčiai PRB KF metu

Žirnių produktų PRB KF metu (3.3 pav.) nustatytas L(+) izomero susidarymo didėjimas: po 24 h fermentacijos, lyginant su kontrole, L(+) izomero kiekis vidutiniškai padidėjo 41,01 mg/kg, po 48 h fermentacijos – 45,11 mg/kg. Daugiausiai L(+) pieno rūgšties izomero susikaupė 72 h fermentuotuose mėginiuose (vidutiniškai, 108,72 mg/kg). Intensyviausiai šį izomerą tiriamoje terpėje produkavo Ls padermė (vidutiniškai 109,98 mg/kg), kai Pp9 ir Pa

fermentuotose mėginiuose nustatyta atitinkamai 104,71 mg/kg ir 100,25 mg/kg. Savaiminės fermentacijos metu (kontrolė) taip pat buvo fiksuotas L(+) izomero susidarymas, tačiau jis buvo vidutiniškai kelis kartus mažesnis nei tiriamuose mėginiuose.



3.4 pav. D(-) pieno rūgšties izomero pokyčiai PRB KF metu

Iš gautų rezultatų matyti (3.4 pav.), jog D(-) izomero susidarymas per pirmąsias fermentacijos valandas (24 h) kito, lyginant su kontrole, nuo 30,17 mg/kg iki 40,35 mg/kg. Didesni D(-) pieno rūgšties izomero pokyčiai, nustatyti mėginiuose fermentuotuose 48 h ir 72 h, atitinkamai vidutiniškai 44,10 mg/kg ir 46,02 mg/kg.

Atlikus L(+) ir D(-) pieno rūgšties izomerų analizę žirnių produktuose nustatyta, jog L(+) ir D(-) pieno rūgšties izomerų koncentracijos tiriamuosiuose mėginiuose priklauso nuo naudotos PRB padermės. Siekiant užtikrinti fermentuotų produktų saugą D(-) izomero atžvilgiu žirnių produktai galėtų būti fermentuojami (24 h) su *P. acidilactici* bakterijomis, šiame mėginyje susidarė mažiausias D(-) izomero kiekis (42,18 mg/kg).

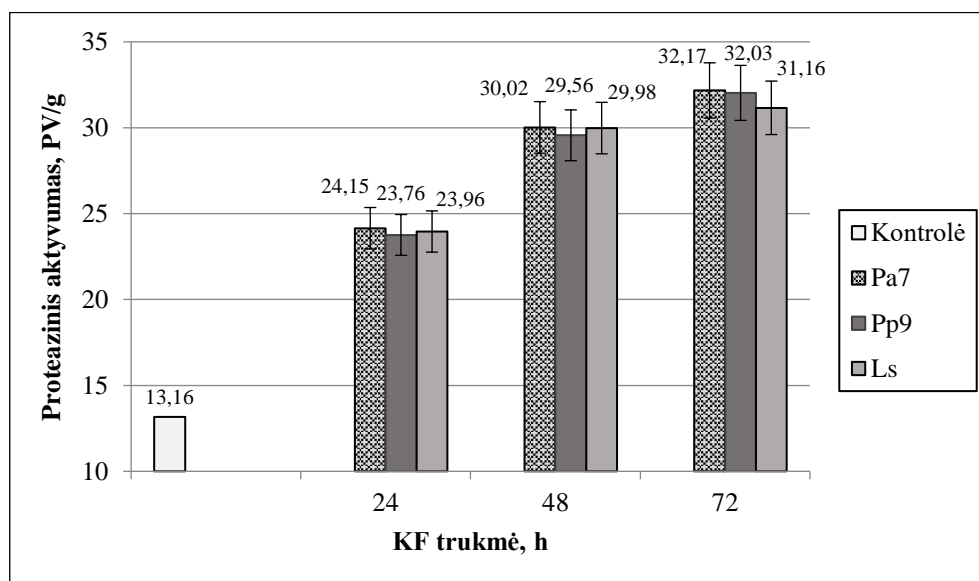
Literatūroje pateikiama informacija apie lubinų (*L. luteus*) ir sojų (*Progress*) pieno rūgšties D(-) ir L(+) izomerų pokyčius KF metu naudojant skirtingas PRB padermes (*P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *L. sakei*). Po 24 h fermentacijos tiriamuose mėginiuose nustatyti skirtingi L(+) ir D(-) pieno rūgšties izomerų kiekiai. Tiek lubinų, tiek sojų produktai pasižymėjo didesniu L(+) izomero kiekiu, nei D(-) izomero kiekiu. Lyginant tyrimo rezultatus priklausomai nuo naudotų PRB padermių, didžiausią poveikį L(+) pieno rūgšties izomero kiekio padidėjimui turėjo *P. pentosaceus* fermentacija (lubinų produktuose nustatytas L(+) izomero kiekis 128,4 mg/kg, sojose – 117,9 mg/kg). Su šia paderme fermentuotų lubinų ir sojų produktuose nustatytas 2 kartus mažesnis D(-) pieno rūgšties izomero kiekis atitinkamai 48,9 mg/kg ir 56,2 mg/kg [54].

3.2. Proteazių aktyvumo pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

Naudojant žirnių produktus kaip PRB fermentacijos terpę, aktualu įvertinti fermentinių aktyvumų pokyčius fermentacijos metu, pvz. proteazinio, kuris gali turėti įtakos technologiniam procesui ir baltyminių medžiagų pasisavinamumui.

Vertinant proteazinio aktyvumo pokyčius PRB KF metu, stebimas analizuojamo parametro verčių didėjimas (3.5 pav.). Nefermentuotuose žirnių produktuose proteazinis aktyvumas nustatytas 13,16 PV/g. Ilgėjant fermentacijos trukmei (nuo 24 h iki 72 h) žirnių produktų proteazinis aktyvumas vidutiniškai kito ribose nuo 23,96 PV/g iki 31,79 PV/g. Didžiausias proteazinio aktyvumo prieaugis nustatytas po 24 h fermentacijos ir jis sudarė 82,00 %. Kituose fermentacijos etapuose (48 h ir 72 h), lyginant su 24 h fermentuotais žirnių produktų mėginiais, nustatyti proteazių aktyvumo pokyčiai buvo atitinkamai 24,63 % ir 32,63 % mažesni.

Analizuojant skirtingų PRB padermių įtaką proteaziniui aktyvumui, pastebėta, jog skirtingos PRB padermės pasižymi skirtingu proteaziniu aktyvumu. Didžiausias proteazių aktyvumas (vykstant 72 h fermentacijai) nustatytas *P. acidilactici* fermentuotuose mėginiuose (32,17 PV/g), o mažiausias - *L. sakei* (31,16 PV/g).



3.5 pav. Žirnių produktų proteazinio aktyvumo pokyčiai PRB KF metu

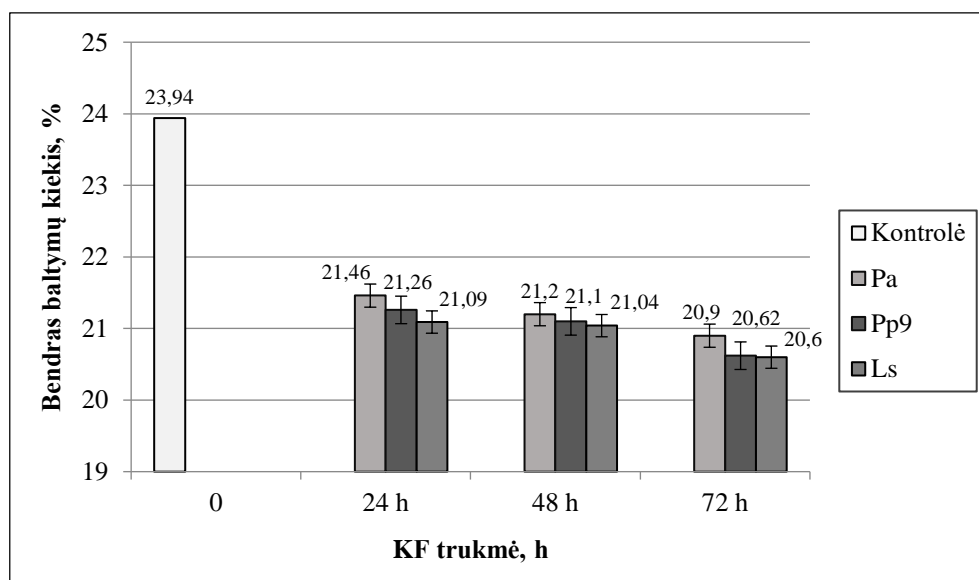
Analogiški tyrimų rezultatai pateikiami ir literatūroje. Didžiausias proteazinis aktyvumas nustatytas 48 h *P. acidilactici* fermentuotuose sojų produktuose, mažesniu proteaziniu aktyvumu pasižymėjo *L. sakei* ir *P. pentosaceus* fermentuoti mėginiai [63].

3.3. Žirnių produktų baltyminių medžiagų, funkcinių savybių ir pasisavinamumo pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

3.3.1. Baltyminių medžiagų pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

Šiame tiriamojo darbo etape pateikti žirnių produktų baltyminių medžiagų pokyčiai PRB KF metu. Apie juos buvo sprendžiama pagal bendro baltymų kiekio, tirpiųjų baltymų (albuminų ir globulinų frakcijų) analizės rezultatus (3.6, 3.7 ir 3.8 pav.).

Nustatyta (3.6 pav.), jog PRB KF žirniuose mažino bendrą baltymų kiekį. Mažiausias bendrą baltymų kiekio pokytis, lyginant su kontrole, nustatytas žirnius fermentuojant 24 h ir jis sudarė 2,67 %. Kitame fermentacijos etape (48 h), lyginant su 24 h fermentuotais mėginiais, baltymų pokyčiai buvo nereikšmingi. Didesni bendrą baltymų pokyčiai, lyginant su kontrole, nustatyti po 72 h fermentacijos ir vidutiniškai sudarė 3,24 %. Be to, PRB padermės skirtingai įtakojo žirnių bendrą baltymų kiekio mažėjimą: didžiausi analizuojamo kriterijaus pokyčiai, lyginant su kontrole, nustatyti visais *L. sakei* fermentacijos etapais (vidutiniškai 3,00 %), kai su kitomis padermėmis (*P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*) bendras baltymų kiekis nustatytas vidutiniškai 2,86 % mažesnis.

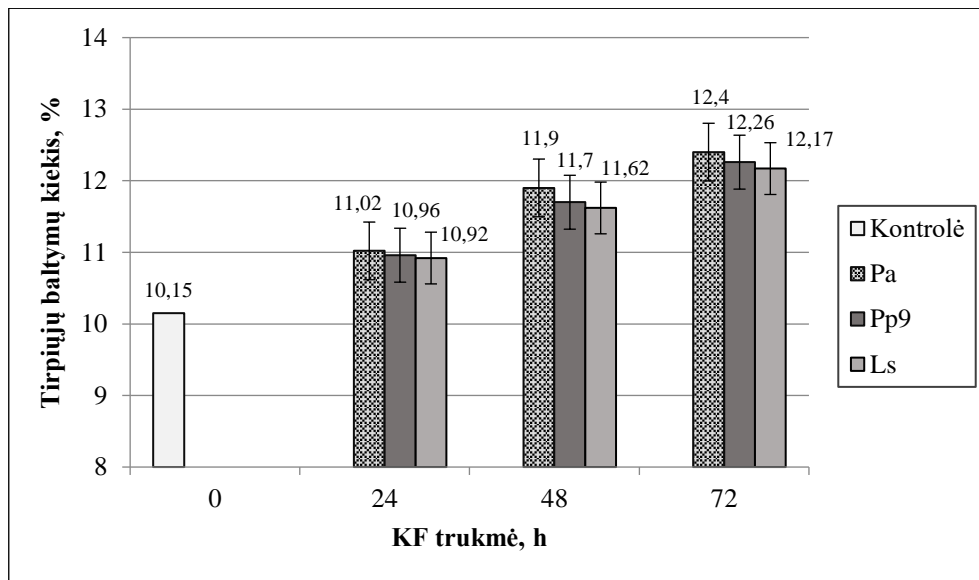


3.6 pav. Žirnių produktų bendro baltymų kiekio pokyčiai PRB KF metu

Vertinant KF įtaką žirnių baltyminėms medžiagoms taip pat buvo stebimi ir tirpiųjų baltymų pokyčiai (3.7 pav.).

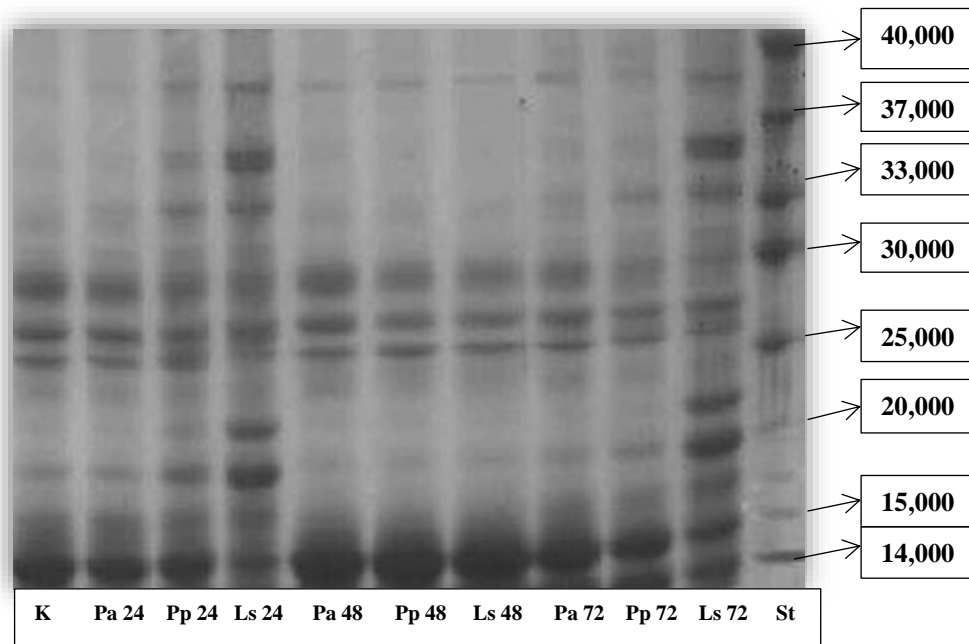
Iš gautų rezultatų matyti, jog PRB KF fiksuojama tirpiųjų baltymų didėjimo tendencija: po 24 h fermentacijos, lyginant su kontrole, tirpiųjų baltymų pokytis vidutiniškai sudarė 7,98 %. Didžiausi tirpiųjų baltymų pokyčiai nustatyti sekančiuose fermentacijos etapuose (48 h ir 72 h) ir atitinkamai sudarė 15,66 % ir 20,88 %.

Lyginant PRB padermių įtaką žirnių tirpiųjų baltymų pokyčiams reikšmingų skirtumų nepastebėta.



3.7 pav. Žirnių produktų tirpiųjų baltymų pokyčiai PRB KF metu

Albuminų ir globulinų frakcijų analizės, taikant SDS – PAGE elektroforezės metodą, tyrimo rezultatai pateikti 3.8 paveiksle. Eksperimento metu tiriami baltyminių medžiagų molekulinės masės pokyčiai mėginiuose, fermentuotuose KF sąlygose, naudojant įvairias PRB padermes.



3.8 pav. Žirnių produktų baltymų molekulinės masės pokyčiai PRB KF metu

K – nefermentuoti žirnių miltai; *St* – baltymo standartas SIGMA colorburst „Electrophoresis marker“.

Iš gautų rezultatų matyti, kad žirnių baltyminių medžiagų molekulinės masės pokyčiai kito ribose nuo 14,000 Da iki 40,000 Da, iš kurių didžiausią dalį sudarė smulkios baltyminės frakcijos, kurių molekulinė masė yra ~ 15,000 Da. Pradiniame žirnių miltų fermentacijos etape (24 h), stebima PRB padermės įtaka baltyminių medžiagų molekulinėms masėms: *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KF mėginiuose fiksuotos 14,000 Da – 15,000 Da baltyminės medžiagos, kai *L. sakei* fermentuotuose mėginiuose papildomai be šių frakcijų matomos ir didesnės molekulinės masės

frakcijos (37,000 Da). Tolimesniame fermentacijos etape (48 h) stebimas mažos molekulinės masės (14,000 Da) frakcijų didėjimas, kuris išryškėjo su visomis PRB padermėmis. Po 72 h *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* fermentacijos mėginiuose fiksuojami mažesnės molekulinės masės (20,000 Da) frakcijų hidrolizės procesai. Tokia tendencija buvo stebima ir didesnės molekulinės masės (25,000 – 30,000) frakcijose, tačiau mažesniu laipsniu. *L. sakei* fermentuotuose mėginiuose, lyginant su *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*, baltyminių medžiagų pokyčiai šio etapo metu buvo mažiausi, išliekant daugiau įvairių ir didesnės molekulinės masės frakcijų (nuo 14,000 Da iki 40,000 Da).

Gauti rezultatai lyginti su kitų tyrėjų darbais, kuriuose analizuojami bendrų ir tirpiųjų baltymų pokyčiai fermentacijos metu [64]. Nustatyta, kad fermentuojant lubinų (*Lupinus angustifolius*) baltymus su *P. pentosaceus* bendras baltymų kiekis mažėjo, o tirpiųjų baltymų kiekis didėjo. Iš gautų rezultatų matyti, jog didžiausią įtaką lubinų baltymų pokyčiams turi fermentacijos trukmė. Nefermentuotuose lubinų produktuose bendras baltymų kiekis nustatytas 39,8 %, o vandenyje tirpių baltymų – 18,6 %. Po 24 h fermentacijos bendras baltymų kiekis nustatytas 38,7 %, o vandenyje tirpių baltymų – 20,0 %, po 48 h fermentacijos – 36,5 % ir 23,6 %, po 72 h fermentacijos – 32,3 % ir 27,6 %.

Analogiški rezultatai gauti ir tiriant metabolitų pokyčius PRB fermentuojamuose sojos pupelių produktuose. Nustatyta, jog 100 % sojos pupelių pastoje fermentacijos metu bendras baltymų kiekis mažėjo (6,73 %), o tirpiųjų baltymų kiekis didėjo (57,67 %), visais atvejais, išskyrus 72 h fermentaciją – fermentuotuose 72 h mėginiuose fiksuojamas tirpiųjų vandenyje baltymų kiekio mažėjimas [65].

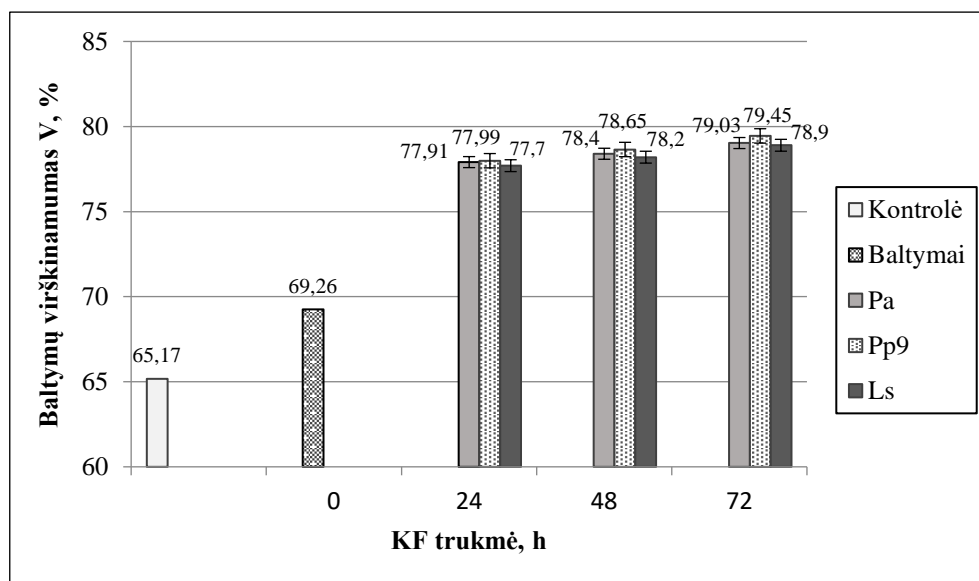
Taip pat literatūroje pateikti ir sojos pupelių tirpiųjų baltymų pokyčiai mėginius fermentuojant su *L. paracasei* H1102 paderme. Po 72 h vykusių sojos pupelių fermentacijos, tirpiųjų baltymų kiekis padidėjo nuo 4,79 % iki 19,97 % [66]. Analogiškos tendencijos buvo stebimos ir šio eksperimento metu.

3.3.2. Baltymų proteazių inhibitorių aktyvumo ir virškinamumo pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

Ankštinės kultūros išsiskiria padidintu kiekiu antimitybinių faktorių, kurie mažina baltymų pasisavinamumą, todėl tikslinga įvertinti jų kitimą PRB KF metu. Šiame tiriamojo darbo etape analizuota žirnių produktų proteazių inhibitorių aktyvumo ir baltymų *in vitro* virškinamumo pokyčiai PRB KF metu.

Baltymų *in vitro* virškinamumas. Žirnių miltų baltymų *in vitro* virškinamumo pokyčiai KF metu naudojant skirtingas PRB padermes pateikti 3.9 paveiksle.

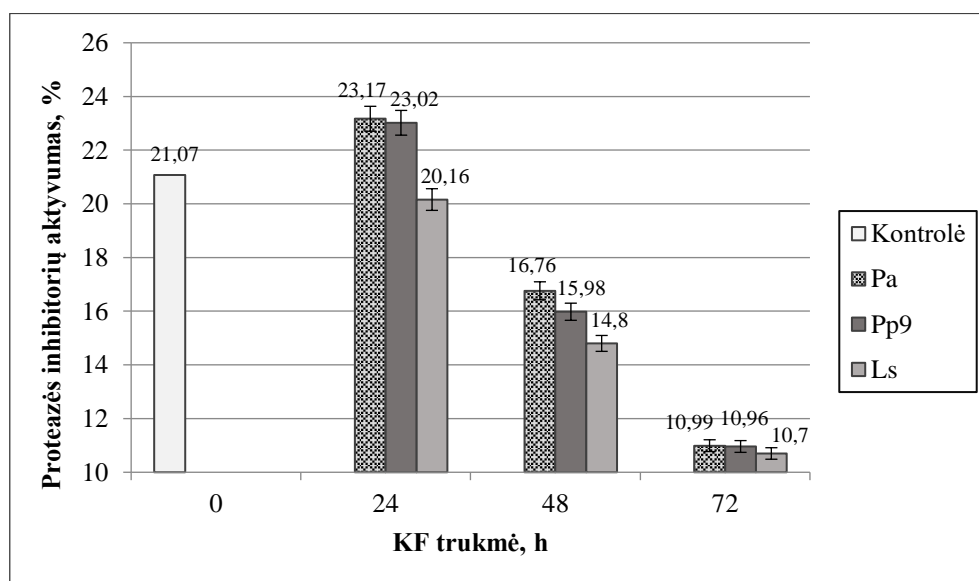
Iš gautų rezultatų matyti, jog PRB KF turėjo teigiamą įtaką žirnių baltymų *in vitro* virškinamumui: po 24 h fermentavimo, lyginant su nefermentuotais žirnių produktų baltymais, baltymų virškinamumas padidėjo 8,6 %, po 48 h fermentacijos – 9,15 %, po 72 h fermentacijos – 9,86 %.



3.9 pav. Žirnių produktų baltymų *in vitro* virškinamumo pokyčiai PRB KF metu

Vertinant PRB padermių įtaką baltymų virškinamumui, didžiausi pokyčiai fiksuojami mėginius fermentuojant su *P. pentosaceus*, analizuojamas kriterijus, lyginant su nefermentuotais žirnių produktų baltymais (visais fermentacijos etapais) vidutiniškai padidėjo 9,43 %, o fermentuojant su *P. acidilactici* ir *L. sakei* šis rodiklis nesiskyrė (atitinkamai 9,18 % ir 9,00 %).

KF metu buvo fiksuojami ir **proteazės inhibitorių aktyvumo** pokyčiai (3.10 pav.). Po 24 h fermentacijos PRB proteazės inhibitorių aktyvumas, lyginant su kontrole, vidutiniškai padidėjo 1,04 %. Tolesnės fermentacijos metu (48 h ir 72 h), lyginant su kontrole, šio parametro pokyčių vertės mažėjo, atitinkamai 5,23 % ir 10,14 %.



3.10 pav. Žirnių produktų baltymų proteazės inhibitorių pokyčiai KF PRB metu

Lyginant tarpusavyje atskiras PRB padermes, reikšmingi skirtumai nustatyti tiek po 24 h fermentacijos, tiek ir po 48 h fermentacijos. Po 24 h fermentacijos didžiausias šio parametro verčių didėjimas, lyginant su kontrole, buvo fiksuojamas žirnių baltyminių medžiagų *P. acidilactici* paderme fermentuotuose mėginiuose ir sudarė 2,1 %.

Iš gautų rezultatų matyti, jog žirnių produktų fermentacija slopino proteazės inhibitorių aktyvumą ir didino baltymų *in vitro* virškinamumą. Pagal mokslininkus M. Zwietering, W. M. de Vos ir kt. toks baltymų virškinamumo didėjimas siejamas su fermentacijos metu išskiriamais fermentais, kurie inaktyvuoja antimonybinius faktorius [67].

Analogiški rezultatai gauti ir kitų tyrėjų darbuose, vertinusių kitos baltymingos augalinės žaliavos (lubinų) virškinamumo pokyčius fermentacijos metu [68]. Analizuojant *L. luteus* lubinų produktus, didžiausias virškinamumas nustatytas *P. pentosaceus* fermentuotuose mėginiuose ($86,25 \pm 1,25\%$). Tos pačios tendencijos nustatytos *L. albus* fermentuotuose lubinų mėginiuose – didžiausias baltymų *in vitro* virškinamumas nustatytas su *P. pentosaceus* fermentuotuose mėginiuose ($87,53 \pm 1,44\%$). Taip pat nustatyta skirtingų PRB padermių įtaka baltymų virškinamumui: fermentuojant lubinus *L. luteus* su *P. pentosaceus*, baltymų virškinamumas padidėjo 18,73 %, kai su *P. acidilactici* – 17,12 %, su *L. sakei* – 16,73 %; *L. albus* fermentuotuose lubinų mėginiuose šie pokyčiai sudarė atitinkamai 17,68 %, 12,15 % ir 14,71 %.

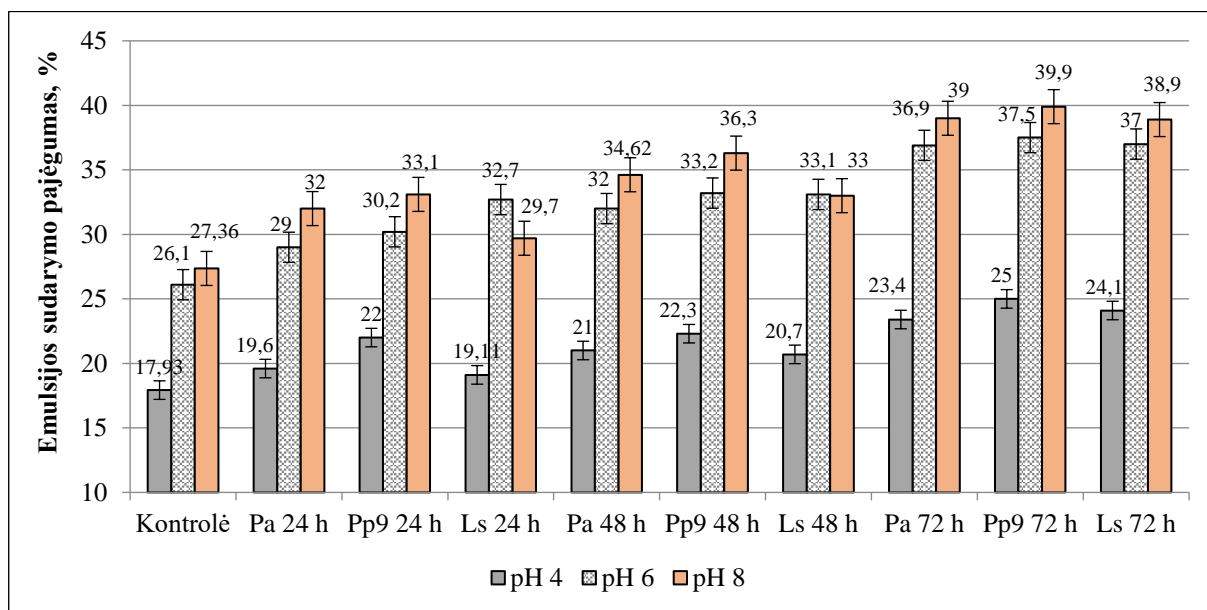
Kitų autorių darbuose taip pat fiksuojama PRB padermių įtaka lubinų (*L. albus* ir *L. luteus*) ir sojos pupelių (*Rudoji* ir *Progress*) baltymų virškinamumui. Visais atvejais PRB fermentacija turėjo teigiamą įtaką analizuojamiems kriterijams. Didžiausi baltymų virškinamumo pokyčiai, lyginant su kontrole (nefermentuotais lubinų miltais), nustatyti lubinų *L. albus* mėginius fermentuojant su *P. acidilactici*, baltymų virškinamumas kito nuo 74,38 % iki 87,53 %. Sojo pupelių *Progress* genotipo mėginiuose didžiausias baltymų virškinamumo padidėjimas, lyginant su kontrole, taip pat nustatytas fermentuojant su *P. acidilactici* (nuo 78,2 % iki 89,67 %) [54].

3.3.3. Baltyminių medžiagų funkcinių savybių pokyčiai PRB kietafazės fermentacijos metu

Atsižvelgiant į ankstesnius tyrimus ir į tai, kad daugumos augalinių baltymų izoelektrinis taškas (pI) vidutiniškai atitinka 4,5, žirnių produktų baltymų funkcinės savybės (emulsijos pajėgumas ir stabilumas, putų sudarymo pajėgumas bei gebėjimas sudaryti gelius) analizuotos naudojant baltymų suspensijas, ruoštas prie pH 4, pH 6 ir pH 8 [69]. Kontrolei naudojami iš žirnių viso dalių malimo sėklų išskirti baltymai be fermentacinio apdorojimo.

Emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas. PRB KF įtakos žirnių produktų baltymų emulgavimo savybėms tyrimų rezultatai pateikti 3.11 pav. ir 3.12 pav..

Atlikus emulsijos sudarymo pajėgumo vertinimą (3.11 pav.), nustatyta, kad didžiausią įtaką šio parametro vertėms turėjo terpės pH: esant terpės pH 4, emulsijos sudarymo pajėgumas vidutiniškai sudaro 21,91 %. Šarminant terpę iki pH 6 ir pH 8 emulsijos susidarymo pajėgumas didėjo nuo 33,52 % iki 39,26 %.



3.11 pav. Žirnių baltymų emulsijos sudarymo pajėgumas PRB KF metu

Iš gautų rezultatų matyti, kad KF trukmė taip pat turėjo įtakos emulsijos sudarymo pajėgumui, šio parametro vertės didėjo visais PRB KF etapais. Didžiausias emulsijos sudarymo pajėgumas, lyginant su kontrole, nustatytas mėginiuose fermentuotuose 72 h (vidutiniškai 9,73 %), kai po 24 h ir 48 h fermentacijos analizuojamas kriterijus didėjo mažesniu intensyvumu – 3,7 % ir 5,79 %.

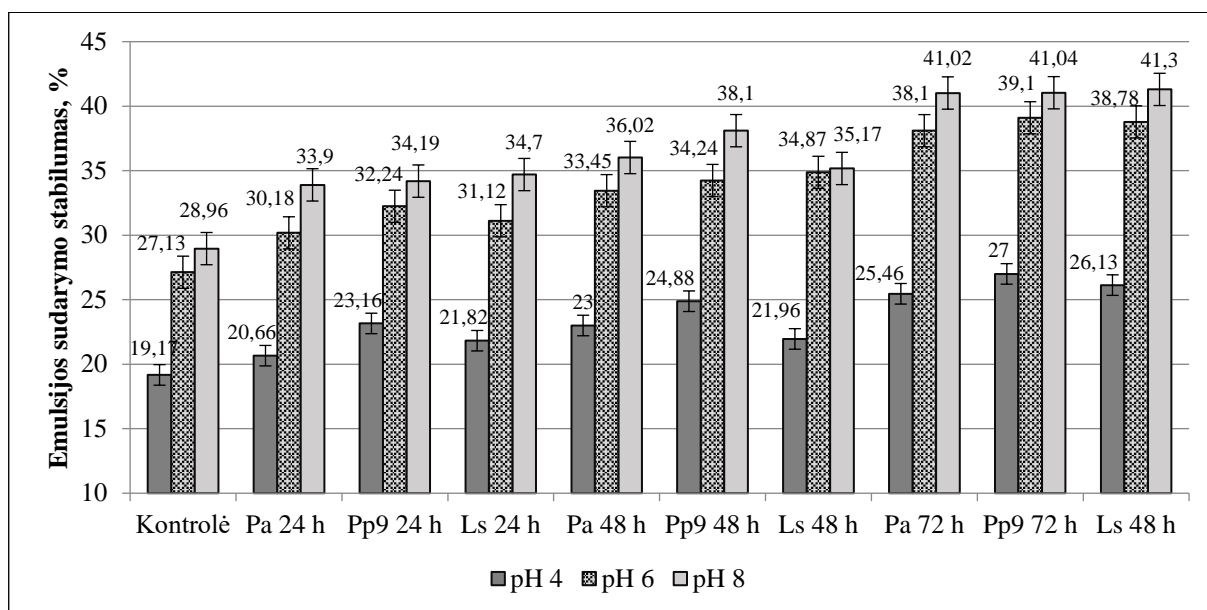
Lyginant skirtingų PRB padermių įtaką analizuojamam kriterijui, pastebėta, kad didžiausias emulsijos sudarymo pajėgumas nustatytas žirnių mėginiuose, fermentuotuose 72 h su *P. pentosaceus* paderme (34,13 %), o mažiausias – naudojant *P. acidilactici* padermę (33,10 %).

Analizuojant KF įtaką emulsijų sudarymo stabilumui (3.12 pav.), pastebėta, jog ilgesnė fermentacijos trukmė įtakojo geresnį emulsijos sudarymo stabilumą: po 24 h fermentacijos, lyginant su kontrole, emulsijos stabilumo pokyčiai buvo statistiškai nereikšmingi, tuo tarpu po 48 h fermentacijos buvo stebimas šio parametro verčių didėjimas ir jis sudarė 4,02 %. Didžiausi analizuojamo kriterijaus pokyčiai nustatyti fermentuojant mėginius 72 h (10,24 %).

Terpės pH taip pat turėjo įtakos emulsijos sudarymo stabilumui: esant terpės pH 4 emulsijos sudarymo stabilumas sudarė vidutiniškai 23,78 %, šarminant terpę iki pH 6 ir pH 8 analizuojamo kriterijaus vertės didėjo nuo 34,67 % iki 37,27 %.

Lyginant skirtingų PRB padermių įtaką analizuojamam kriterijui, pastebėta, kad didžiausias emulsijos sudarymo stabilumas po 72 h fermentacijos, nustatytas žirnių mėginiuose, fermentuotuose su *P. pentosaceus* paderme (35,71 %), o mažiausias – su *P. acidilactici* paderme

(34,86 %).



3.12 pav. Žirnių baltymų emulsijos sudarymo stabilumas PRB KF metu

Literatūroje pateikiama informacija apie fermentacijos įtaką kukurūzų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumui. Nustatyta, jog ilgėjant fermentacijos trukmei (nuo 12 h iki 48 h) didėja tiriamojo kriterijaus vertė: kontroliniame mėginyje emulsijos sudarymo pajėgumas nustatytas 57 %, po 12 h fermentacijos – 59 %, po 24 h fermentacijos – 61 %, po 36 h ir 48 h fermentacijos atitinkamai 62 % ir 66 %. Šis emulsijos sudarymo pajėgumo pokytis siejamas su fermentacijos metu didėjančiu baltymų tirpumu [70].

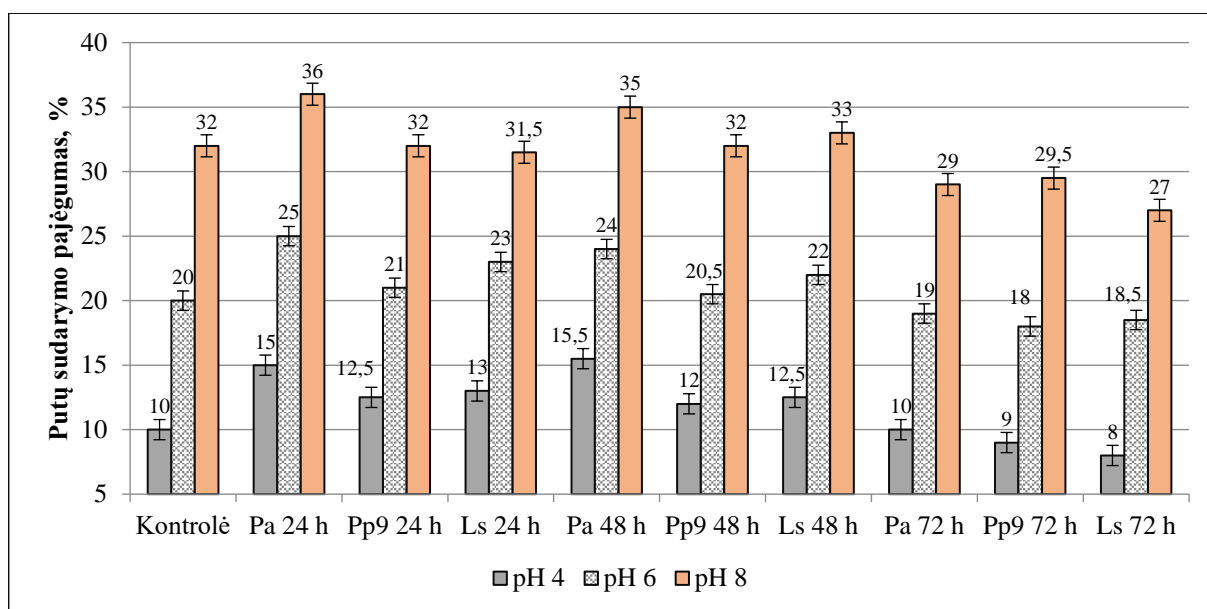
Kitų tyrėjų darbuose taip pat buvo nustatyta pH įtaka emulsijų sudarymo stabilumui: lubinų mėginius šarminant nuo pH 6 iki pH 8, emulsijos sudarymo stabilumas didėja nuo 45,2 % iki 50,2 % [66].

Iš žirnių išskirtų baltyminių medžiagų **putų sudarymo pajėgumo** tyrimo rezultatai pateikti 3.13 pav.

Iš gautų tyrimo rezultatų matyti, kad didžiausią įtaką žirnių baltyminių medžiagų putų sudarymo pajėgumui, taip pat kaip ir emulsavimo savybėms, turėjo terpės pH. Didžiausias putų susidarymo pajėgumas nustatytas, mėginiuose, kuriuose terpės pH 8 (vidutiniškai 31,66 %), mažiausias – esant terpės pH 4 (11,94 %).

Taip pat analizuojama ir PRB KF įtaką putų sudarymo pajėgumui. Fermentuojant žirnių baltymus 24 h ir 48 h, fiksuojamas (lyginant su kontrole) analizuojamo kriterijaus didėjimas, kuris vidutiniškai sudarė 2,56 % ir 2,28 %. Paskutiniame fermentacijos etape (po 72 h) nustatytas šios parametro verčių mažėjimas – 2 %.

Lyginant tarpusavyje įvairias PRB padermes, didžiausias putų sudarymo pajėgumas nustatytas su *P. acidilactici* 24 h fermentuotuose (esant terpės pH 8) mėginiuose (36 %), mažiausias – *L.sakei* fermentacijos atveju (31,50 %).



3.13 pav. Žirnių baltymų putų sudarymo pajėgumas PRB KF metu

Gauti rezultatai, kaip ir pateikti kitų tyrėjų darbuose, įrodo pH ir fermentacijos trukmės įtaką putų sudarymo pajėgumui [66]. Fermentuojant lubinų produktus 24 h, esant terpės pH 6 putų sudarymo pajėgumas didėjo nuo 25 % iki 38 %, o esant terpės pH 8 – nuo 37 % iki 50 %. Fermentuojant lubinų mėginius 48 h esant terpės pH 6 ir pH 8 analizuojamas kriterijus, lyginant su kontrole, didėjo atitinkamai 12 % ir 18 %.

Analizuojant žirnių baltymų (išskirtų iš žirnių miltų) funkcines savybes, papildomai tirtas **gelių sudarymo pajėgumas** (3.1 lentelė). Nustatyta, kad didžiausią įtaką gelių formavime turi baltymų koncentracija: 2 % ir 6 % baltymų suspensijos kiekis buvo nepakankamas baltyminių gelių formavimuisi ir sudarė skystą konsistenciją. Didinant baltymų koncentracijas iki 12 %, buvo išgaunamas optimalios konsistencijos gelis. Tarpinės gelių tekstūros savybės susiformavo ruošiant gelius su 10 % baltymų koncentracija. Skirtingos PRB padermės ir KF trukmė gelių formavimui įtakos neturėjo.

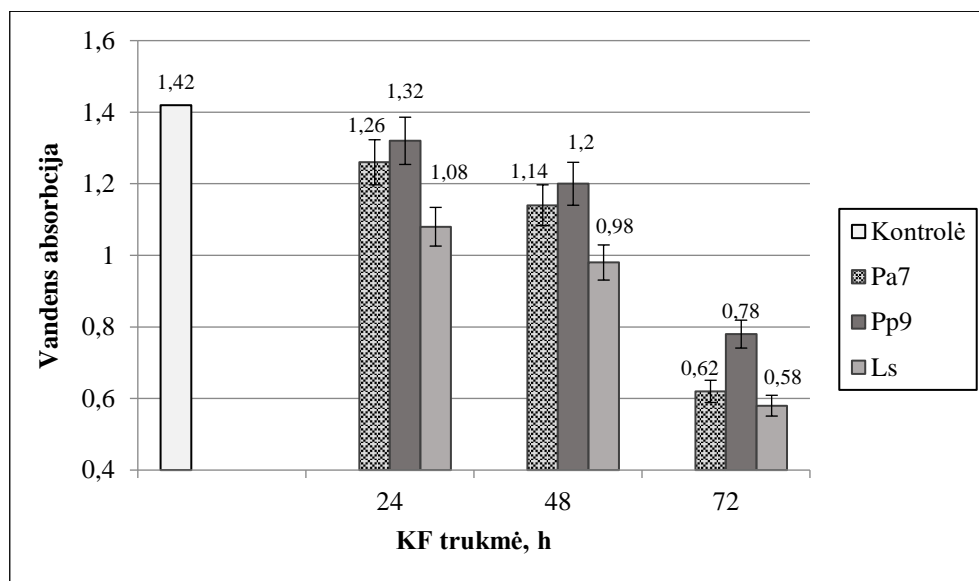
3.1 lentelė. Žirnių baltymų gelio sudarymo pajėgumas PRB KF metu

Baltymų suspensija, %	PRB padermės	24 h		48 h		72 h	
		Gelio formavimas	Konsistencija	Gelio formavimas	Konsistencija	Gelio formavimas	Konsistencija
2 %	Pa7	-	skysta	-	skysta	-	skysta
	Pp9	-	skysta	-	skysta	-	skysta
	Ls	-	skysta	-	skysta	-	skysta
6 %	Pa7	-	skysta	-	skysta	-	skysta
	Pp9	-	skysta	-	skysta	-	skysta
	Ls	-	skysta	-	skysta	-	skysta
10 %	Pa7	-/+	klampi	-/+	klampi	-/+	klampi
	Pp9	-/+	klampi	-/+	klampi	-/+	klampi
	Ls	-/+	klampi	-/+	klampi	-/+	klampi
12 %	Pa7	+	gelis	+	gelis	+	gelis
	Pp9	+	gelis	+	gelis	+	gelis
	Ls	+	gelis	+	gelis	+	gelis

V. Raikos, M. Neacsu, W. Russell ir kt. [71] nagrinėjo žaliųjų žirnių funkcines savybes, iš kurių ypatingas dėmesys buvo skiriamas gelių sudarymo pajėgumui. Vykdyto eksperimento metu išryškėjo baltymų koncentracijos įtaka gelių sudarymui: mėginiai, ruošti su 12 % baltymų koncentracija formavo gelį, kai tuo tarpu mėginiai su mažesniu baltymų kiekiu (10 %) sudarė silpną gelį, o mėginiuose su 2 %, 4 %, 6 %, 8 % baltymų koncentracija gelis nesusiformavo.

Literatūroje pažymima, kad baltymų kiekis nėra vienintelis veiksnys, nuo kurio priklauso gelių formavimasis [72]. Pagal Adebowale ir kt., gelių sudarymui įtakos turi angliavandeniai, kurie didina sąveikų tarp baltymų molekulių susidarymą, tokiu būdu pagerinant gelio sudarymo pajėgumą [73], [74]. Gelio sudarymo procesui taip pat turi įtakos pH, jei pH vertės yra nutolusios nuo izoelektrinio taško, baltymų paviršiaus įkrova padidėja ir tai slopina baltymų molekulių gebėjimą tarpusavyje sąveikauti ir sudaryti stipresnius ryšius [75], [76].

3.14 paveiksle pateikti PRB KF žirnių miltų **vandens absorbcijos** tyrimų rezultatai. Analizuojant gautus rezultatus, matyti, kad PRB KF turėjo neigiamos įtakos žirnių miltų vandens absorbcijai. Ilgėjant fermentacijos trukmei, blogėjo žirnių miltų savybė įgerti vandenį: po 24 h fermentacijos, lyginant su kontrole, vandens absorbcija sumažėjo 0,20, po 48 h fermentacijos – 0,32, po 72 h fermentacijos – 0,76.



3.14 pav. Žirnių miltų vandens absorbcijos pokyčiai PRB KF metu

Vertinant skirtingų PRB padermių įtaką analizuojamam kriterijui, matoma, kad didžiausios šio parametro vertės (visais fermentacijos etapais) nustatytos mėginius fermentuojant su *P. pentosaceus* paderme (vidutiniškai sumažėjo 0,32). Mažiausiai vandenį absorbavo *L. sakei* fermentuoti miltai (0,54).

Literatūroje aprašoma KF įtaka sojų miltų cheminei sudėčiai ir funkcinėms savybėms. Vertinant vandens absorbciją, nustatyta, kad didžiausią įtaką šio parametro vertėms turėjo KF trukmė. Nefermentuotuose sojų miltuose vandens absorbcija nustatyta 142,0 g/ml.

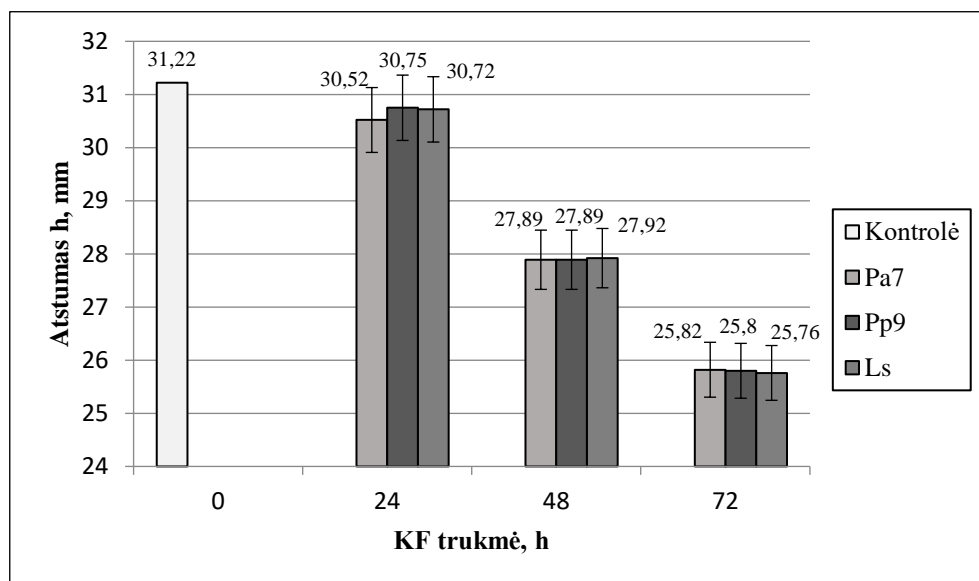
Fermentuojant mėginius 24 h nustatytas vandens absorbcijos mažėjimas – iki 137,0 g/ml. Tolesnės fermentacijos metu (48 h, 72 h ir 96 h) šio parametro pokyčių vertės taip pat mažėjo atitinkamai iki 136,0 g/ml, 131,0 g/ml ir 121,0 g/ml. Didžiausias vandens absorbcijos mažėjimas nustatytas mėginius fermentuojant 120 h (113,0 g/ml) [34].

J.C. Onweluzo ir C.C. Nwabugwu nustatė, kad fermentuotuose tikrojo kajano (*Cajanus cajan*) miltuose vandens absorbcijai įtakos taip pat turėjo fermentacijos trukmė. Kontroliniame mėginyje vandens absorbcija nustatyta 2,19 g/g. Po 24 h fermentacijos, lyginant su kontrole, vandens absorbcija sumažėjo 0,05 g/g, po 48 h fermentacijos – 0,15 g/g, po 72 h fermentacijos – 0,45 g/g. Mažiausia vandens absorbcija pasižymėjo mėginiai fermentuoti 96 h (0,77 g/g) [77].

3.4. Gelių klampos analizė PRB kietafazės fermentacijos metu

Tyrimo metu tirtas ultragarsinės įrangos panaudojimas žirnių baltymingų gelių (išskirtų iš žirnių izoliato) susidarymui, kontroliuojamam akustiniu klampos fiksavimo prietaisu (3.13 pav.).

Nustatyti reikšmingi skirtumai, tarp išmatuoto atstumo “h”, kurį penetruoja laisvai krisdamas kūnas per laiko vienetą, priklausomai nuo KF trukmės. Didesnės “h” vertės rodo didesnę laisvojo kritimo objekto greitį ir mažesnę gelio konsistenciją bei klampą.



3.15 pav. Žirnių iš izoliatų gelių klampumas PRB KF metu

Kontroliniame mėginyje (be PRB KF) gelio klampumas nustatytas 31,22 mm, kai fermentuotuose mėginiuose kito vidutiniškai nuo 30,66 % iki 25,79 %. Iš gautų rezultatų matyti, jog gelių klampumui daugiausia įtakos turi fermentacijos trukmė. Per pirmąsias fermentacijos valandas gelių klampumas vidutiniškai padidėjo 1,79 %, po 48 h fermentacijos – 10,63 %. Didžiausi gelių klampos pokyčiai nustatyti mėginius fermentuojant 72 h (17,39 %). Vertinant PRB įtaka gelių klampumui, pastebėta, jog KF naudotos skirtingos PRB padermės neturėjo įtakos analizuojamam kriterijui.

3.5. Ultragarinio poveikio įtaka žirnių produktų sudėčiai ir technologinėms savybėms

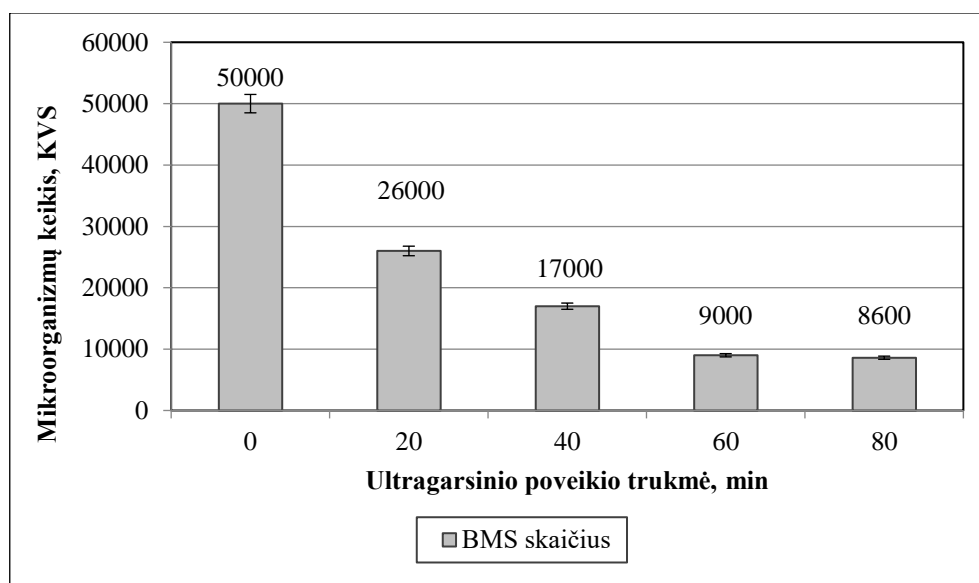
PRB KF sąlygose

Norint užtikrinti optimalų PRB dauginimąsi ir norimų metabolizmo produktų susidarymą, būtina debakterizuoti substratą. Įvertinant tai aktualu ieškoti efektyvių ir pramonėje naudotinių augalinės žaliavos debakterizacijos būdų. Viena iš galimybių būtų ultragarinio apdorojimo taikymas žaliavos debakterizacijai. Ši priemonė padeda efektyviau vykdyti fermentacijos procesus, kurie yra svarbūs maisto kokybės gerinimui. Be to, ultragarsas yra plačiai taikomas atliekant šių procesų stebėjimą [82].

Šiame tyrimo etape vertinta ultragarinio apdorojimo įtaka tiek augalinės žaliavos mikrobiniam užterštumui (pagal BMS tyrimų rezultatus), tiek ir baltyminių medžiagų bei jų funkcinių ir antimonybinių savybių pokyčiams. Ypatingas dėmesys skirtas, siekiant nustatyti optimalią ultragarinio poveikio trukmę, sąlygojančią tikslingą technologinių procesų eigą, įskaitant ir substrato debakterizavimą.

3.5.1. Ultragarinio apdorojimo įtaka mikrobiologinės taršos mažinimui

Ultragarinio poveikio, esant skirtingai trukmei, įtaka žirnių sėklų BMS pavaizduota 3.16 pav.



3.16 pav. Ultragarso įtaka bendram mikroorganizmų kiekiui žirnių sėklose

Kontroliniame žirnių miltų mėginyje BMS nustatytas 50000 KSV/g. Ilgėjant ultragarinio apdorojimo trukmei, augalinėje žaliavoje esantis mikroorganizmų skaičius mažėjo: po 20 min. ultragarso taikymo iki 26000 KSV/g, po 40 min. – iki 17000 KSV/g, po 60 min. – iki 9000 KSV/g, po 80 min. – iki 8600 KSV/g. Didžiausias BMS mažėjimas pasiektas po 60 min. ultragarinio apdorojimo (apie 5 kartus), todėl tolimesniuose eksperimento etapuose šį laiką buvo veikiami visi žirnių mėginiai.

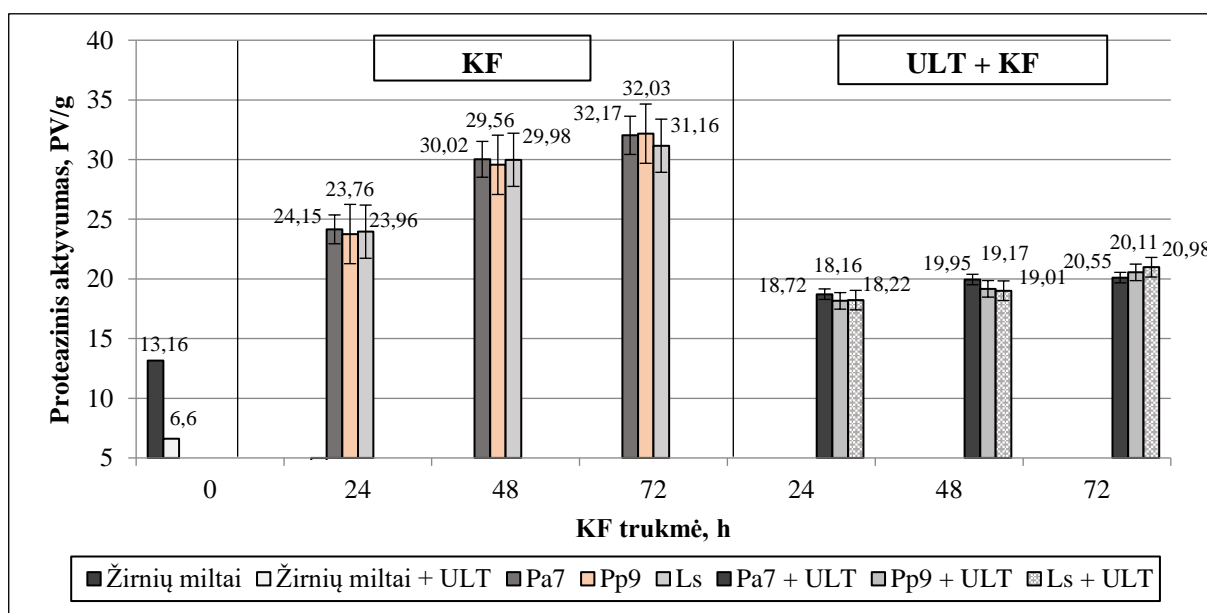
Kitų tyrėjų darbai taip pat įrodo, kad ultragarsas gali būti naudojamas siekiant sumažinti mikrobinę žirnių daigų taršą ir padidinti žirnių sėklų daigumą bei jų kokybę. Sėklų daigai yra jautrūs pašalinei mikroflorai, todėl labai svarbu, kad jiems būtų naudojamas veiksmingas sanitarinis apdorojimas. Pagal K. Y. Chiu, J. M. Sung (2014) atliktą ultragarso poveikio įtakos trijų žirnių genotipų daigų mikrobinei saugai ir sėklų fermentų inhibicijai tyrimą, nustatyta, kad ultragarsas ne tik pagerino daigumą (nuo 83 % iki 97 %), bet ir sumažino sėklų daiguose bendrą aerobinių mikroorganizmų skaičių iki $2,21 \log^{10} \text{CFU g}^{-1}$. Tuo tarpu kiti cheminiai būdai nebuvo šiuo požiūriu pakankamai efektyvūs. Ultragarsu taip pat buvo padidintas žirnių daigų kiekis iki 301,83 g/10 g sėklų [79].

Pagal K. Y. Chiu (2015) atliktą ultragarsu paveiktų sėklų daigumo ir augalų mikrobinio saugumo tyrimą, nustatyta, jog apdorojimas ultragarsu sumažino mėlynžiedės liucernos, mungo pupelių, žirnių ir ridikėlių daiguose bendrą aerobinių mikroorganizmų skaičių ir bendrą kolibakterinių mikroorganizmų skaičių iki $< 3 \log^{10} \text{CFU g}^{-1}$ lygio. Mėlynžiedės liucernos, mungo pupelių, žirnių ir ridikėlių daigai, paveikti ultragarsu, turėjo atitinkamai 88 %, 25 %, 73 % ir 56 % didesnę derlių nei daigai, kurie nebuvo apdoroti ultragarsu [80].

Tuo remiantis galima teigti, kad ultragarsas turi plačias pritaikymo galimybes ir gali būti sėkmingai naudojamas žirnių daigų pašalinės mikrofloros mažinimui.

3.5.2. Ultragarsinio poveikio įtaka proteazių aktyvumų pokyčiams PRB KF sąlygose

Ultragarsinio apdorojimo įtakos PRB KF žirnių proteaziniam aktyvumui tyrimų rezultatai pateikti 3.17 pav.



3.17 pav. Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių baltymų proteaziniam aktyvumui PRB KF sąlygose

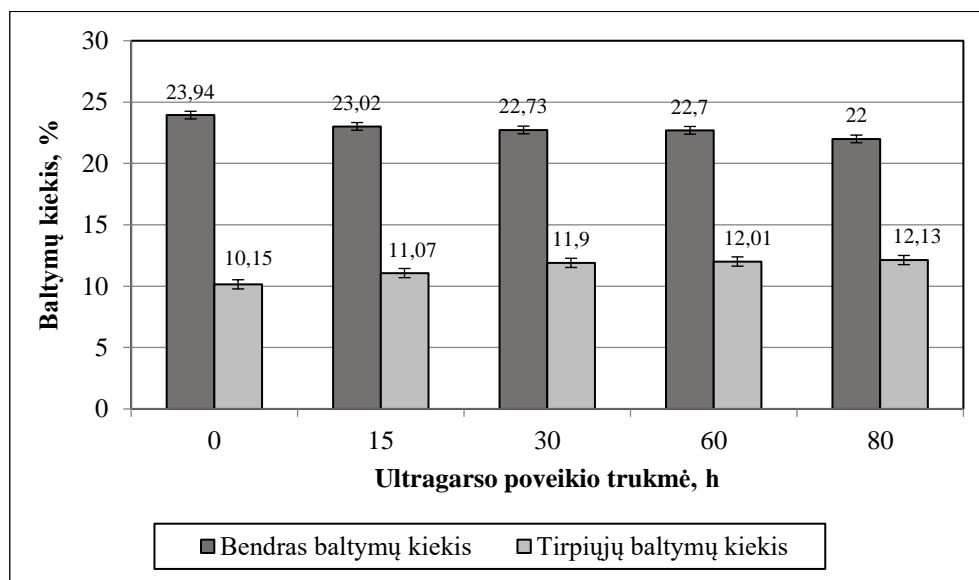
Žirnių miltuose, kurie nebuvo apdoroti ultragarsu, proteazinis aktyvumas nustatytas 13,16 PV/g. Paveikus juos ultragarsu, analizuojamas kriterijus sumažėjo iki 6,56 PV/g (apie 2 kartus).

Ši tendencija išryškėjo visais PRB KF etapais: po 24 h fermentacijos analizuojamas kriterijus nustatytas 23,34 % mažesnis nei mėginiuose apdorotuose vien tik PRB KF, po 48 h fermentacijos – 35,10 %, po 72 h fermentacijos – 25,92 %.

3.5.3. Ultragarinio poveikio įtaka žirnių produktų baltyminių medžiagų, funkcinių savybių ir antimonybiniams pokyčiams PRB KF sąlygose

3.5.3.1. Ultragarinio poveikio įtaka baltyminių medžiagų pokyčiams PRB KF sąlygose

Žirniai ypatingai vertinami kaip baltymų šaltinis ir yra lyginami su mėsos baltymais. Dėl šios priežasties tikslinga įvertinti ultragarinio poveikio įtaką žirnių baltyminių medžiagų pokyčiams. Atskirai tirtas ultragarinio apdorojimo poveikis PRB KF fermentuotiems žirnių baltymų mėginiams, palaikant pastovią 60 min. trukmę.



3.18 pav. Ultragarinio poveikio įtaka bendram ir tirpiųjų baltymų kiekiui

Iš pateiktų rezultatų (3.18 pav.) matyti, jog taikant ultragarinį apdorojimą, baltymų kiekis žirniuose pakito nežymiai: po 80 min. apdorojimo ultragarsu bendras baltymų kiekis nustatytas 1,94 % mažesnis nei mėginyje be ultragarinio apdorojimo.

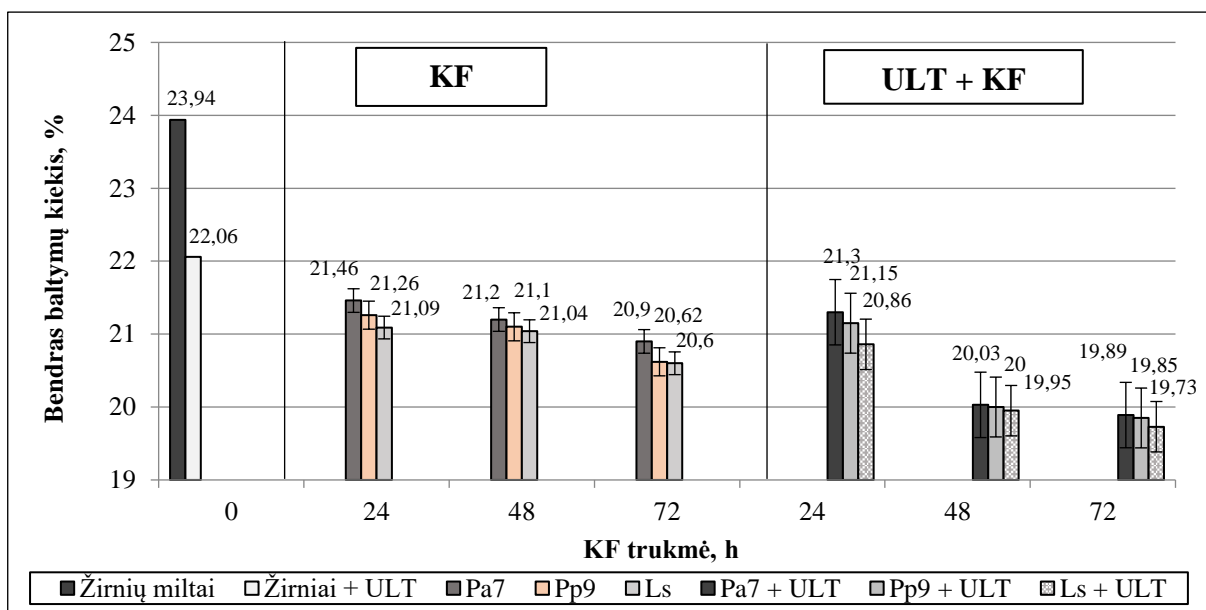
Vertinant ultragarso įtaką tirpiųjų baltymų pokyčiams fiksuojamos kitos tendencijos: ilgėjant ultragarinio apdorojimo trukmei stebimas analizuojamo kriterijaus didėjimas: po 15 min., 30 min., 60 min., ir 80 min. ultragarinio apdorojimo, lyginant su ultragarsu nepaveiktais mėginiais, žirnių tirpiųjų baltymų kiekis padidėjo atitinkamai 0,92 %, 1,75 %, 1,86 %, 1,98 %.

Ultragarinio apdorojimo įtakos PRB KF žirnių baltyminėms medžiagoms tyrimų rezultatai pateikti 3.19 ir 3.20 pav.

Iš gautų rezultatų matyti, kad veikiant žirnių baltymus ultragarsu prieš PRB KF (ULT + KF), taip pat kaip ir netaikant ultragarinio apdorojimo, stebimas bendrųjų baltymų mažėjimas

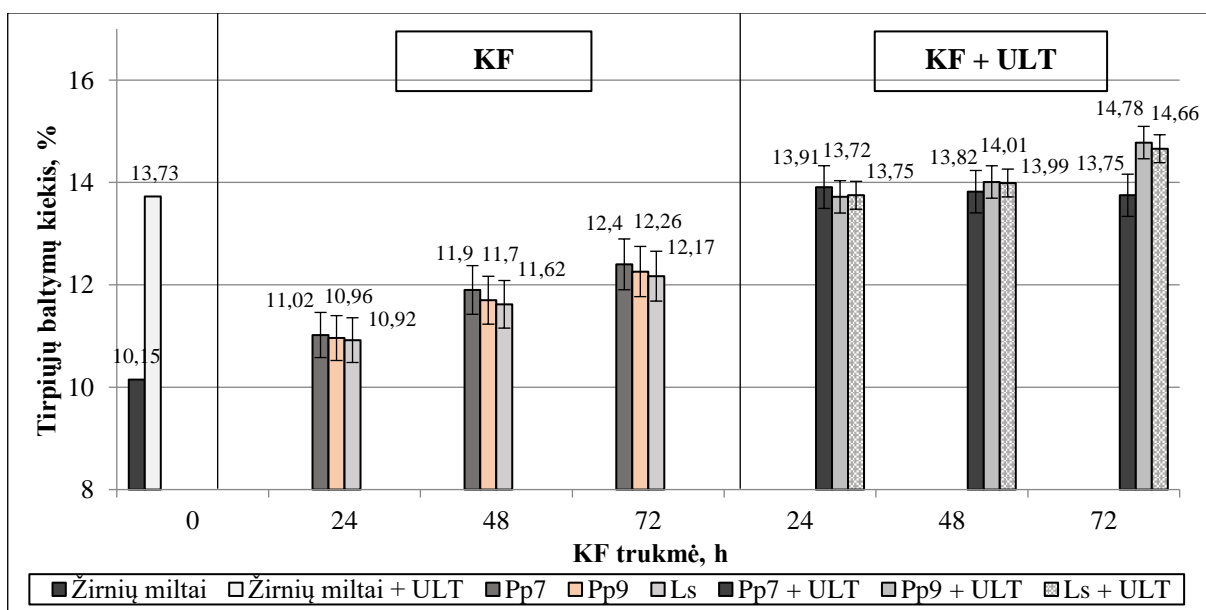
ir tirpiųjų baltymų didėjimas ir šis pokytis fiksuojamas visais fermentacijos etapais.

Taikant ultragarsinį apdorojimą žirnių produktams prieš PRB KF (ULT + KF), bendras baltymų kiekis nustatytas vidutiniškai 3,47 % mažesnis nei taikant vien tik PRB KF. (3.19 pav.).



3.19 pav. Ultragarsinio poveikio įtaka bendram baltymų kiekiui PRB KF sąlygose

Tyrimai rodo (3.20 pav.), kad ultragarsu paveiktuose žirnių produktuose prieš PRB KF tirpiųjų baltymų kiekis nustatytas vidutiniškai 2,43 % didesnis nei PRB KF mėginiuose be ultragarsinio apdorojimo. Ši tendencija išryškėjo visais PRB KF etapais: po 24 h fermentacijos tirpiųjų baltymų kiekis nustatytas 2,83 % didesnis nei mėginiuose apdorotuose vien tik PRB KF, po 48 h fermentacijos – 2,20 %, po 72 h fermentacijos – 2,12 %.



3.20 pav. Ultragarsinio poveikio įtaka tirpiųjų baltymų kiekiui PRB KF sąlygose

Gautus rezultatus patvirtina ir kitų mokslininkų tyrimai, kurių metu nustatytas ultragarsinio apdorojimo poveikis sojos baltymų izoliatams: veikiant mėginį 20 kHz ultragarsu po 15 min. tirpiųjų baltymų kiekis, lyginant su mėginiu, kuris buvo be ultragarsinio apdorojimo, padidėjo 5 %, o po 30 min. – 9 % [81].

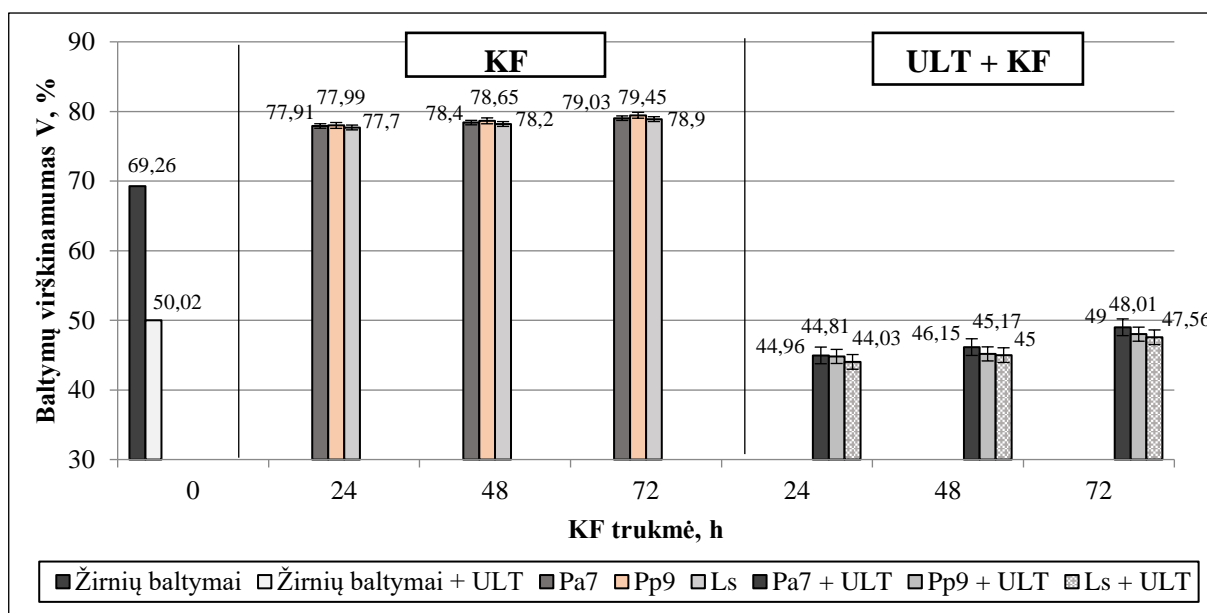
Taip pat paskelbti tyrimų rezultatai, kuriuose ultragarsinis poveikis (20 kHz) padidino žirnių baltymų tirpumą: mėginyje be ultragarsinio apdorojimo tirpiųjų baltymų kiekis sudarė 8,17 %, kai mėginyje apdorotame ultragarsu (5 min.) analizuojamo kriterijaus vertė padidėjo 47,63 % [82].

3.5.3.2. Ultragarsinio poveikio įtaka baltymų virškinamumo ir proteazių inhibitorių aktyvumui PRB KF sąlygose

Vykdamas eksperimentą analizuota ultragarso įtaka PRB KF žirnių baltyminių medžiagų virškinamumui ir proteazės inhibitorių aktyvumui (3.21 ir 3.22 pav.).

Lyginant su 3.3.2 skyriuje gautais rezultatais (3.9 pav.), nustatyta, jog žirnių baltyminių medžiagų *in vitro* virškinamumui įtakos turi tik PRB KF. Vien tik ultragarsu apdorotame mėginyje (žirnių miltai + ULT) baltymų virškinamumas nustatytas 27,77 % mažesnis nei žirnių baltymų mėginyje be PRB KF ir ULT. Tai įrodo, jog ultragarsinis poveikis analizuojamam kriterijui įtakos neturi.

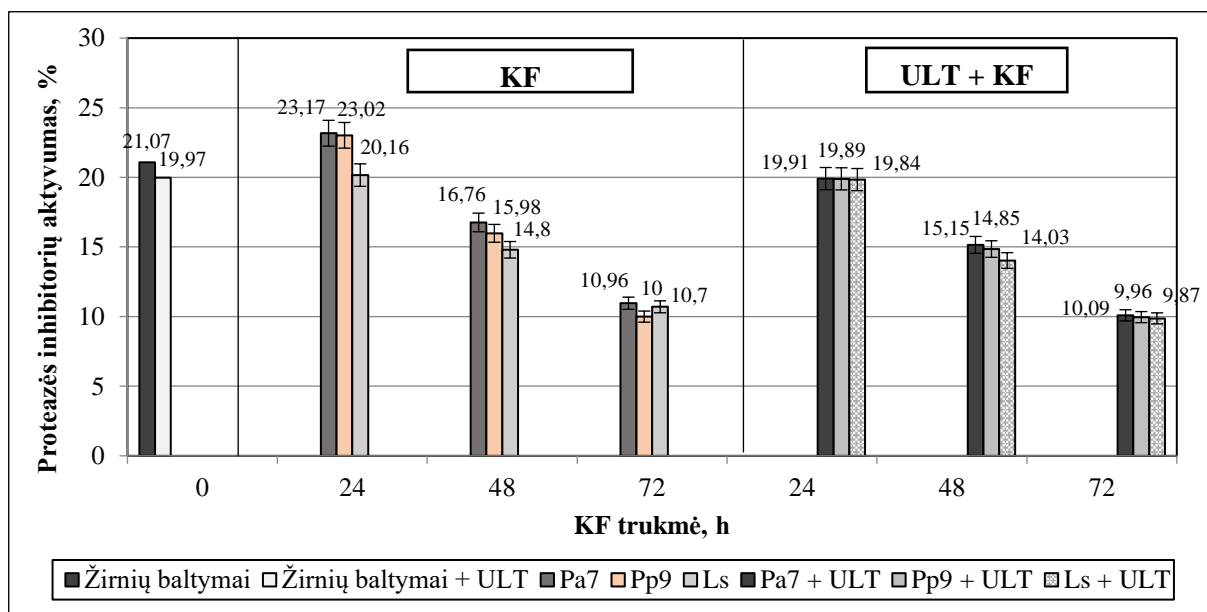
Vertinant PRB KF įtaką baltymų virškinamumui, nustatyta, kad visais fermentacijos etapais analizuojamo kriterijaus vertės, lyginant su kontrole, didėjo (po 24 h fermentacijos – 8,6 %, po 48 h – 9,15 %, po 72 h – 9,86 %), kai mėginiuose apdorotuose ultragarsu prieš PRB KF šio parametro vertės nustatytos atitinkamai 33,26 %, 32,97 %, 30,93 % mažesnės.



3.21 pav. Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių baltymų *in vitro* virškinamumui PRB KF sąlygose

Analogiškos tendencijos stebimos ir vertinant ultragarsinio poveikio įtaką PRB KF žirnių produktų proteazės inhibitorių aktyvumui (3.22 pav.).

Iš gautų rezultatų matyti, jog ultragarsinis apdorojimas neturėjo įtakos analizuojamam kriterijui. Proteazės inhibitorių aktyvumas žirnių PRB KF mėginiuose apdorotuose ultragarsu buvo 1,46 % mažesnis, nei mėginiuose, kuriuose ultragarsinis apdorojimas nebuvo taikomas. Šio tyrimo metu išryškėjo tik PRB KF teigiamas poveikis analizuojamam kriterijui, kuris kito priklausomai nuo fermentacijos trukmės (3.3.2 skyrius, 3.10 pav.).



3.22 pav. Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių baltymų proteazės inhibitorių aktyvumui PRB KF sąlygose

Siekiant pagerinti žirnių baltymų pasisavinamumą, žirnių produktus tikslinga fermentuoti 72 h, naudojant *P. pentosaceus* padermę. Šiuose tiriamuose mėginiuose nustatytos didžiausios baltymų *in vitro* virškinamumo (79,45 %) ir mažiausios proteazės inhibitorių aktyvumo vertės (10,00 %).

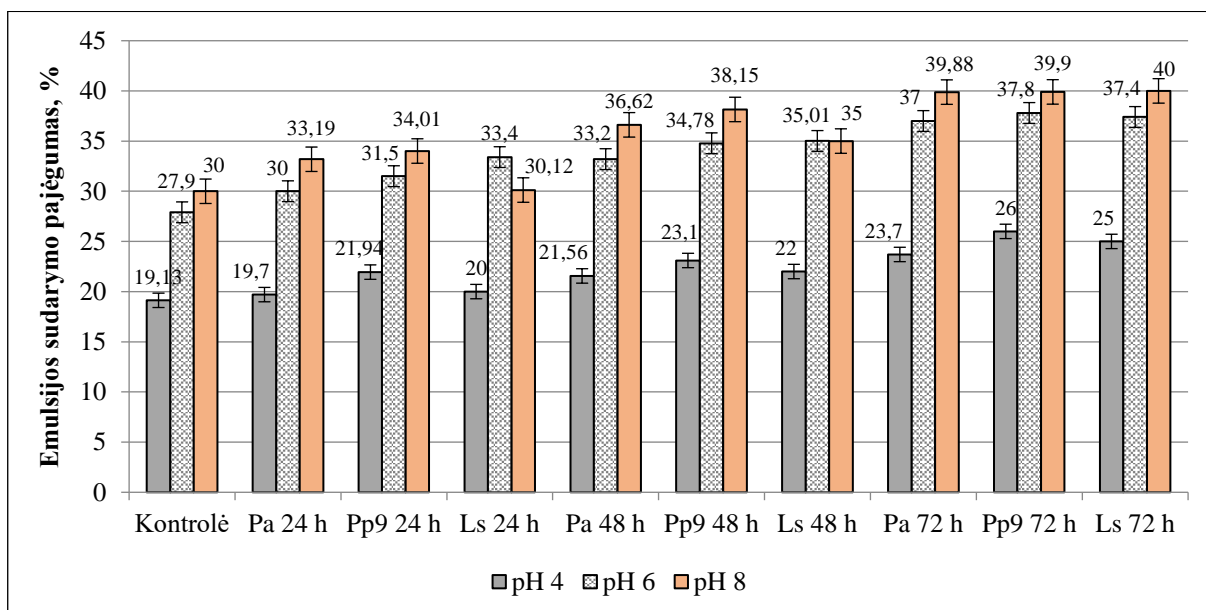
3.5.3.3. Ultragarsinio poveikio įtaka baltyminių medžiagų funkcinėms savybėms PRB KF metu

Šiame eksperimento etape vertinta ultragarsinio poveikio įtaka žirnių baltyminių medžiagų, išskirtų iš žirnių miltų, funkcinėms savybėms: emulsijos pajėgumui (3.23 pav.) ir stabilumui (3.24 pav.), putų sudarymo pajėgumui (3.25 pav.) bei gebėjimui sudaryti gelius (3.27 pav.).

Emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas. Iš gautų rezultatų matyti, kad ULT poveikis turėjo reikšmingos įtakos tiek emulsijos sudarymo pajėgumui, tiek stabilumui.

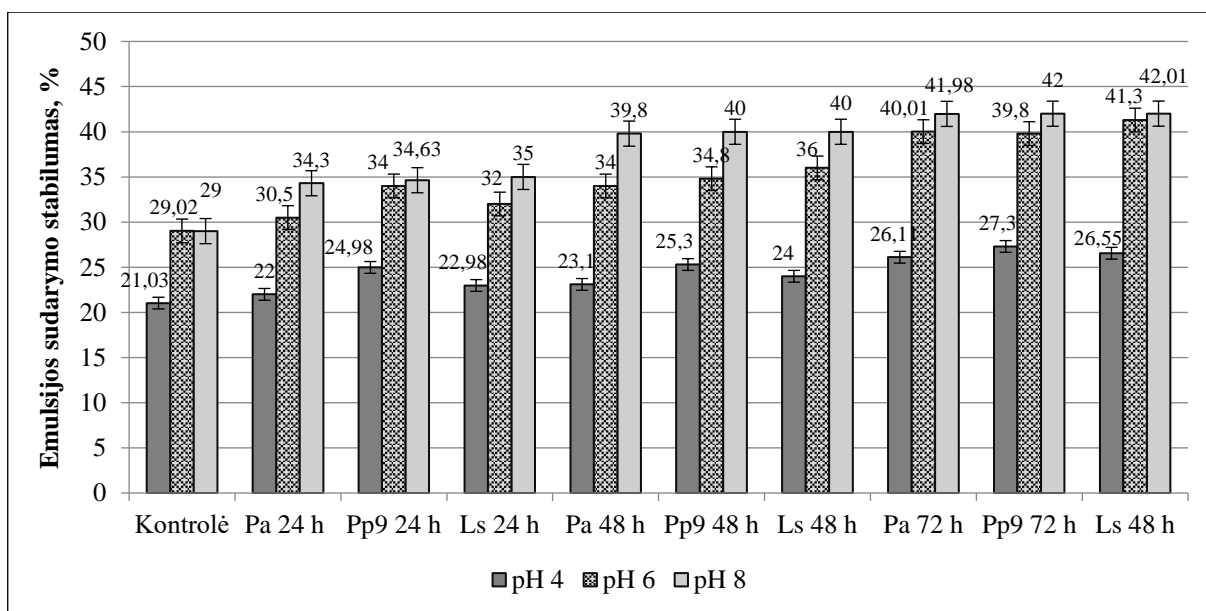
Stebima tendencija, kad apdorojant žirnių baltymines medžiagas ultragarsu prieš PRB KF, emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas, lyginant su mėginiais, kurie buvo apdoroti vien tik PRB KF (3.3.3 skyrius, 3.11 ir 3.12 pav.) padidėjo visais fermentacijos etapais, o ypač išryškėjo

po 72 h fermentacijos: emulsijos sudarymo pajėgumas ir stabilumas padidėjo vidutiniškai 10,28 % ir 11,26 %, kai taikant vien tik PRB KF – atitinkamai 9,37 % ir 10,24 %.



3.23 pav. Ultragarinio poveikio įtaka žirnių baltyminių medžiagų emulsijos sudarymo pajėgumui PRB KF sąlygose

Vertinant ultragarinio poveikio įtaką tiek emulsijos sudarymo pajėgumui, tiek stabilumui taip pat išryškėjo ir pH įtaka šių parametru vertėms: didžiausias emulsijos sudarymo pajėgumo ir stabilumo didėjimas nustatytas esant terpės pH 8 (visais fermentacijos etapais) ir sudarė vidutiniškai 8,95 % ir 9,89 %, kai taikant vien tik PRB KF – atitinkamai 7,8 % ir 8,31 %.



3.24 pav. Ultragarinio poveikio įtaka žirnių baltyminių medžiagų emulsijos sudarymo stabilumui PRB KF sąlygose

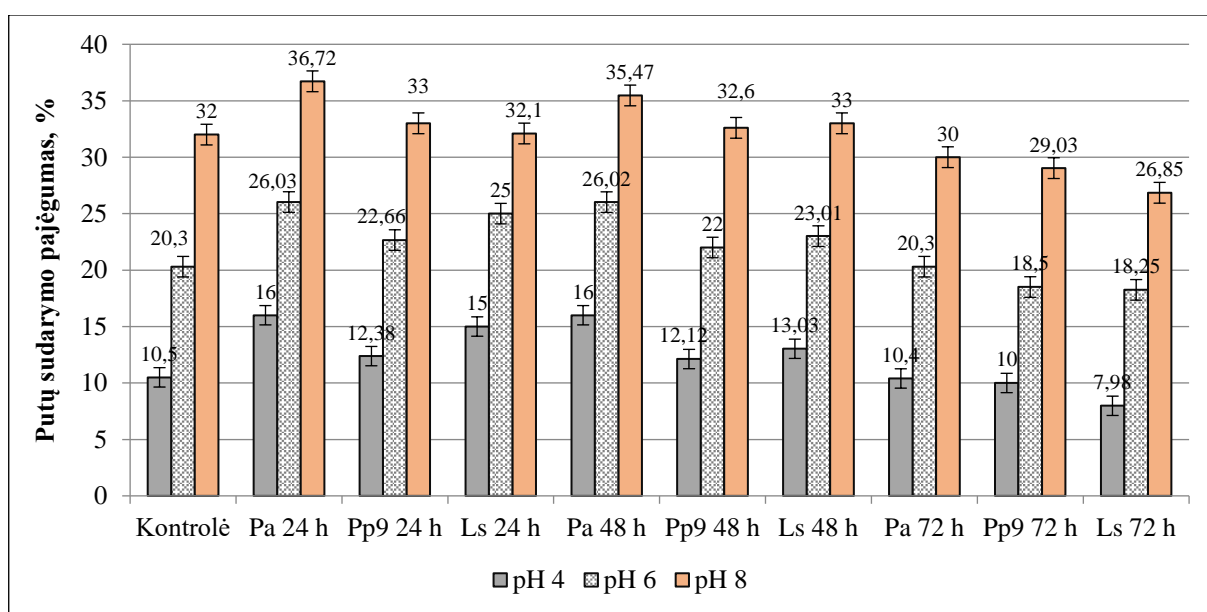
Tokiu būdu, ultragarinį apdorojimą tikslinga naudoti 72 h fermentuotų žirnių baltymų emulsijų ruošimui ir šį procesą taikyti šarminėje terpėje (pH 8).

Literatūroje pateiki tyrimų rezultatai, kuriuose analizuojama ultragarinio apdorojimo įtaka

žirnių baltymų emulsavimo savybėms. Nustatyta, jog ultragarsu apdoroti žirnių baltymai pasižymėjo gereresnėmis analizuojamo kriterijaus savybėmis, nei baltymai, kuriems ultragarsinis apdorojimas nebuvo taikomas [83].

Putų sudarymo pajėgumas. Nustatyta, jog apdorojant žirnių baltymines medžiagas ultragarsu prieš PRB KF, kaip ir mėginiuose apdorotuose PRB KF be ultragarsinio poveikio (3.3.3 skyrius, 3.13 pav.), putų sudarymo pajėgumas didėjo pirmuose fermentacijos etapuose (24 h ir 48 h) ir buvo vidutiniškai 0,92 % didesnis nei taikant vien tik PRB KF.

Vertinant ultragarsinio poveikio įtaką putų sudarymo pajėgumui taip pat išryškėjo ir pH įtaka šio parametro vertėms: didžiausias putų sudarymo pajėgumo didėjimas nustatytas esant terpės pH 8 (pirmaisiais fermentacijos etapais) ir vidutiniškai sudarė 1,81 %, kai taikant vien tik PRB KF – 1,25 %.



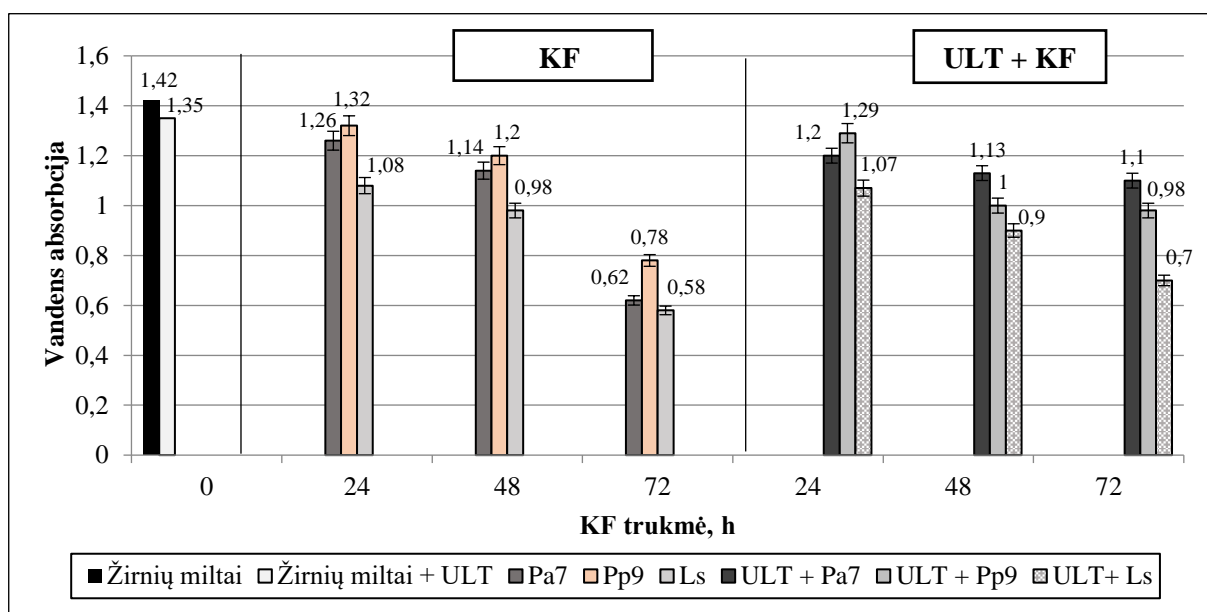
3.25 pav. Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių baltyminių medžiagų putų sudarymo pajėgumui PRB KF sąlygose

Iš gautų rezultatų matyti, jog ultragarsinis apdorojimas prieš fermentaciją gali būti taikomas žirnių baltyminių medžiagų putų sudarymo pajėgumo gerinimui.

Šiuos rezultatus patvirtina ir kitų mokslininkų tyrimai, kuriuose nustatytas teigiamas ultragarsinio apdorojimo poveikis putų sudarymo pajėgumui priklausomai nuo ultragarsinio apdorojimo trukmės: po 10 min. ultragarsinio analizuojamas kriterijus, lyginant su mėginiais, kurie nebuvo apdoroti ultragarsu, padidėjo 76 %, po 20 min. – 128 %, po 30 min. – 150 %. Tokia pati tendencija nustatyta ir vertinant putų stabilumą – ilginant ultragarsinio apdorojimo trukmę analizuojamas kriterijus kito nuo 71 % iki 86 %.

Ultragarsinio poveikio įtakos **vandens absorbcijai** tyrimo rezultatai pateikti 3.26 pav. Skirtingas žirnių apdorojimas neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos analizuojamam kriteriui:

tiek PRB KF mėginiuose apdorotuose ultragarsu, tiek mėginiuose, kuriuose ultragarsinis apdorojimas nebuvo taikomas, vandens absorbcija mažėjo.



3.26 pav. Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių produktų vandens absorbcijai PRB KF sąlygose

Vertinant ultragarsinio poveikio įtaką vandens absorbcijai (lyginant su kontrole), nustatyta, kad ilgėjant fermentacijos trukmei, žirnių miltų savybė įgerti vandenį mažėjo: po 24 h fermentacijos vandens absorbcija vidutiniškai sumažėjo 1,22, po 48 h fermentacijos – 1,10, po 72 h fermentacijos – 0,66, kai PRB KF mėginiuose neapdorotuose ultragarsu šios vertės buvo atitinkamai 0,17, 0,34 ir 0,43.

Analizuojant ultragarsinio poveikio įtaką žirnių baltymų (išskirtų iš žirnių miltų) funkcinėms savybėms, papildomai tirtas **gelių sudarymo pajėgumas** (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių baltymų gelio sudarymo pajėgumui PRB KF metu

Baltymų suspensija, %	PRB padermės	24 h		48 h		72 h	
		Gelio formavimas	Konsistencija	Gelio formavimas	Konsistencija	Gelio formavimas	Konsistencija
2 %	Pa7	-	skysta	-	skysta	-	skysta
	Pp9	-	skysta	-	skysta	-	skysta
	Ls	-	skysta	-	skysta	-	skysta
6 %	Pa7	-/+	klampi	-/+	klampi	-/+	klampi
	Pp9	-/+	klampi	-/+	klampi	-/+	klampi
	Ls	-/+	klampi	-/+	klampi	-/+	klampi
10 %	Pa7	+	gelis	+	gelis	+	gelis
	Pp9	+	gelis	+	gelis	+	gelis
	Ls	+	gelis	+	gelis	+	gelis
12 %	Pa7	+	gelis	+	gelis	+	gelis
	Pp9	+	gelis	+	gelis	+	gelis
	Ls	+	gelis	+	gelis	+	gelis

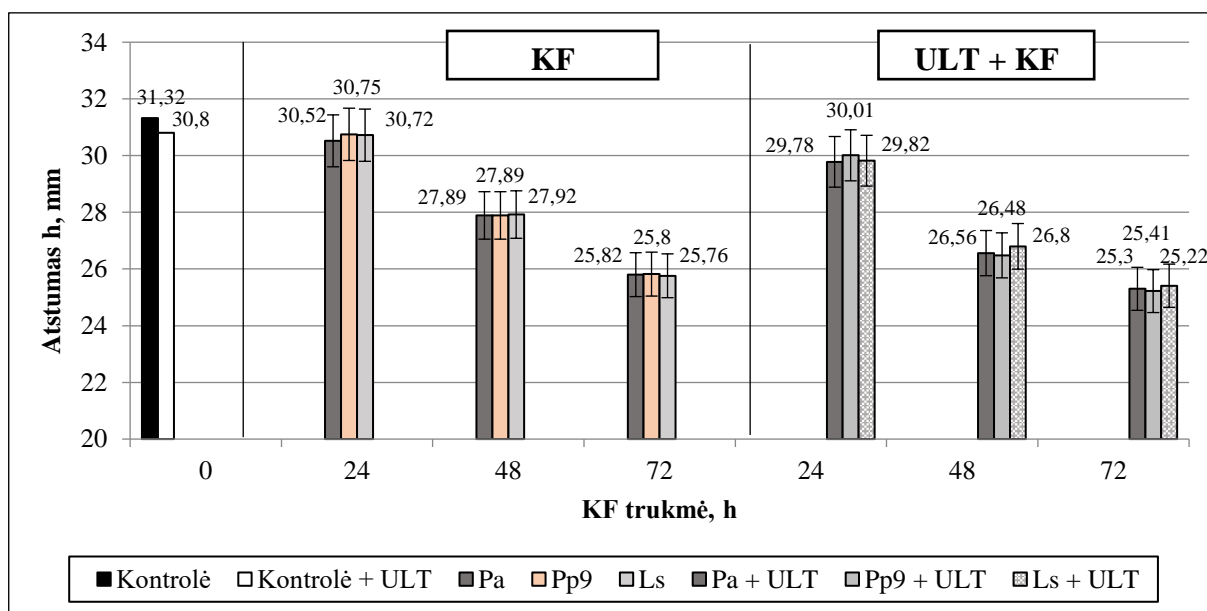
Įvertinus 3.3.3 skyriuje gautus tyrimo rezultatus (3.1 lentelė), nustatyta, kad apdorojant ultragarsu žirnių baltymines medžiagas, gelių susidarymui reikalinga mažesnė baltymų

koncentracija (10 %) nei PRB KF mėginiuose, ruoštuose be ultragarsinio apdorojimo (12 %). Tai įrodo, jog ultragarsinis baltyminių medžiagų apdorojimas sąlygoja gelio klampio didėjimą.

Gauti tyrimų rezultatai sutampa su kitų mokslininkų literatūroje paskelbtais duomenimis, kuriuose teigiama, jog ultragarsinis apdorojimas sumažina baltymų dalelių dydį todėl susiformuoja tvirtesnė gelio struktūra [82]. Taip pat paskelbti tyrimo rezultatai, kuriuose didelio intensyvumo ultragarsinis poveikis įtakojo tvirtesnių kazeino gelių formavimąsi [84].

3.5.4. Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių baltyminių medžiagų gelių klampumui PRB KF sąlygose

Atlikus žirnių baltyminių medžiagų (išskirtų iš žirnių izoliato) klampumo analizę (3.27 pav.), nustatytas teigiamas ultragarsinio apdorojimo poveikis PRB KF fermentuotiems žirnių produktams.



3.27 pav. Ultragarsinio poveikio įtaka žirnių baltyminių medžiagų gelių klampumui PRB KF sąlygose

Ultragarsu paveiktuose žirnių produktuose prieš PRB KF gelių klampumas nustatytas vidutiniškai 3,02 % didesnis nei PRB KF mėginiuose be ultragarsinio apdorojimo. Ši tendencija išryškėjo visais PRB KF etapais (ULT + KF): po 24 h fermentacijos gelių klampumas nustatytas 2,57 % didesnis nei mėginiuose apdorotuose vien tik PRB KF, po 48 h fermentacijos – 4,51 %, po 72 h fermentacijos – 1,86 %.

Išvados

1. Vietinėse sąlygose auginamų sėjamųjų žirnių baltymų kiekis, priklausomai nuo genotipo (Lincoln, Progress 9, Gloriosa), kito ribose nuo 17 % iki 25 % ir atitinkamai nustatytas 17 %, 20 %, 25 %.
2. Frakcionuojant žirnių malinį pagal geometrinius požymius išgautos 5 frakcijos, kurios skyrėsi savo granulimetrine sudėtimi ir baltymų kiekiu. Didžiausias baltymų kiekis (23,94 %) nustatytas smulkiausioje frakcijoje (V frakcija), kurioje dalelių dydis vyravo iki $\emptyset < 0,5$ mm, stambiausioje frakcijoje (I frakcija $\emptyset \geq 2$ mm) baltymų kiekis nustatytas 21 %. Vidurinėse frakcijose, (II ($2 \text{ mm} < \emptyset \leq 1,6 \text{ mm}$), III ($1,6 \text{ mm} < \emptyset \leq 1 \text{ mm}$) ir IV ($1 \text{ mm} < \emptyset \leq 0,5 \text{ mm}$), baltymų kiekis nustatytas apie 22 %.
3. Didinant žirnių miltų ultragarsinio apdorojimo (37 kHz) trukmę nuo 15 min. iki 80 min. bendras mikroorganizmų skaičius mėginiuose sumažėjo ~5 kartus. Didžiausias BMS pokytis buvo pasiektas apdorojant žirnių miltus 60 min.
4. Nustatyta, kad PRB kietafazė fermentacija (KF) kombinacijoje su ultragarsu (ULT) turėjo reikšmingos įtakos žirnių produktų baltyminėms medžiagoms ir proteaziniui aktyvumui:
 - 4.1. Žirnių produktų PRB KF metu bendras baltymų kiekis, lyginant su kontrole, sumažėjo vidutiniškai 3 %, o tirpiųjų baltymų kiekis padidėjo 2 %; proteazinis aktyvumas didėjo 2 kartus.
 - 4.2. Ultragarsu paveiktuose žirnių produktuose prieš PRB KF bendrų baltymų kiekis nustatytas vidutiniškai 3 % mažesnis, o tirpiųjų baltymų kiekis 2 % didesnis, nei PRB KF mėginiuose be ultragarsinio apdorojimo; proteazių aktyvumas nustatytas 2 kartus mažesnis.
5. Įvertinus PRB KF kombinacijoje su ULT įtaką žirnių produktų antimonybiniam faktoriams, nustatyta:
 - 5.1. PRB KF, lyginant su kontrole, padidimo žirnių baltymų *in vitro* virškinamumą vidutiniškai 13 %, o proteazių inhibitorių aktyvumą sumažino 5 %.
 - 5.2. Ultragarsinis poveikis šiems pokyčiams įtakos neturėjo.
6. Nustatyta, kad tiek PRB KF, tiek ULT turėjo teigiamos įtakos žirnių produktų funkcinėms savybėms:
 - 6.1. PRB KF pagerino emulgavimo, putų ir gelių sudarymo pajėgumą.
 - 6.2. ULT poveikis tai pat gerino emulgavimo ir putų sudarymo pajėgumą, tačiau gelių, ruošiamų iš ultragarsu apdorotos žaliavos, susidarymui reikėjo mažesnės baltymų koncentracijos (10 %), skirtingai nei PRB KF žirnių mėginiuose be ultragarsinio apdorojimo (12 %).

7. Nustatyta, kad tiek PRB KF, tiek ULT turėjo reikšmingos įtakos žirnių gelių klampumui.
 - 7.1. Didžiausias gelių klampos didėjimas PRB KF metu nustatytas žirnių mėginius fermentuojant 72 h (17 %).
 - 7.2. Ultragarstu paveiktuose žirnių produktuose prieš PRB KF gelių klampumas nustatytas vidutiniškai 3 % didesnis, nei PRB KF mėginiuose be ultragarsinio apdorojimo.

Literatūros sąrašas

1. Klimas, T. *Drėgmės trūkumo poveikis žirnių morfofiziologiniams rodikliams*: magistro baigiamasis darbas, 2014. Kaunas: Aleksandro Stulginskio universitetas, p. 9 – 10.
2. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras. *Mokslinis tyrimas dėl žieminių javų, vasarinių pupinių ir miglinių javų, vaisių, daržovių, uogynų, daugiamečių žolių veislių tinkamų auginti ekologinės gamybos ūkiuose Lietuvoje*. 2016 m. galutinė ataskaita. Prieiga per internetą: http://zum.lrv.lt/uploads/zum/documents/files/LT_versija/Veiklos_sritys/Mokslas_mokymas_ir_konsultavimas/Moksliniu_tyrimu_ir_taikomosios_veiklos_darbu_galutines_ataskaitos/LAMMC%20veisles.pdf, (žiūrėta 2018 02 28).
3. Ruzgienė, R., Mackevičius, A. *Mažasis daržovių ir prieskonių žinynas*. Vilnius: Eugrimas, 2010, p. 38 – 253.
4. Rasiukevičiūtė, N., Brazaitytė, A., Duchovskis, P. *Kompleksinis temperatūros ir drėgmės poveikis sėjamojo žirnio (*Pisum sativum* L.) fiziologiniams rodikliams*. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filialo sodininkystės ir daržininkystės instituto ir Lietuvos žemės ūkio universiteto mokslo darbai. *Sodininkystė ir daržininkystė*, Nr. 30(2), 2011, p. 85 – 93.
5. Mačiukas, A. *Kaip išauginti gerą žirnių derlių*. Prieiga per internetą: <http://www.agrozinios.lt/portal/categories/133/1/0/1/article/12241/kaip-isauginti-gera-zirniu-derliu>, (žiūrėta 2018 02 27).
6. Skaburskytė, K. *Žirnių ir vikių mišinio įtaka karvių pieno sudėties rodikliams*: magistro baigiamasis darbas, 2013. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, p. 15.
7. Grigaliūnaitė, B., Balčiūnienė, L., Jančys, Z. *Žirnio (*Pisum*) genties augalų kai kurių veislių grybinių ligų sukėlėjai*. Vilnius: Vilniaus universitetas, 2006, p. 99 – 105.
8. Baranauskas, S., Juknevičius, S., Stankevičiūtė, J. *Pašarai ir galvijų šėrimas*. Mokomoji knyga. Kaunas: Lietuvos žemės ūkio universitetas, 2009, p. 65.
9. Sprainaitienė, J., Ruzgas, V. *Augalų selekcija ir genetika*. *Žemdirbystė*, Nr. 2(95), 2008, p. 98 – 108.
10. Barac, M. B., Pešič, M. B., Stanojevič, S. P. (2015). *Techno-functional properties of pea (*Pisum sativum*) protein isolates - a review*. *Acta periodica technologica*, No. 46, p. 1 – 18.
11. McKay, K., Schatz, B., Endres, G. (2003). *Field pea production*. Agriculture research. North Dakota: NDSU extension service. p. 2 – 8.
12. Stone, A. K., Avarmenko, N. A., Warkentin, T. D. (2015). *Functional properties of protein isolates from different pea cultivars*. *Food Science and Biotechnology*, No. 3(24), p. 827 – 833.
13. Barac, M. B., Pešič, M. B., Stanojevič, S. P. (2015). *Techno-functional properties of pea (*Pisum sativum*) protein isolates - a review*. *Acta periodica technologica*, No. 46, p. 1 – 18.
14. Day, L. *Proteins from Land Plants—potential Resources for Human Nutrition and Food*

- Security*. Trends in Food Science & Technology, 2013, vol. 32, no. 1. p. 25 – 42.
15. Saavedra, J. P., Vera, N. G., Soto, J. L. M. Comparative study of functional properties of protein isolates obtained from free *Lipinus* species. *Advances in Bioresearch*, No. 4, p. 106 – 116.
 16. Medaro, A., et al. *Correlation of Average Hydrophobicity, Water/Air Interface Surface Rheological Properties and Foaming Properties of Proteins*. Food Science and Technology International, 2012, vol. 18, no. 2. p. 187 – 193.
 17. Vinauskienė, R. Mėsos produktų mokslas ir technologija. *Mėsos emulsijos*. Mokomoji knyga, Kaunas. Kauno technologijos universitetas, p. 1.
 18. Solorio, A. C., Aquilar, M. G., Toro, G. V. (2017). *Nutritional and functional properties of protein concentrate and protein isolates of foods*. Mexiko: Universidad Nacional Autónoma de México, p. 9.
 19. Barac, M., Cabrilo, S., Pesic, M. (2010). *Profile and Functional Properties of Seen Proteins from Six Pea (Pisum sativum) Genotypes*. International Journal of Molecular Sciences, No. 11, p. 4973 – 4990.
 20. Singhal, A., Karaca, A. C., Tyler R. (2016). *Pulse Proteins: from Processing to Structure-Function Relationships*. Agricultural and Biological Sciences. p. 55 – 68.
 21. Umar, G., Sawinder K. (2017). *Protein isolates: production, functional properties and application*. International research journal of chemistry, vol. 4, p. 22 – 36.
 22. Separt ultrafiltracijos technologijos. Prieiga per internetą: www.jurby.lt/lt/technologijos-ir-produktai/sep-art-ultrafiltracijos-technologijos/ (žiūrėta 2018 04 15).
 23. Pramoninė chromatografija. Prieiga per internetą: www.biotecha.lt/pramonine-chromatografija/ (žiūrėta 2018 04 13).
 24. Michailovič, V., Mikič, A., Vasiljevič, S. (2005). *Protein pea in animal feeding*. Biotechnology in Animal Husbandry, No. 21, p. 281 – 285.
 25. Starzyńska–Janiszewska Anna, Bożena Stodolak, *Effect of Inoculated Lactic Acid Fermentation on Antinutritional and Antiradical Properties of Grass Pea (Lathyrus sativus 'Krab') Flour*, Food Nutrition Science, (2011) 61 (4), p. 245 – 249.
 26. Schindler, S., Zelena, K., Krings, U. (2012). *Improvement of the Aroma of Pea (Pisum sativum) Protein Extracts by Lactic Acid Fermentation*. Food Biotechnology, No. 1, p. 58 – 74.
 27. Stanisavljevic, N. S., Vukotic, G. N., Pastor, F. T. (2015). *Antioxidant activity of pea protein hydrolysates produced by batch fermentation with lactic acid bacteria*. Archives of Biological Sciences, No. 3, p. 1033 – 1042.
 28. Halasz, A. (2017). *Lactic acid bacteria*. Food Quality and Standards, No. 1, p. 1 – 6.

29. Beasley Shea, *Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota*, Academic Dissertation in Microbiology, 2004, p. 6 – 11.
30. So, A., Go, A. (2017). *Molecular Characteristics of Probiotics Lactic Acid Bacteria Isolated from Soursop, Cowmilk, Goatmilk Yoghurts and Cheese*. Journal of Food Biotechnology Research, No. 1, p. 1 – 9.
31. Chen Yi-Sheng, Wu Hui, Yanagida Fujitoshi, *Isolation and Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Ripe Mulberries in Taiwan*, Brazilian Journal of Microbiology (2010) 41: p. 916 – 921.
32. Juodeikienė Gražina, Elena Bartkienė ir kt., *Fermentation Processes Using Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins for Preservation and Improving Functional Properties of Food Products*, 2012, p. 65.
33. Janiszewska, A. S., Stodolak, B. (2011). *Effect of Inoculated Lactic Acid Fermentation on Antinutritional and Antiradical Properties of Grass Pea (Lathyrus sativus 'Krab') Flour*. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, No. 4, p. 245 – 249.
34. Adebowale, O.J., Maliki, K. (2011). *Effect of fermentation period on the chemical composition and functional properties of Pigeon pea (Cajanus cajan) seed flour*. International food Research Journal, No.4, p. 1329 – 1333.
35. Sulaiman, A. Z. B.(2011). *Use of ultrasound in enhancing productivity of biotechnological processes*. A thesis for the degree of Doctor of Philosophy in Biochemical Engineering. New Zeland: Massey University. p. 223.
36. Sfakianakis, P., Tzia, C. (2012). *Yogurt from ultrasound treated milk: monitoring of fermentation process and evaluation of product quality characteristics*. Greece: Laboratory of Food Chemistry and Technology. p. 6.
37. Ojha, S., Kumar, T. B., Mason, T. J. (2016). *Ultrasound technology for food fermentation applications*. Ultrasonics Sonochemistry, No. 1, p. 410 – 417.
38. Raukšlėtieji žirniai Lincoln. Prieiga per internetą: <https://www.sekluva.lt/produktas/zirniai-lincoln/>, (žiūrėta 2018 03 11).
39. Raukšlėtieji žirniai Progress N.9 . Prieiga per internetą: <https://www.sekluva.lt/produktas/zirniai-progress-n-9/>, (žiūrėta 2018 03 11).
40. Raukšlėtieji žirniai Lincoln. Prieiga per internetą: <https://www.sekluva.lt/produktas/zirniai-gloriosa/>, (žiūrėta 2018 03 11).
41. Sakalauskas A., (2004). *Daugiamečių žolių ir netradicinių žolinių augalų (drambliažolės, sidos, legestų, nendrinių žolių) bei jų mišinių panaudojimas presuoto biokuro gamybai*, p. 25 – 26.

42. Domínguez-Manzano J., Jiménez-Díaz R.. *Suppression of bacteriocin production in mixed-species cultures of lactic acid bacteria*. Food Control. 2013. 30. p. 474 – 479.
43. Lietuvos standartizacijos departamentas [LST EN ISO 20483:2007]. *Varpinių ir ankštinių javų grūdai. Azoto kiekio nustatymas ir žalių baltymų kiekio apskaičiavimas*, 2007.
44. Vidmantienė D., Juodeikienė G., „*Kai kurie biologiniai grūdinės žaliavos fermentacijos procesų inhibitoriai ir jų vertinimo aspektai*“. Bendro baltymų kiekio nustatymas, 2012, p. 88.
45. Jayasena, V., H.J. Chih ir S.M. Nasar-Abbas. *Functional Properties of Sweet Lupin Protein Isolated and Tested at Various pH Levels*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2010, vol. 6(2), p. 130 – 137.
46. Vidmantienė D., Juodeikienė G., „*Kai kurie biologiniai grūdinės žaliavos fermentacijos procesų inhibitoriai ir jų vertinimo aspektai*“. Baltymų elektroforezė, 2012, p. 97 – 104.
47. Naczek, M., L.J. Rubin ir F. Shahidi, *Functional properties and phytate content of peaprotein preparations*. Journal of Food Science, 1986, vol. 51, p. 1245 – 1247.
48. Coffman, C. W. and V. V. Garcia. 1977. *Functional properties and amino acid content of protein isolate from mungbean flour*. J. Food Tech. 12:473 484. p. 1 – 8.
49. Sosulski FW., McCurdy AR.. *Functionality of flours, protein fractions and isolates from field peas and faba bean*. Journal of Food Science, 1987, vol. 52, p. 1010 – 1014.
50. D. Žadeikė, G. Juodeikienė, *Comparative study of ciabatta crust crispness through acoustic and mechanical methods: Effects of wheat malt and protease on dough rheology and crust crispness retention during storage*, Kaunas, Kauno technologijos universitetas, 2018, p. 111 – 112.
51. H. Lqari, J. Vioque, J. Pedroche, F. Milla'n. *Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization*. Food Chemistry. 2002, vol 76, p. 349 – 356.
52. Anwar, A. ir M. Saleemuddin. *Regulation of digestive proteolytic activity in the larvae of Spilosoma obliqua (Lep., Arctiidae)*. Journal of Applied Entomology. 2001, vol. 125, p. 577 – 582.
53. Megazyme International Ireland, Wicklow, Ireland. D – Lactic acid and L –Lactic acid assay procedures.
54. Elena Bartkiene, 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, p. 1336 – 1342.
55. Lietuvos standartizacijos departamentas [LST EN ISO 4833:2003]. *Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis metodas. Kolonijų skaičiavimo 30 °C temperatūroje metodas*, 2003.

- 56.** Martins S., Mussatto S.I., Martínez-Avila G., Montañez-Saenz J., Aguilar C.N., Teixeira J.A. *Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation*. A review. *Biotechnology Advances*. 2011. 29, p. 365 – 373.
- 57.** Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A., 2010. *Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases*. *Enz. Microb. Technol.* 46, p. 541 – 549.
- 58.** Solid state Fermentation technology: examples, advantages and disadvantages. Prieiga per internetą: <https://www.easybiologyclass.com/solid-state-fermentation-technology-examples-advantages-and-disadvantages>, (žiūrėta 2018 04 12).
- 59.** Ashok Pandey *Solid-state fermentation*. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, vol. 13, p. 81 – 84.
- 60.** García H.S., López-Malo A., Mani-López E. Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research International*. 2012; 45:713-721.
- 61.** G. Garmienė G., Kulikauskienė M., Saikauskienė V., *Probiotinių mikroorganizmų įtaka pieno rūgšties izomerų kiekiui jogurte*, ISSN 1392-0227. *Maisto chemija ir technologija*. 2005. T. 39, Nr. 1, Kaunas, p. 12 – 14.
- 62.** Ewaschuk, J. B., Naylor, J. M., Zello, G. A.. *D-Lactate in Human and Ruminant Metabolism*. *The Journal of Nutrition*. 2005. 135. p. 1619 – 1625.
- 63.** Bartkienė E., Skabeikytė R. ir kt., *The use of solid state fermentation for food and feed plant material processing*, ISSN 1392-2130, *Veterinarija ir zootechnika, (Vet Med Zoot)*. T. 66 (88). 2014, p. 3 – 9.
- 64.** Juodeikienė G., Klupšaitė D., *The influence of lactic acid fermentation on functional properties of narrow-leaved lupine protein as functional additive for higher value wheat bread*, 2016, Kaunas, Kauno technologijos universitetas, p. 181 – 185.
- 65.** T., Ng'ong'ola-Manani, H., Marit Østlie, A. Mbachi Mwangwela, T. Wicklund, *Metabolite changes during natural and lactic acid bacteria fermentations in pastes of soybeans and soybean maize blends*, Lilongwe University of Agriculture and Natural Resources, Norway, p. 768 – 781.
- 66.** S. Sasithorn, A. Sivamaruthi, B. Sundaram, K. Periyana, *Lactic acid bacteria mediated fermented soybean as a potent nutraceutical candidate*, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, October 2017, Vol.7(10), p. 930 – 936.
- 67.** Rob M. J., Willem M. de Vos, Marcel H. Zwietering. *Food Fermentation*. Wageningen Academic Publishers The Netherlands. 2005. ISBN 9076998833.
- 68.** V. Krunglevičiūtė, V. Starkutė, bartkienė E., *Design of lupin seeds lactic acid fermentation – changes of digestibility, amino acid profile and antioxidant activity*, *Veterinarija ir zootechnika*.

Kaunas, Lietuvos sveikatos mokslų universiteto veterinarijos akademija. 2016, t. 73(95). p. 47 – 53.

69. Tsoukala, A., et al. *Adsorption at the air–water interface and emulsification properties of grain legume protein derivatives from pea and broad bean*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006, vol. 53, no. 2. p. 203 – 208.

70. Ogodo, A. C., Ugbogu, O. C., Onyeagba, R. A., *Dynamics of functional properties of sorghum flours fermented with lactic acid bacteria (LAB)-consortium isolated from cereals*, *International Food Research Journal* 24(6): 2666-2671, 2017, p. 2666 – 2670.

71. V. Raikos, M. Neacsu, W. Russell, G. Duthie, *Comparative study of the functional properties of lupin, green pea, fava bean, hemp, and buckwheat flours as affected by pH*, Rowett Institute of Nutrition and Health, University of Aberdeen, Scotland, 2014, p. 803 – 809.

72. Sathe, S. K., and D. K. Salunkhe. 1981. *Functional properties of Great Northern bean (Phaseolus vulgaris)*. *J. Food Sci.* p. 46:71 – 75.

73. Adebowale, Y. A., and K. O. Adebowale. 2008. *Evaluation of the gelation characteristics of mucuna bean flour and protein isolate*. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* p. 7:3206 – 3222.

74. Adebowale, K. O., and O. S. Lawal. 2004. *Comparative study of the functional properties of Bambara groundnut (Voandzeia subterranean), jack bean (Canavalia ensiformis) and mucuna bean (Mucuna pruriens) flours*. *Food Res. Int.* p. 37:355 – 365.

75. Raikos, V., L. Campbell, and S. R. Euston. 2007. *Rheology and texture of hen's egg protein heat-set gels as affected by pH and the addition of sugar and/or salt*. *Food Hydrocolloids* p. 21:237 – 244.

76. Elofsson, C., P. Dejmek, M. Paulson, and H. Burling. 1997. *Characterization of a cold gelling whey protein concentrate*. *Int. Dairy J.* p. 7:601 – 608.

77. J.C. Onweluzo and C.C. Nwabugwu, *Fermentation of Millet (Pennisetum americanum) and Pigeon Pea (Cajanus cajan) Seeds for Flour Production: Effects on Composition and Selected Functional Properties*, University of Nigeria, Nsukka, Nigeria, 2009, p. 737 – 741.

78. Farnword E. R. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton: CRC Press. 2003.

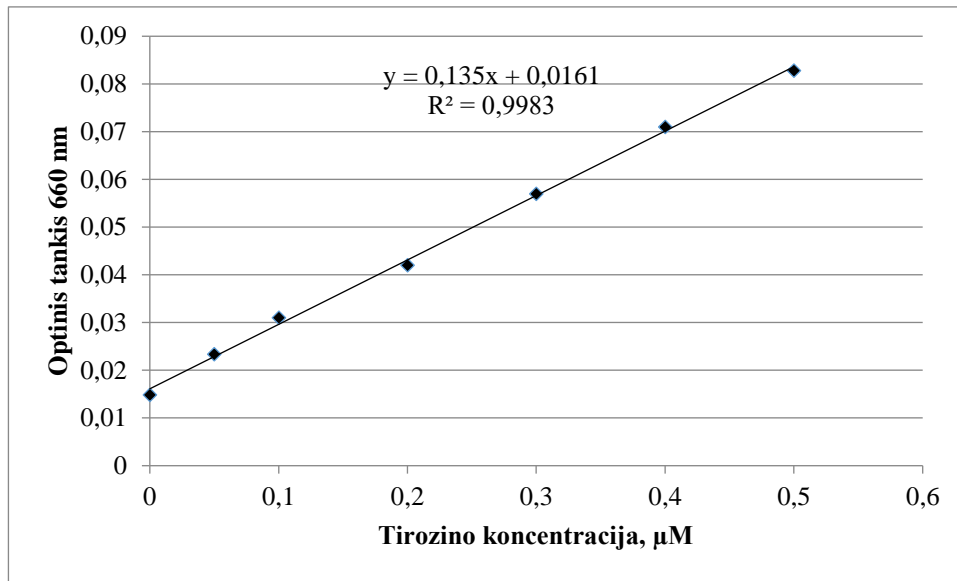
79. Chiu, K. Y., Sung, J. M. (2014). *Use of ultrasonication to enhance pea seed germination and microbial quality of pea sprouts*. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(7), p. 1699 – 1706.

80. Chiu, K. Y. (2015). *Ultrasonication-enhanced seed germination and microbial safety of sprouts produced from selected crop species*. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88, p. 120 – 126.

- 81.** Joseph F. Water *Gelling Properties of Proteins*. *Functionality of Proteins in Food*, 1997, p. 310 – 366.
- 82.** S., Jianga, J., Dinga, J., Andradea, A., Almajwalc, *Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments*, *Ultrasonics - Sonochemistry*, September 2017, Vol.38, p. 835-842.
- 83.** O'sullivan, J., Murray, B., Flynn, Norton, I. *The Effect of Ultrasound Treatment on the Structural, Physical and Emulsifying Properties of Animal and Vegetable Proteins*. *Food Hydrocolloids*, 2016, vol. 53. p. 141-154.
- 84.** A., Madadlou, et. al., *Acid-induced gelation behavior of sonicated casein solutions*. *Journal of diary research*, 2013, vol.80, p. 138 – 143.

Priedai

1 priedas



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