

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

DOVILĖ KLUPŠAITĖ

TVARIŲ BIOTECHNOLOGINIŲ PROCESŲ
TAIKYMAS SIAURALAPIŲ LUBINŲ SĖKLŲ
IR SŪRINIŲ IŠRŪGŲ BEATLIEKIAM
PERDIRBIMUI

Daktaro disertacija
Technologijos mokslai, chemijos inžinerija (05T)

Kaunas, 2018

Disertacija rengta 2014–2018 metais Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakulteto Maisto mokslo ir technologijos katedroje. Dalis tyrimų atlikta Santiago De Compostela universiteto (Ispanija) APLTA laboratorijoje (ES 7-ios BP projektas nr. 613589 SUSMILK). Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinė vadovė:

Prof. habil. dr. Gražina JUODEIKIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T).

Interneto svetainės, kurioje skelbiama disertacija, adresas:

<http://ktu.edu>

Redagavo:

Virginija Stankevičienė (Užsienio kalbų centras, Kauno technologijos universitetas)

© D. Klupšaitė, 2018

ISBN 978-609-02-1542-5

Leidinio bibliografinė informacija pateikiama Lietuvos nacionalinės Martyno Mažvydo bibliotekos Nacionalinės bibliografijos duomenų banke (NBDB).

TURINYS

SANTRUMPOS	5
IVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Lubinų paplitimas ir cheminė sudėtis	9
1.2. Antimitybiniai faktoriai lubinų sėklose ir jų mažinimo būdai	11
1.3. Baltymų funkcinės savybės ir jų modifikavimas	12
1.3.1. Baltymų funkcinų savybių kriterijai	13
1.3.2. Baltymų funkcinėms savybėms įtakos turintys išoriniai faktoriai	15
1.3.3. Baltymų funkcinų savybių modifikavimui taikomi metodai	17
1.4. Ultragarso taikymas mikrobiologinei taršai mažinti ir fermentų aktyvumui reguliuoti	23
1.5. Baltymų išskyrimo metodai	25
1.6. Lubinų produktų panaudojimas maisto pramonėje	27
1.7. Lignoceliuliozinės žaliavos ir šalutinių pieno perdirbimo produktų panaudojimas bioproduktų gamybai	29
1.7.1. Biodujų gamyba iš lignoceliuliozinės biomasės	29
1.7.2. Pieno rūgšties gamyba	32
1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir darbo tikslo pagrindimas	37
2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI	39
2.1. Tyrimų objektai	39
2.1.1. Fermentuotų lubinų sėklų miltų ruošimas	40
2.1.2. Lubinų sėklų baltymų izoliatų paruošimas	40
2.1.3. Ultragarsu apdorotų lubinų sėklų miltų ruošimo sąlygos	40
2.1.4. Kvietinės duonos su lubinų sėklų miltų priedu ruošimas	40
2.1.5. Biodujų gamybos iš lignoceliuliozinės lubinų sėklų biomasės sistemos paruošimas	42
2.1.6. Lignoceliuliozinės lubinų sėklų biomasės, skirtos pieno rūgšties gamybai, paruošimas	43
2.1.7. Sūrių gamybos šalutinių produktų, skirtų pieno rūgšties gamybai, paruošimas	43
2.1.8. Pieno rūgšties išskyrimo ir gryninimo sistemos paruošimas	43
2.2. Tyrimų metodai	44
2.2.1. Lubinų sėklų ir sūrių gamybos šalutinių produktų cheminės sudėties įvertinimas	44
2.2.2. pH vertės, PRB gyvybingumo ir tirpiųjų baltymų nustatymas lubinų sėklų fermentacijos metu	45
2.2.3. Baltymų funkcinų savybių įvertinimas	45
2.2.4. Lubinų sėklų baltymų gelių klampos įvertinimas	46
2.2.5. Mikroorganizmų skaičiaus nustatymas	47
2.2.6. Baltymų <i>in vitro</i> virškinamumo ir tripsino inhibitorių nustatymas	47
2.2.7. Tiriamosios duonos su lubinų priedais kokybės analizė	47
2.2.8. Fermentų aktyvumo nustatymas	48

2.2.9. Sausųjų ir organinių medžiagų nustatymas lubinų sėklų biomasėje.....	48
2.2.10. Acto rūgšties kiekio nustatymas lubinų biomasės PRB fermentacijos metu	49
2.2.11. Biodujų sudėties tyrimai	49
2.2.12. Redukuojančių cukrų kiekio hidrolizuotoje lubinų sėklų biomasėje nustatymas	50
2.2.13. Pieno rūgšties stereoizomerų nustatymas	50
2.2.14. Statistinė duomenų analizė	50
3. TYRIMŲ REZULTATAI	52
3.1. Lubinų sėklų miltų panaudojimo kepinų ruošimui tyrimai.....	52
3.1.1. Kietafazės fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis įtaka lubinų sėklų baltymų funkcinėms savybėms.....	52
3.1.1.1. Lubinų sėklų baltymų funkcinių savybių pokyčiai.....	53
3.1.2. Ultragarso panaudojimas lubinų sėklų miltų kietafazėje fermentacijoje pieno rūgšties bakterijomis.....	55
3.1.2.1. PRB skaičiaus, pH vertės ir tirpiųjų baltymų kiekio pokyčiai lubinų sėklų miltų kietazės fermentacijos su <i>Pp9</i> metu	56
3.1.2.2. Ultragarso ir kietafazės fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis poveikis lubinų sėklų baltymų <i>in vitro</i> virškinamumui ir funkcinėms savybėms.....	58
3.1.3. Apdorotų ultragarsu ir fermentuotų pieno rūgšties bakterijomis lubinų sėklų miltų panaudojimo galimybės kvietinės duonos ruošimui	61
3.1.3.1. Duonos su lubinų sėklų miltų priedais kokybė	63
3.2. Biodujų gamybos iš lubinų sėklų biomasės	66
3.3. Pieno rūgšties gamyba iš lubinų sėklų biomasės	68
3.4. Pieno rūgšties gamyba iš šalutinių sūrių gamybos produktų	70
3.5. Membraninių technologijų panaudojimas pieno rūgščiai išgauti	75
IŠVADOS.....	80
LITERATŪRA	81
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS	104
INFORMACIJA APIE DISERTACIJOS AUTOREĮ.....	107
PADĖKA.....	108

SANTRUMPOS

ACET – acetogenezė
ATP – adenozin 5' trifosfatas
 a_w – vandens aktyvumas
D-GPT – D-glutamato-piruvato transaminazė
D/L – D(-)- ir L(+)- pieno rūgšties izomerų santykis
DNS – 3,5-dinitrosalicilo rūgšties reagentas
DPR – D(-)-pieno rūgšties izomeras
EA – emulsavimo aktyvumas
ES – emulsijos termostabilumas
FC – putojimo geba
FLM – fermentuotų lubinų priedas
FS – putojimo stabilumas
J – našumas
KF – kietafazė fermentacija
KSV – kolonijas sudarantys vienetai
Lb – *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*
LM – lubinų miltai
LPI – lubinų baltymų izoliatas
LPR – L(+)-pieno rūgšties izomeras
Ls – *Lactobacillus sakei* KTU05-6
MET – metanogenezė
MRS – de Man, Rogosa ir Sharpe mitybinė terpė
NF – nanofiltracija
NLM – nefermentuotų lubinų priedas
ONPG – o-nitrofenil β -D-galaktopiranozidas
OSM – organinė spiralinės konfigūracijos membrana
Pa – *Pediococcus acidilactici* KTU05-7
pI – izoelektrinis taškas
Pp8 – *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8
Pp9 – *Pediococcus pentosaceus* KTU05-9
PR – pieno rūgštis
PRB – pieno rūgšties bakterijos
RO – atvirkštinis osmosas
TMP – transmembraninis slėgis
TS – bendrosios sausosios medžiagos
VCF – koncentravimo faktorius
VS – organinės medžiagos
Qp – srauto greitis

IVADAS

Temos aktualumas

Kintantis žmonių požiūris į sveiką mitybą ir švaresnės aplinkos kūrimą skatina vis daugiau dėmesio skirti sveikatai palankių maisto produktų kūrimui naudojant baltymingas augalines žaliavas. Ankštiniai javai užima antrą vietą pasaulyje pagal visą grūdinių kultūrų auginimui skiriamą žemės plotą. Neseniai atlikti tyrimai parodė, kad gausesnis ankštinių javų pritaikymas maisto pramonėje leistų sumažinti tokias pasaulio problemas kaip globalinis atšilimas, eutrofikacija ir vandenynų rūgštėjimas. Sojos pupelių produkcija yra viena gausiausių pasaulyje, o jų baltymų pritaikymas maisto pramonėje yra labai platus. Tačiau ši žaliava yra brangi ir vyrauja prieštaringos nuomonės dėl sojos poveikio žmonių sveikatai: jos sudėtyje yra palyginti didelis fitoestrogenų ir tripsino inhibitorių kiekis. Be to, sojos pupelėms auginti dažniausiai naudojamos genetiškai modifikuotos sėklos. Todėl vis daugiau dėmesio susilaukia ir kitos ankštinių javų rūšys – pupelės, žirniai, taip pat ir lubinai. Šios augalų rūšys yra paplitusios mūsų šalyje, o jų sėklos yra turtingos biologiškai aktyviomis medžiagomis ir gali būti naudojamos baltymams išskirti bei įvairių maisto produktų pridėtinei vertei didinti.

Iki šiol lubinų sėklos Lietuvoje buvo naudojamos kaip pašaras dėl jose esančio didesnio alkaloidų kiekio. Tačiau dėl vertingos maistinės sudėties, kai kurios lubinų veislės gali būti pritaikomos ir žmonių mitybai. Norint padidinti lubinų panaudojimo maisto pramonėje galimybes, išlieka daugybė spręstinių klausimų. Lubinų, kaip ir daugumos ankštinių augalų, baltymai turi mažesnę virškinamumą, o pačiose sėklose gali būti antimonybinių junginių, mažinančių baltyminių medžiagų pasisavinimą. Be to, šių javų sėklų panaudojimą mažina ir galimas nepageidaujamo skonio ir kvapo junginių susidarymas maisto gamybos metu. Dalį antimonybinių faktorių galima sumažinti taikant terminį apdorojimą, tačiau tai gali turėti neigiamos įtakos kitoms sudėtinėms dalims, pvz., baltymų funkcionalumui.

Fermentacija – kitas svarbus procesas, plačiai naudojamas perdirbant soją ir siekiant sumažinti antimonybinius faktorius. Taikant tokį bioprocesą galima padidinti perdirbamos žaliavos maistinę vertę, o parinkus bakteriocinus gaminančius mikroorganizmus, pailginti realizacijos trukmę ir suteikti produktui naują skonį, aromatą bei tekstūros savybes. Maisto pramonėje fermentacijos procesuose plačiai taikomos starterinės pieno rūgšties bakterijų (PRB) kultūros, kurių išskirtinis privalumas – GRAS statusas. Priklausomai nuo PRB genotipo bei kultivavimo sąlygų produktui galima suteikti norimų technologinių savybių. Pastaruoju metu didelio susidomėjimo sulaukė antimikrobinį aktyvumą turinčios PRB ir jų panaudojimas maisto saugai didinti. Literatūroje pateikiama duomenų apie tai, kad PRB gali būti kultyvuojamos kietafazės fermentacijos (KF) sąlygomis ir naudojamos ankštiniais javų grūdams perdirbti. Šiuo metu kietafazė fermentacija (drėgnis < 50 %) įgauna vis didesnę pranašumą nei tradicinė, nes yra ekonomiškesnė dėl mažesnių energijos ir vandens sąnaudų. Laboratorinėmis sąlygomis vykdant PRB KF, taikomas fermentuojamo substrato autoklavavimas, kurį realizuoti gamybinėmis sąlygomis, vykdant augalinės žaliavos perdirbimą, būtų sudėtinga. Tampa aktuali naujų technologinių sprendimų paieška, leidžianti mažinti žaliavos mikrobiologinę taršą ir

užtikrinti stabilią fermentacijos proceso eigą su pageidaujamų metabolizmo produktų sinteze. Šiuo požiūriu vis didesnio susidomėjo sulaukia ultragarsas, kuris gali būti naudinga priemonė fermentacijos proceso efektyvumui didinti.

Paminėtina, kad apdorotos bioprocesų metu lubinų sėklos galėtų būti naudinga žaliava baltymams išgauti, taikant šarminės ekstrakcijos būdą. Po baltymų išskyrimo gautus didelius lignoceliuliozinės žaliavos kiekius, taikant šiuolaikinį biorafinavimo principą, būtų tikslinga perdirbti į pieno rūgštį (PR) ir / ar biodujas. Kadangi pieno rūgšties poreikis pastaraisiais metais ypač padidėjo dėl plataus taikymo maisto, farmacijos ir bioplastikų pramonėje, svarbu įvertinti šios rūgšties (L(+)- ir D(-)-pieno rūgšties izomerų) gamybos galimybes iš lignoceliuliozinės lubinų sėklų biomasės bei laktozės turinčių šalutinių sūrių gamybos produktų, fermentacijai naudojant *Pediococcus* spp. padermes, išskirtas iš lietuviškų ruginių duonos raugų. Be to, aktualu išbandyti membranines technologijas pieno rūgščiai išgauti ir gryninti, nes šis PR gamybos etapas sudaro net iki ~ 70 % gamybos išlaidų.

Darbo tikslas

Siauralapių lubinų sėklų ir sūrinių išrūgų beatliekis perdirbimas į baltyminius priedus kvietiniams kepiniams ruošti, biodujas ar pieno rūgštį, tam naudojant kietafazę fermentaciją pieno rūgšties bakterijomis (PRB) ir apdorojimą ultragarsu.

Darbo tikslui pasiekti suformuoti šie uždaviniai:

1. įvertinti kietafazės fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis panaudojimą lubinų sėklų miltų perdirbimui į pagerintų funkcinį savybių baltymus;
2. ištirti apdorojimo ultragarsu įtaką lubinų sėklų miltų kietafazei fermentacijai pieno rūgšties bakterijomis ir baltymų funkcinėms savybėms;
3. įvertinti fermentuotų pieno rūgšties bakterijomis lubinų sėklų miltų panaudojimą geresnės kokybės kvietinei duonai ruošti;
4. ištirti lubinų sėklų biomasės perdirbimą į biodujas, taikant vienapakopį ir dvipakopį anaerobinį skaidymą;
5. ištirti ir parinkti fermentinius preparatus ir PRB kultūras lignoceliuliozinės lubinų sėklų biomasės biokonversijai į pieno rūgšties izomerus;
6. ištirti sūrinių išrūgų perdirbimą į pieno rūgštį, fermentacijai naudojant *Pediococcus* spp. padermes;
7. įvertinti membraninių technologijų taikymą pieno rūgščiai išgauti ir gryninti iš fermentacijos terpės.

Mokslinio darbo naujumas

Taikant PRB kietafazę fermentaciją kartu su ultragarsu, pagerintos siauralapių lubinų sėklų baltymų funkcinės savybės: emulsavimas, putojimas ir gelių formavimas. Pagerintas lubinų baltymų *in vitro* virškinamumas ir reikšmingai sumažintas tripsino inhibitoriaus aktyvumas. Ultragarsas turėjo teigiamą poveikį augalinės žaliavos mikrobiologinei taršai mažinti ir fermentiniams aktyvumams valdyti. Lubinų sėklų baltymų gelių tekstūros vertinimui panaudotas akustinis klampos matuoklis.

Praktinė darbo vertė

Parinktos priemonės lubinų sėklų baltymų funkcinėms savybėms pagerinti ir pridėtinės vertės baltymams išgauti. PRB kietafazės fermentacijos sąlygomis, taikant apdorojimą ultragarsu, pagaminti maltų lubinų sėklų produktai pritaikyti kvietinės duonos kokybei pagerinti. Nustatytos pieno rūgšties susidarymo galimybės iš skirtingos kilmės substratų (lubinų sėklų biomasės ir sūrinių išrūgų), fermentacijai naudojant *Pediococcus* kultūras. Pieno rūgščiai išgauti iš fermentacijos terpės panaudota dviejų etapų membraninio filtravimo sistema. Biodujų gamybai atrinktas dvipakopis gamybos būdas (acetogenezė ir metanogenezė), kuriuo išgaunamas didžiausias metano kiekis ir susidariusių biodujų grynumo laipsnis. Panaudota „FaceReader“ programinė įranga kvietiniams kepiniams su lubinų sėklų miltų priedu priimtinumui įvertinti.

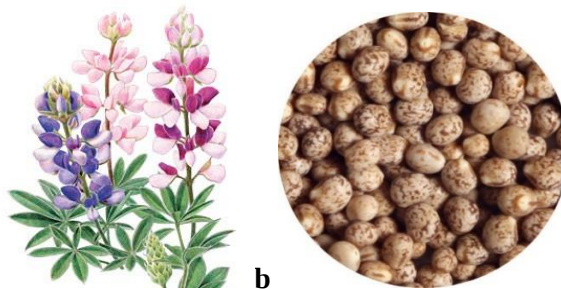
Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Lubinų sėklų baltymų funkcinės savybės pagerėja naudojant kietafazę fermentaciją pieno rūgšties bakterijomis kartu su pirminiu žaliavos apdorojimu ultragarsu.
2. Metano išeiga biodujose, gautose iš lubinų sėklų biomasės, padidėja naudojant dvipakopį anerobinį skaidymą (acetogenezę, incijuotą *L. sakei*, ir metagonezę).
3. L(+)-pieno rūgšties gamybos iš sūrinių išrūgų efektyvumas padidėja naudojant rūgščiai atsparias *Pediococcus* spp. padermes.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Lubinų paplitimas ir cheminė sudėtis

Lubinais auginami jau nuo seno, tačiau platesniu jų pritaikymu maisto pramonėje susidomėta tik dabar. Lubinai (lot. *Lupinus*) priklauso pupinių (*Fabaceae*) arba ankštinių (*Leguminosae*) augalų šeimai (1). Tai vienmečiai ir daugiamečiai augalai, sukraunantys įvairiaspalvius žiedus, o vėliau formuojantys ankštis su sėklomis (žr. 1.1 pav.). Lubinai kilę iš kelių vietų – Viduržemio jūros regiono ir Pietų Amerikos (2). Lubinai gerai auga skirtingo klimato zonose ir įvairios sudėties dirvožemyje, todėl dabar lubinai paplitę Centrinėje ir Vakarų Europoje, Australijoje, Afrikoje, Vakarų Azijoje, o kai kurios rūšys auga Aliaskoje ir Islandijoje (3).



1.1 pav. Lubinas: augalas (a) ir sėklos (b) (aut. Carolyn Crawford)

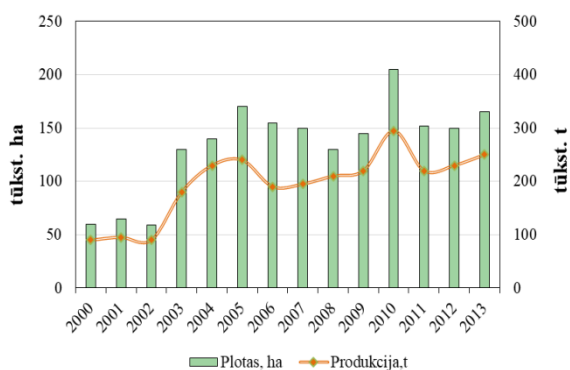
Pasaulyje žinoma daugiau nei 400 skirtingų lubinų rūšių (4). Pagrindinės kultivuojamos lubinų rūšys yra *Lupinus albus* L. (baltieji lubinai), *Lupinus angustifolius* L. (mėlynieji / siauralapiai / saldieji lubinai), *Lupinus luteus* L. (geltonieji lubinai) ir *Lupinus mutabilis* (Andinis / perlamutrinis lubinas) (žr. 1.1 lent.). Pirmosios trys rūšys yra kilusios iš Viduržemio jūros regiono, o *Lupinus mutabilis* – iš Pietų Amerikos (5). 2000–2013 m. lubinai Europoje auginti vis daugiau, todėl iš šios žemyno dalies gauti lubinai sudarė iki 17,6 % bendros lubinų produkcijos pasaulyje (žr. 1.2 pav.) (6). Lubinai auginami dėl keleto pagrindinių priežasčių: pašarams, kaip „žalioji“ trąša dirvožemio derlingumui gerinti ir maisto reikmėms. Lietuvoje lubinai pradėti auginti nuo XIX a., o pagrindinis genotipas buvo geltonžiedžiai pašariniai lubinai. 1995 m. pradėta auginti nauja lubinų rūšis – siauralapiai lubinai (*L. angustifolius*). Ši lubinų rūšis, lyginant su kitomis lubinų rūšimis, yra labiau atspari grybinėms ligoms, trumpu vegetacijos periodu, pakankamai dideliu sėklų derliumi ir žaliosios masės kiekiu. Siauralapiai lubinai išskirtinių morfologinių savybių neturi, tačiau turi mažesnę alkaloidų kiekį. Trakų Vokės filiale 1995–2010 m. sukurti siauralapių sideracinių lubinų genotipai „Derliai“ ir „Ugniai“ bei pašarinių lubinų genotipai „Vilniai“ ir „Antaniai“, kurie tinkami auginti visuose Lietuvos regionuose.

Lubinų sėklos yra vertingas maistinių medžiagų šaltinis. Palyginti su dažniausiai žmonių mitybai naudojamais ankštiniais augalais, lubinų sėklos turi daugiausia baltymų, kurių kiekis svyruoja nuo 28 iki 48 % ir priklauso nuo lubinų rūšies bei kultivavimo sąlygų (klimato sąlygų ir dirvožemio tipo) (4).

1.1 lentelė. Lubinų rūšių botaninė variacija (7, 8)

Rūšis	Tipas	Augalo aukštis, m	Žiedų spalva	Sėklos svoris, mg
<i>L. angustifolius</i>	vienmetis	0,2 – 1,5	Mėlyna, kartais rausva, balta (kultūrinė forma)	30–240
<i>L. albus</i>	vienmetis	0,4 – 2	Balta, šviesiai rausva, šviesiai mėlyna, mėlyna (var. <i>graecus</i>)	120–870
<i>L. luteus</i>	vienmetis	0,4 – 1,5	Geltona, kartais balta (hibridinės linijos)	50–150
<i>L. mutabilis</i>	vienmetis	1 – 2	Violetinė, mėlyna, rožinė, balta	80–280
<i>L. arboreus</i>	daugiametis	1,5 – 2,5	Geltona	30–100
<i>L. polyphyllus</i>	daugiametis	1 – 1,5	Mėlyna, hibridinių linijų spalvos įvairios	20–70

Bähr ir kt. (9) įvertino įvairių rūšių lubinų, žirnių ir sojos pupelių cheminę sudėtį ir nustatė, kad vidutinis baltymų kiekis lubinuose buvo beveik dvigubai didesnis nei žirniuose, tačiau tam tikros lubinų rūšys turėjo mažesnę baltymų kiekį nei sojos pupelės. Lubinų sėklos, lyginant su žirniais ir sojos pupelėmis, taip pat turėjo didesnę skaidulinių medžiagų kiekį.



1.2 pav. Lubinų kultivavimo plotai ir produkcija Europoje

Pagal Osborno klasifikaciją, lubinų sėklų baltymus galima suskirstyti į albuminus, globulinius, prolaminus ir gliuteninus (10). Globulinų frakcija, kuri dominuoja lubinų sėklose, susideda iš dviejų pagrindinių baltymų α konglutino (11 S, dar vadinamas glicininu ar leguminu) ir β -konglutino (7S, vicilinas, konvicilinas) bei savitų baltyminių medžiagų, būdingų tik lubinams – γ -konglutino (10S) ir δ -

konglutino (2S siera turtingo albumino). Lubinų konglutinai skiriasi tarpusavyje molekuline mase, aminorūgščių sudėtimi, disulfidinių ryšių kiekiu ir jų struktūra. Baltų lubinų sėklose esančio α -konglutino molekulinė masė gali svyruoti nuo 330 iki 430 kDa, β -konglutino – 143–260 kDa, γ -konglutino – 200 kDa ir δ -konglutino – 13 kDa. Analizuojant baltųjų lubinų α -konglutino aminorūgščių sudėtį, daugiausia rasta leucino (7,5 %) ir izoleucino (5,8 %), β -konglutino – leucino (7,3 %) ir fenilalanino (4,9 %), γ konglutino – leucino (9,4 %) ir treonino (7,4 %) ir δ -konglutino – leucino (8,8 %) ir cisteino (6,5 %) (11). Specifinė globulinų frakcijos sudėtis sąlygoja savitas jos savybes, pvz., didesnę baltymų tirpumą, turintį teigiamos įtakos technologinėms baltymų savybėms.

Lubinių sėklų baltymų aminorūgščių sudėtis yra gerai subalansuota, juose yra nemažas kiekis lizino, tačiau lubinai stokoja sierą turinčių aminorūgščių (metionino ir cisteino) ir valino bei triptofano (10). Lizino, izoleucino, leucino, fenilalanino ir tirozino kiekiai lubinuose yra panašūs į pateikiamus Maisto ir žemės ūkio organizacijos (FAO) standartuose, apibrėžiančiuose suaugusiems rekomenduojamus idealių baltymų aminorūgščių kiekius (12). Grela ir kt. (13) analizavo įvairių ankštinių augalų sėklų aminorūgščių sudėtį. Didžiausias glutamino kiekis (~22 %) ir $CS_{met+cys}$ indeksas (54 %) nustatytas geltonuosiuose ir Andiniuose lubinuose, o glutaminas ir asparaginas buvo dominuojantys tarp pakeičiamų aminorūgščių visose tirtose lubinų rūšyse (*Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius* L., *Lupinus luteus*, *Lupinus mutabilis*). $CS_{met+cys}$ indeksas mėlyniesiems ir baltiesiems lubinams buvo atitinkamai 37 % ir 39 %. Lubinų baltymai turėjo mažesnę nepakeičiamų aminorūgščių indeksą (EAAI) nei kiti tirti ankštiniai augalai, kurių buvo 62–70 %.

Lubinų sėklose gausu skaidulinių medžiagų, kurių kiekis gali būti iki 40 %, o tai yra daug daugiau nei randama kituose ankštinių javų grūduose (9). Krakmolo kiekis lubinuose svyruoja nuo 5 % iki 12 %, priklausomai nuo rūšies. Toks krakmolo kiekis yra pakankamai mažas palyginti su randamu kvietiniuose miltuose. Įvertinant tai galima teigti, kad lubinų sėklos maistiniu požiūriu yra visavertės (14). Taip pat lubinų sėklose yra tiamino, niacino, riboflavino ir tokoferolių bei tokių mineralinių medžiagų kaip geležis, cinkas ir manganas (12).

Vertinant lubinų sėklų naudą sveikatai nustatyta, kad lubinų sėklos gali mažinti cholesterolį, turėti antihipertenzinių, hipoglikeminių, priešušdegiminių ir antioksidacinių savybių (11, 15, 16). Lima ir kt. (17) nustatė, kad lubinų sėklose yra mažos molekulinės masės polipeptidų – MMP-9 inhibitorių, stabdančių storosios žarnos vėžio vystymąsi. Tyrimo rezultatai parodė, kad šių inhibitorių efektyvumas lubinų sėklose yra didžiausias, lyginant su kitais tirtais ankštiniais augalais (avinžirniais, sojos pupelėmis, lęšiais, žirniais ir paprastosiomis pupelėmis).

Taigi, lubinų sėklos išsiskiria iš kitų ankštinių javų sėklų vertingomis baltyminėmis ir skaidulinėmis medžiagomis ir turi teigiamą poveikį sveikatai turinčių biologiškai aktyvių junginių. Jos galėtų būti pigi ir genetiškai nemodifikuota žaliava augalinių baltymų išskyrimui ir panaudojimui maisto pramonėje. Tačiau lubinų sėklų vartojimą maistui riboja antimonybiniai junginiai ir mažesnis baltymų pasisavinimas, o platesnį pritaikymą naujų maisto produktų kūrimui – ribotos baltymų funkcinės savybės. Įvertinant tai, svarbiu klausimu išlieka antimonybinių faktorių mažinimas lubinų sėklų perdirbimo metu ir baltymų funkcinių savybių gerinimas, taikant tinkamus vartotojui ir maisto pramonei bioprocesus.

1.2. Antimonybiniai faktoriai lubinų sėklose ir jų mažinimo būdai

Antimonybiniai faktoriai yra viena iš pagrindinių priežasčių, ribojanti ankštinių augalų, įskaitant lubinus, panaudojimą žmonių mitybai. Palyginus antimonybinius faktorius, esančius lubinų sėklose ir sojos pupelėse, nustatyta nemažai skirtumų. Lubinų sėklose, skirtingai nei sojoje, nėra lektinų, kurių sojos pupelėse randama apie 100 µg/g. Fitatų lubinuose randama 0,5 %, o tai yra dvigubai mažiau nei sojose. Saponinų kiekis komercinėse *L. angustifolius* veislėse gali būti iki 570 mg/kg (18). Taninų, kurie turi neigiamą įtaką baltymų sąveikoms su kitais komponentais, kiekis

lubinuose ir sojos pupelėse yra panašus – sudaro iki 0,3 % (8). Cianogeniniai glikozidai, kurių kiekiai kituose ankštiniuose augaluose yra palyginti dideli, lubinuose randami nedidelėmis koncentracijomis. Lubinuose, skirtingai nei kitų ankštinių javų sėklose, daugiau randama alkaloidų. Pagal jų kiekį lubinai skirstomi į du tipus: kartieji ir saldieji (19). Karčiųjų lubinų rūšys negali būti tiesiogiai naudojamos maistui ar pašarams, nes turi didesnę kiekį chinolizidino alkaloidų, tokių kaip sparteinas ir lupaninas, kurie gali sukelti kvėpavimo sutrikimus ir kepenų pažeidimus (20). Alkaloidai nesukelia toksinio efekto, jei jų koncentracijos lubinuose yra mažos.

Literatūroje aprašytos technologinės priemonės, skirtos sumažinti alkaloidų kiekį lubinuose (2). Viena iš labiausiai praktikoje taikomų būdų – lubinų sėklų mirkymas. Daugelis lubinų sėklose esančių alkaloidų yra tirpūs vandenyje, todėl jų kiekis mirkymo metu (vandenyje ar druskų tirpaluose) ar verdant gali būti sumažintas nuo 0,5–4 % iki 0,04 %. Taip pat gali būti išvedamos saldžiųjų lubinų hibridinės linijos, turinčios labai mažą alkaloidų kiekį (0,008–0,012 %) (2). Siauralapiai lubinai, kurių genotipai yra sukuri Trakų Vokėje, turi mažą alkaloidų kiekį ir yra tinkami maistui ruošti.

Mokslinėje literatūroje pateikiama nemažai duomenų ir apie fermentacijos naudą siekiant sumažinti antititybinius faktorius ankštinių javų sėklose. Daugiausia fermentuojamos sojos pupelės gaminant tokius tradicinius Azijos šalių produktus, kaip sojų padažas, *tempe*, *tofu* ir *miso* (21). Sojos pupelių *Rhizopus oligosporus* fermentacija gali sumažinti stachiozės ir fito rūgšties kiekį, o *Lactobacillus brevis*, *Aspergillus oryzae* GB-107 – rafinozės kiekį ir tripsino inhibitoriaus aktyvumą (22, 23, 24). Pateikiama ir keletas tyrimų apie fermentacijos įtaką lubinų antititybiniais faktoriams. Fritsch'as ir kt. (25) nustatė, kad lubinų sėklų fermentacija su *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* reikšmingai sumažino dujų kaupimąsi skatinančių oligosacharidų kiekį, o *Lactobacillus plantarum* fermentacijos metu vyko dalinis fito rūgšties skilimas. Bartkienės ir kt. (26, 27, 28) atlikti tyrimai parodė, kad baltųjų ir geltonųjų lubinų *L. sakei*, *P. pentosaceus* 10 ir *P. acidilactici* fermentacija leido sumažinti akrilamino formavimąsi ir biogeninių aminių susidarymą fermentuotuose produktuose, o mėlynųjų lubinų genotipo „Vilniai“ 24 val. trukusi PRB fermentacija padidino baltymų virškinamumą.

1.3. Baltymų funkcinės savybės ir jų modifikavimas

Pagrindinis maisto komponentas – baltymai – yra reikšmingi didinant ne tik produktų maistinę vertę, bet ir turi ypatingos svarbos maisto produktų fizikocheminėms ir juslinėms savybėms. Norint užtikrinti maisto produkto tinkamumą vartotojui, augaliniai baltymai turi turėti tam tikrų funkcinių savybių, kurios vertinamos pagal tokius parametrus: tirpumą, vandens surišimą, riebalų absorbciją, emulsavimą, putojimą, gelių sudarymą (žr. 1.2 lent.). Nuo šių augalinių baltymų savybių priklauso jų sąveikos su kitais maisto matricoje esančiais komponentais, kas svarbu kuriant naujus produktus ir suteikiant jiems savitų fizikinių ir juslinių savybių.

1.2 lentelė. Baltymų funkcinės savybės ir pritaikymas maiste(29)

Funkcinė savybė	Apibūdinimas	Mechanizmas	Pritaikymas
Tirpumas	Geba ištirpti tirpiklyje	Hidrofiliškumas	Gėrimai
Vandens surišimas	Baltymų sąveika su vandeniu, vandens surišimas, brinkimas;	Vandeniliniai ryšiai;	Mėsa, dešros, tortai, duona;
Riebalų absorbcija	Skonio ir kvapo junginių sąveika / Skonio ir kvapo junginių fiksavimas ir riebalų sulaikymas;	Hidrofobinė sąveika;	Kepiniai, jogurtas, žuvies, mėsos produktai;
Gelių sudarymas	Gelio formavimas;	Tinklinės struktūros formavimas;	Mėsa, dešros, makaronai, kepiniai
Putojimas	Baltymų adsorbpcija paviršiuje, oro burbuliukų padengimas;	Tarpfazinė adsorbpcija, plėvelės formavimas;	Krema, tortai, morengai, putos;
Emulsavimas	Baltymų adsorbpcija paviršiuje, aliejaus lašelių padengimas.	Tarpfazinė adsorbpcija, plėvelės formavimas.	Salotų padažai, sriubos.

1.3.1. Baltymų funkcinį savybių kriterijai

Dauguma maisto baltymų turi tam tikrą funkcionalumą dėl globulinių struktūrų tirpumo ir baltymų savybės formuoti tinklinę struktūrą, kuri padeda sudaryti įvairius gelius ir plėveles, surišti vandenį, absorbuoti lipidus, turėti putojimo ir emulsavimo savybių bei tirpti esant skirtingoms terpės pH vertėms (27, 29). Šios savybės taikomos sriubų, gėrimų, kremų gamyboje, taip pat ekstruzijos procese ir įvairiems kepiniams ruošti.

Baltymų tirpumas. Tirpumas, kuris apibūdinamas medžiagos savybe tirpti tirpiklyje, yra viena iš pagrindinių baltymų charakteristikų vertinant jų pritaikymą maisto ir gėrimų gamyboje. Baltymų tirpumui įtaką turi aminorūgščių seka ir jų kompozicija, molekulės dydis, konformacija, polinių ir krūvio neturinčių aminorūgščių santykis, joninė jėga, tirpiklio tipas, pH vertė ir temperatūra (30). Mažiausias baltymų tirpumas yra jų izoelektriniame taške (pI) (31). Daugumos augalinių baltymų tirpumas ir geba formuoti emulsijas rūgštinėje terpėje yra sumažėjęs ir tai riboja jų taikymą maisto pramonėje. Įvairūs perdirbimo procesai, kurių metu didėja molekulės elektrinis krūvis, kinta aminorūgščių išsidėstymas molekulės paviršiuje bei izoelektrinis taškas, turi įtakos ir baltymų tirpumo kitimui. Aryee ir Boye (30) analizavo skirtingų perdirbimo metodų (sausos malimo, virimo ir nusodinimo izoelektriniame taške) įtaką lęšių baltymų maistinėms, fizikocheminėms ir funkcinėms savybėms. Tyrimas parodė, kad baltymų tirpumas gali būti sumažintas taikant sausą malimą ir padidintas naudojant nusodinimą izoelektriniame taške. Taip pat baltymų tirpumas yra glaudžiai susijęs su emulsavimo, putojimo ir gelių formavimo savybėmis.

Vandens surišimo geba ir riebalų absorbcija. Vandens surišimo geba (WHC) parodo, kiek vandens gali absorbuoti vienas gramas baltymų miltelių. Tyrimai parodė, kad lęšių baltymų vandens surišimo geba padidėjo taikant kaitinimą ir nusodinimą

izoelektriniame taške (30). Baltymai, turintys mažą WHC, sudaro mažai hidratuotus gelius, turinčius netvirtą tekstūrą (32).

Baltymų savybė absorbuoti riebalus (FAC) svarbi produkto skonio ir kvapo formavimuisi. Tam, kad augaliniai baltymai turėtų didelę riebalų absorbcijos gebą, juose turi būti kuo daugiau nepolinių aminorūgščių. FAC vertei įtakos turi baltymų kilmė, dydis, koncentracija, krūvio neturinčių aminorūgščių kiekis, perdirbimo būdas ir baltymų-riebalų sąveika. Mažos molekulinės masės ir mažo tankio baltymai gali absorbuoti ir sulaikyti daugiau riebalų nei didelės masės ir tankio baltymai (30).

Emulsavimas ir putojimas yra dvi pagrindinės baltymų funkcinės savybės, svarbios gėrimų, ledų, padažų, putėsių, kremų ir margarinų gamyboje. Dėl amfifilinės prigimties, baltymai elgiasi kaip emulsikliai, kurie padengia aliejaus lašelius ar oro burbuliukus, formuoja stabilias plėveles ir stabilizuoja įvairias dispersijas. Emulsavimo savybės galima vertinti dviem kriterijais: emulsijos aktyvumo indeksu (EAI) ir emulsijos stabilumo indeksu (ESI). EAI parodo aliejaus kiekį, kurį gali emulsuoti vienas baltymų vienetas, o ESI matuoja emulsijos stabilumą saugant tam tikrą laiką. Putojimo savybės vertinamos pagal putų tūrio, putojimo gebos ir putų stabilumo rodiklius, kurie priklauso nuo baltymų struktūros ir kompozicijos. Mohamed'as ir kt. (33) teigė, kad didelis avižų baltymų putų stabilumas yra susijęs su dideliu baltymų kiekiu ir hidrofobiškumu. Avižų baltymų izoliato, turinčio daugiau nei 85 % baltymų, putų stabilumas po 15 min. buvo 31 % didesnis, lyginant su avižų miltų (baltymų < 20 %). Padidėjęs emulsijos stabilumas siejamas su disulfidinių ryšių formavimusi tarp adsorbuotų baltymų, o sumažėjęs stabilumas – su elektrostatische stūmos jėga tarp adsorbuotų molekulių (34). Augalinės kilmės baltymams būdinga kompaktiška struktūra ir ribotos putojimo savybės. Augalinių baltymų frakcijos, kuriose yra daug albuminų (frakcijos iš žirnių ir lubinų), turi geras putojimo savybes, panašias į kiaušinio baltymo (35). Lyginant su kitais augaliniais baltymais, sojos baltymų putojimo savybės yra geriausiai ištirtos, o duomenų apie siauralapių lubinų baltymų putojimo savybes yra nedaug. β -konglicininas turi geresnes putojimo savybes nei glicininas, nes β -konglicinino molekulė yra mažesnė ir turi lankstesnę struktūrą. Manoma, kad papildant naujus maisto produktus β -konglicininu, galima pakeisti pieno baltymus (36). Tam, kad augaliniai baltymai būtų aktyvūs putojimo agentai, būtinos struktūrinės modifikacijos keičiant pH vertę arba taikant fermentinę hidrolizę.

Gelių formavimas yra kita svarbi baltymų funkcinė savybė, kuri panaudojama gaminant želė, pudingus ir mėsos produktus. Be to, ši savybė reikšminga vertinant produkto tekstūrą, pvz., elastingumą. Geba sudaryti gelius vertinama pagal mažiausią baltymų koncentraciją, reikalingą sudaryti gelį. Baltymų gelio susidarymą gali sukelti temperatūra (32, 37), cheminis apdorojimas (38) ar fermentų poveikis (39). Skirtingų mikrostruktūrų, didesnio funkcionalumo ir pagerintų juslinių savybių geliai gali būti gaunami tiek iš baltymų, tiek iš baltymų ir polisacharidų kompleksų (37). Gelio struktūros ypatybės nulemia ir kitas baltymų funkcines savybes, pvz., dideles poras turintys geliai pasižymi mažu WHC (29). Geliams susidaryti įtakos turi baltymų molekulinė masė, temperatūra, pH ir joninės jėgos. Naudojant fermentinius preparatus baltymų geliams sudaryti, atsiradę po fermentinės hidrolizės mažesni baltymų ar peptidų fragmentai jungiasi tarpusavyje hidrofobiniais ryšiais ir formuoja gelius

struktūrą (39). Dviejų pagrindinių ankštinių augalų baltymų 11S glicinino (legumino) ir 7S konglutino (vicilino) geba formuoti gelius yra nevienoda, todėl šie baltymai formuoja skirtingų savybių (tvirtumo, elastingumo) ir struktūros gelius. β -konglicinino gelio sudarymo temperatūra yra mažesnė nei glicinino ir labiau priklauso nuo baltymo koncentracijos (40). 7S baltymo gelio susidarymo metu svarbiausias vaidmuo tenka vandeniliniams ryšiams ir hidrofobinei sąveikai kartu su kovalentiniais disulfidiniais ryšiais, o 11S baltymui sudarant gelį, vyrauja tik disulfidiniai ryšiai (35). Lubinų baltymai formuoja iš esmės silpnesnius gelius nei sojos baltymai. Batista ir kt. (41) tyrinėjo sojų, žirnių ir lubinų baltymų savybes geliams sudaryti. Sojos baltymai formavo stiprius gelius, o lubinų baltymų geliai buvo silpnesni dėl nevysiškos baltymų molekulių denatūracijos. Panašius duomenis gavo ir Berghout'as ir kt. (42), kurie nustatė mažesnę lubinų baltymų dalelių brinkimą gelio viduje lyginant su sojos baltymais.

1.3.2. Baltymų funkcinėms savybėms įtakos turintys išoriniai faktoriai

Baltymų funkcionalumui gali turėti įtakos išoriniai (maisto komponentai, pH, temperatūra, maisto perdirbimas) ir vidiniai (fizikocheminės savybės, struktūra, konformacija, aminorūgščių sudėtis, hidrofobiškumas, hidrofiliskumas) faktoriai (žr.1.3 pav.) (29).

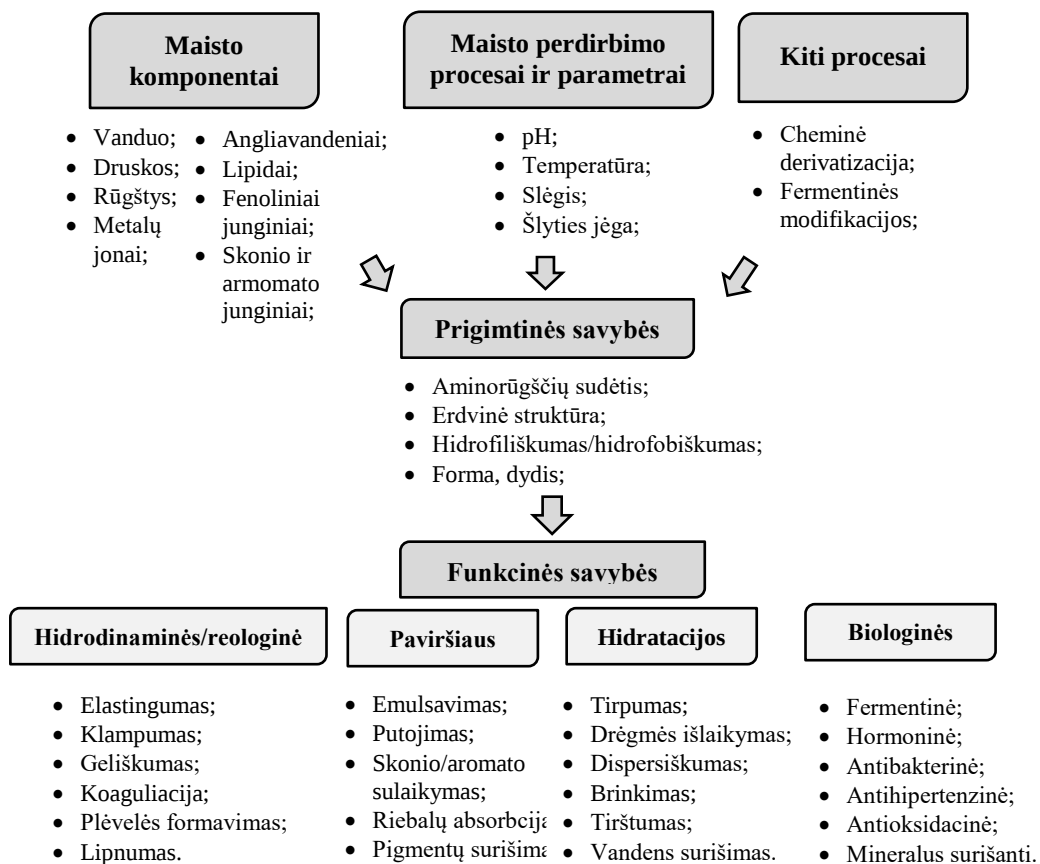
Išoriniai faktoriai gali keisti baltymo cheminę struktūrą, todėl kinta ir baltymų funkcinės savybės. Tretinė ir ketvirtinė baltymo struktūra priklauso ne tik nuo pirminės struktūros, jungiančios aminorūgštis kovalentiniais ryšiais, bet ir nuo daugelio kitų nekovalentinių sąveikų, galimų pačioje baltymo molekulėje ar tarp baltymų ir kitų komponentų (pvz., vandens). Šios molekulinės jėgos gali stabilizuoti / destabilizuoti baltymo struktūrą, turėti įtakos molekuliniam lankstumui, dydžiui, formai bei lemti baltymo fizikochemines ir funkcines savybes. Hidrodinaminės / reologinės, paviršiaus, hidratacinės ir biologinės maisto baltymų savybės turi įtaką baltymų funkcionalumui maisto sistemose.

Maisto komponentai. Baltymų cheminės savybės lemia jų sąveiką su kitais maisto komponentais: vandeniu, kitais baltymais, lipidais, angliavandeniais, druskomis, metalų jonais, skonį ir kvapą formuojančiais junginiais, fenoliniais junginiais. *Vandens molekulės*, prisijungusios vandeniliniams ryšiams prie baltymo molekulės, yra labai svarbios baltymo struktūros stabilizavimui. Pusiausvyra tarp baltymų-vandens ir baltymų-baltymų sąveikų svarbi tokioms funkcinėms savybėms kaip brinkimas, vandens surišimas, tirpumas ir geba formuoti geliuose, plėvelėse ir putose tinklines struktūras (43). Manoma, kad tokios *druskos* kaip natrio sulfatas, fosfatas ir fluoridas stabilizuoja baltymus, sustiprindamos vandenilinius ryšius, o jodido, bromido ir perchlorato – destabilizuoja ir denatūroja baltymus (44). Polisacharidų-baltymų sąveika turi įtaką maisto baltymo stabilumui perdirbimo metu, kai naudojamas terminis apdorojimas, dehidratacija, šaldymas (45). Susidarant emulsijoms, nepolinės polipeptidinės grandinės dalys yra atsakingos už hidrofobinę sąveiką su aliejaus-vandens paviršiuje esančiomis lipidų molekulėmis. Tarp baltymų ir kvapo / skonio junginių dažniausiai vyrauja hidrofobinė sąveika. Šių junginių polinės grupės gali su baltymais formuoti tiek vandenilinius, tiek elektrostatinis

ryšius (46). Tam įtakos turi molekulės dydis, nes didesnės molekulinės masės fenoliniai junginiai labiau linkę sudaryti kompleksus su baltymais, nei mažesnės (47).

Perdirbimo procesai ir jų parametrai. Dažniausiai baltymų denatūracija siejama tik su antrinės, tretinės ir ketvirtinės struktūros pokyčiais, nepakeičiant pirminės baltymo struktūros (48). Baltymų struktūra gali būti keičiama kintant pH, temperatūrai, pridendant oksiduojančių ar redukuojančių junginių, veikiant druskoms bei kitiems fiziniams veiksniams. Baltymų savybės taip pat keičiasi priklausomai nuo maisto perdirbimo metu naudojamų operacijų. Ne visi baltymų pokyčiai yra pageidaujami, todėl, siekiant optimalaus varianto, svarbu kontroliuoti proceso parametrus.

Kiti procesai. Baltymų savybes keičia ir tikslinga jų modifikacija cheminiais, biologiniais ir fiziniais metodais. Įvairių technologijų ar jų kombinacijų pritaikymas gali pagerinti specifines baltymų funkcines savybes ir praplėsti jų panaudojimą daugelyje maisto sistemų.



1.3 pav. Funkcinėms maisto baltymų savybėms įtaką turintys faktoriai (29)

1.3.3. Baltymų funkcinių savybių modifikavimui taikomi metodai

Cheminiai metodai. Dauguma augalinių baltymų turi daug glutamino ir asparagino rūgščių, kurios mažina baltymų paviršiaus aktyvumą ir tirpumą vandenyje esant neutraliai pH vertei (35). Baltymų savybės gali būti pakeistos naudojant cheminius modifikavimo metodus. Teorinėje literatūroje minimi tokie cheminiai metodai: aminogrupių acilinimas (acetilinimas, sukcinilinimas) arba alkilinimas; karboksigrupių esterifikacija arba amidinimas; fenolgrupių acilinimas arba elektrofilinis pakeitimas; tiolo-, imidazolo- ir indologrupių oksidacija arba alkilinimas (43, 49). *Deamininimas* yra vienas iš būdų, galintis pakeisti baltymų paviršiaus krūvio pasiskirstymą ir taip padidinti jų tirpumą bei pagerinti funkcines savybes. Proceso metu aminorūgšties šoninė amino grupė atskyta arba kovertuojama į kitą funkcinę grupę, pvz., rūgštinę. Dėl to molekulė tampa amfifiline ir turi geresnį tirpumą vandenyje bei didesnę paviršiaus aktyvumą (esant neutraliam pH) (50). *Deamininimą* galima atlikti taikant rūgštinį apdorojimą arba veikiant fermentu transglutaminaze. Šis metodas buvo taikytas kviečių glitimo, ryžių, kukurūzų, miežių ir sojų baltymų funkcinėms savybėms gerinti (50, 51, 52, 53, 54). *Acetilinimas* ir *sukcinilinimas* taip pat gali būti taikomi norint padidinti augalinių baltymų paviršiaus hidrofobiškumą (50). Kraus'as ir kt. (55) nustatė, kad šių metodų taikymas turėjo reikšmingą įtaką geltonųjų lubinų sėklų baltymų izoliatų reologinėms savybėms. Sukcinilinimas žymiai padidino baltymų dispersijos klampą, o acetilinimas turėjo įtakos stipresnio gelio, turinčio mažesnę, klampiai elastingą sritį, formavimuisi. Tačiau, maisto pramonėje cheminė baltymų modifikacija vertinama nepalankiai, nes dauguma cheminių metodų yra nepatvirtinti ir netinkami baltymų, skirtų žmonių vartojimui, funkcionalumui didinti (43). Šie metodai gali sumažinti baltymų maistinę vertę ir sukelti toksiškų aminorūgščių junginių susidarymą.

Biologiniai metodai. *Fermentinė modifikacija* yra švelnesnis ir specifiskesnis būdas, lyginant su cheminiu, galintis padidinti augalinių baltymų funkcionalumą, nes susidaro daug mažesni nepageidaujamų šalutinių junginių kiekiai (56). Dažniausiai naudojami proteolitiniai fermentai, kuriais galima kontroliuoti baltymų hidrolizės laipsnį. Proteazės katalizuoja peptidinių jungčių skilimą susidarant mažesnės molekulinės masės peptidams, kurie turi didesnę tirpumą ir amfifiliškumą (35). Šis metodas buvo taikomas kviečių glitimo (57), sojų (58), žirnių (59), rapsų (60) ir ryžių (61) baltymų modifikacijai. Sumažėjusi molekulinė masė ir padidėjęs hidrolizuotų polipeptidų hidrofobiškumas pagerina baltymų emulsavimo ir putojimo savybes. Svarbu parinkti proteazes ir kontroliuoti hidrolizės laipsnį, nes per didelė baltymų hidrolizė gali turėti atvirkštinę įtaką baltymų funkcionalumui bei suteikti kartaus skonio pojūtį (62).

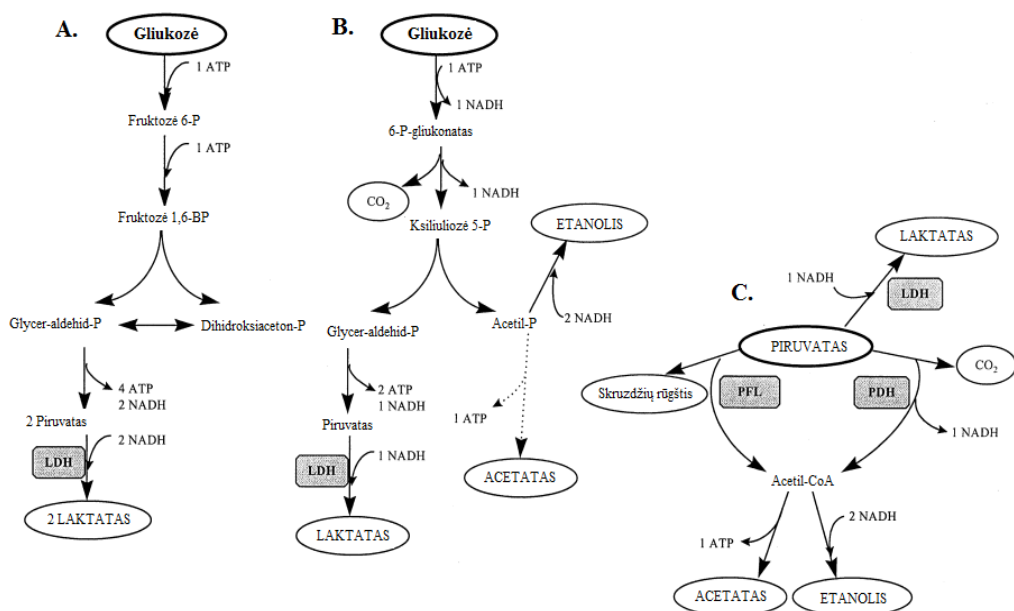
PRB fermentacijos poveikis baltymų funkcionalumui. Fermentacijos metu žaliavoje vykstantys biocheminiai procesai, kuriuos katalizuoja įvairūs mikroorganizmai (mielės, grybai ir bakterijos), gali turėti įtakos baltymų funkcinėms savybėms. Fermentacijos metu terpės pH mažėja dėl susidariusių organinių rūgščių, o mikroorganizmų išskirti proteolitiniai fermentai hidrolizuoja baltymus į peptidus ir laisvasias aminorūgštis. Daugelyje fermentacijos procesų PRB atlieka pagrindinį vaidmenį ir jau ilgą laiką yra taikomos fermentuoto maisto ir gėrimų gamyboje. PRB priklauso gramteigiamų bakterijų šeimai: *Carnobacterium*, *Enterococcus*,

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ir *Weissella* (63). Šie mikroorganizmai yra katalazei neigiamos, sporų neformuojančios aerobinės ar fakultatyviai anaerobinės lazdelės, ar kokai (64). Paminėtina tai, kad PRB negali sintetinti porfirino ir citochromų, todėl negeneruoja ATP (65). Daugumos PRB vidutinė augimo temperatūra svyruoja nuo 20 iki 45 °C, tačiau, priklausomai nuo rūšies, ji gali būti žemesnė ar aukštesnė. Pasaulinė sveikatos organizacija daugumai šių bakterijų suteikė GRAS statusą (angl. *Generally regarded as safe*) (63). KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje taip pat yra sukaupta kolekcija bakteriocinus gaminančių PRB padermių, išskirtų iš spontaninių ruginių duonos raugų: *L. sakei* KTU05-6, *P. acidilactici* KTU05-7, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10.

PRB fermentuoja angliavandenius skirtingais būdais, todėl galima homo-, hetero- ir mišrių rūgščių fermentacija (žr. 1.4 pav.) (66). Homofermentacija vyksta pagal Embden–Meyerhof–Parnas schemą ir susidariusi pieno rūgštis yra vienintelis galutinis gliukozės metabolizmo produktas. Pagal fosfoketolazės schemą, heterofermentacijos metu iš gliukozės susidaro vienodas PR, anglies dioksido, etanolio ar acetato molekulių skaičius. Etanolio ir acetato santykis priklauso nuo terpės redokso potencialo. Fakultatyvios heterofermentinės bakterijos (pvz., *Lb. casei*) tokiu būdu fermentuoja pentozes, o obligatinės heterofermentinės bakterijos (pvz., *Leuconostoc*), taip fermentuoja heksozes ir pentozes.

Esant gliukozės trūkumui, sumažėjus temperatūrai ar padidėjus pH vertei, homofermentinės bakterijos, pvz., *Lactococci*, sintetina įvairių rūgščių mišinį. Etanolis, acetatas ir skruzdžių rūgštis sintetinama kartu su PR. Tokia fermentacija vyksta pagal homofermentinę schemą, tačiau skirtumai atsiranda piruvato metabolizmo metu. Piruvatas naudojamas ne tik PR sintezei, bet ir skruzdžių rūgšties bei acetilo kofermento A (acetyl-CoA) susidarymui, veikiant piruvato-skruzdžių rūgšties liazei. Esant deguoniui šis fermentas inaktyvuojamas ir piruvato metabolizmas vyksta katalizuojant piruvatdehidrogenazei bei susidarant anglies dioksidui, acetyl-CoA ir NADH.

PRB fermentacijos metu susidaro ir kiti metabolitai: aromato ir skonio junginiai, egzopolisacharidai, bakteriocinai (67). Junginių susidarymas priklauso nuo mikroorganizmų rūšies ir substrato sudėties. Tokiu būdu, PRB fermentacija leidžia pailginti produkto galiojimo laiką, padidinti jo mikrobiologinį saugumą, suteikti gaminiui naujų tekstūros ir juslinių savybių. Literatūroje nurodoma, kad PRB fermentacija lubinų sėkloms apdoroti naudota norint pakeisti žaliavos juslines savybes. Kaczmarska ir kt. (68) nustatė, kad *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ir *Streptococcus thermophilus* fermentacija pakeitė lubinų miltų aromato profilį, nes jos metu susiformavo specifiniai kvapo junginiai, primenantys grybus, riešutus ir žalumą. Schindler'is ir kt. (69) analizavo PRB fermentacijos galimybes mažinant lubinų baltymų izoliato nepageidaujamą kvapą, kuris atsiranda lubinų baltymų izoliatų laikymo metu. Nustatyta, kad *Lactobacillus plantarum* L1047 ir *Pediococcus pentosaceus* P113 fermentacija reikšmingai pakeitė lubinų baltymų izoliato aromato profilį, o nemalonius ankštinių augalų kvapas buvo sumažintas ar užmaskuotas naujai susidariusių kvapo junginių.



1.4 pav. PRB angliavandenių fermentacijos būdai. Homofermentinė (A), heterofermentinė (B), mišrių rūgščių (C) fermentacija. čia – LDH – laktatdehidrogenazė, PFL – piruvato-skrudžių rūgšties liazė, PDH – piruvatdehidrogenazė (66)

Mokslinėje literatūroje pateikiama keletas fermentacijos būdų. Kietafazė fermentacija (KF) pastaraisiais metais tapo patikima ir vis dažniau pramoniniuose procesuose taikoma biotechnologija. KF yra heterogeninis procesas, susidedantis iš trijų fazių – kietos, skystos ir dujinės, ir sudarantis palankias sąlygas mikroorganizmų kultivavimui ir įvairių metabolitų sintezei (70). Proceso metu a_w substrate yra palyginti mažas, tačiau pakankamas reikiamų mikroorganizmų vystymuisi. Kadangi skystoji fazė sudaro nedidelę dalį, produkuojami metabolitai yra labiau koncentruoti, o tai palengvina jų gryninimo procesus. Tai yra ekonomiškai naudinga technologija pramoniniams bioprocesams tobulinti, nes šio proceso energijos sąnaudos yra mažesnės, sintetinamų produktų išeiga didesnė, naudojamas nedidelis vandens kiekis, todėl, lyginant su skystafazė fermentacija, sumažėja bakterinio užterštumo rizika (žr.1.3 lent.). KF taikymas biotechnologiniuose procesuose yra platus: biohidrometalurgija, bioremediacija, įvairių atliekų biokonversija į biokurą ir kitus pridėtinės vertės produktus, fermentų ir organinių rūgščių sintezė, funkcionaliųjų junginių išgavimas, fermentuotų maisto produktų gamyba (71, 72). KF yra svarbi maisto fermentų, kvapiųjų ir skoninių medžiagų gamyboje. Parinkus tinkamas proceso sąlygas ir mikroorganizmus, KF metu sintetintos α -amilazės, pektinazės, proteazės, lipazės, tanazės, fitazės, ksilanazės, celiulazės ir hemiceliulazės (73). Taikant šį būdą, galima išskirtinai sintetinti ne tik aromata ir skonį formuojančius junginius kaip laktonai, pirazinai, metilketonai, vanilinas, bet ir natūralius pigmentus, kurie gali būti plačiai naudojami maisto pramonėje (74). Bioaktyviųjų fenolinių

junginių gamyba taikant KF, taip pat turi pranašumą lyginant su šių junginių chemine sinteze ar ekstrakcija, nes KF sumažina organinių tirpiklių sąnaudas, reikalingas junginiams iš substrato išgauti (75).

Tradicinė skystafazė fermentacija (SF) taip pat turi savų privalumų. Šis fermentacijos būdas turi greitesnius šilumos perdavimo srautus bei didesnę terpės homogeniškumą (72). Tačiau SF metu susidaro didesni atliekų kiekiai, yra didesnė mikrobiologinio užterštumo galimybė, o tam tikri proceso parametrai gali būti netinkami specifiško produkto gamybai.

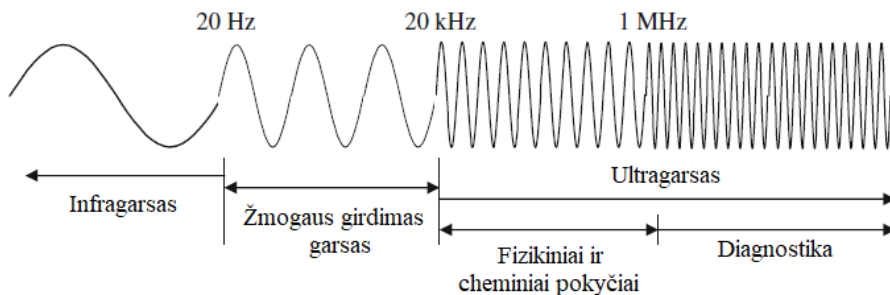
1.3 lentelė. Kietafazės ir tradicinės skystafazės fermentacijos skirtumai (76)

Kietafazė fermentacija (KF)	Skystafazė fermentacija (SF)
• Naudojami mikroorganizmai (pvz., gijjiniai grybai) kurių kultivavimui reikalingas mažesnis vandens kiekis. • Substratas (natūralus ar dirbtinis) dažniausiai yra kieta medžiaga, kuri yra terpė mikroorganizmams augti. • Mažesnis mikrobiologinio užsiteršimo pavojus dėl mažo vandens kiekio. • Naudojami mažesnio dydžio bioreaktoriai. • Mažesnės energijos sąnaudos aeracijai ir dujų pernašai. • Mikroorganizmų dauginimąsi riboja sumažėjęs maistinių medžiagų pasiekiamumas. • Sunkumai matuojant biomasės kiekį ir kitus proceso parametrus. • Lengvesnis, pigesnis ir mažiau laiko reikalaujantis galutinių produktų išskyrimas ir gryninimas. • Nesusidaro skystųjų atliekų.	• Substrato kiekis yra daug mažesnis nei vandens. • Procese naudojamos brangios žaliavos. • Didelis vandens aktyvumas yra pagrindinė mikrobiologinio užteršimo priežastis. • Naudojami didelės talpos bioreaktoriai, nes fermentacijos terpė yra labai praskiesta. • Didesniam oro slėgiui reikia daugiau energijos sąnaudų, o dujų pernaša proceso metu yra prasta. • Energingas maišymas palengvina medžiagų difuziją. • Galimybė matuoti proceso parametrus <i>online</i> režimu, lengvas mėginių paėmimas. • Dėl vandens, galutinių produktų išskyrimas ir gryninimas iš terpės yra sunkesnis ir brangesnis. • Susidaro didelis kiekis skystųjų atliekų.

Kiti metodai. *Ekstruzija, apdorojimas dideliu slėgiu* bei *ultragarsas* taip pat gali būti taikomi norint pakeisti baltymų savybes. *Ekstruzijos technologija* modifikuoti sojų baltymai ir augalinių baltymų mišiniai gali būti naudojami kaip mėsos analogai (77, 78). Tačiau Lampart-Szczapa ir kt. (79) nustatė, kad ekstruzija nebuvo tinkamas metodas norint pagerinti lubinų baltymų savybes. Ekstruzija sumažino lubinų baltymų vandens absorbciją bei pablogino emulsavimo savybes. *Didelio slėgio technologija* taip pat naudojama kaip efektyvus ir saugus metodas baltymų struktūrai modifikuoti (80). Apdorojimas dideliu slėgiu (>400 MPa) sukelia baltymų konformacijos pokyčius, kurie nulemia padidėjusį baltymų paviršiaus hidrofobiškumą. Taikant švelnesnes apdorojimo sąlygas, nustatytas nekovalentinių ryšių silpnėjimas, tačiau tolimesnis cheminių ryšių susidarymas galimas didėjant

slėgiui. Taikant šį metodą, buvo atlikta keletas tyrimų modifikuojant kviečių glitimo (81, 82) ir sojų (83) baltymų struktūrą bei funkcines savybes. Chapleau ir de Lamballerie-Anton'as (84) vertino šio metodo įtaką lubinų baltymų agregacijai ir emulsavimo savybėms. Nustatyta, kad apdorojant 400 MPa slėgiu, denatūravo 11S (α -konglutino) frakcija, o baltymų tirpumas sumažėjo. Dideliu slėgiu (400 MPa) apdoroti baltymai, lyginant su kontroliniais mėginiais, sudarė emulsijas, turinčias didesnę dispersiškumą ir mažesnę flokuliacijos indeksą.

Ultragarso panaudojimas baltymų funkcionalumui didinti. Garso bangos yra saugios, netoksiškos ir nedaro žalos aplinkai, todėl jų panaudojimas maisto pramonėje, lyginant su kitomis technologijomis, turi daugiau privalumų (85). Dėl to kyla vis didesnis susidomėjimas ultragarso pritaikymu siekiant pagerinti fizikines, chemines ir funkcines maisto savybes. Ultragarsas – tai mechaninės bangos, kurių dažnis yra didesnis nei 20 kHz (žr. 1.5 pav.).



1.5 pav. Garso spektras (86)

Galimas mažo (1 W/cm^2) ir didelio ($10\text{--}1000 \text{ W/cm}^2$) intensyvumo ultragarso, kurio dažnis yra atitinkamai 1–10 MHz (didelis dažnis) ir 20–100 kHz (mažas dažnis) (87, 88). Ultragarsas naudojamas chemijos, bioprocesų, maisto, farmacijos ir medicinos pramonėje (87, 89). Didelio dažnio ultragarso yra mažo galingumo, kurio nepakanka sukelti akustinės kavitacijos efektą, tačiau jis sukelia minimalius cheminius ir fizikinius medžiagos, per kurią jis sklinda, pokyčius (90). Dėl to jis taikomas maistui tirti ir bekontaktę kokybės kontrolei. Mažo dažnio ultragarso sukelia stiprias šlyties bei mechanines jėgas ir taikomas įvairiems procesams intensyvinti (85).

Kai mažo dažnio ultragarso sklinda skystyje, dėl slėgių skirtumo susidaro kavitaciniai burbuliukai (91). Šie burbuliukai charakterizuojami pagal virpėjimų dinamiką, maksimalią temperatūrą ir slėgį, kuriuos jie pasiekia suirdami (92). Teigiama, kad ultragarso sklindant skystoje terpėje, ultragarsinės bangos, skystis ir ištirpusios dujos sukuria neįprastą reiškinį, vadinamą akustine kavitacija. Ištirpusių dujų branduoliai virpa dėl akustinio lauko poveikio ir kintančio aplink juos slėgio. Virpėjimų metu ištirpusios dujos ir tirpiklio garai difunduoja iš kavitacinių burbuliukų ir į juos. Dėl difuzijos dujų / garų kiekis, patenkantis į burbuliukus išsiplėtimo fazėje, yra didesnis nei difunduojantis iš burbuliukų suspaudimo fazėje. Tai lemia burbuliukų didėjimą iki rezonansinio dydžio. Kai pasiekama rezonansinė sritis, burbuliukai

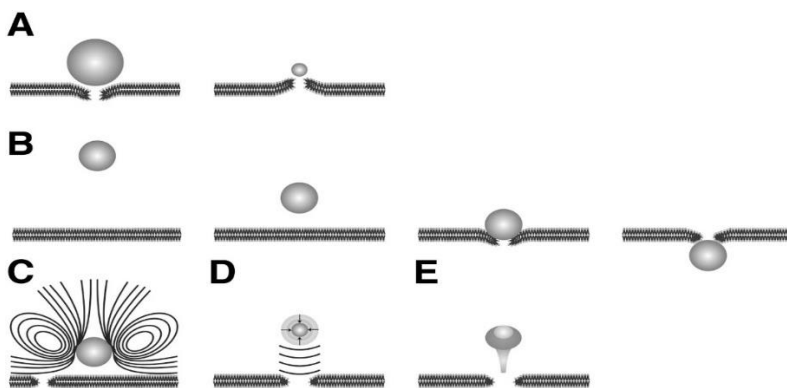
didėja iki maksimalaus galimo dydžio ir tuomet plyšta, smarkiai padidindami terpės temperatūrą (93). Tokiu būdu ultragarsas gali paspartinti masių pernašos procesus ir ląstelių pralaidumą bei turėti įtakos mikroorganizmų, trikdančių fermentacijos procesus, inaktyvavimui. Ultragarso poveikis daugiausia tirtas pieno ir sojų baltymams. Jambrak'as ir kt. (94) analizavo mažo (500 kHz) ir didelio (20 kHz ir 40 kHz) intensyvumo ultragarso įtaką išrūgų baltymų funkcinėms savybėms. Ultragarsas padidino baltymų tirpumą tik išrūgų baltymų izoliatai ir hidrolizate, bet ne baltymų koncentrate. Nustatyta, kad 20 kHz ir 40 kHz ultragarsas pagerino baltymų putojimo savybes, o mažo intensyvumo ultragarsas neturėjo įtakos baltymų funkcinėms savybėms. Gülseren'as ir kt. (95) bei Güzey ir kt. (96) nustatė, kad didelio intensyvumo ultragarso taikymas galvijų serumo albuminui sukėlė laisvųjų tiologrupių, dalelių dydžio, paviršiaus hidrofobiškumo ir antrinės baltymo struktūros pokyčius. Panašius rezultatus gavo Hu ir kt. (97), kurie pastebėjo, kad po ultragarso taikymo sojų baltymuose padidėjo laisvųjų tiologrupių skaičius ir pagerėjo baltymų tirpumas. Liofilizuojant tokie baltymai formavo didesnius agregatus nei neapdoroti ultragarsu. Arzeni ir kt. (98) tyrė didelio intensyvumo ultragarso poveikį (20 min.) išrūgų, sojų ir kiaušinio baltymams. Apdorojimas ultragarsu padidino paviršiaus hidrofobiškumą ir turėjo įtaką dalelių dydžiui, tačiau reikšmingai padidino tik sojų baltymų tirpumą. Kito tyrimo metu, O'Sullivan'as ir kt. (99) nustatė, kad didelio intensyvumo ultragarso poveikis sumažino žirnių ir sojų baltymų izoliatų dalelių dydį, o iš ultragarsu paveiktų žirnių baltymų izoliatų pagamintų emulsijų dispersiškumo laipsnis buvo didesnis nei nepaveiktų. Kitų mokslinių tyrimų metu nustatyta, kad ultragarsinis apdorojimas padidino fermentinį sojų baltymų skaidymą, reikšmingai pakeitė specifinį laidumą ir reologines savybes, padidino tirpumą ir emulsavimo aktyvumą (100, 101). Morales'as ir kt. (102) nustatė, kad mažo dažnio ultragarso taikymas pagerino sojų baltymų putojimo gebą dėl baltymų dalelių dydžio sumažėjimo, tačiau šis apdorojimas neturėjo įtakos putų stabilumui. Tyrimo metu taip pat nustatyta, kad ultragarso taikymas aukštoje temperatūroje (70, 80 ir 85 °C) turėjo sinergetinį poveikį putojimo gebai, kuri, lyginant su kambario temperatūroje ultragarsu apdorotais mėginiais, padidėjo 20 %. Qin'as ir kt. (103) tyrė sojų baltymo gelio, formuoto naudojant transglutaminazes, savybes. Eksperimento metu sojų baltymų izoliatas (prieš sudarant gelį) papildomai paveiktas didelio intensyvumo ultragarsu. Ultragarsui veikiant sumažėjo baltymų dalelių dydis, pagerėjo paviršiaus hidrofobiškumas bei laisvųjų tiologrupių kiekis. Ultragarsas sustiprino gelį, vandens surišimo gebą, todėl susiformavo tankesnės ir homogeniškesnės struktūros gelis. Taigi, literatūroje teigiama, kad taikant ultragarsą baltymų molekulėse formuojasi nauji ryšiai, kinta molekulių struktūra ir funkcinės savybės, tačiau ultragarso poveikis baltymų funkcinėms savybėms labai priklauso nuo baltymų kilmės ir ultragarsinio apdorojimo parametrų, todėl kiekvienai tiriamajai medžiagai jis gali pasireikšti skirtingai.

Atsižvelgiant į mokslinę literatūrą, svarbu įvertinti minėtų metodų taikymą lubinų sėklų baltymų funkcionalumui gerinti.

1.4. Ultragarso taikymas mikrobiologinei taršai mažinti ir fermentų aktyvumui reguliuoti

Ultragarso poveikis apdorojant augalinę žaliavą gali pasireikšti ne tik baltymams, bet ir žaliavoje esantiems mikroorganizmams bei fermentams. Apdorojimas ultragarsu gali būti naudingas norint sumažinti pašalinių mikroorganizmų įtaką PRB fermentacijos proceso efektyvumui. Ultragaras taip pat gali slopinti arba stiprinti fermentų veiklą tiek pradinėje žaliavoje, tiek fermentuotuose produktuose.

Poveikis mikroorganizmams. Mikroorganizmų inaktyvavimas ultragarsu naudotas pieno ir sulčių pasterizavimui bei mielių ląstelių lizės paspartinimui viename iš vyno gamybos etapų (104, 105, 106). Ultragarso efektas mikrobinėms ląstelėms priklauso nuo daugelio faktorių: mikroorganizmų rūšies, terpės tipo ir sudėties, ultragarso parametrų (intensyvumo ir dažnio), veikimo trukmės, pH vertės ir temperatūros (107). Norint suprasti ultragarso poveikio mechanizmą yra pasiūlyta keletas teorijų. Teigiama, jog gramteigiamos bakterijos yra atsparesnės ultragarso poveikiui nei gramneigiamos tikriausiai dėl to, kad gramteigiamų bakterijų ląstelių sienelės yra storesnės ir stipresnės (108). Ultragaras gali turėti tiek teigiamos, tiek neigiamos įtakos bakterijų ląstelėms, priklausomai nuo sonoporacijos lygio. Sonoporacija – tai laikinų ertmių ar porų formavimasis ląstelių membranoje dėl ultragarsinio poveikio. Kavitacinių mikroburbulų sąveika su membrana jau seniai domina mokslininkus, todėl yra pasiūlyta keletas galimų sonoporacijos mechanizmų. Mokslininkai pateikia (žr. 1.6 pav.) membranos suardymo mechanizmus: membranos vientisumo suardymas dėl „stūmimo“ arba „traukimo“ efekto, susidarančio stabiliai virpančių mikroburbulų plėtimosi ar traukimosi fazėje (A); akustinės radiacijos jėgos nulemia mikroburbulų judėjimą ir prispaudžia juos prie ląstelės membranos, todėl įvyksta jos suardymas, o mikroburbulai netgi gali būti įstumiami per membranos dvigubąjį lipidų sluoksnį į ląstelę (B); stabilūs mikroburbulų virpesiai sukuria mikrosroves supančioje aplinkoje, ląstelės membranoje formuojasi poros dėl mechaninio įtempio jėgos (C); dėl mikroburbulų plyšimo sukeltos smūginės bangos padidėja ląstelės membranos įtempis ir ji suardoma (D); mikroburbulo plyšimas prie membranos paviršiaus yra asimetriškas, todėl formuojasi skystas piltuvo formos darinys, kuris praduria ląstelės membraną ir suformuoja porą (E) (109, 110). Nustatyta, kad žemo lygio sonoporacija pagerina medžiagų ir reagentų pernešimo procesus abipus ląstelės membranos ir pašalina ląstelės metabolizmo šalutinius produktus bei pagerina mikroorganizmų dauginimąsi. Pitt's ir Ross'as (111) teigė, kad ultragaras padidino deguonies ir maistinių medžiagų, reikalingų ląstelėms dauginis, pernešimo greitį bei antrinių produktų šalinimą, todėl ląstelės dauginosi sparčiau. Tačiau didesnio laipsnio negrįžtama sonoporacija gali sukelti citoplazmos turinio ištekėjimą ir lipidų peroksidaciją, dėl kurios atsiranda fiziniai pažeidimai ar pakitimai ląstelės membranos dvigubame lipidų sluoksnyje ir įvyksta ląstelės mirtis (90).



1.6 pav. Galimi sonoporacijos mechanizmai suardant bakterinių ląstelių membranas (109)

Wu ir kt. (112) analizavo ultragarso poveikį ląstelių sienelėms ir membranoms naudojant skirtingą ultragarso intensyvumą (10, 24 and 39 W/cm²). Tyrimas parodė, kad esant mažam akustiniam intensyvumui (10 W/cm²), ląstelių sienelių polisacharidai buvo atpalaiduojami greičiau nei ląstelės viduje esantys baltymai. Tačiau didesnio intensyvumo ultragarsas (nuo 24 iki 39 W/cm²) turėjo priešingą efektą. Nustatyta, kad temperatūros padidėjimas veikiant ultragarsu silpnina ląstelių sieneles ir sukelia viduje esančių baltymų denatūraciją. Terminis apdorojimas kartu su ultragarsu yra dar efektyvesnis būdas mikroorganizmams inaktyvinti nei kiekvienas metodas atskirai. Ciccolini ir kt. (113) tyrė temperatūros, kartu su mažo dažnio ultragarsu, įtaką *S. cerevisiae* gyvybingumui vandenyje. Nustatyta, kad vien tik ultragarso bangos nesunaikino mielių ląstelių, kurių pažeidimai įvyko tik didinant temperatūrą. Guerrero ir kt. (114) analizavo mielių atsparumą ultrgarsui (20 kHz) 35, 45 ir 55 °C temperatūrose „Sabouraud“ sultinyje (pH 3,0 ir 5,6). Tyrėjai neužfiksavo jokių struktūrinių skirtumų tarp ląstelių apdorotų ultragarsu (55 °C) ir termiškai paveiktų ląstelių. Tačiau apdorojimas ultragarsu 45 °C temperatūroje (95,2 μm bangos amplitudė) sukėlė plyšimus sienelėje ir citoplazmos turinio išteklėjimą. Marx'as ir kt. (115) tyrė terminio apdorojimo ultragarsu įtaką *S. cerevisiae*. Visiška mielių inaktyvacija įvyko tokiomis sąlygomis: 400 W, 24 kHz, 120 μm amplitudė, 60 °C ir 30 min. Skenuojamoji elektroninė mikroskopija parodė porų formavimąsi membranoje, ląstelės lizę dėl viduląstelių komponentų išteklėjimo ir membranos fragmentų pasiskirstymą ant kitų ląstelių.

Ultragarso poveikiui įtakos turi mikroorganizmų rūšis. Yamamoto ir kt. (116) tyrė skirtingo dažnio (20, 585, 864, 1146 kHz) ir intensyvumo ultragarso įtaką *Chlamydomonas concordia* ir *Dunaliella salina*. Mikroorganizmų skaičius mažėjo priklausomai nuo ultragarso dažnio ir intensyvumo. Didelio dažnio ultragarsas buvo efektyvesnis abiemis mikroorganizmų rūšims. Nustatyta tokia ultragarso dažnio įtaka pažeidimų efektyvumui: *C. Concordia* – 20 < 580 < 864 < 1146 kHz, o *Dunaliella salina* – 20 < 580 ≅ 864 ≅ 1146 kHz. Tai rodo, kad tinkamiausio dažnio parinkimas priklauso nuo mechaninių ląstelės savybių. Gao ir kt. (117) tyrė didelio intensyvumo ir mažo dažnio ultragarso įtaką bakterijų gyvybingumui suspensijose. Apdorojimas

ultragarsu sukėlė *Enterobacter aerogenes* ir *Bacillus subtilis* ląstelių žūtį, tačiau *Staphylococcus* spp. nebuvo pažeista. *E. aerogenes* buvo jautresnės ultragarsui eksponentinėje augimo fazėje nei stacionarioje. Tyrimas parodė, kad mikrobai su storesne ir minkštesne kapsule yra atsparesni inaktyvuojančiam ultragarso poveikiui.

Poveikis fermentų aktyvumui. Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad, molekulinio lygmeniu, ultragarsas gali turėti dvejopą efektą fermentams, substratams ir jų tarpusavio sąveikai (118). Priklausomai nuo intensyvumo ir kitų parametru, ultragarsas skatina fermentų veikimą arba, priešingai, mažina jų aktyvumą ar visiškai inhibuoja (91). Vieni mokslininkai teigia, kad akustinė kavitacija, sukelta ultragarso bangų, fiziškai ir chemiškai veikia fermentus, tačiau kiti tyrėjai nurodo, kad ultragarsas neturi jokio poveikio fermentams. Kai kurie tyrimai parodė, kad švelnios ultragarso taikymo sąlygos ir tinkamai parinkti parametrai gali pagreitinti fermentinius procesus (91). Bartonas ir kt. (119) tyrinėjo ultragarso poveikį α -amilazių, amilogliukozidazių ir invertazių aktyvumams. Visais atvejais nustatytas aktyvesnis fermentų veikimas taikant ultragarsą ir esant didelei substrato koncentracijai, pažymint reikšmingą invertazės aktyvumo padidėjimą ir sacharozės hidrolizės inhibicijos sumažėjimą. To priežastimi galėjo būti efektyvesnis reakcijos komponentų maišymas ir difuzija dėl ultragarso įtakos, o invertazių atveju ultragarsas galėjo turėti įtakos geresnei tarpmolekulinėms ryšiams sąveikai tarp substrato ir vandens. Seneris ir kt. (120) padidino laktozės hidrolizės laipsnį piene taikydami 20 W ultragarsą.

Ultragarsas, naudojamas kartu su aukšta temperatūra (termoapdorojimas ultragarsu), slėgiu ar kombinuojant visus kartu, yra efektyvi priemonė maisto fermentams inaktyvuoti pieno ir sulčių gamyboje (91). Apdorojimas ultragarsu sumažino sojų pupelių lipoksigenazių, krienų peroksidazių, apelsinų pektinmetilesterazių (121), paprastojo rėžiuko peroksidazių (122), polifenoloksidazių ir kitų lipazių bei proteazių (123, 124) aktyvumą. Dažniausiai inaktyvacijai įtakos turėjo fizinės (kavitacija, mechaninis efektas) ir cheminės priežastys (laisvųjų radikalų formavimasis sonocheminių reakcijų metu), o jos lygis labai priklausė nuo terpės, kurioje yra fermentai. Dauguma tyrimų patvirtino, kad fermentų inaktyvacijai reikalinga ilgesnė veikimo ultragarsu trukmė, kai naudojamas didelio intensyvumo ultragarsas (91). Ultragarso veikimo principas, inhibuojant fermentus, yra panašus į mikroorganizmų inaktyvaciją (125). Veikimo mechanizmas daugiausiai susijęs su baltymų denatūracija, kurią sukelia laisvųjų radikalų formavimasis vandenyje ar kavitacinių mikroburbulų susidarymas ir plyšimas (126). Özbek'as ir Ülgen'as (127) teigė, kad inaktyvuojantis ultragarso poveikis yra specifiskas kiekvienam fermentui ir priklauso nuo aminorūgščių sudėties bei fermentų konformacijos. Pavyzdžiui, aukštos temperatūros, slėgio ir apdorojimo ultragarsu kombinacija inaktyvuoja peroksidazes, atskeldama prostetinę hemogrupę, tačiau lipoksigenazės tampa neaktyvios dėl laisvųjų radikalų susidarymo ir baltymų denatūracijos. Kai kurie fermentai, pvz., katalazės, mielių invertazės ar pepsinas yra atsparūs ultragarsui (128).

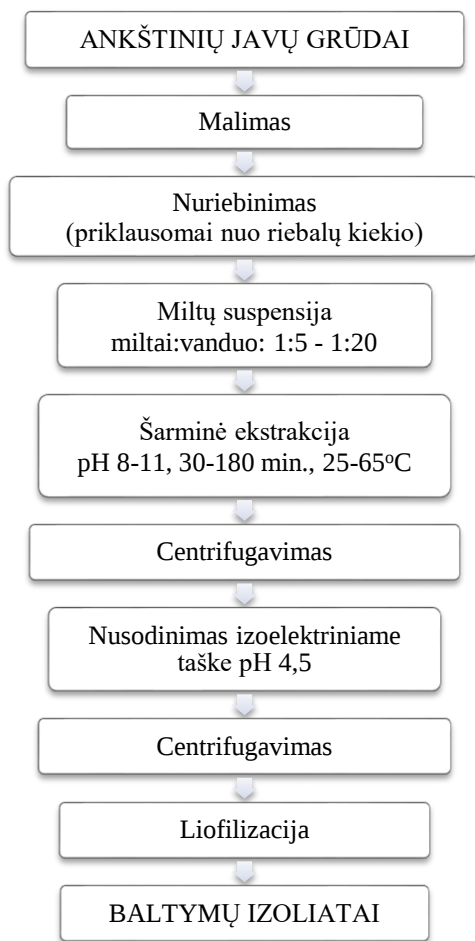
1.5. Baltymų išskyrimo metodai

Baltymams išskirti naudojami sausieji arba šlapieji būdai (129). Priklausomai nuo pasirinkto būdo išgaunami baltymų koncentratai arba izoliatai. Pastarieji

labiausiai vertinami maisto pramonėje, nes juose baltymų kiekis gali būti didesnis nei 90 %. Izoliatų naudojimas gali padidinti baltymų kiekį tiek tradiciniuose, tiek naujai kuriamuose produktuose. Koncentratuose baltymų kiekis sudaro daugiau nei 65 %. Skirtingi išskyrimo metodai ir procesų parametrai (temperatūra, trukmė, miltų ir tirpiklio santykis, baltymų tirpumas ir kt.) turi įtakos galutinio produkto išeigai ir grynumui (130).

Šlapieji baltymų iš augalinės žaliavos išskyrimo metodai. Plačiausiai naudojama ekstrakcija tirpikliu, kaip viena efektyviausių technologijų (131). Iš jų šarminė ekstrakcija ir nusodinimas izoelektriniame taške (nusodinimas rūgštimis) yra dažniausiai taikomas metodas, kuris pagrįstas skirtingu baltymų tirpumu ir nusodinimo sąlygomis bei turi mažiausią įtaką aminorūgščių sudėčiai (žr. 1.7 pav.). Pradžioje baltymai ištirpinami esant terpės pH 8–12, po to terpės pH vertė mažinama iki 4–5 – daugelio augalinių baltymų izoelektrinio taško. Jayasena ir kt. (131) nustatė, kad nusodinimas izoelektriniame taške, esant skirtingai pH vertei (ribos nuo 4,4 iki 5,0), neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos *L. angustifolius* baltymų kiekiui ir izoliatų išeigai. Rūgštinė ekstrakcija yra panaši į šarminę, tačiau remiasi tuo, kad augaliniai baltymai tirpsta esant labai žemai terpės pH vertei (< 4). Tokios terpės pH vertės taikomos baltymams ištirpinti prieš jų nusodinimą izoelektriniame taške, šaldant ar naudojant membraninį filtravimą. Wäsche ir kt. (132) taikė šarminę ir rūgštinę ekstrakcijas lubinų baltymams išskirti. Pirmuoju būdu gautuose lubinų baltymų izoliatuose buvo 98–100 % baltymų, iš kurių daugiausia didelės molekulinės masės α - ir β -konglutinų, o izoliatuose, gautuose po rūgštinės ekstrakcijos ir membraninio filtravimo, baltymų kiekis buvo 84–90 %, tarp jų γ -konglutinas buvo vyraujanti baltymų frakcija. Rūgštinės ekstrakcijos būdas taikomas rečiau nei šarminė ekstrakcija.

Ankštinių javų grūdų baltymų išskyrimui galima taikyti ir ekstrakciją vandeniu, tačiau šiuo metodu gaunami tik baltymų koncentratai. Naudojant nusodinimą



1.7 pav. Ankštinių javų grūdų baltymų išskyrimo procesas taikant šarminę ekstrakciją ir nusodinimą izoelektriniame taške (130)

druskomis, galima baltymus sukongcentruoti iki 80–90 %, priklausomai nuo žaliavos rūšies (130). Muranyi ir kt. (133) analizavo skirtingos baltymų išskyrimo technikos įtaką *L. angustifolius* L. genotipo „Vitabor“ baltymų pasiskirstymui ir kiekiui. Nustatyta, kad šarminės ekstrakcijos metu baltymų išeiga buvo didesnė nei taikant nusodinimą druskomis ar derinant abu metodus. Daugiausia skirtumų nustatyta albuminų frakcijoje, kurioje α - ir γ -konglutinų kiekiai po nusodinimo druskomis buvo didesni nei po šarminės ekstrakcijos.

Sausasis metodas baltymams išskirti realizuojamas naudojant frakcionavimą sietais ir oru (130). Ankštinių javų grūdai smulkiai sumalami ir, naudojant oro srautą, miltai skirstomi į smulkią (baltymų) ir stambią (krakmolo ir skaidulinių medžiagų) frakcijas. Šio metodo trūkumas tas, kad baltymai sunkiai atsiskiria nuo krakmolo grūdelių net ir po pakartotinio malimo. Be to, galutinėje smulkioje frakcijoje baltymų kiekis vis tiek yra mažesnis nei taikant šlapiuosius baltymų išskyrimo metodus. Taikant sausąjį metodą gaunami koncentratai, kuriuose baltymų kiekis yra 60–75 %.

1.6. Lubinų produktų panaudojimas maisto pramonėje

Vartotojai teikia pirmenybę kvietiniams kepiniams, turintiems puikią išvaizdą ir juslines savybes. Jiems gaminti naudojami kvietiniai miltai savo sudėtyje turi baltymų gliadino ir gliutenino, kurie formuoja glitimą, padedantį gauti pageidaujamą produkto tekstūrą, savitąjį tūrį ir skonines savybes (134). Tačiau kvietiniai miltai yra mažesnės maistinės vertės, nes perdirbimo metu praranda nemažą kiekį skaidulinių ir fitocheminių medžiagų, vitaminų bei mineralų (14). Be to, kviečių baltymai stokoja lizino ir metionino. Taigi ankštinių javų grūdai, tarp jų ir lubinų sėklos, gali būti gera alternatyva iš dalies pakeisti kvietinius miltus ne tik tokiems kepiniams gaminti, tačiau taip pat pagerinti ir jų maistinę vertę. Paminėtina tai, kad tokių mišrių miltų naudojimas kepiniams ruošti turi ir keletą trūkumų. Antonas ir kt. (135) nustatė, kad, didinant pupelių miltų kiekį, padidėjo fitorūgšties kiekis ir tripsino inhibitorių aktyvumas kviečių-pupelių miltų mišinyje. Kvietinių ir ankštinių javų grūdų miltų santykis taip pat turi įtakos tešlos reologinėms savybėms ir galutinio produkto tekstūrai, kuri yra labai reikšminga priimtinumui ir konkurencingumui rinkoje (136). Gana didelė dalis (15–50 %) kvietinių miltų gali būti pakeičiami ankštinių javų miltais gaminiuose, kuriuose glitimo funkcionalumas nėra labai svarbus, t. y. gaminant tortus, sausinius ar makaronus (35). Tačiau lubinų, kaip ir kitų ankštinių javų grūdų, priedo naudojimas kvietinės duonos gamyboje yra gan sudėtingas, nes glitimas yra pagrindinis veiksnys, lemiantis tešlos reologines savybes. Pablogėjus kepinio išvaizdai ar kitoms juslinėms savybėms, sumažėja ir jo priimtinumas vartotojams. Apibendrinant galima teigti, kad naudojant kitos rūšies miltus kvietinei tešlai ruošti, keitėsi tešlos struktūra: silpnėjo glitimas, didėjo vandens absorbcija, mažėjo stabilumas. Tačiau reikia paminėti, kad poveikio dydis priklausė nuo ankštinių javų rūšies ir kiekio (137, 138). Lubinų sėklų priedas taip pat gali turėti įvairų poveikį galutinio produkto kokybei: savitajam tūriui, tekstūrai ir juslinėms savybėms, o pats priedo kiekis – gaminio spalvai ir minkštimo tekstūros savybėms (136). Literatūroje nurodoma, kad iki 10 % rafinuotų kvietinių miltų gali būti pakeisti lubinų miltais, kartu nepabloginant duonos kokybės (139, 140). Lubinų sėklų miltų priedas gali pabloginti tešlos savybes dėl kelių priežasčių: didesnis tiologrupių kiekis gali sukelti

tešlos skystėjimą; lubinų sėklų baltymai silpnina kviečių glitimo savybes, sukeldami „praskiedimo“ efektą; lubinų sėklų miltuose esantys baltymai ir skaidulinės medžiagos gali sugerti daugiau vandens nei kvietiniai miltai (139). Tačiau 20–30 % lubinų sėklų priedas neturėjo neigiamos įtakos kepinių be glitimo jausnoms savybėms ir priimtinumui (141, 142, 143). Teorinėje literatūroje pateikiama duomenų apie lubinų miltų ir jų frakcijų panaudojimą keleto rūšių kvietinių kepinių (duonos, sausainių, pyragų, keksų ir makaronų) gamyboje ir jų įtaką baltymų bei skaidulinių medžiagų kiekiui galutiniam produkte (žr. 1.4 lent.). Kadangi lubinų sėklos neturi glitimo, jos yra tinkamas funkcinis ingredientas beglitiminės duonos gamyboje. Tačiau dauguma tokių produktų yra priimtini nedaugeliui vartotojų, nes kepiniai su lubinų sėklomis yra gaminami ir pateikiami tik užsienio rinkose (12). Pastaruoju metu maisto pramonėje pradėta domėtis lubinų baltymų izoliatų panaudojimu mėsos gaminiams ruošti, pvz., dešroms ir Frankfurto dešrelėms, taip pat ir pieno pramonėje ledams ir kitiems fermentuotiems pieno produktų gaminti (144, 145, 146). Dėl geltonos spalvos ir funkcinių savybių (emulsavimo) lubinų baltymai gali pakeisti kiaušinio trynį *brioche* ar gali būti naudojami glazūrų gamyboje (4, 147).

1.4 lentelė. Kvietinių miltų pakeitimas lubinų sėklų miltais kepinuose – įtaka baltymų ir skaidulinių medžiagų kiekiui (12)

Lubinų rūšis	Lubinų frakcija	Lubinų kiekis (% nuo kvietinių miltų)	Kepinys	Padidėjimas, %		Nuoroda
				Baltymų	Skaidulinių medžiagų	
Neminima	Miltai	40	Duona	110	106	(148)
		30	Sausainiai	352	211	
<i>L. albus</i>	Viso grūdo miltai	10, 20, 30, 40	Pyragas be glitimo	26–103		(143)
Neminima	Miltai	40	Duona	108	346	(149)
Neminima	Miltai	40	Duona	108	341	(150)
Neminima	Miltai	40	Duona	65	252	(151)
<i>L. angustifolius</i>	Miltai	10	Duona	14	112	(152)
		60	Keksai	46	294	
		28	Šokoladiniai sausainiai	51	316	
<i>L. albus</i>	Miltai, baltymų koncentratai ir izoliatai	3, 6, 9, 12	Duona	11–53	7–44	(139)
<i>L. albus</i> cv. Multolupa	Nenuriebalinti miltai	3, 6, 9, 12	Duona	20–23		(153)

Siekiant padidinti lubinų sėklų ir jų frakcijų taikymą maisto pramonėje, svarbu ieškoti priemonių, leidžiančių pagerinti lubinų sėklų baltymų funkcionalumą ir pagerinančių jų panaudojimą kuriant naujus maisto produktus.

1.7. Lignoceliuliozinės žaliavos ir šalutinių pieno perdirbimo produktų panaudojimas bioproduktų gamybai

Augalinės žaliavos perdirbimo metu susidaro nemaži kiekiai šalutinių produktų, todėl, siekiant plėtoti / tobulinti beatliekų lubinų sėklų perdirbimo technologiją, tikslinga taikyti biorafinavimo metodus. Lubinų sėklų biomasė, likusi po baltymų išskyrimo, turi daug polisacharidų ir gali būti priskiriama lignoceliuliozinei žaliai. Tokios rūšies biomasė, kuriai perdirbti taikomi įvairūs biologiniai / cheminiai metodai, gali būti bioenergijos šaltiniu ir žaliava vertingiems cheminiams junginiams sintetinti (154). Lignoceliuliozinė biomasė naudojama pieno rūgšties sintezei, o termocheminių ir biocheminių procesų metu iš šios biomasės gaminamas skystasis (etanolis) ir dujinis (metanas) kuras bei elektros energija. Šiuo metu iš įvairios rūšies biomasės pagamintos bioenergijos kiekis pasaulyje siekia tik 10,2 % (155). Žemės ūkio sektoriaus atliekos (energetiniai pasėliai, augalinės atliekos ir šalutiniai produktai) bei maisto atliekos sudaro tik 20 % šios biomasės. Dažniausiai biomasės perdirbimo procesai yra gan sudėtingi, o žaliavos tiekimas nėra pastovus. Be to, kintant lignoceliuliozinės žaliavos cheminei sudėčiai ir fizikinėms savybėms, taikomos skirtingos perdirbimo technologinės schemos (156).

1.7.1. Biodujų gamyba iš lignoceliuliozinės biomasės

Biodujų gamyba panaudojant įvairias organines medžiagas, taip pat ir lignoceliuliozinę biomasę, susilaukia vis daugiau dėmesio. Šiuo metu apie 88 % visos pasaulyje sunaudojamos energijos išgaunama iš iškastinio kuro, kuris yra pagrindinis faktorius, lemiantis šiltnamio efektą sukeliančių dujų kiekio atmosferoje didėjimą (157). Biodujos yra atsinaujinantis energijos šaltinis, kuris gali pakeisti iškastinį kurą. Biodujų gamyba padeda sumažinti dirvos ir vandens užterštumą, o anglies dioksido kiekis, susidarantis biodujų gamybos metu, yra gerokai mažesnis, lyginant su iškastinio kuro išgavimu. Biodujų gamybai dažniausiai taikoma vienpakopė anerobinio substrato skaidymo schema, kai visas procesas vyksta viename bioreaktoriuje (158). Toks metodas nėra efektyvus norint padidinti biodujų išeigą ir grynumą. Tikėtina, kad anaerobinio skaidymo proceso suskirstymas į dvi pakopas galėtų turėti teigiamą įtaką metano išeigai ir grynumo laipsniui.

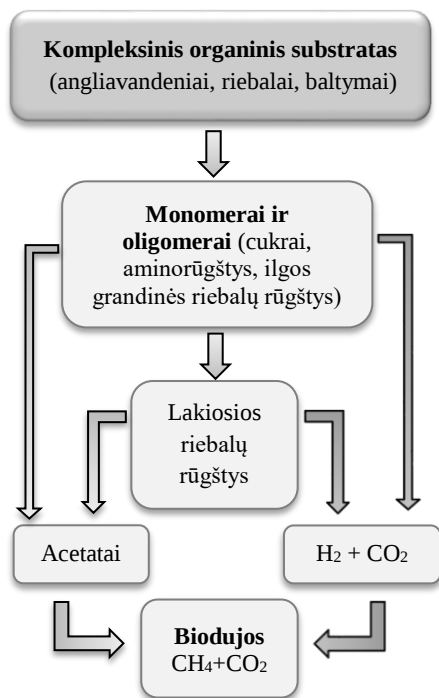
Biocheminis procesas. Biodujų gamyba vyksta anaerobinio skaidymo būdu, kuris yra vienas efektyviausių ir švariausių bioenergijos gavybos metodų. Metano fermentacija yra kompleksinis procesas, kurį galima suskirstyti į keturis pagrindinius etapus: hidrolizę, acidogenezę, acetogenezę / dehidrogenezę ir metanogenezę (žr. 1.8 pav.) (159). Hidrolizės metu, fakultatyvinių ar obligatinių anaerobinių bakterijų išskirti egzofermentai skaido tokius netirpius junginius kaip celiuliozė, baltymai ir riebalai į mažesnius, vandenyje tirpius monomerus. Šiame etape cheminių reakcijų su vandeniu metu vyksta kovalentinių ryšių sklilimas. Angliavandenių hidrolizė gali vykti keletą valandų, o baltymų ir lipidų skaidymas gali tęstis ir keletą dienų. Lignoceliuliozė ir ligninas skyla lėtai ir dažniausiai ne iki galo (160). Fakultatyvūs anaerobiniai mikroorganizmai naudoja vandenyje ištirpusį deguonį ir mažina redokso potencialą, kuris tinkamas obligatiniams fakultatyviniams mikroorganizmams.

Angliavandenių skaidymas į mažesnės molekulinės masės sacharidus ir baltymų hidrolizė į aminorūgštis taip pat vyksta šios fazės metu.

Acidogenezės metu įvairios bakterijos skaido monomerus, susidariusius hidrolizės metu, į trumpos grandinės organines rūgštis, C_1 – C_5 molekules (sviesto, propiono, acto rūgštis, acetatas), alkoholius, vandenilį ir anglies dioksidą (159). Vandenilio jonų koncentracija turi įtakos fermentacijos metu susidarantiems produktams. Kuo didesnis vandenilio dalinis slėgis, tuo mažiau susidaro redukuojančių junginių (pvz., acetato). Taigi šios fazės metu cukrų monomerai, riebalų rūgštys ir aminorūgštys konvertuojamos į organines rūgštis ir alkoholius (161).

Metabolitai, susidarę acidogenezės metu, yra substratas kitoms bakterijoms trečiame biometano gamybos etape. Acetogenezės metu, homoacetogeniniai mikroorganizmai pastoviai konvertuoja H_2 ir CO_2 į acto rūgštį. Nustatyta, kad acetogeninės bakterijos sudaro simbiozę su metaną gaminančiomis bakterijomis. Šios fazės metu organinės rūgštys ir alkoholiai verčiami į acetatą, kuris yra substratu metano bakterijoms. Šioms bakterijoms taip pat reikalingas ir vandenilis metanui sintetinti.

Tam, kad susidarytų metanas, metogenezės metu reikalingos griežtos anaerobinės sąlygos. Ne visos metano bakterijų rūšys gali skaidyti visus substratus. Vienos bakterijos gamina metaną iš acetatų, kitos iš metanolio, trečios – iš vandenilio ir anglies dioksido (162). Metano bakterijos katalizuoja unikalius vandenilio oksidavimo ir anglies dioksido redukcijos mechanizmus. Anglies dioksidą jos naudoja kaip galutinį elektronų akceptorį ir metanui sintetinti (163).



1.8 pav. Biometano sintezės etapai (159)

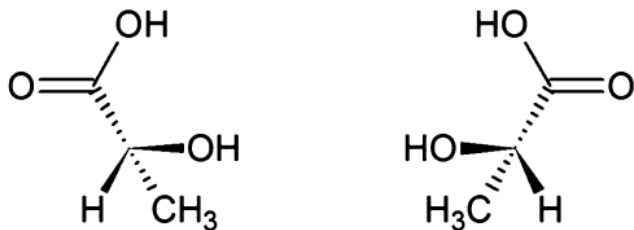
Anaerobiniai mikroorganizmai yra aktyvūs ir gali augti mezofilinės (35–42 °C) ir termofilinės (45–60 °C) temperatūros sąlygoms (164), todėl metano sintezės trukmė priklauso nuo temperatūros. Dauguma metaną gaminančių bakterijų yra mezofilinės ir tik keletas priklauso termofilinėms. Psichrofilinės metano bakterijos veikia 20 °C temperatūroje skaidydamos nedidelius kiekius bioskaidžių lakiųjų medžiagų ir sudarydamos labai mažus biodujų kiekius (159). Mezofilinės bakterijos pradeda veikti temperatūrai pakilus iki 20–45 °C, o metano gamyba pasiekia maksimumą esant apie 35 °C temperatūrai (165). Termofilinės proceso sąlygos suteikia privalumų norint sumažinti hidrolizės trukmę, patogenų skaičių ir padidinti dujų

išeigą, tačiau tokį procesą yra sunkiau kontroliuoti. Tam, kad specifinės mikroorganizmų grupės išliktų aktyvios ir daugintųsi, reikalingi tam tikri makro- ir mikroelementai (166). Tokių makroelementų kaip anglis, fosforas ir siera reikia labai mažai, nes jų pakankamai galima rasti ir pačioje biomasėje. Geležis, nikelis, kobaltas, selenas, molibdenas ir volframas yra svarbūs mikroorganizmų dauginimuisi ir turi būti pridėti į fermentuojamą substratą (167). Nikelis reikalingas visoms, metaną gaminančioms bakterijoms, nes dalyvauja metanui susidaryti reikalingo ląstelių komponento kofaktoriaus F_{430} sintezeje. Optimaliam bakterijų dauginimuisi svarbaus korinoidinio faktoriaus III sintezei taip pat reikalingas kobaltas. Seleno, molibdeno ir volframo įtaka nėra iki galo ištirta. Paminėtina tai, kad nuo šių elementų priklauso tik kelių metano bakterijų aktyvumas. Reikalinga mikroelementų koncentracija yra labai maža ir svyruoja nuo 0,05 iki 0,06 mg/l, tik geležies reikia šiek tiek daugiau – nuo 1 iki 10 mg/l (157).

Įvairių rūšių biomasė, turinti angliavandenių, baltymų, riebalų, celiuliozės ir hemiceliuliozės, gali būti substratu biodujoms gaminti. Literatūroje nurodoma, kad potenciali metano išeiga iš lignoceliuliozinės kukurūzų, kviečių, ryžių ir cukranendrių biomasės gali kisti nuo 0,14 iki 0,4 m^3/kg VS (159). Lehtomäki'o ir kt. (168) tyrimų metu nustatyta, kad metano išeiga iš lubinų biomasės yra 0,31–0,40 m^3/kg VS. Jensenas ir kt. (169) teigia, kad naudoti vien tik ankštinių javų biomasę biodujoms gaminti nėra optimalus variantas, nes gan didelis azoto kiekis gali nulemti spartų NH_4 susidarymą bioreaktoriuje ir stabdyti anaerobinio skaidymo procesą. Biodujų sudėtis ir metano išeiga priklauso nuo substrato kilmės, organinių medžiagų kiekio ir anaerobinio skaidymo sistemos parametrų (170). Skaidant riebalus gaunama didžiausia biodujų išeiga, tačiau jų biologinis skaidymas yra lėtas, todėl reikia daugiau laiko dujoms susidaryti. Angliavandeniai ir baltymai konvertuojami daug lengviau, bet gaunama mažesnė biodujų išeiga. Tam, kad biodujų gamyba vyktų efektyviai, substrate neturėtų būti patogenų ar kitų mikroorganizmų, nes, kitu atveju, reikalinga substrato pasterizacija ar sterilizacija prieš fermentaciją. Siekiant padidinti substratų skaidymo greitį, galima taikyti mechaninį, terminį, cheminį apdorojimą arba hidrolizę fermentais (171). Substrato skaidymas vyksta greičiau, jei jis susmulkinamas į mažesnes daleles, tačiau tai nebūtinai užtikrina didesnę metano išeigą (172). Hidrolizei naudojant aukštą temperatūrą ir slėgį (230 °C, 20–30 bar), organiniai polimerai skaidomi į trumpesnės grandinės junginius, kurie tampa biologiškai lengviau prieinami, todėl biodujų išeiga gali padidėti (173). Hidrolitinių fermentų taikymas padidina polisacharidų skilimą į mažesnius junginius, todėl biodujų išeiga gali padidėti iki 20 % (174). Tyrimai su žaliaja kviečių biomase atskleidė, kad hidrolizuojančių fermentų naudojimas turėjo reikšmingą įtaką biodujų gamybai, tačiau anaerobinio perdirbimo pabaigoje nei metano išeiga, nei substrato hidrolizė reikšmingai nepadidėjo (175). Fermentų veikiamo substrato klampa bioreaktoriuje stipriai sumažėja, todėl pavyksta išvengti sluoksnių formavimosi mišinysje. Tačiau, fermentų aktyvumas gali smarkiai sumažėti dėl anaerobinių mikroorganizmų išskiriamų proteazių veiklos (176).

1.7.2. Pieno rūgšties gamyba

Pieno rūgštis (2-hidroksipropan rūgštis, $\text{CH}_3\text{--CH(OH)--COOH}$) (žr. 1.9 pav.) yra natūrali organinė rūgštis, kuri naudojama maisto ir kitose pramonės srityse, įskaitant kosmetikos ir farmacijos preparatų, oksiduojančių chemikalų, augalų augimo stimuliatorių ir specialios paskirties tarpinių chemijos produktų gamybą (177, 178, 179, 180). Visame pasaulyje pagamintos pieno rūgšties (PR) apytikslis panaudojimas yra toks: 35 % skiriama maisto ir gėrimų pramonei, 39 % – polimerų gamybai, 13 % – tirpiklių gamybai ir kitoms pramoninėms reikmėms, 13 % – asmeniniam naudojimui (181). PR turi GRAS statusą ir maisto pramonėje naudojama kaip rūgštinanti medžiaga ir konservantas duonos, saldumynų, kepinų, gaiviųjų gėrimų, alaus, džemų, majonezo ir pieno produktų gamyboje (182). Pieno rūgštis egzistuoja optiškai aktyvių D(–) ir L(+) izomerų pavidalu, kurių poveikis žmogaus organizme yra skirtingas. D(–)-pieno rūgšties izomeras žmogaus organizme metabolizuojamas sunkiau, todėl yra labiau žalingas nei L(+). Per didelis šio izomero kiekis gali sukelti metabolitinius pakitimus, dėl kurių atsiranda acidozė ir kalcio trūkumas (183). L(+)-pieno rūgšties izomeras gyvuose organizmuose yra randamas dažniau nei D(–). Susitraukiant raumenims žmogaus kūne gaminasi L(+)-pieno rūgštis. Maisto pramonėje ir medicinoje pirmenybė teikiama būtent šiam izomerui, nes jis yra panašiausias į žmogaus organizme sintetinamus junginius bei sukelia mažiau problemų, susijusių su pakitusiu medžiagų metabolizmu, alergija ar netoleravimu (181).



D(–)-pieno rūgšties izomeras L(+)-pieno rūgšties izomeras

1.9 pav. Pieno rūgšties izomerų cheminė struktūra (182)

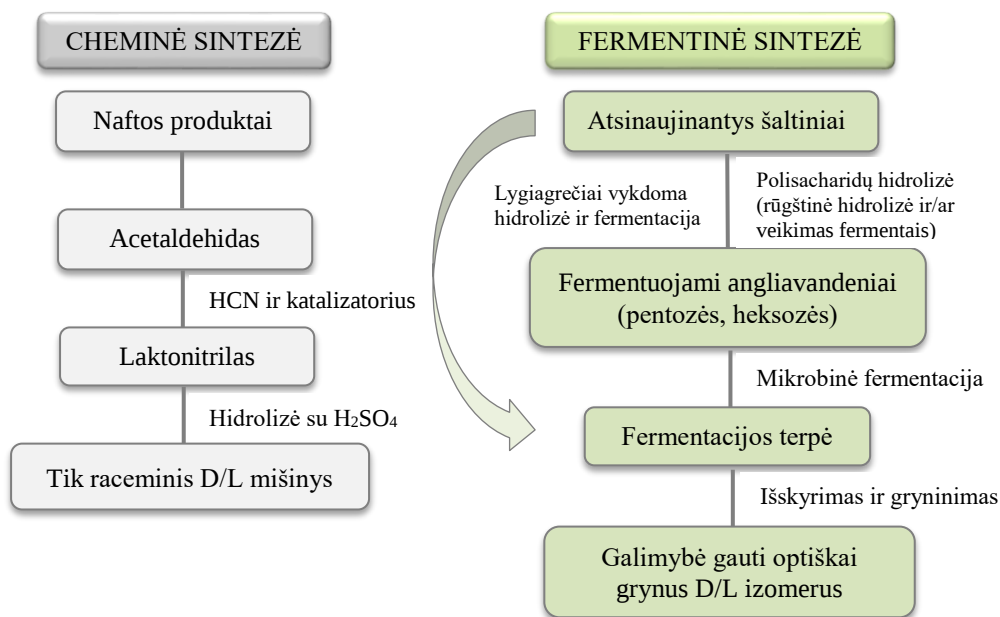
Pastaruoju metu PR paklausa išaugo, nes tai yra pagrindinė žaliava biopolimero polilaktidui (PPR) gaminti. Naujos kartos biopolimerai yra gera alternatyva plastikams, išgaunamiems iš naftos produktų, nes PPR yra biologiškai

skaidus, o jo gamyba ir utilizavimas nekenkia aplinkai. Polilaktidų fizikinės savybės priklauso nuo PR izomerų sudėties. Gryniesiems D(–) ir L(+) izomerams yra vertinami labiau nei raceminis mišinys DL, nes kiekvienas PR izomeras turi specifinį pritaikymą pramonėje. L(+)-pieno rūgšties izomerai naudojami sintetinti didelės molekulinės masės poli-L(+)-laktidus (PLPR) (184). PLPR yra pusiau kristalinis, skaidrus ir biologiškai skaidus polimeras, daugiausia naudojamas pakavimo medžiagoms gaminti. Taip pat D(–)-pieno rūgšties izomeras naudojamas poli-D(–)-laktidams (PDPR) gaminti. Gryniesiems polimerams yra jautrūs temperatūrai, tačiau PLPR ir PDPR stereokompleksai turi 50 °C aukštesnę lydimosi temperatūrą nei gryniesiems izomerams ir yra lengviau biologiškai skaidomi (185, 186). D(–) ir L(+) izomerų santykis taip pat lemia PPR irimo savybes.

Nors PR natūraliai randama augaluose, mikroorganizmuose ir gyvūnuose ji gali būti gaminama cheminės sintezės metu iš anglies, naftos produktų ir dujų (187) (žr. 1.10 pav.). Cheminė sintezė yra sudėtinga tiek techniniu, tiek ekonominiu požiūriu ir 32

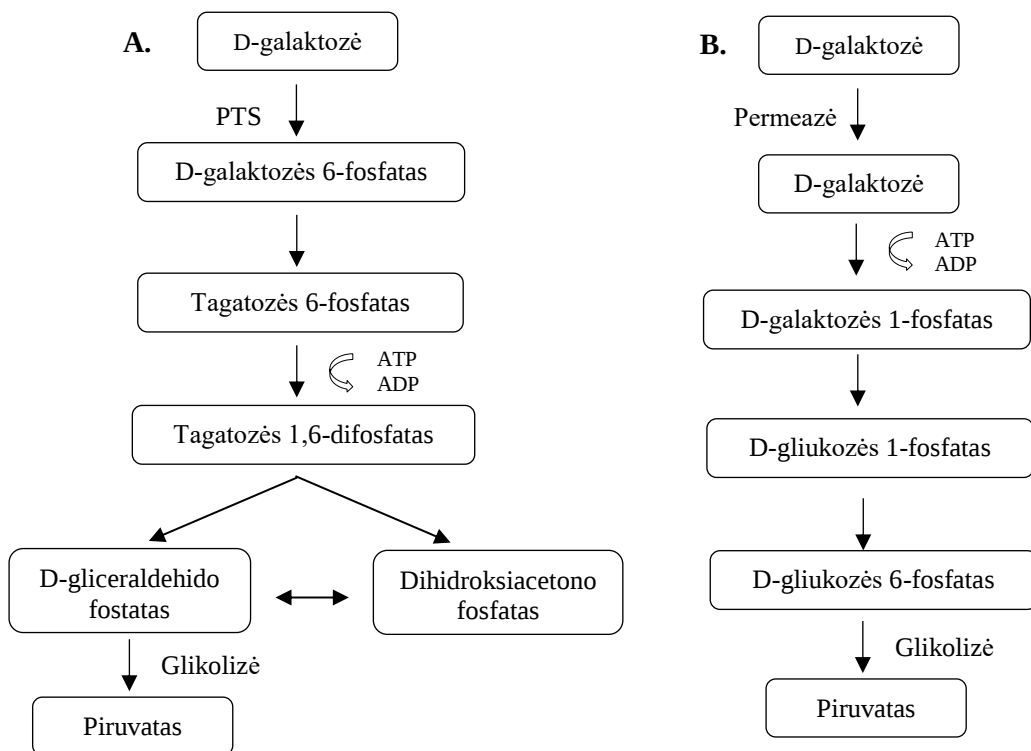
labiau priklauso nuo kitų pramonės sričių šalutinių produktų, susidarančių naudojant iškastinį kurą ar tiekimo (182). Be to, naudojant šį metodą visada susidaro raceminis PR izomerų mišinys.

Kitas būdas sintetinti PR – angliavandenių fermentacija, kurios metu įvairūs mikroorganizmai sintetina PR iš atsinaujinančių energijos šaltinių. Taikant šį metodą galima ir optiškai grynių PR izomerų sintezė (188) (žr. 1.10 pav.). Fermentacijos metodas turi ir daugiau privalumų, nes naudojami pigūs substratai, o proceso energijos sąnaudos ir temperatūra yra mažesnės. Šiuo metu 90 % PR pasaulyje sintetinama mikrobinės fermentacijos būdu.



1.10 pav. PR sintezės būdai

Fermentinė sintezė. Pagrindiniai mikroorganizmai, sintetinantys PR, yra grybeliai (*Rhizopus*) ir PRB (189). *Rhizopus* aerobiniu būdu skaido gliukozę ir sintetina PR, tačiau tokios fermentacijos metu reikalinga nuolatinė terpės aeracija. Daugiausia informacijos pateikiama apie pieno rūgšties sintezę naudojant PRB, priklausančias *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ir *Enterococcus* šeimoms (190). Literatūroje nurodoma, kad *Lactococcus lactis* (191), *Lactobacillus delbrueckii* (192), *L. helveticus* (193) ir *L. casei* (194) yra vienos pagrindinių homofermentinių PRB pieno rūgščių gaminti. PR susidaro fermentuojant angliavandenius pagal įvairias schemas, būdingas PRB padermėms. Gliukozė metabolizuojama pagal Embden–Meyerhof schemą (žr. 1.4 pav.), o D-galaktozė – pagal tagatozės 6-fosfato arba Leloir schemą (žr. 1.11 pav.) (195). Piruvo rūgšties, kuri yra galutinis šių procesų produktas, konversijai į laktatą įtakos gali turėti PRB fermentai L-laktatdehidrogenazė ir D-laktatdehidrogenazė, todėl PR stereospecifiškumas priklauso nuo mikroorganizmų rūšies, kurių fermentai dalyvauja PR sintezėje.



1.11 pav. D-galaktozės fermentacija PRB. Tagatozės 6-fosfato (A) ir Leloir (B) schemos

PRB fermentacijos metu intensyviai gaminamos organinės rūgštys, todėl po tam tikro laiko, terpės pH vertė labai sumažėja. Žema pH vertė turi inhibicinį efektą mikroorganizmų ląstelių metabolizmui ir PR sintezei. Dauguma PRB yra tolerantiškos žemesnei terpės pH vertei ir gali išgyventi esant pH 5 ir mažiau. *Lactobacillus* optimaliai dauginasi esant pH vertei apie 5,7 ir toleruoja žemesnę pH vertę nei *Lactococci* (181). Norint palaikyti optimalią terpės pH vertę naudojami neutralizacijos agentai: kalcio karbonatas ir hidroksidas, natrio bei amonio hidroksidas (196). Tokiu būdu fermentacijos terpėje dalis PR yra paverčiama laktatu, turinčiu mažesnę tirpumą nei PR, todėl sumažėja rūgščių sukeltas inhibicinis efektas. Tačiau, naudojant neutralizavimo agentus, susidaro nemaži kiekiai šalutinių produktų (pvz., kalcio sulfatas), kurie apsunkina PR išskyrimą iš fermentacijos terpės, o proceso metu atsirandančias atliekas reikia papildomai utilizuoti. Įvertinant tai, svarbiu klausimu išlieka naujų PRB padermių, turinčių atsparumą rūgščiai terpei, paieška ir panaudojimas fermentinės PR sintezės procesuose.

PR sintezei angliavandenių šaltinių gali būti grynas cukrus (pvz., gliukozė, fruktozė, laktozė), cukrų turinti terpė (melasa, išrūgos, cukranendrės) arba krakmolingos medžiagos (bulvės, tapijoka, kviečiai, miežiai) (197). Geriausios kokybės PR gaunama iš išgryninto cukraus (cukranendrių ar cukrinių runkelių), tačiau

tokia žaliava yra brangi, o gamyba neekonomiška (181). Todėl daug dėmesio šiuo metu susilaukia lignoceliuliozinė biomasė iš maisto pramonės ir žemės ūkio antrinių produktų bei atliekų (166). Šis angliavandenių šaltinis turi nemažai privalumų ekonominiu ir aplinkosaugos atžvilgiu. Tai nuolat atsinaujinanti, nebrangi ir daug polisacharidų turinti žaliava, kurios pasaulyje generuojami dideli kiekiai ir kuri dažniausiai lieka neutilizuota. Ši žaliava daugiausiai sudaryta iš celiuliozės, hemiceliuliozės ir lignino, kurie kartu sudaro 90 % visos biomasės (198, 199). Pagrindinis augalų biomasės komponentas, t. y. celiuliozė, yra homopolisacharidas, kurį sunku suardyti dėl papildomų vandenilinių jungčių ir specifinio kitų jungčių išsidėstymo. Hemiceliuliozė yra heterogeninis polimeras, sudarytas iš pentozų (ksilozės ir arabinozės) ir heksozų (galaktozės, gliukozės ir manozės), hidrolizuojama daug greičiau nei celiuliozė (200). Ligninas yra aromatinis polimeras, sintetinamas iš fenilpropanoido pirmtakų. Lignino makromolekulė yra didelio poliariškumo, nes turi įvairių funkcinių grupių (hidroksil-, metoksil- ir karbonil-) (201). Lignino fermentacija yra sudėtinga, nes ji apsunkina cheminį ir biologinį biomasės skaidymą (171).

Nepaisant lignoceliuliozinės biomasės privalumų ir tvarumo, PR gamyba iš šios žaliavos yra pakankamai sudėtinga (202). Monomeriniams cukrams (gliukozės, ksilozės, manozės ir arabinozės) susidaryti, kurie vėliau gali būti fermentuojami įvairių PRB padermių, reikalinga kelių etapų biocheminė konversija. PR gamybą iš lignoceliuliozinės biomasės galima skirstyti į šiuos pagrindinius etapus (196):

- pirmiausiai žaliava apdorojama mechaniniu būdu – suardoma lignoceliuliozinė struktūra;
- hidrolizė fermentiniais preparatais, depolimerizuojant lignoceliuliozinę masę į fermentuojamus mažesnės molekulinės masės komponentus;
- susidariusių monomerų fermentacija (PRB, mikroskopiniai grybai) į PR;
- PR išskyrimas iš fermentacijos terpės ir gryninamas taikant įvairias technologijas.

Lignoceliuliozinis substratas gali būti pirmiausia hidrolizuojamas, o tik vėliau fermentuojamas, tačiau polisacharidų hidrolizė ir fermentacija gali vykti ir vienu metu (190). Redukuojančių cukrų koncentracija hidrolizate turi įtakos fermentacijos efektyvumui, nes PR sintezė gali būti slopinama esant didelei cukrų koncentracijai. Proceso trukumas yra tas, kad, dėl papildomo fermentų ir cheminių medžiagų naudojimo, gamybos išlaidos padidėja, o cheminės hidrolizės metu susidaro inhibitoriniai junginiai, stabdantys mikroorganizmų veiklą fermentacijos metu (181). Be to, hidrolizės metu susidaro ir nemažai pentozų, kurias fermentuoja nedaugelis mikroorganizmų (200).

Tokių žemės ūkyje ir maisto pramonėje susidarančių antrinių produktų kaip kviečių sėlenų (WB), žliaugtų (DGS) ir salyklojaus (BSG) panaudojimo galimybės PR gamybai taikant bioprocesus, buvo įvertintos Juodeikienės ir kt. (203) atliktuose tyrimuose. Rezultatai parodė, kad PRB padermė ir substrato tipas turėjo statistiškai reikšmingos įtakos PR išeigai ($p < 0,05$). Didžiausias PR kiekis nustatytas WB ir BSG terpėse *P. pentosaceus* fermentacijos metu ir siekė atitinkamai 38 g/kg ir 27 g/kg *L. sakei* daugiausiai PR (36 g/kg) produkavo WB terpėje, o *P. acidilactici* – BSG terpėje (20 g/kg). PRB padermė turėjo įtakos ir susidariusių izomerų sudėčiai: *L. sakei*

išskirtinai produkavo tik L(+)-pieno rūgšties izomerą, D/L izomerų santykis fermentuotose su *P. acidilactici* terpėse svyravo nuo 0,06 (WB) iki 0,12 (BSG ir DGS), o fermentuotose su *P. pentosaceus* – nuo 0,18 (WB ir BSG) iki 0,23 (DGS). Fermentinių preparatų taikymas prieš PRB fermentaciją padidino PR kiekį terpėse nuo 1,9 iki 2,4 karto (WB), nuo 2 iki 3 kartų (DGS) ir nuo 1,7 iki 2 kartų (BSG). Kitų tyrėjų duomenimis, fermentuojant augalinės kilmės žaliavą, nustatyti tokie PR kiekiai: kukurūzų biomasė – 96 g/l (204), cukranendrių biomasė – 11 g/l (205), baltųjų ryžių sėlenų hidrolizatas – 82 g/l (206).

Pataruoju metu pieno pramonėje taip pat generuojami dideli kiekiai antrinių produktų (207). Išrūgos yra sūrio gamybos šalutinis produktas, kurio netinkamas utilizavimas daro neigiamą poveikį aplinkai, nes keičia dirvos cheminę sudėtį ir fizikines savybes bei mažina ištirpusio deguonies kiekį vandens telkiniuose. Išrūgose yra laktozės, baltymų, lipidų, mineralinių medžiagų, todėl susidaro palankios sąlygos PRB fermentacijos procesui (208). Laktozės fermentacijai dažniausiai naudotos *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* ir *Lb. casei*, tačiau kai kurios PRB (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, and *L. acidophilus*) geba metabolizuoti gliukozę tik po laktozės hidrolizės (209, 210, 211, 212).

Pieno rūgšties išskyrimas ir gryninimas membraninėmis technologijomis.

Galutinio produkto išskyrimas ir gryninimas yra vienas svarbiausių ir brangiausių PR sintezės etapų, sudarantis 40–70 % visų gamybos išlaidų (213). Klasikinis PR gryninimo procesas susideda iš nusodinimo, filtravimo, rūgštinimo, adsorbcijos anglimi, išgarinimo, kristalizavimo bei kitų etapų, kurie lemia galutinio produkto kokybę ir kainą (214). Apie pramonėje naudojamą PR išskyrimo ir gryninimo technologiją pateikiama nedaug duomenų (215). Tačiau literatūroje nurodoma, kad PR gryninimui naudojamas nusodinimas, ekstrakcija tirpikliais, jonų mainų chromatografija arba membraninio filtravimo procesai (198). Visos gryninimo technologijos turi nemažai trūkumų. Taikant nusodinimą reikalingi brangūs reagentai, o kokybiškam produktui išgauti reikalingi keletas gryninimo etapų (198). Dėl susidariusių nemažų šalutinių produktų kiekių, PR gamyba turi neigiamą poveikį aplinkai. Ekstrahuojant tirpikliais reikalinga brangi įranga, o tokie tirpikliai dažnai būna toksiški fermentacijoje naudojamiems mikroorganizmams.

Membraninės technologijos jau kuris laikas taikomos biotechnologiniuose procesuose bioproduktams išskirti ir gryninti, taip pat dažnai naudojamos ir pieno pramonėje susidariusioms nuotekoms perdirbti (216). Membraninėms technologijoms galima priskirti mikrofiltraciją, nanofiltraciją, atvirkštinį osmosą, ultrafiltraciją ir elektrodializę (214). Šios membraninės technologijos gali būti efektyvios atskiriant nuo susidariusios PR mikrobines ląsteles, baltymus, maistines medžiagas, nemetabolizuotus monosacharidus ir vandenį. Mikrofiltracijos membranos turi didžiausias poras (0,1–0,2 μ m), todėl gali lengvai atskirti mikrobines ląsteles iš fermentacijos terpės. Ultrafiltracijos membranų poros yra gerokai mažesnės nei mikrofiltracijos, todėl gali sulaikyti ne tik ląsteles, bet ir baltymus. Atvirkštinio osmoso (RO), kuris veikia difuzijos principu, ir nanofiltracijos (NF) metu nuo PR atskiriamos druskos, kitos maistinės medžiagos ir nesuskaidyti cukrai.

Timmeris ir kt. (217) integravo į fermentatorių spirales NF ir RO membranas ir nustatė, kad PR atskyrimo rodikliai buvo geresni naudojant NF membranas nei RO, tačiau abiejų procesų metu buvo matomas greitas membranų porų užsikimšimas. Bouchoux'as ir kt. (218) taip pat integravo NF membraną į fermentatorių, kuriame gliukozė buvo naudojama PR sintezei. Nustatyta, kad gliukozės sulaikymas membranomis mažėjo, didėjant natrio laktato kiekiui, todėl atskirti gliukozę iš terpės buvo vis sunkiau. Li ir kt. (219) pirmieji pasiūlė PR atskyrimui ir gryninimui taikyti NF ir RO membranas. Jie naudojo penkias skirtingas NF (CK, DK, DL, HL ir GE) ir dvi RO (DS 11 AG ir ADF) membranas, kurias testavo esant skirtingam slėgiui. Didžiausias laktazės ($97 \pm 1\%$) ir PR (43,7 %) sulaikymas pasiektas su HL NF membrana (našumas $33,0 \text{ L/m}^2 \text{ h}^{-1}$). 100 % PR sulaikymas gautas esant 5,5 MPa slėgiui, naudojant ADF RO membraną. Visais atvejais membranų paviršiai taip pat greitai užsiteršdavo. Taigi, optimalaus metodo PR išskirti ir gryninti mokslinėje literatūroje dar nėra pateikta, tačiau membraninių procesų taikymas išlieka vienu pažangiausių.

1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas ir darbo tikslo pagrindimas

Augalinės kilmės baltymai tampa vis svarbesni žmonių mityboje ir neretai jais keičiami gyvūninės kilmės baltymai arba kuriami nauji maisto priedai, funkciniai maisto produktai. Baltymai, kaip sudėtinė maisto dalis, formuoja produkto struktūrą ir juslines savybes bei yra svarbūs didinant produktų maistinę vertę. Maisto pramonėje labai svarbu, kad baltymai pasižymėtų geromis funkcinėmis savybėmis, kas užtikrintų maisto produkto išvaizdą, tekstūrą bei skonines savybes, priimtinas vartotojui. Todėl geresnės maistinės vertės ir pagerintų funkcinių savybių augalinių baltymų gamyba visada išlieka svarbi maisto pramonėje.

Europos valstybės yra labai priklausomos nuo sojos pupelių importo, sudarančio 70 % augalinių baltymų poreikį, dėl tam tikrų prekybos susitarimų ir kokybės standartų. Tačiau tai nebetenkina nei gamintojų, nei vartotojų lūkesčių. Todėl pastaraisiais metais išaugo susidomėjimas kitomis baltyminėmis augalinėmis žaliavomis, kurios būtų pigios ir saugesnės vartototi. Tokia žaliava galėtų būti lubinai, kurie Europoje auginami nuo seno, tačiau jų užauginama ne tiek, kad pavyktų užtikrinti stabilią pasiūlą maistui ir pašarams gaminti. Lietuvoje auginami mėlynieji, geltonieji ir gausialapiai lubinai dažniausiai naudojami kaip pašaras gyvuliams arba kaip „žalioji“ trąša dirvožemiui gerinti. Lubinų sėklos išsiskiria iš kitų ankštinių javų grūdų dideliu vertingų baltymų bei skaidulinių medžiagų kiekiu. Tačiau lubinų sėklų, kaip ir kitų ankštinių augalų, tinkamumą maistui riboja mažesnis baltymų virškinamumas ir antimonybiniai faktoriai. Be to, augalinių baltymų, tarp jų ir lubinų, funkcinės savybės ne tokios geros kaip gyvūninių, todėl jų pritaikymas maisto produktams yra sudėtingesnis. Baltymų savybėms modifikuoti literatūroje pateikiama daug metodų, tačiau ne visi vertinami palankiai, pvz., cheminė baltymų modifikacija yra efektyvi, tačiau nėra tinkama baltymų, skirtų žmonėms vartoti, funkcionalumui didinti.

Lubinų sėklų produktų funkcionalumui didinti galėtų būti taikoma fermentacija pieno rūgšties bakterijomis (PRB). PRB, turinčios GRAS statusą, iki šiol išlieka svarbios fermentacijos procesuose naudojant skystąją terpę. Kietafazė fermentacija

turi nemažai privalumų prieš skystafazę, nes tai aplinką tausojantis metodas, kuriam būdingos mažesnės energijos sąnaudos, mažesnis bakterinės taršos pavojus ir paprastesnis produkto gryninimas. Derinant proceso parametrus ir mikroorganizmų rūšis, galima išgauti skirtingus struktūrinius ir cheminius pokyčius fermentuojamoje žaliavoje. Remiantis literatūros duomenimis, PRB fermentacija taikyta siekiant pakeisti lubinų sėklų juslines savybes, sumažinti akrilamino ir biogeninių aminų susidarymą lubinų produktuose (25, 26, 27, 28, 68, 69), tačiau jos įtaką baltymų funkcinėms savybėms – nėra įvertinta. Todėl būtų tikslinga įvertinti bakteriocinus gaminančių ir iš lietuviškų ruginių raugų išskirtų PRB (*L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*) fermentacijos įtaką lubinų baltymų funkcinėms savybėms.

Ultragarsas yra saugus ir netoksiškas, todėl jo įtaka augalinės žaliavos mikrobiologinei taršai mažinti bei augalinių produktų funkcionalumui didinti taip pat turėtų būti įvertinta. Priklausomai nuo ultragarso dažnio ir intensyvumo bei sukeliama akustinės kavitacijos efekto, ultragarsas gali turėti skirtingą poveikį mikroorganizmams, fermentams ir baltymų struktūriniais pokyčiams. Ultragarsas gali paspartinti masių pernašos procesus ir padidinti bakterinių ląstelių pralaidumą, formuoti naujus ryšius baltymo molekulėje bei aktyvinti arba inhibuoti fermentus.

Sprendžiant ekologines problemas būtų svarbu įgyvendinti beatliekį perdirbimą ir įvertinti lignoceliuliozinės lubinų sėklų dalies panaudojimą bioproduktų gamybai. Lignoceliuliozinė žaliava gali būti substratu anaerobinio skaidymo būdu gaminamoms biodujoms, galinčioms pakeisti iškastinį kurą. Biodujoms gaminti dažniausiai taikoma vienpakopė anerobinio skaidymo schema, tačiau svarbu įvertinti ir daugiapakopį procesą, galintį turėti teigiamos įtakos biodujų išeigai ir grynumui. Pastaruoju metu padidėjusi pieno rūgšties paklausa skatina optimizuoti šios rūgšties sintezę, tam panaudojant įvairius substratus ir mikroorganizmus. Todėl daug dėmesio šiuo metu susilaukia lignoceliuliozinė biomasė, susidaranti kaip atlieka maisto pramonėje ir žemės ūkyje (166). Tai atsinaujinanti, nebrangi ir daug polisacharidų (celiuliozės, hemiceliuliozės ir lignino) turinti žaliava, kurios pasaulyje generuojami dideli kiekiai, tačiau utilizuojama tik nedidelė dalis (198, 199). Taip pat svarbu įvertinti ir atsparių rūgštinei terpei *Pediococcus* padermių, išskirtų iš ruginių duonos raugų, panaudojimo galimybes pieno rūgšties sintezei ir iš kitų substratų, pvz., šalutinių sūrinių gamybos produktų.

2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

2.1. Tyrimų objektai

Medžiagos ir mikroorganizmai tyrimų objektams ruošti

Lubinų sėklos. Mažai alkaloidų turinčios (<0,01 %) siauralapių lubinų sėklos (*Lupinus angustifolius* L., hibridinė linija Nr.1682(2015)) gautos iš Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centro (LAMMC) Vokės filialio Trakuose. Nustatyta lubinų sėklų cheminė sudėtis (%): 39,8 ± 0,9 baltymų, 6,5 ± 0,4 riebalų, 42,0 ± 0,1 angliavandenių, 2,8 ± 0,3 pelenų. Prieš tyrimus sėklos sumaltos laboratoriniu malūnu (Bühler-Miag, Brunswick, Germany) iki 0,5–2,0 mm dydžio dalelių. Galutinis viso grūdo lubinų sėklų miltų drėgnis – 8,9 %.

Sūrių gamybos šalutiniai produktai. Sūrinės išrūgos ir išrūgų permiatas gauti iš „Rokiškio pienas“ (Lietuva) ir pieno tyrimų laboratorijos „Aula de Productos Lácteos“ (Ispanija). Cheminė sudėtis pateikta 2.1 lentelėje. Prieš PRB fermentaciją, mėginiai sterilizuoti 121 °C 15 min.

2.1 lentelė. Sūrių gamybos šalutinių produktų cheminė sudėtis

Objektai	Baltymai, %	Riebalai, %	Laktozė, g/l	pH
<i>Sūrinės išrūgos</i>	9,5 ± 0,4	0,65 ± 0,09	35,2 ± 0,5	6,3 ± 0,3
<i>Išrūgų permiatas</i>	0,34 ± 0,08	0,25 ± 0,07	43,7 ± 0,6	6,2 ± 0,2

Fermentai. Lubinų biomasės polisacharaidų hidrolizei naudoti amilolitiniai ir ksilanolitiniai fermentai: bakterinė α -amilazė iš *Bacillus subtilis* AlphaStar PLUS (1200 AV/ml) ir ksilanazė CeluStar XL (15000-17500 AV/ml) (DYADIC International, JAV). Laktozės hidrolizei naudota β -D-galaktozidazė iš *Kluyveromyces lactis* (Lactozyme 2600L) (2600 AV/ml) gauta iš Sigma Chem. Co. (St.Louis, MO, JAV)

Pieno rūgšties bakterijos. PRB fermentacijai pasirinktos KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje saugomos bakteriocinus gaminančios PRB: *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 padermės, *Lactobacillus sakei* KTU05-6, kurios prieš tai buvo išskirtos iš lietuviškų ruginių duonos raugų.

2.2 lentelė. PRB ruošimo substratų fermentacijai sąlygos

PRB	PRB kodas	Kultivavimo temperatūra, °C	Kultivavimo trukmė, val	Terpė (skysta)	Koncentracija, log KSV/ml
<i>Pediococcus acidilactici</i> KTU05-7	Pa	35 ± 2	36	MRS	9,3 ± 0,4
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KTU05-8	Pp8	25 ± 2	36	MRS	9,2 ± 0,2
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KTU05-9	Pp9	25 ± 2	36	MRS	9,2 ± 0,3
<i>Lactobacillus sakei</i> KTU05-6	Ls	30 ± 2	36	MRS	9,2 ± 0,5
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	Lb	42 ± 2	36	MRS	9,4 ± 0,2

Lactobacillus delbrueckii spp. *bulgaricus* gauta iš KTU Maisto instituto. PRB ruošimo tolimesniems tyrimams sąlygos pateiktos 2.2 lentelėje.

Dumblas biodujų gamybai. Dumblas, gautas iš Kėdainių cukraus fabriko, iki tyrimų pradžios laikytas 4 °C temperatūroje. Dumblo charakteristikos: pH – 6,9, 31 g/l sausųjų medžiagų (TS), 22 g/l organinių medžiagų (VS).

Tyrimų schema pateikta 2.1 paveiksle.

2.1.1. Fermentuotų lubinų sėklų miltų ruošimas

Sumaltoms lubinų sėkloms taikyta PRB kietafazė fermentacija (KF), kurios metu fermentuojamos žaliavos drėgnis yra ne didesnis nei 50 %. Šviežiai paruoštų PRB suspensija, kurioje bakterijų skaičius yra 9,2–10,4 log KSV/ml (2 % nuo bendros mėginio masės) sumaišoma su steriliu vandeniu ir užpurškiama ant lubinų sėklų miltų bei gerai sumaišoma. Lubinų sėklų miltai laikomi termostate 72 val. atitinkamoje temperatūroje, kuri priklauso nuo pasirinktų PRB padermių kultivavimo sąlygų. Po 24, 48 ir 72 val. fermentacijos lubinų sėklų miltų mėginiuose nustatyta pH vertė, PRB skaičius ir tirpiųjų baltymų kiekis.

2.1.2. Lubinų sėklų baltymų izoliatų paruošimas

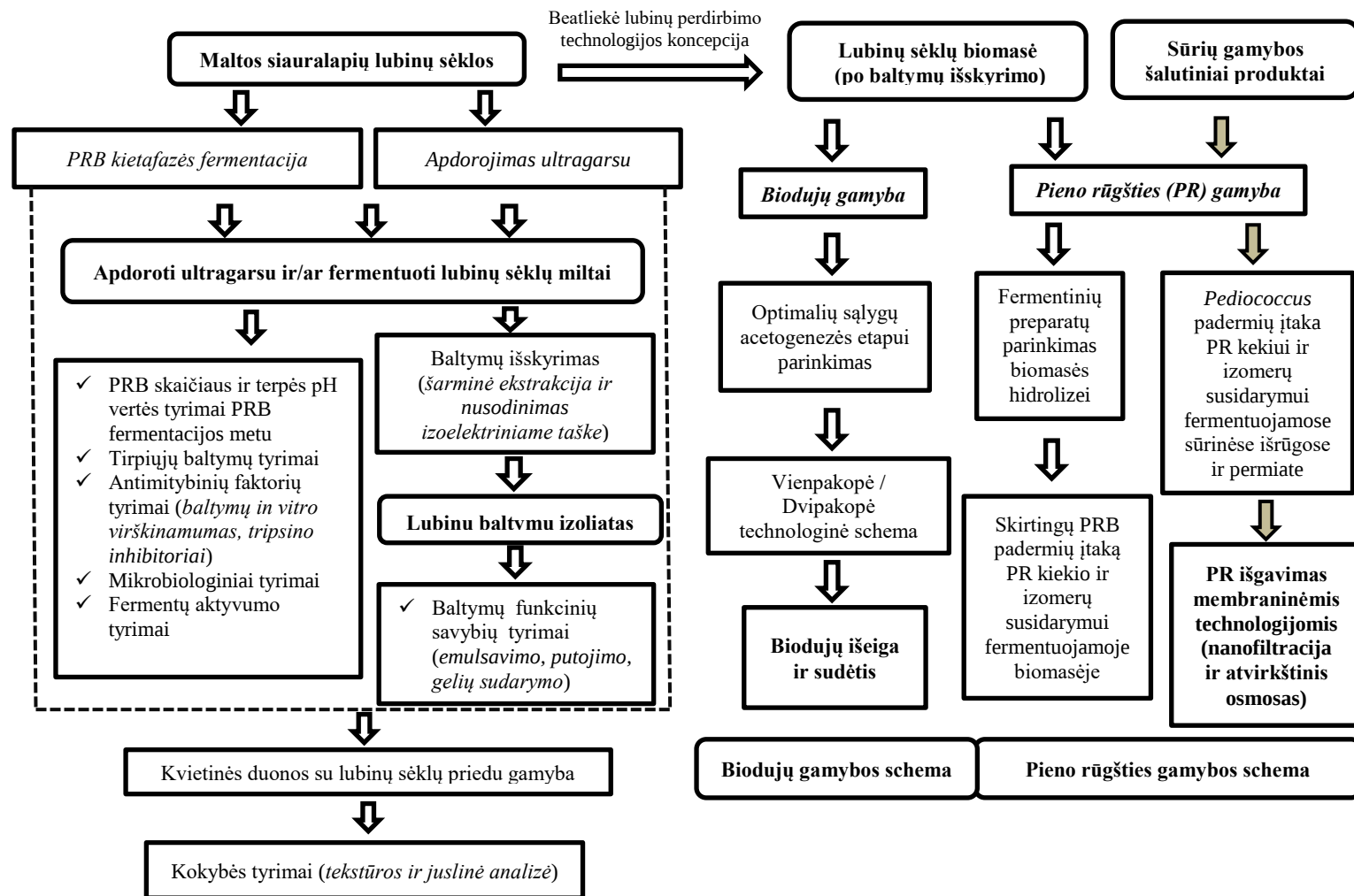
Baltymams išskirti iš nefermentuotos ir fermentuotos žaliavos naudotas šarminės ekstrakcijos ir nusodinimo izoelektriniame taške būdas pagal Jayasena ir kt. (220) metodiką. Lubinų miltai sumaišyti su distiliuotu vandeniu santykiu 1:10 ir, naudojant NaOH (1 mol/l), tirpalo pH vertė padidinta iki 9,0. Maišant tirpalas laikomas 3 valandas, po to 20 min. centrifuguojamas 3000 aps./min. greičiu 8 °C temperatūroje. Supernatantas surenkamas į atskirą kolbą, o nuosėdos pakartotinai ekstrahuojamos ir centrifuguojamos. Surinktų supernatantų pH vertė sumažinama iki 4,5 naudojant 1 mol/l HCl. Mėginiai 20 min. centrifuguojami 3000 aps./min. greičiu 8 °C temperatūroje. Nusėdę baltymai atskiriami, liofilizuojami (Sublimator 3×4×5 Zirbus technology, GmbH, Vokietija) ir toliau naudojami funkcinėms savybėms tirti.

2.1.3. Ultragarsu apdorotų lubinų sėklų miltų ruošimo sąlygos

Lubinų sėklų miltai yra apdoroti ultragarsu naudojant žemo dažnio ultragarsinę vonelę PROCLEAN 3.0DSP (Ulsonix, Vokietija). Ultragarsinės vonelės parametrai: 37 kHz, 160 W. Tyrimų metu vonelėje buvo 20–25 °C vandens temperatūra. Lubinų sėklų miltai, priklausomai nuo vėliau atliekamų tyrimų (mikrobiologinės taršos, fermentacijos parametrų, baltymų funkcinių savybių, baltymų virškinamumo, inhibitorių aktyvumo ir fermentų aktyvumo), veikti nuo 10 iki 60 min., o lubinų baltymų izoliatui (gelių savybių tyrimams) taikytas ultragarsinis apdorojimas nuo 10 iki 30 min.

2.1.4. Kvietinės duonos su lubinų sėklų miltų priedu ruošimas

Bazinė duonos receptūra (1 kg kvietinių miltų): šviežios mielės – 30 g, druska – 1,5 g, vanduo – 600 ml.



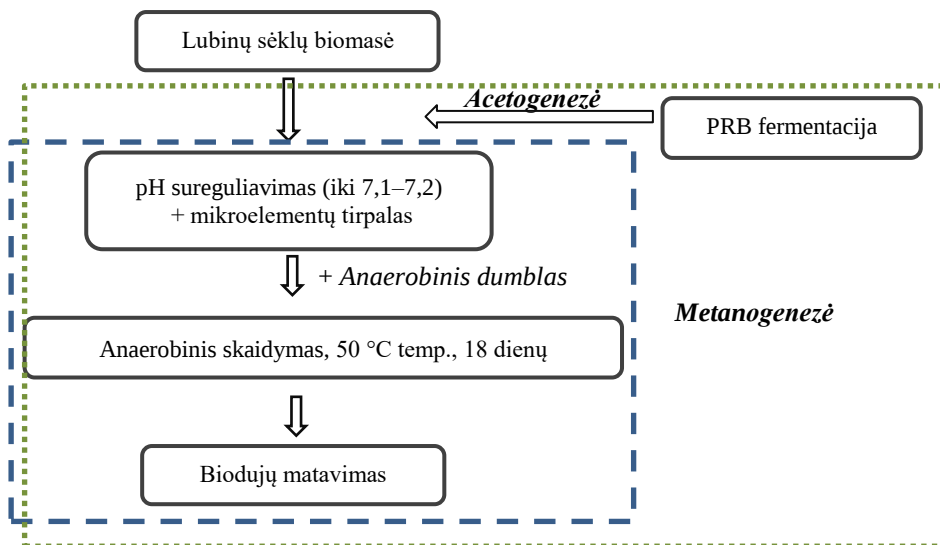
2.1. pav. Tyrimų schema

Tiriamosios duonos paruoštos pakeičiant dalį (3 ir 6 %) kvietinių miltų nefermentuotais ir fermentuotais lubinų miltais. Visi komponentai sumaišyti maišyklėje (SP25 Diosna, Dierks & Söhne GmbH, Osnabrück, Vokietija) 3 min. lėtuju ir 6 min. greituju režimu. Tešla rauginama 60 min. 28 °C temperatūroje, esant 80 g/100 g santykiniam drėgniui. Po to formuojami 400 g tešlos ruošiniai ir kildinami 45 min. 35 °C temperatūroje. Duona kepama krosnyje (MIWE Condo, MichaelWenz GmbH, Armstead, Germany) 25 min. 210 °C temperatūroje. Duonos kokybės tyrimai atliekami po 24 val.

2.1.5. Biodujų gamybos iš lubinų sėklų biomasės sistemos paruošimas

Biodujų gamybai naudotos lubinų sėklų biomasės cheminė sudėtis (%) nustatyta tokia: 77,3±1,2 sausųjų medžiagų (TS), 70,4±1,4 lakiųjų medžiagų (VS), 9,1±0,3 baltymų, 5,9±0,1 riebalų.

Biodujų gamyba, taikant vienapakopį ir dvipakopį būdus, atlikta pagal Juodeikienės ir kt. (2021) aprašytą metodiką, atlikus keletą pakeitimų (žr. 2.2 pav.).



2.2 pav. Biodujų gamybos iš lubinų sėklų biomasės schema. Vienapakopis būdas – metanogenezė (— — —), dvipakopis – acetogenezė ir metanogenezė (.....)

Vienapakopė biodujų gamyba (metanogenezė). 5 g mėginio sumaišyta su 100 ml distiliuoto vandens, 400 ml anaerobinio dumblo ir supilta į 1 l stiklinius butelius. Naudojant Na_2CO_3 , pH vertė padidinta iki 7,1–7,2. Mišinys papildytas 1 ml/l mikroelementų tirpalu (1,5 g/l nitrilotriacto rūgštis; 3,0 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,0 g/l NaCl; 0,1 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,18 g/l $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,18 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,01 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,02 g/l $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 0,01 g/l H_3BO_3 ; 0,01 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,03 g/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,3 mg/l $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,35 g/l K_2HPO_4 ; 0,23 g/l KH_2PO_4). Dumblo produkuojamam

metano kiekiui įvertinti pagal tą pačią metodiką paruoštas ir tuščias mėginys – be substrato (lubinų sėklų biomasės). Anaerobinės sąlygos sudarytos į butelius prileidžiant N₂ dujų. Metanogenezė vykdyta 50 °C temperatūroje 18 dienų. Biodujų gryninimui naudotas 6 mol/l NaOH.

Dvipakopė biodujų gamyba (acetogenezė ir metanogenezė). Pimajame etape lubinų sėklų biomasė fermentuojama su atrinkta PRB paderme (pagal susidariusių lakiųjų rūgščių kiekį) jai optimaliomis kultivavimo sąlygomis (*acetogenezė*). Antrajame etape metanogenezė vykdyta pagal vienpakopės biodujų gamybos (*metanogenezės*) schemą.

2.1.6. Lignoceliuliozinės lubinų sėklų biomasės, skirtos pieno rūgšties gamybai, paruošimas

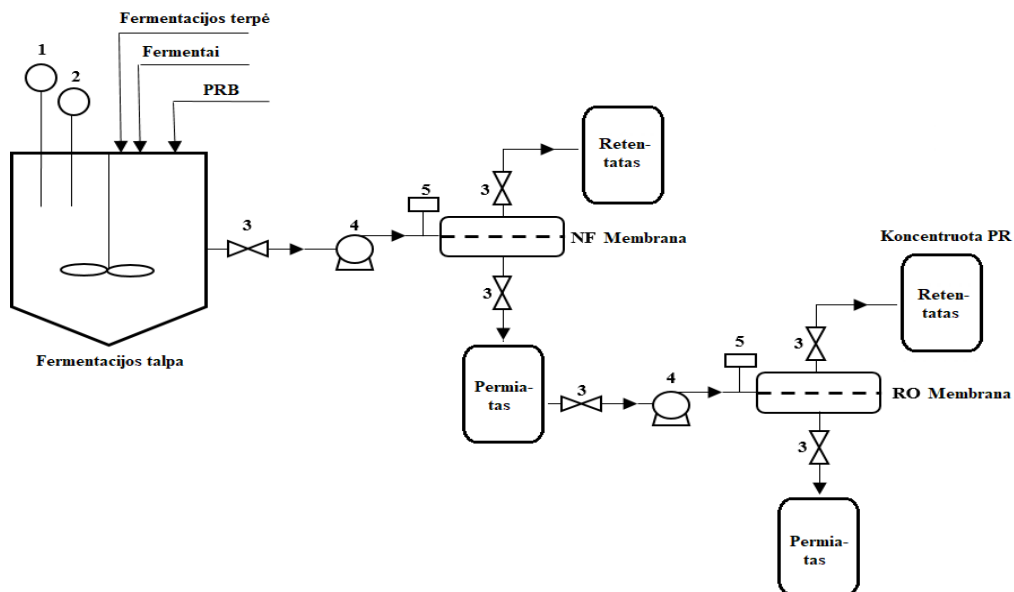
Prieš vykdant lubinų biomasės, likusios po baltymų išskyrimo, PRB fermentaciją žaliava sterilizuota 121 °C 15 min., o po to taikyta fermentinė hidrolizė. Polisacharidų hidrolizei naudota bakterinė α -amilazė iš *Bacillus subtilis* AlphaStar PLUS (40, 80, 120, 140 AV/100 g biomasės) ir ksilanazė CeluStar XL (1000, 1800, 2400, 3200 AV/100 g biomasės). Hidrolizė vykdyta 55–57 °C (CeluStar XL) ir 66–68 °C (AlphaStar PLUS) temperatūroje 60 min. Atlikus susidariusių redukuojančių sacharidų analizę, parenkami optimalūs fermentinių preparatų aktyvumai. Atvėsintai hidrolizuotai biomasei toliau taikyta PRB kietafazė fermentacija su pasirinktomis PRB kultūromis joms optimalioje temperatūroje 48 val, kaip ir ruošiant fermentuotus lubinų produktus. Po 12, 24, 36 ir 48 val. fermentacijos, mėginiuose nustatyta pH vertė ir susidarę PR izomerai.

2.1.7. Sūrių gamybos šalutinių produktų, skirtų pieno rūgšties gamybai, paruošimas

Į sūrinės išrūgas ir išrūgų permiatą inokuliuota MRS terpėje padaugintų PRB ląstelių (9,2–9,4 log KSV/ml, 2 % nuo mėginio masės) ir, naudojant optimalią kiekvienai PRB padermei temperatūrą, fermentuota 72 val. Po 24, 48 ir 72 val. fermentacijos mėginiuose nustatytas PRB skaičius, pH vertė ir pieno rūgšties izomerų kiekis. Atrinktos PRB padermės toliau naudotos PR išskyrimo ir gryninimo membraninėmis technologijomis tyrimams.

2.1.8. Pieno rūgšties išskyrimo ir gryninimo sistemos paruošimas

Eksperimentas vykdytas APLTA laboratorijoje (Ispanija). PRB fermentacija vykdyta 150 l fermentacijos talpyklose, turinčiose šildymo garais ir vandens aušinimo sistemas (Pierre Guerin, France). Pieno rūgšties gamybos schema, pritaikant membranines technologijas, pateikta 2.3 pav. PR išskirti iš fermentacijos terpės naudota tangentinio filtravimo sistema su 3838/3840 dimensijų organinėmis spiralinės konfigūracijos membranomis (OSM), skirtomis nanofiltracijai ir atvirkštiniam osmosui (žr. 2.3 lentelė). Po 12, 24, 36 ir 48 val. fermentacijos, mėginiuose nustatyta pH vertė, PRB skaičius, laktozės ir PR stereoizomerų kiekis, kuris taip pat nustatytas po kiekvieno filtravimo etapo retentate ir permiate.



2.3 pav. PR gamyba, naudojant membranines technologijas, 1 – temperatūros matuoklis; 2 – pH elektrodas; 3 – vožtuvas; 4 – siurblys; 5 – manometras; NF – nanofiltracija; RO – atvirkštinis osmosas

2.3 lentelė. Membranų parametrai

Parametrai	NF OSM	RO OSM
Aktyvus paviršius, m ²	7,5	7,5
Maksimalus darbinis slėgis, bar	54,8	54,8
Maksimali darbinė temperatūra, °C	50	50
pH darbinis režimas	3–10	2–10
pH režimas valymo operacijų metu (max. 50° C)	1–11,5	1–11,5
Laisvojo chloro koncentracija, ppm	0,1	0,1

NF – nanofiltracija, RO – atvirkštinis osmosas, OSM – organinė spiralinės konfigūracijos membrana

2.2. Tyrimų metodai

2.2.1. Lubinų sėklų ir sūrių gamybos šalutinių produktų cheminės sudėties įvertinimas

Drėgmės kiekis lubinų sėklose nustatytas kaitinant mėginius 105±2°C temperatūroje iki pastovios masės pagal ICC standartinį metodą Nr. 109/01:1976.

Bendras baltymų kiekis lubinų sėklose nustatytas Kjeldalio metodu pagal ICC standartinį metodą Nr. 105/2:2001, taikant perskaičiavimo koeficiento vertę 5,7.

Lubinų sėklose esantis *riebalų kiekis* nustatytas ekstrahuojant heksanu „Soksleto“ aparate pagal ICC standartinį metodą Nr. 136:1984.

Pelenų kiekis lubinų sėklose nustatytas išdeginant mėginį 900 °C pagal ICC standartinį metodą Nr. 104/1:1990.

Angliavandenių kiekis (g/100 g) lubinų sėklose apskaičiuotas taikant (2.1) formulę:

$$\text{Angliavandeniai} = 100 - (B + R + D + P), \quad (2.1)$$

čia: *B* – baltymų kiekis, g/100 g; *R* – riebalų kiekis, g/100 g; *D* – drėgmės kiekis, g/100 g; *P* – pelenų kiekis, g/100 g.

Laktozės kiekis sūrių gamybos šalutiniuose produktuose nustatytas fermentinės analizės metodu, naudojant Megazyme K-LACGAR *Laktozės / Galaktozės* testą. Analizė pagrįsta tuo, kad β-galaktozidazės katalizuojama laktozės ar / ir D-galaktozės hidrolizė yra tiesiogiai proporcinga susidariusio nikotinamido adenino dinukleotido (NADH) kiekiui.

2.2.2. pH vertės, PRB gyvybingumo ir tirpiųjų baltymų nustatymas lubinų sėklų fermentacijos metu

pH vertės nustatymas. Lubinų sėklų miltų mėginys (5 g) sumaišomas su 50 ml steriliu distiliuotu vandeniu ir filtruojamas per „Whatmano“ filtro popierių Nr. 1. Filtrato pH vertė matuojama tiesiogiai pH metru (PP-15, Sartorius, Goettingen, Germany).

Mikrobiologinė analizė. 10 gramų fermentuoto mėginio užpilama 90 ml 0,9 % NaCl tirpalu ir homogenizuojama. Į lėkšteles su MRS agaru (Liofilchem, REF 610024) pilama po 1 ml pradinės suspensijos ar skiedinio. Lėkštelės anaerobinėmis sąlygomis laikomos termostate 72±3 val. PRB kultivavimo temperatūroje. PRB skaičius išreiškiamas log KVS/g mėginio.

Tirpiųjų baltymų nustatymas. 5 g mėginio sumaišoma su 20 ml distiliuoto vandens ir 2 ml 10 % NaCl tirpalo ir paliekama 10 min. Filtruojama per vatą, o likusios nuosėdos dar kartą užpilamos 20 ml distiliuoto vandens ir vėl filtruojama. Filtratai surenkami į 50 ml kolbą, praskiedžiami vandeniu iki žymės ir 20 ml gauto mėginio naudojama baltymams nustatyti Kjeldalio metodu.

2.2.3. Baltymų funkcinio savybių įvertinimas

Pagal Jayasena ir kt. (220) aprašytą metodiką, nustatytos tokios lubinų sėklų baltymų izoliato funkcinės savybės: emulsavimo aktyvumas, emulsijos termostabilumas, putojimo geba ir putų stabilumas. Funkcinių savybių tyrimams paruoštos 1 g/100 ml baltymų suspensijos vandenyje, kurių pH vertė 6,0 ir 8,0 gauta pridedant 0,1 mol/l NaOH tirpalo.

Nustatant *emulsijos aktyvumą*, lubinų sėklų baltymų suspensija homogenizuojama su homogenizatoriumi (IKA T 25, Staufen, Vokietija) 10 min., po 5 min. po truputį supilamas rapsų aliejus (100 ml) ir toliau vienodai maišoma. Gauta emulsija 10 min. centrifuguojama 3000 aps./min. greičiu.

Emulsijos aktyvumas (EA, %) apskaičiuotas taikant (2.2) formulę:

$$EA = \frac{\text{emulsuoto sluoksnio tūris, ml}}{\text{bendras suspensijos tūris, ml}} \times 100. \quad (2.2)$$

Emulsijos termostabilumas nustatomas taip pat gautą emulsiją su rapsų aliejumi kaitinant 85 °C temperatūroje 30 min. ir vėsinant 5 min. po tekančiu vandeniu iki kambario temperatūros (20 ± 2 °C). Mėginiai 10 min. centrifuguojami 3000 aps./min. greičiu. Emulsijos termostabilumas (ES, %) apskaičiuotas taikant (2.3) formulę:

$$ES = \frac{\text{emulsuoto sluoksnio tūris, ml}}{\text{bendras suspensijos tūris, ml}} \times 100. \quad (2.3)$$

Nustatant mėginių putojimo savybes, lubinų baltymų suspensijos plakamos 5 min. rankiniu plakikliu ir po to greitai perpilamos į 1000 ml matavimo cilindrą. Putojimo geba (FC, %) apskaičiuota taikant (2.4) formulę:

$$FC = \frac{\text{putų tūris, ml}}{\text{bendras suspensijos tūris, ml}} \times 100. \quad (2.4)$$

Lubinų sėklų baltymų putų stabilumas matuojamas 90 min., fiksuojant rodmenis kas 30 min. Putų stabilumas (FS, %) apskaičiuotas taikant (2.5) formulę:

$$FS = \frac{\text{putų tūris po tam tikro laiko, ml}}{\text{pradinis putų tūris, ml}} \times 100. \quad (2.5)$$

Mažiausia lubinų baltymų koncentracija reikalinga geliui sudaryti nustatyta pagal Sun'ο ir Arntfield'ο (222) aprašytą metodiką, atlikus keletą pakeitimų. Paruošiamos 8–36 % koncentracijos lubinų baltymų suspensijos distiliuotame vandenyje (5 ml) ir kaitinamos 90 °C temperatūroje 30 min. Mėginiai vėsinami 1 val. kambario temperatūroje ir paliekami 24 val. 4 °C temperatūroje. Mažiausia baltymų koncentracija geliui sudaryti nustatoma pagal tai, kai atvertus mėgintuvėlį jo turinys neišteka.

2.2.4. Lubinų sėklų baltymų gelių klampos įvertinimas

Lubinų sėklų baltymų gelių reologinės savybės vertintos reometru *Physica MCR 502* (Anton Paar, Messtechnik, Štutgartas, Vokietija), taikant plokštė-plokštė geometrijos sistemą (PP-25/P2), 25°C temperatūroje ir didinant poslinkio greitį nuo 1 iki 100 s⁻¹. Rezultatai išreikšti klampos priklausomybe nuo poslinkio greičio.

Gelių klampa taip pat vertinta naudojant akustinį klampos matuoklį (SME „Matmuo“, Kaunas, Lietuva), sukurtą KTU MTEPI projekto GelFix metu. Įrenginys matuoja atstumą bekontakčiu būdu, matuodamas akustinio aidolokacinio signalo sklaidimo trukmę nuo ultragarsinio siuntiklio-ėmiklio iki mėginio poveikio modulio viršutinės plokštumos ir atgal. Apskaičiavus signalo sklaidimo greičio verčių vidurkius, gaunamas vidutinis atstumas (*h*), kuris parodomas prietaiso indikatoriuje ir kompiuterio ekrane. Parametras *h* – tai išmatuotas atstumas, kurį kūnas nukrenta per laiko vienetą. Matuojama milisekundės (ms) tikslumu. Metodo patikimumas įvertintas tiriant įvairias modelines gelines sistemas. Tyrimui atlikti 20 g lubinų

baltymų gelio įdedama į matavimo lėkštelę (skersmuo – 90 mm, aukštis – 12 mm), o parametro h kitimas matuojamas 300 ms.

2.2.5. Mikroorganizmų skaičiaus nustatymas

Debakterizuojantis ultragarso poveikis lubinų miltams įvertintas nustatant bendrą mikroorganizmų skaičių pagal LST EN ISO 4833:2003.

2.2.6. Baltymų *in vitro* virškinamumo ir tripsino inhibitorių nustatymas

Baltymų *in vitro* virškinamumo įvertinimas atliktas pagal Lqari ir kt. (223) aprašytą metodiką. Lubinų sėklų miltų mėginys, turintis 62,5 mg baltymų, sumaišomas su 10 ml distiliuoto vandens ir, naudojant 0,1M NaOH, tirpalo pH vertė padidinama iki 8,0. Fermentinis tirpalas, sudarytas iš 1,6 mg/l tripsino (18 AV/mg), 3,1 mg/l α -chymotripsino (40 AV/mg) ir 1,3 mg/l peptidazės (50 AV/mg) sumaišomas su lubinų sėklų miltų mėginiu santykiu 1:10. Tirpalo pH vertė išmatuota po 10 min., o baltymų *in vitro* virškinamumas (%) apskaičiuotas taikant (2.6) formulę:

$$\textit{in vitro} \text{ baltymų virškinamumas} = 210,464 - 18,103 \times pH, \quad (2.6)$$

čia: pH – reakcijos tirpalo pH vertė, išmatuota po 10 min.; formulėje pateikti skaičiai yra regresijos lygties koeficientai.

Tripsino inhibitorių aktyvumas nustatytas pagal Lqari ir kt. (223) aprašytą metodiką. Vertinimui naudotas eksperimentinis mišinys, sudarytas iš 1 ml fosfatinio buferio (0,1 M, pH = 7,6), 0,5 ml proteazės tirpalo (1 mg/ml 1 mN HCl), 0,5 ml 1 mN HCl tirpalo, 2 ml kazeino tirpalo (2 % fosfatiniame buferyje, 0,1 M, pH = 7,6) ir 1 ml inhibitorinio tirpalo fosfatiniame buferyje (0,1 M, pH = 7,6), laikytas 30 min. kambario temperatūroje. Po to dedamas kazeino tirpalas ir mišinys laikomas 20 min. 37 °C temperatūroje. Tuščias mėginys paruošiamas pridėjant trichloracto rūgšties prieš proteazės tirpalo įpilimą. Kontrolinis mėginys ruošiamas be inhibitorinio tirpalo. Reakcija substabdoma pridėjant 6 ml 5 % trichloracto rūgšties. Mėginiai filtruojami per „Whatmano“ Nr. 1 filtrą, o išsiskyręs tirozino kiekis filtratuose nustatomas kolorimetriniu metodu pagal Lowry'so ir kt. (224) aprašytą metodą. Tripsino inhibitorių aktyvumas įvertinamas pagal tirozino kiekio skirtumą tarp kontrolinio ir eksperimentinio mėginių.

2.2.7. Tiriamosios duonos su lubinų priedais kokybės analizė

Duonos minkštimo aktyvumas nustatytas pagal LST 1442:1996 „Duona ir pyrago kepiniai. Aktyvumo nustatymas“. Specifinis duonos tūris įvertinantis pagal išstumtą tiriamojo kepinio, biraus užpildo (sorų kruopų) tūrį (AACC metodas Nr. 10-05.01). Duonos tekstūros savybės įvertintos tekstūros analizatoriumi TA.XT2 (Stable Micro Systems Ltd, Godalming, Surrey, Didžioji Britanija). Taikytas tekstūros profilio analizės (TPA) metodas. Analizei naudoti cilindrinės formos duonos mėginiai (diametras – 2 cm, aukštis – 3 cm). Matavimams naudota 80 mm plokštelė, kurios leidimosi greitis 1 mm/s, suspaudimas 8 mm.

Duonos juslinė analizė atlikta pagal ISO 6658 metodą. Vertinime dalyvavo 50 vertintojų. Vertintas tokių juslinių savybių kaip spalvos, kvapo, skonio ir rūgštingumo

intensyvumas 7 balų skalėje. Duonos priimtinumas vertintas 7 balų hedoninėje skalėje tradiciniu juslinės analizės metodu bei emocijų vertinimo programine įranga „FaceReader5“ (Noldus Information Technology, Vageningenas, Nyderlandai), kuri naudojama ir maisto produktams analizuoti (225, 226, 227). Vertintojui ragaujant duonos mėginius, jis yra filmuojamas vaizdo kamera (Microsoft Corporation, Redmond, Vašingtonas, JAV), o gauti įrašai vėliau analizuojami „Facereader5“ programa, kuri fiksuoja žmogaus veido išraiškas ir priskiria jas šešioms pirminėms (bazinėms) emocijoms: laimingas, piktas, liūdnas, nustebęs, išsigandęs, pasibjaurėjęs. Emocijos intensyvumas išreiškiamas skalėje nuo 0 (0 %) iki 1 (100 %).

2.2.8. Fermentų aktyvumo nustatymas

Nustatant ultragarsinio apdorojimo įtaką nefermentuotų ir PRB fermentuotų lubinų fermentiniam aktyvumui, įvertinti proteolitinio, amilolitinio ir ksilanolitinio aktyvumo pokyčiai. Fermentų aktyvumas išreikštas gramui lubinų sėklų.

Proteolitinis aktyvumas nustatytas pagal Sigma-Aldrich SSCASE01.001 protokolą (228). *Metodo esmė*: veikiant proteazei, kazeinas suskaldomas iki aminorūgščių ir jų kiekis nustatomas kolorimetriniu metodu. Po reakcijos su Folin-Ciocalteu fenoliniu reagentu, išmatuota 660 nm monochromatinio spindulio sugertis spalvotame tirpale.

Amilolitinis aktyvumas nustatytas modifikuotu krakmolo / jodo metodu pagal Nguyen ir kt. (229). *Metodo esmė*: veikiant α -amilazei tirpus krakmolas hidrolizuojamas iki įvairios molekulinės masės dekstrinų. Likusio nehidrolizuoto krakmolo kiekis nustatytas kolorimetriniu metodu. Sureagavus krakmolui su jodu, išmatuota 670 nm monochromatinio spindulio sugertis spalvotame tirpale.

Ksilanolitinis aktyvumas nustatytas modifikuotu Millerio kolorimetriniu metodu (230), naudojant 3,5-dinitrosalicilo rūgšties reagentą (DNS). *Metodo esmė*: veikiant ksilanazei vyksta ksilano hidrolizė iki redukuojančių sacharidų, daugiausia ksilozės, kurie su DNS stipriai šarminėje aplinkoje sudaro spalvotus junginius. Jų kiekis nustatytas kolorimetriniu metodu, išmatuojant 540 nm monochromatinio spindulio sugertį spalvotame tirpale.

PRB laktazinis aktyvumas modelinėse sistemose nustatytas pagal iš *o*-nitrofenil β -D-galaktopiranozido (ONPG) atlaisvintą *o*-nitrofenolio kiekį, išmatuojant 405 nm monochromatinio spindulio sugertį spalvotame tirpale (231). 10 ml fermentuoto mėginio filtruojama per filtro popierių, filtrato pH vertė padidinama / sumažinama iki 4,5. Reakcijos mišinys, sudarytas iš 1,7 ml 100 mM natrio acetato buferio (pH 4,5), 0,2 ml filtrato ir 0,1 ml 20 mM ONPG, gerai sumaišomas. Reakcija sustabdoma įpilant 2,0 ml 1,0 M natrio karbonato tirpalo, o išsiskyręs *o*-nitrofenolio kiekis matuojamas spektrofometriniu būdu.

2.2.9. Sausųjų ir organinių medžiagų nustatymas lubinų sėklų biomasėje

25 g mėginio džiovinama krosnyje 103–105 °C temperatūroje 12 val. iki nekintančios masės, mėginys atvėsinamas ir pasveriamas.

Sausosios medžiagos (TS, %) apskaičiuojamos taikant (2.7) formulę:

$$TS = \frac{W_b - W_t}{W_m - W_t} \times 100, \quad (2.7)$$

čia: W_b – išdžiovinto mėginio ir tiglio masė, mg; W_t – tiglio masė, mg; W_m – mėginio prieš džiovinimą ir tiglio masė, mg.

Išdžiovintas mėginys toliau 2 val. išdeginamas 550 °C temperatūroje mufelinėje krosnyje iki pastovios masės, atvėsintas ir pasveriamas. Organinės medžiagos (VS, %) apskaičiuojamos taikant (2.8) formulę:

$$VS = \frac{W_b - W_v}{W_b - W_t} \times 100, \quad (2.8)$$

čia: W_b – išdžiovinto mėginio ir tiglio masė, mg; W_t – tiglio masė, mg; W_v – mėginio ir tiglio masė po išdeginimo, mg.

2.2.10. Acto rūgšties kiekio nustatymas lubinų biomasės PRB fermentacijos metu

PRB padermei ir fermentacijos trukmei acetogenezės etape įvertinti, pirmiausiai nustatytas kiekvienos padermės lakiųjų rūgščių sintezės efektyvumas. Lakiąsias rūgštis daugiausia sudaro acto rūgštis, kurios kiekis išreiškiamas 1 M NaOH kiekiu (ml arba cm^3), sunaudotu 100 g (arba 100 cm^3) produkte esančioms lakiosioms rūgštims neutralizuoti. PRB fermentacija atlikta pagal tą pačią metodiką, kaip ir ruošiant fermentuotus lubinų produktus. Mėginiai imti po 24, 48 ir 72 val. 20 g fermentuoto mėginio sumaišoma su 100 ml distiliuoto vandens, centrifuguojama ir filtruojama. 10 ml filtrato sumaišoma su 3 ml 5 % H_2SO_4 . Mėginys distiliuojamas „Behr S4“ distiliatoriumi (Lab Unlimited UK, Behr, Frimley, Didžioji Britanija). Distiliatas titruojamas 0,1 M NaOH tirpalu, įlašinus 3–4 lašus fenolftaleino.

Bendras lakiųjų rūgščių kiekis (laipsniais) apskaičiuojamas taikant (2.9) formulę:

$$X = \frac{a \times K \times 100}{r \times 20}, \quad (2.9)$$

čia: a – 0,1 mol/l NaOH tirpalo kiekis, sunaudotas titravimui, ml; K – NaOH titro pataisos koeficientas; r – mėginio kiekis, g.

Acto rūgšties kiekis (g/100g) apskaičiuojamas bendrą lakiųjų rūgščių kiekį padauginant iš koeficiento 0,06.

2.2.11. Biodujų sudėties tyrimai

Biodujų sudėtis matuota anaerobinio proceso pabaigoje analizatoriumi *Optima 7 Biogas Analyser* (MRU Messgeräte für Rauchgase und Umweltschutz GmbH,

Neckarsulm, Vokietija). Matuoklis matuoja metano (%), anglies dioksido (%), deguonies (%) ir vandenilio sulfido (ppm) kiekį dujose.

2.2.12. Redukuojančių cukrų kiekio hidrolizuotoje lubinų sėklų biomasėje nustatymas

Mėginio paruošimas analizei. 5 g mėginio sumaišyta su 20 ml distiliuoto vandens ir 15 min. centrifuguota 5000 aps./min. greičiu. Supernatantas kaitintas 10 min. 90 °C temperatūroje baltymų denatūracijai ir filtruotas per „Whatmano“ 42 filtrą (Whatman, Kent, UK). Filtratas (2,5 ml) sumaišytas su 7,5 ml acetonitrilu ir filtruotas naudojant 0,45 µm PVDF membrininį filtrą (Millex; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). Paruošti etaloniniai maltozės, gliukozės, ksilozės ir arabinozės (*Sigma–Aldrich*) tirpalai (0,01–2 mg/ml) kalibracinei kreivei sudaryti.

Naudota aparatūra. Tyrimai atlikti KTU Maisto instituto laboratorijoje. Redukuojančių cukrų (maltozės, gliukozės, ksilozės ir arabinozės) kiekybinė analizė lubinų sėklų biomasės hidrolizės metu atlikta naudojant *Shimadzu Prominence LC20AD* chromatografinę įrangą su garinančiu šviesos išbarstymo detektoriumi „ELSDLTII“ ir „Lab Solutions“ programine įranga. Junginiams atskirti naudota kolonėlė „YMC-Pack Polyamine II“ 250 × 4,6 mm, 5 µm (YMC Co., Ltd., Japonija). Chromatografinės sąlygos: eliuentas – 75 % acetonitrilas ir 25 % vanduo; eliuento tekėjimo greitis – 1,2 ml/min.; injekcijos tūris – 20 µl; kolonėlės temperatūra – 28 °C.

2.2.13. Pieno rūgšties stereoizomerų nustatymas

Mėginio paruošimas. Fermentuota lubinų sėklų biomasė: 5 g lubinų sėklų mėginio sumaišoma su 20 ml distiliuoto vandens ir nuolat maišant ant magnetinės maišyklės išlaikoma 15 min. Mėginys 10 min. centrifuguojamas 5000 aps./min. greičiu. Supernatantas praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 50 ml, filtruojamas per filtro popierių ir naudojamas analizei. Fermentuotos sūrinės išrūgos ir išrūgų permias: 1 ml mėginio skiedžiamas iki 50 ar 100 ml distiliuotu vandeniu, filtruojamas per „Whatmano“ Nr.1 filtro popierių ir naudojamas analizei.

Metodas. L(+)- ir D(–)-pieno rūgšties izomerų susidarymas lubinų biomasės PRB fermentacijos metu įvertintas fermentiniu Megazyme K-DLATE testu (Megazyme International, Airija). D(–)-pieno rūgšties izomero kiekiui nustatyti reikia dviejų fermentinių reakcijų. Katalizuojant D-laktato dehidrogenazei ir esant NAD⁺, vyksta D(–) PR izomero oksidacija iki piruvato. Antrosios reakcijos metu, katalizuojant D-glutamato-piruvato transaminazei (D-GPT), iš piruvato ir D-gliutamato susidaro D-alaninas ir 2-oksigliutaratas. Abiejų reakcijų metu susidaręs NADH kiekis yra proporcingas D(–)-pieno rūgšties izomero kiekiui ir yra nustatomas išmatavus 340 nm monochromatinio spindulio sugertį tiriamajame tirpale. Tokios pat reakcijos vyksta ir nustatant L(+)-pieno rūgšties izomero kiekį, tik jas katalizuoja L-laktato dehidrogenazė ir D-GPT.

2.2.14. Statistinė duomenų analizė

Eksperimentai kartoti mažiausiai tris kartus. Rezultatų vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai apskaičiuoti „Microsoft Excel“ programine įranga. Matematinė statistinė

duomenų analizė atlikta „SPSS Windows XP V15.0“ (2007; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programa, taikant vieno faktoriaus ir dviejų faktorių dispersinės analizės (ANOVA) metodus. Skirtumai tarp mėginių įvertinti taikant Dunkano kriterijų. Statistiškai reikšmingais skirtumai tarp mėginių yra tada, kai reikšmingumo lygis $p < 0,05$.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. Lubinų sėklų miltų panaudojimo kepinių ruošimui tyrimai

3.1.1. Kietafazės fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis įtaka lubinų sėklų baltymų funkcinėms savybėms

Netradicinių augalų panaudojimas funkcionaliųjų ingredientų išgavimui ir didesnės pridėtinės vertės maisto produktų kūrimui susilaukia vis didesnio dėmesio ir tampa populiaria tendencija kuriant funkcionalųjį maistą. Ankštiniai javai yra vertingas baltymų šaltinis ir gali iš dalies pakeisti gyvūninės kilmės baltymus, tačiau šių augalų tinkamumą žmogaus mitybai dažnai riboja mažas baltymų virškinamumas ir antimitybiniai faktoriai. Pastarieji veiksniai yra glaudžiai susiję su sumažėjusiu baltymų proteolizės laipsniu (232). Kitų tyrėjų moksliniai tyrimai rodo, kad pienarūgštė fermentacija gali sumažinti neigiamą antimitybinių faktorių įtaką ir taip padidinti ankštinių augalų pritaikymą mitybai (27, 233). Pieno rūgšties bakterijos (PRB), kurioms dažniausiai priskiriamos *Lactobacillus*, *Lactococcus* ir *Pediococcus* genčių bakterijos, turi antimikrobinį aktyvumą ir gamina antimikrobinius peptidus – bakteriocinus, kurie užtikrina fermentuojamų produktų mikrobiologinį stabilumą (234). Lyginant su tradicine fermentacija, kietafazės fermentacijos (KF) metu substrato vandens aktyvumas yra daug mažesnis, todėl sumažėja mikrobiologinės taršos pavojus (235). Be to, kietafazė fermentacija yra energiją tausojantis metodas, kurio metu susidaro mažesni antrinių atliekų kiekiai (236). Atsižvelgiant į tai, šiame darbo etape vertintas kietafazės fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis panaudojimas lubinų sėklų baltymų funkcinėms savybėms gerinimui.

Lubinų sėklų miltų kietafazė fermentacija atlikta naudojant *Pediococcus pentosaceus* KTU05-9 (*Pp9*) padermę. Fermentacijos eiga ir efektyvumas stebimas pagal terpės pH vertės ir PRB skaičiaus pokyčius, todėl tyrimo metu vertinta jų priklausomybė nuo fermentacijos trukmės. Lubinų sėklų miltų pH vertė fermentacijos metu sumažėjo nuo 5,2 iki 3,1 (žr. 3.1 lentelė). Sparčiausias pH vertės mažėjimas (~21 %) fiksuotas per pirmąjį lubinų sėklų miltų fermentacijos periodą (24 val.), tolimesnės fermentacijos metu pH vertės kitimas sulėtėjo (~13 %). Iš pH tyrimų rezultatų matyti, kad fermentuojant lubinų sėklų miltus vyksta intensyvus organinių rūgščių susidarymas. Vertinant PRB dauginimąsi, didžiausias PRB ląstelių skaičius, nustatytas po 48 val. lubinų sėklų miltų fermentacijos, buvo 7,6 log KVS/g.

3.1 lentelė. Kietafazės fermentacijos trukmės įtaka terpės pH vertei ir PRB (*Pp9*) skaičiui fermentuotuose lubinų sėklų miltuose

Fermentacijos trukmė, val	pH vertė	PRB skaičius, log KSV/g
0	5,21±0,02 ^d	3,2±0,6 ^a
24	4,11±0,01 ^c	3,5±0,3 ^a
48	3,60±0,02 ^b	7,6±0,4 ^b
72	3,11±0,03 ^a	7,1±0,3 ^b

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±StN; a, b, c, d – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis tame pačiame stulpelyje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$).

Toliau ilginant fermentaciją – PRB skaičiaus mažėjo. Šiam tyrimui naudota Pp9 padermė yra išskirta iš ruginių duonos raugų, kuriuose pH vertė gali būti 3,2–4,2, todėl ji geba daugintis ir išlikti gyvybinga esant žemai fermentuojamos terpės pH vertei (237, 238).

Tirpiųjų baltymų kiekis. Lubinų sėklų miltų kietafazės fermentacijos metu nustatytas statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) tirpiųjų baltymų kiekio padidėjimas (žr. 3.2 lentelė). Mažiausi šio parametro verčių pokyčiai, lyginant su nefermentuotais lubinų miltais, nustatyti po 24 val. ir sudarė 8 %. Tęsiant fermentaciją iki 48 val., tirpiųjų baltymų kiekis padidėjo 27 %, o pats didžiausias prieaugis fiksuotas po 72 val. – 49 %.

3.2 lentelė. Fermentacijos trukmės įtaka tirpiųjų baltymų kiekiui fermentuotuose lubinų sėklų miltuose

Fermentacijos trukmė, val	Tirpieji baltymai, %
0	18,6±0,6 ^a
24	20,0±0,7 ^b
48	23,6±1,4 ^c
72	27,6±1,8 ^d

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±StN; a, b, c, d – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis tame pačiame stulpelyje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$).

Ši tendencija atsispindi ir kitų tyrėjų darbuose (26, 239). Baltymų pokyčiai fermentacijos metu sietini su PRB ir fermentų, esančių žaliavoje, veikla. Baltymų proteolizė gali vykti dėl kompleksiško įvairių veiksnių, tokių kaip terpės rūgštėjimas ar padidėjęs proteazių aktyvumas, poveikio (240). Proteolizės metu susiformavusios laisvosios aminorūgštys ir peptidai reikalingi pieno rūgšties bakterijų dauginimosi procesams ir organinių rūgščių sintezei. Fermentuojamos terpės pH vertės mažėjimas taip pat turi poveikį baltymų tirpumui ir polipeptidų hidrolizei (241, 242). Atlikus statistinę analizę, rasta stipri atvirkštinė priklausomybė tarp tirpiųjų baltymų kiekio ir pH vertės pokyčių lubinų sėklų miltų fermentacijos metu ($r = -0,90$; $p < 0,05$).

3.1.1.1. Lubinų sėklų baltymų funkcinių savybių pokyčiai

Atsižvelgiant į ankstesnius tyrimus ir į tai, kad, daugumos augalinių baltymų izoelektrinis taškas (pI) vidutiniškai atitinka 4,5, lubinų sėklų baltymų funkcinės savybės analizuotos naudojant baltymų suspensijas, ruoštas esant pH vėrtėms 6 ir 8 (243). Nefermentuoti ir fermentuoti pieno rūgšties bakterijomis lubinų sėklų baltymų izoliatai (LPI) ruošti naudojant šarminę ekstrakciją ir nusodinimą izoelektriniame taške. Ši baltymų išskyrimo technika leidžia užtikrinti produkte vieną didžiausių baltymų koncentracijų (apie 90 %). LPI emulsuojančios savybės įvertintos pagal rapsų aliejaus vandenyje emulsijų, kurioms ruošti naudotas lubinų sėklų baltymų izoliatas, savybes.

LPI emulsavimo aktyvumo (EA), emulsijos stabilumo (ES) ir putojimo gebos (FC) tyrimų rezultatai pateikti 3.3 lentelėje. Lubinų sėklų miltų kietafazė fermentacija pieno rūgšties bakterijomis turėjo statistiškai reikšmingos įtakos ($p < 0,05$) LPI funkcinių savybių pokyčiams. 24 valandas fermentuotas LPI, kai suspensijos pH buvo

6, turėjo 14 % didesnę EA bei 11 % didesnę ES nei kontrolė (LPI be fermentacijos). Ilgesnė fermentacijos trukmė (72 val.) neturėjo reikšmingos įtakos šių funkcinių savybių pokyčiams.

Bendru atveju, visų LPI mėginių putojimo geba didėjo, didėjant baltymų suspensijos pH vertei (nuo 6 iki 8). Kietafazė fermentacija su *Pp9* statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) padidino LPI putojimo gebą. 68 % didesnė FC, lyginant su nefermentuotu mėginiu, nustatyta 48 val. fermentuotam LPI (suspensijos pH vertė 6).

3.3 lentelė. Kietafazės fermentacijos su *Pp9* trukmės įtaka lubinų sėklų baltymų izoliato funkcinėms savybėms

Fermentacijos trukmė, val	pH vertė	Emulsavimo aktyvumas, %	Emulsijos termostabilumas, %	Putojimo geba, %
0	6	46,1±1,2 ^a	46,6±2,2 ^a	25±3,2 ^a
24		50,8±1,8 ^b	51,5±1,2 ^b	38±2,0 ^b
48		50,3±1,3 ^b	46,0±2,8 ^a	42±3,2 ^c
72		47,0±1,9 ^a	45,2±2,7 ^a	32±1,2 ^b
0	8	48,3±1,3 ^a	55,2±3,1 ^b	37±3,2 ^a
24		55,0±1,2 ^b	55,5±2,9 ^b	50±2,0 ^c
48		55,0±2,1 ^b	49,6±2,2 ^a	55±2,3 ^d
72		50,9±1,7 ^a	50,2±3,1 ^a	44±2,1 ^b

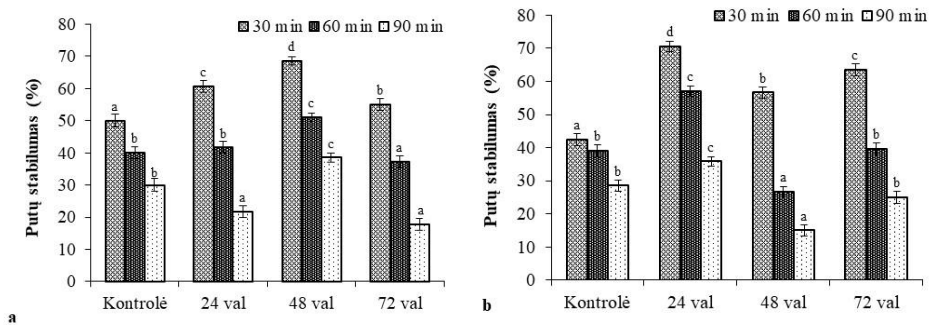
Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±StN; a, b, c, d – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis tame pačiame stulpelyje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$).

Kietafazės fermentacijos trukmės įtaka lubinų sėklų baltymų izoliatų putų stabilumui (FS) pateikta 3.1 paveiksle. FS vertintas, praėjus 30, 60 ir 90 min. nuo putų susidarymo pradžios. Lubinų sėklų miltų kietafazė fermentacija su *Pp9* statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) pagerino FS vertes. Didžiausias putų stabilumas, lyginant su pradine verte, užfiksuotas po 30 min. nuo putų susidarymo pradžios tuose LPI mėginiuose, kurie buvo fermentuoti 24 val. (suspensijos pH vertė 8) ir 48 val. (suspensijos pH vertė 6). Po 90 min. nuo putų susidarymo pradžios, 24 ir 48 val. fermentuotų LPI mėginių FS vertės, lyginant su nefermentuotais mėginiais, išliko 25,6 % (suspensijos pH vertė 8) ir 28,3 % (suspensijos pH vertė 6) didesnės.

Atlikus statistinę analizę nustatyta, kad suspensijos pH vertė turėjo reikšmingą įtaką emulsavimo aktyvumui ($F(9,099)=42,667$; $p=0,008$), emulsijos termostabilumui ($F(123,910)=169,602$; $p<0,001$), putojimo gebai ($F(276,391)=737,042$; $p<0,001$) ir putų stabilumui po 60 min. ($F(20,61)=17,65$; $p<0,001$). Fermentacijos trukmė taip pat turėjo reikšmingą įtaką prieš tai išvardintoms LPI funkcinėms savybėms (atitinkamai: $F(6,793)=31,854$; $p=0,004$; $F(33,545)=45,914$; $p<0,0001$; $F(106,391)=283,708$; $p<0,0001$; $F(174,40)=149,35$; $p<0,0001$). Nustatyta reikšminga abiejų faktorių (pH vertės ir fermentacijos trukmės) sąveikos įtaka emulsijų stabilumui ($F(5,491)=7,516$; $p<0,0001$), putojimo gebai ($F(22,47)=59,93$; $p<0,0001$), putų stabilumui po 30 min. ($F(301,22)=184,99$; $p<0,0001$), po 60 min. ($F(470,73)=403,11$; $p<0,0001$) ir po 90 min. ($F(534,34)=311,88$; $p<0,0001$).

Lubinų sėklų baltymų emulsavimo ir putojimo savybių pagerėjimas sietinas su baltymų pokyčiais augalinės žaliavos fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis metu. Veikiant mikroorganizmų išskirtiems fermentams ir susidarant organinėms rūgštims,

vyksta baltymų proteolizė ir dėl to žaliavoje padidėja tirpiųjų baltymų kiekis. Šie baltymai turi reikšmingą įtaką baltymų funkcinėms savybėms (emulsavimo, putojimo, gelių sudarymo), nes pasižymi didesniu dispersiškumu ir geresnėmis koloidinėmis savybėmis (244). Baltymų funkinių savybių pokyčiai taip pat priklauso ir nuo fermentacijos trukmės, nes per didelis baltymų hidrolizės laipsnis gali pabloginti baltymų funkcines savybes (29).



3.1 pav. Kietafazės fermentacijos su *P.pentosaceus* KTU05-9 trukmės įtaka lubinų sėklų baltymų izoliatų (suspensijos pH vertė 6 (a) ir suspensijos pH vertė 8 (b)) putų stabilumui (po 30, 60 ir 90 min. išlaikymo); Čia kontrolė – nefermentuota žaliava; *Pastaba:* a, b, c, d – vidurkiai, esant tam pačiam putų stabilumo intervalui, pažymėti skirtingomis raidėmis statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$)

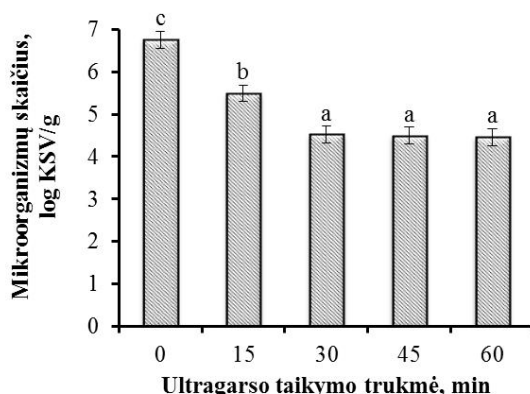
3.1.2. Ultragarso panaudojimas lubinų sėklų miltų kietafazėje fermentacijoje pieno rūgšties bakterijomis

Ruošiant fermentuotus produktus, žaliavoje jau esančios ar specialiai į ją įdėtos pieno rūgšties bakterijos ir mielės yra vyraujantys mikroorganizmai, kurie atsakingi ne tik už pageidaujamas galutinių produktų juslines savybes, bet ir už mikrobiologinę saugą (245). Pradinėje žaliavoje esanti pašalinė mikroflora gali mažinti kietafazės fermentacijos efektyvumą, todėl svarbu sudaryti kuo palankesnes sąlygas PRB vystymuisi ir kartu užtikrinti norimų metabolizmo produktų susidarymą. Ultragaras, kuris dar įvardijamas kaip aplinkai draugiška „žalioji“ technologija, galėtų būti naudinga priemonė mažinant augalinės žaliavos mikrobiologinę taršą ir pagerinant fermentacijos proceso stabilumą (246).

Apdorojimo ultragarsu trukmės įtaka mikroorganizmų skaičiui lubinų sėklų miltuose pavaizduota 3.2 pav. Po 15, 30, 45 ir 60 min. apdorojimo ultragarsu, lyginant su neapdorota žaliava, lubinų sėklų miltų mikrobiologinė tarša sumažėjo atitinkamai 18 %, 32 %, 33 % ir 34 %. Statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) didžiausias mikroorganizmų skaičiaus sumažėjimas gautas po 30 min. apdorojimo ultragarsu, todėl ši trukmė taikyta tolimesniuose tyrimuose fermentuojant lubinų sėklų miltus.

Mikrobiologinės taršos sumažėjimą lubinų miltuose galima paaiškinti tuo, kad ultragaras pažeidžia mikroorganizmų ląstelių sienelės, citoplazminę membraną, bakterijų kapsules ir viduląstelinius komponentus (118). Mikroorganizmų inaktyvacija įvyksta dėl skystoje fazėje esančių kavitacinių burbuliukų formavimosi,

augimo ir plyšimo, kuris įvyksta dėl mechaninio poveikio ir sonocheminių reakcijų (*ultragarso cheminio efekto*) (247). Atlikta nemažai mokslinių tyrimų, kuriuose analizuojamas ultragarso poveikis mikroorganizmams. Šiais tyrimais įrodyta, kad ultragaras neigiamai veikia *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *E. aerogenes*, *B. subtilis* ir mieles *Saccharomyces cerevisiae* (117, 247, 248, 249, 250). Juodeikienė ir kt. (251) nustatė, kad ultragarsinis apdorojimas sumažino *Silybum marianum* L. sėklų mikrobiologinę taršą.



3.2 pav. Apdorojimo ultragarsu trukmės įtaka mikroorganizmų skaičiui lubinų sėklų miltuose. a, b, c – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$)

3.1.2.1. PRB skaičiaus, pH vertės ir tirpiųjų baltymų kiekio pokyčiai lubinų sėklų miltų kietazės fermentacijos su *Pp9* metu

Kitame tyrimo etape tirta ultragarsu apdorotų lubinų sėklų miltų kietafazė fermentacija su *Pp9* ir vertintas PRB ląstelių dauginimasis bei pH vertės kitimas mėginiuose (žr. 3.4 lentelė). Statistiškai reikšmingi skirtumai neužfiksuoti tarp ultragarsu apdorotų ir neapdorotų lubinų sėklų miltų pH vertės ir PRB skaičiaus fermentacijos metu. Didžiausias PRB ląstelių skaičius (7,9 log KSV/g) nustatytas ultragarsu apdorotuose ir 48 val. fermentuotuose su *Pp9* lubinų sėklų miltų mėginiuose. Lyginant su neapdorotais ultragarsu mėginiais, žemesnės pH vertės fermentacijos su *Pp9* metu gautos ultragarsu paveikuose lubinų sėklų miltuose.

Nustatyta, kad apdorojimas ultragarsu statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) padidino lubinų sėklų miltuose tirpiųjų baltymų kiekį (žr. 3.5 lentelė). Taip pat nustatyta, kad ultragaras ir kietafazė fermentacija pieno rūgšties bakterijomis veikė sinergetiškai, didindama tirpiųjų baltymų kiekį lubinų sėklų miltuose. Lyginant su fermentuotais mėginiais, kuriems ultragarsinis apdorojimas nebuvo taikytas, po 72 val. fermentacijos su *Pp9*, ultragarsu apdorotuose lubinų sėklų miltuose nustatyta 27 % daugiau tirpiųjų baltymų.

3.4 lentelė. Apdorojimo ultragarsu (30 min.) įtaka PRB skaičiui ir pH vertei lubinų sėklų miltuose kietafazės fermentacijos su *Pp9* metu

Mėginys	PRB skaičius, log KSV/g	pH vertė
LM	-	5,5 ±0,2 ^c
LM + 24 val. KF	3,3±0,3 ^a	4,4±0,3 ^b
LM + 48 val. KF	7,4±0,4 ^b	3,9±0,4 ^a
LM + 72 val. KF	7,2±0,3 ^b	3,7±0,3 ^a
Ultragarsu apdoroti LM	-	5,6±0,2 ^c
Ultragarsu apdoroti LM + 24 val. KF	3,7±0,4 ^a	4,2±0,4 ^b
Ultragarsu apdoroti LM + 48 val. KF	7,9±0,3 ^b	3,6±0,3 ^a
Ultragarsu apdoroti LM + 72 val. KF	7,4±0,4 ^b	3,4±0,4 ^a

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±StN; a, b, c, d – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis tame pačiame stulpelyje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$); Čia LM – lubinų miltai, KF – kietafazė fermentacija.

3.5 lentelė. Apdorojimo ultragarsu (30 min.) įtaka tirpiųjų baltymų kiekiui nefermentuotuose ir fermentuotuose lubinų sėklų miltuose

Mėginys		Tirpieji baltymai, %
LF		20,3±0,3 ^a
Ultragarsu apdoroti LM		27,8±0,3 ^c
LM fermentacija su <i>Pp9</i>	24 val.	22,1±0,3 ^{ab}
	48 val.	24,2±0,4 ^b
	72 val.	27,2±0,4 ^c
Ultragarsu apdorotų LM fermentacija su <i>Pp9</i>	24 val.	29,0±0,4 ^{cd}
	48 val.	31,3±0,5 ^d
	72 val.	32,0±0,4 ^d

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±StN; a, b, c, d – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis tame pačiame stulpelyje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$); Čia LM – lubinų miltai, *Pp9* – *Pediococcus pentosaceus* KTU05-9.

PRB dauginimuisi reikalingos tam tikros maisto medžiagos, nes šių bakterijų galimybės sintetinti B vitaminus ir aminorūgštis yra ribotos (212). Ultragarsu paveikus fermentuojamą žaliavą, galima padidinti tirpiųjų baltymų kiekį, o tai palengvina PRB dauginimuisi reikalingų aminorūgščių prieinamumą. Tirpiųjų baltymų kiekio padidėjimas yra susijęs su baltymų molekuliniiais pokyčiais, kurie atsiranda dėl ultragarso poveikio. Mažo dažnio ultragarsas turi įtakos laisvoms sulfhidrilgrupėms, baltymų dalelių dydžiui ir paviršiaus hidrofobiškumui bei globulinei baltymo struktūrai (252). Apdorojant ultragarsu keičiasi globulinė baltymo konformacija ir struktūra, didesnis kiekis hidrofilinių aminorūgščių dalių tampa labiau prieinamos vandens molekulėms, todėl baltymų-vandens sąveika intensyvėja (241, 253). Baltymų molekulinė masė sumažėja, padidėjęs jų paviršiaus plotas gali būti prieinamas vandens molekulėms. Šiame tyrime gauti rezultatai patvirtina ir kitų tyrėjų pateikiamus duomenis apie ultragarso poveikį baltymų tirpumui. Jambrakas ir kt. (94) nustatė, kad 40 kHz ultragarsas, kuris buvo taikomas 15 min., gali padidinti išrūgų baltymo tirpumą. Sojos ir juodųjų pupelių baltymų tirpumas taip pat didėjo, didėjant ultragarso intensyvumui ir taikymo trukmei (252, 254). Baltymų tirpumo padidėjimas

yra labai svarbus maisto gamybos procesuose, nes nusako baltymų būklę ir yra glaudžiai susijęs su funkcinėmis baltymų savybėmis, tokiomis kaip putojimas ar emulsavimas (255). Šio tyrimo rezultatai taip pat leidžia manyti, kad tolimesnei proteolizės eigai įtakos gali turėti ir pH mažėjimas fermentuotoje žaliavoje bei PRB proteolitinis aktyvumas (256).

3.1.2.2. Ultragarso ir kietafazės fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis poveikis lubinų sėklų baltymų *in vitro* virškinamumui ir funkcinėms savybėms

Apdorojimas ultragarsu ir kietafazė fermentacija su *Pp9* turėjo statistiškai reikšmingą įtaką lubinų sėklų baltymų *in vitro* virškinamumui ($p < 0,05$) (žr. 3.6 lentelė). Baltymų virškinamumas apdorojant lubinų sėklų miltus ultragarsu padidėjo 12 %, o pritaikius kietafazę fermentaciją pieno rūgšties bakterijomis – 16–28 %. Ilgesnė fermentacijos trukmė nulėmė geresnį lubinų sėklų baltymų virškinamumą.

Nustatyta, kad tripsino inhibitorių aktyvumas lubinų sėklų miltuose mažėjo tiek juos fermentuojant, tiek apdorojant ultragarsu (žr. 3.6 lent.). Tripsino inhibitorių slopinimas priklausė nuo fermentacijos trukmės. Lyginant su nefermentuotais lubinų sėklų miltais, po 72 val. kietafazės fermentacijos su *Pp9*, inhibitoriaus aktyvumas buvo 60 % mažesnis. Lyginant su pradine žaliava, ultragarsu apdorotuose lubinų sėklų miltuose taip pat nustatytas 47 % mažesnis tripsino inhibitorių aktyvumas.

3.6 lentelė. Apdorojimo ultragarsu (30 min.) ir kietafazės fermentacijos su *Pp9* įtaka baltymų *in vitro* virškinamumui ir tripsino inhibitorių aktyvumui

Mėginys	Baltymų <i>in vitro</i> virškinamumas, %	Tripsino inhibitorių aktyvumas, %
LM	70,3±0,6 ^a	29,4±0,4 ^c
Ultragarsu apdoroti LM	78,9±0,7 ^b	15,7±0,7 ^b
LM fermentacija su <i>Pp9</i>	24 val.	82,1±0,6 ^b
	48 val.	88,5±0,5 ^c
	72 val.	90,2±0,7 ^c
		11,8±0,6 ^a

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±StN; Čia LM – lubinų miltai; *Pp9* – *Pediococcus pentosaceus* KTU05-9; a, b, c – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis tame pačiame stulpelyje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$).

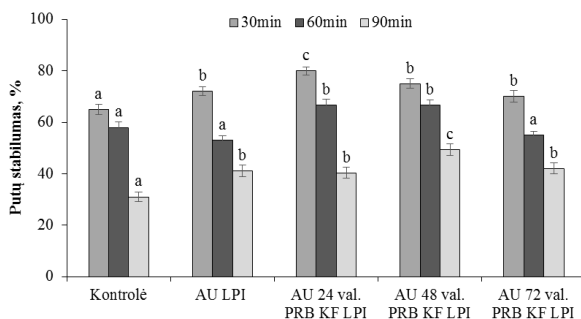
Emulsavimo ir putojimo savybių įvertinimas. Ultragarso poveikis nefermentuotų ir fermentuotų lubinų baltymų izoliatų emulsavimo savybėms ir putojimo gebai pateiktas 3.7 lentelėje. Ultragarsu apdorotų nefermentuotų lubinų sėklų baltymų emulsavimo aktyvumas (EA), emulsijos termostabilumas (ES) ir putojimo geba (FC) nustatyta atitinkamai 11 %, 12 % ir 26 % didesnė nei kontrolinio mėginio (neapdorotų ir nefermentuotų lubinų sėklų baltymų izoliato). Lubinų sėklų miltų apdorojimas ultragarsu ir tolimesnė mėginių kietafazė fermentacija pieno rūgšties bakterijomis turėjo statistiškai reikšmingą įtaką ($p < 0,05$) lubinų sėklų baltymų funkcionalumui. Lyginant su kontrole nustatyta, kad ultragarsu apdorotų ir 48 val. fermentuotų su *Pp9* lubinų sėklų baltymų EA, ES ir FC vertės buvo didesnės, atitinkamai: 21 %, 20 % ir 50 %.

Ultragarso įtaka nefermentuotų ir fermentuotų LPI putų stabilumui (FS) pavaizduota 3.3 paveiksle. Visuose mėginiuose buvo stebimas mažesnis gautų putų stabilumas saugant nuo 30 iki 90 min. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad, lyginant su kontrole, apdoroto ultragarsu nefermentuoto LPI putos po 90 min. saugojimo buvo 32 % stabilesnės. Apdorojimas ultragarsu ir tolimesnė mėginių kietafazė fermentacija su *Pp9* padidino LPI putų stabilumą, kuris priklausė ir nuo fermentacijos trukmės. Po 90 min. saugojimo, 48 val. fermentuotų LPI putos buvo 59 % stabilesnės nei kontrolinio mėginio.

3.7 lentelė. Apdorojimo ultragarsu įtaka nefermentuotų ir fermentuotų su *P. pentosaceus* KTU05-9 lubinų sėklų baltymų emulsavimo savybėms ir putojimo gebai

Mėginys	Emulsavimo aktyvumas, %	Emulsijos termostabilumas, %	Putojimo geba, %
Kontrolė	45,1±1,2 ^a	45,4±1,2 ^a	34,5±1,4 ^a
Ultragarsu apdoroti LPI	50,2±1,2 ^b	50,7±1,1 ^b	43,5±1,2 ^b
<i>Fermentuoti su Pp9</i>			
Ultragarsu apdoroti ir 24 val. KF LPI	49,3±1,2 ^b	51,1±1,1 ^b	47,1±1,1 ^c
Ultragarsu apdoroti ir 48 val. KF LPI	54,5±1,1 ^c	54,6±1,3 ^b	51,8±1,1 ^d
Ultragarsu apdoroti ir 72 val. KF LPI	50,2±1,4 ^b	49,1±1,1 ^b	47,2±1,5 ^c

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±StN; Čia kontrolė – lubinų sėklų baltymai, LPI – lubinų sėklų baltymų izoliatas, KF – kietafazė fermentacija, *Pp9* – *Pediococcus pentosaceus* KTU05-9; a, b, c, d – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis tame pačiame stulpelyje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$).



3.3 pav. Apdorojimo ultragarsu (30 min.) įtaka nefermentuotų ir fermentuotų su *P. pentosaceus* KTU05-9 lubinų baltymų putų stabilumui; Čia kontrolė – lubinų sėklų baltymai; AU – apdorojimas ultragarsu; PRB – pieno rūgšties bakterijos, KF – kietafazė fermentacija; LPI – lubinų sėklų baltymų izoliatas. *Pastaba:* a, b, c, d – vidurkiai, esant tam pačiam putų stabilumo intervalui, pažymėti skirtingomis raidėmis statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$)

Iš gautų rezultatų matyti, kad žaliavos apdorojimas ultragarsu prieš fermentaciją gali pagerinti lubinų sėklų baltymų funkcines savybes. Rezultatai patvirtina literatūroje pateikiamą informaciją apie tai, kad ultragarsas gali sukelti konformacinius pokyčius baltymo globulinėje struktūroje, aktyvuoti baltymų-

vandens sąveiką ir padidinti baltymų tirpumą (94, 246, 252). Baltymų emulsavimo ir putojimo savybės priklauso nuo hidrofobiškumo ir baltymo struktūros konformacinių kitimų. Tirpiųjų baltymų kiekis turi reikšmingą įtaką baltymų emulsavimo ir putojimo savybėms, nes palaiko riebalų lašelių struktūrą ir stabilizuoja jų pasiskirstymą (220). Atlikta nemažai tyrimų, kuriuose analizuojama ultragarso įtaka augalinės kilmės baltymų funkcinėms savybėms, tokioms kaip putojimas, gebėjimas formuoti gelius, vandens surišimas ir emulsavimas. Hao ir kt. (254) nustatė, kad žemo dažnio ultragarsas padidino sojų baltymų izoliato laisvųjų sulfhidrilogrupių kiekį, paviršiaus hidrofobiškumą ir baltymų tirpumą. Jambrakas ir kt. (100) nustatė, kad 20 kHz ultragarsas padidino sojų baltymų tirpumą ir emulsavimo aktyvumą bei turėjo įtakos specifiniam laidumui. O’Sullivanas ir kt. (257) analizavo ultragarso įtaką gyvūninės ir augalinės kilmės baltymų emulsavimo savybėms ir nustatė, kad, lyginant su ultragarsu neapdorotais mėginiais, ultragarsu paveiktos kiaušinio ir žirnių baltymų emulsijos pasižymėjo mažesniu lašelių dydžiu.

Gelių susidarymo vertinimas. Norint įvertinti lubinų baltymų kiekio įtaką gelio susiformavimui, buvo paruošti skirtingų koncentracijų baltymų tirpalai (žr. 3.8 lentelė). Nustatyta, kad geliui sudaryti reikalinga mažesnė fermentuotų lubinų baltymų koncentracija (16 %) nei nefermentuotų (20 %). Tai sietina su padidėjusiu tirpiųjų baltymų kiekiu fermentacijos metu. Dėl PRB proteolitinio aktyvumo ir pH vertės pokyčių susidaro mažesni baltymų ar peptidų fragmentai, palengvinantys gelių struktūros formavimąsi. Didinant LPI kiekį iki 28 % ir daugiau, gelis nebesiformavo, nes vandens kiekis buvo pakankamas baltymų hidratacijai.

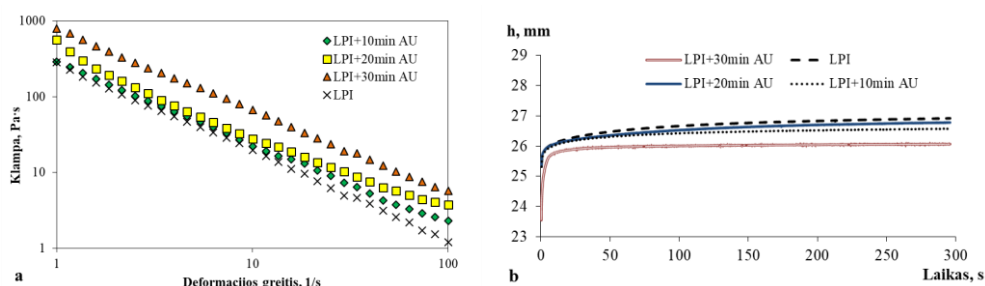
3.8 lentelė. Baltymų kiekio įtaka gelio formavimuisi

Baltymų kiekis, %	Gelio formavimasis*	
	Nefermentuotas LPI	Fermentuotas LPI
8	-	-
12	-	-
16	-	+
20	+	+
24	+	+
28	+	+
32	-	-
36	-	-

*Vertinama vizualiai: apvertus mėgintuvėlį, tirpalas neturi ištekti; LPI – lubinų sėklų baltymų izoliatas; „+“ – gelis susiformavo; „-“ – gelis nesiformavo.

Kitame etape nustatyta apdorojimo ultragarsu įtaka LPI gelio savybėms. Gelių klampa įvertinta dviem metodais – reometru (žr. 3.9 pav., a) ir akustiniu matuokliu (žr. 3.9 pav., b). Gauti rezultatai parodė, kad apdorojimas ultragarsu padidino LPI gelio klampą. Didžiausia klampa pasižymėjo 30 min. ultragarsu apdoroti LPI, tačiau trumpesnė apdorojimo trukmė (10 ir 20 min.), lyginant su neapdorotu LPI, neturėjo reikšmingos įtakos gelių klampai. Šias tendencijas patvirtina ir akustiniu matuokliu gautos klamos kreivės. Mažiausias plunžerio kritimo atstumas „h“ gautas 30 min. ultragarsu apdorotam LPI mėginiui, kas leidžia teigti, kad šio mėginio klampa buvo didesnė nei kitų LPI mėginių.

Šiuos rezultatus patvirtina ir kitų mokslininkų tyrimai, kurių metu nustatytas teigiamas ultragarso poveikis baltymų savybėms formuoti gelius. Didelio intensyvumo ultragaras turėjo įtakos kazeino gelių tvirtumui, stiprumui, geliacijos temperatūrai ir sinerezei (258, 259). Ultragaras pagerino sojų baltymų gelių, formuotų naudojant Ca^{+2} jonus, organines rūgštis ir transgliutaminazės fermentą, savybes (254, 260, 261, 262). Gelio tvirtumas ir didesnė klampa ultrgarsu paveiktuose mėginiuose siejama su tuo, kad apdorojimas ultrgarsu sumažina baltymų dalelių dydį, todėl formuojasi homogeniškesnė ir tvirtesnė gelio struktūra. Homogeniškesnė struktūra sumažina vandens atpalaidavimo galimybę. Taip pat ultragaras gali sukelti polipeptidinės grandinės laisvųjų –SH ir kitų hidrofilinių grupių lokalizaciją baltymo molekulės paviršiuje, todėl susidaro daugiau tarp molekulinų ryšių ir formuojasi tvirtesnės tekstūros gelis (103).



3.4 pav. Klampos priklausomybė nuo poslinkio greičio LPI geliuose, taikant skirtingą apdorojimo ultrgarsu trukmę (a). Ultrgarsu apdorotų LPI gelių klampos kreivės, gautos akustiniu matuokliu (b); Čia LPI – lubinų sėklų baltymų izoliatas, AU – apdorojimas ultrgarsu

3.1.3. Apdorotų ultrgarsu ir fermentuotų pieno rūgšties bakterijomis lubinų sėklų miltų panaudojimo galimybės kvietinės duonos ruošimui

Norint padidinti produkto maistinę vertę, kvietiniai miltai gali būti maišomi su kitų javų ar sėklų miltais. Kepiniai iš įvairių rūšių miltų mišinio dažniausiai turi didesnę baltymų kiekį bei geriau subalansuotą aminorūgščių sudėtį, kurią praturtina ankštinių javų sėklose esantis lizinas (136). Fermentuojant ankštinių javų sėklas pieno rūgšties bakterijomis, joms suteikiamas naujas skonis, aromatas bei pagerinamas baltymų įsisavinamumas (232). Tokių fermentuotų priedų panaudojimas duonos gamyboje pagerina galutinio gaminio fitocheminę sudėtį ir juslines savybes, tačiau sąlygoja tam tikrus technologinius pokyčius, kurie keičia tešlos reologines savybes. Javų-ankštinių javų sėklų miltų mišiniai skirti pyragams, sausainiams, tortilijoms gaminti (136). Lubinų sėklų miltai, kaip funkcinis priedas, turintis didelį baltymų bei skaidulinių medžiagų kiekį, gali būti naudojami pridėtinės vertės produktams gaminti. Be to, būtų ypač naudinga taikyti PRB fermentaciją, kuri leistų sumažinti antitumorigeninius faktorius žaliavoje bei padidinti baltyminių medžiagų pasisavinimą.

Naudojant fermentuotus produktus duonos gamybai, fermentų aktyvumas yra svarbus rodiklis, nulemiantis technologinio proceso eigą ir galutinio gaminio kokybę

(263). Amilolitinių ir proteolitinių fermentų poveikis pasireiškia glitimo ir krakmolo polimerų struktūros keitimu. Suintensyvėjęs α -amilazės aktyvumas nulemia lipnią minkštimo tekstūrą ir netaisyklingą kepinio formą (264). Pernelyg aktyvi proteazių veikla gali padidinti tirpiųjų baltymų kiekį ir susilpninti glitimo struktūrą, dėl ko gali atsirasti nepageidaujami kepinų tekstūros pokyčiai (265). Atsižvelgiant į tai reikia, kad fermentų veikla būtų kontroliuojama, todėl kitame tyrimų etape įvertintas ultragarso poveikis lubinų sėklų miltų fermentiniam aktyvumui.

Proteolitinio, amilolitinio ir ksilanolitinio aktyvumų pokyčiai nefermentuotuose ir fermentuotuose (48 val., su *Pp9*) lubinų sėklų miltuose, esant skirtingai apdorojimo ultragarsu trukmei, pateikti 3.9 lentelėje. *Pp9* fermentacijos metu proteolitinis, amilolitinis ir ksilanolitinis aktyvumai padidėjo atitinkamai: 64, 136 ir 12 kartų, lyginant su nefermentuotais miltais. Gauta, kad didinant apdorojimo ultragarsu trukmę, fermentų aktyvumas statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjo tiek nefermentuotuose, tiek fermentuotuose lubinų sėklų miltuose. Apdorojant ultragarsu fermentuotus su *Pp9* mėginius nuo 10 iki 20 min., fermentų aktyvumas sumažėjo 17–31 % (proteolitinis), 18–40 % (amilolitinis) ir 3–8 % (ksilanolitinis).

3.9 lentelė. Apdorojimo ultragarsu trukmės įtaka fermentų aktyvumui fermentuotuose lubinų sėklų miltuose

Mėginiai	Proteolitinis aktyvumas, PU/g	Amilolitinis aktyvumas, AV/g	Ksilanolitinis aktyvumas AV/g
LM	2,1±1,2 ^b	2,6±0,9 ^b	2,1±0,4 ^b
LM + 10 min. AU	1,5±0,3 ^a	0,9±0,4 ^a	0,4±0,5 ^a
LM + 15 min. AU	-	-	-
LM + 20 min. AU	-	-	-
LM + KF	135,1±1,1 ^f	354,5±4,3 ^f	24,5±1,1 ^d
LM + KF + 10 min. AU	112,5±1,5 ^e	289,2±3,1 ^e	23,8±0,4 ^d
LM + KF + 15 min. AU	102,1±1,4 ^d	265,9±5,6 ^d	22,9±0,3 ^c
LM + KF + 20 min. AU	92,7±1,7 ^c	211,1±4,4 ^c	22,6±0,3 ^c

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės $\pm$ StN; Čia LM – lubinų miltais, KF – kietafazė fermentacija; AU – apdorojimas ultragarsu; a, b, c, d, e, f – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis tame pačiame stulpelyje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$).

Ultragaras sukelia konformacinius pokyčius baltymo struktūroje, pakeičia fermentų aktyvumą ir sąveiką su substratu (118). Fermentų aktyvacijai ar inhibicijai įtakos gali turėti ultragarso intensyvumas ir dažnis: mažo intensyvumo ultragaras gali padidinti fermentų veiklos aktyvumą ir priešingai – jei intensyvumas didelis, ultragaras gali sukelti molekulės denatūraciją dėl kavitacijos proceso (266, 267). Tai patvirtina ir šio tyrimo rezultatai, nes fermentų aktyvumas lubinų sėklų miltuose buvo sumažintas juos apdorojus didelio intensyvumo ultragarsu. Panašias tendencijas gavo ir kiti tyrėjai. Kadkhodaei ir Povey (268) pastebėjo, kad termoapdorojimas ultragarsu sumažina α -amilazės aktyvumą. Oliveira ir kt. (269) analizavo žemo dažnio ultragarso poveikį įvairioms α -amilazėms, kurios buvo išskirtos iš skirtingų mikroorganizmų. Nustatyta, kad ultragaras inaktyvavo α -amilazės iš *Aspergillus oryzae* ir *Bacillus amyloliquefaciens*, o α -amilazių, išgautų iš kitų mikroorganizmų, aktyvumas kito intervale nuo –44 % iki +1657 %. Kitų tyrimų metu nustatyta, kad ultragaras ir jo

taikymas kartu su kitais metodais turėjo įtakos lipazių, proteazių, lipoksigenazių ir peroksidazių aktyvumo mažėjimui (123, 270).

3.1.3.1. Duonos su lubinų sėklų miltų priedais kokybė

Gaminant grūdinių javų-ankštinių javų sėklų mišinio duoną, lubinų sėklų miltų priedo kiekis ir fermentacija yra svarbūs faktoriai, galintys turėti įtakos galutinei kepinio kokybei ir priimtinumui. Kvietinės duonos su nefermentuotu ir fermentuotu lubinų sėklų miltų priedu kokybės rodikliai pateikti 3.10 lentelėje. Atlikus statistinę analizę nustatyta, kad lubinų sėklų miltų priedas (nefermentuotas ir fermentuotas) bei priedo kiekis (3 g/100 g ir 6 g/100 g) turėjo statistiškai reikšmingą ($p < 0,0001$) įtaką duonos tekstūros rodikliams. Nustatyta reikšminga abiejų faktorių (priedo rūšies ir kiekio) sąveikos įtaka savitajam tūriui ($F(12,62)=0,05$; $p < 0,0001$), minkštimo aktyvumui ($F(41,49)=61,00$; $p < 0,0001$), kietumui ($F(31,24)=12,36$; $p < 0,0001$), kramtomumui ($F(653,67)=8,89$; $p < 0,0001$) ir tamprumui ($F(5,22)=0,01$; $p < 0,0001$).

3.10 lentelė. Nefermentuoto (NLM) ir fermentuoto (FLM) lubinų sėklų miltų priedo įtaka kvietinės duonos kokybės rodikliams

Rodikliai	Kontrolė	Duona su NLM		Duona su FLM	
		3 g/100 g	6 g/100 g	3 g/100 g	6 g/100 g
Tekstūros					
Specifinis tūris (cm ³ /g)	2,56±0,02 ^a	2,55±0,02 ^a	2,54±0,02 ^a	2,63±0,03 ^b	2,80±0,02 ^c
Minkštimo akytumas, %	47±1,3 ^b	42±1,1 ^a	45±1,3 ^b	51±0,9 ^c	54±0,9 ^d
Kietumas, N	5,90±0,02 ^c	7,90±0,01 ^e	6,90±0,02 ^d	3,20±0,01 ^a	5,50±0,02 ^b
Elastingumas	0,91±0,06 ^a	0,95±0,05 ^{ab}	0,95±0,04 ^{ab}	0,96±0,03 ^{ab}	0,98±0,03 ^b
Kramtomumas, N	4,09±0,02 ^b	5,40±0,02 ^d	4,80±0,01 ^c	2,20±0,01 ^a	4,30±0,02 ^b
Tamprumas	0,42±0,04 ^a	0,47±0,01 ^a	0,44±0,03 ^a	0,51±0,02 ^b	0,53±0,01 ^b
Jusliniai					
Spalva	4,5±0,7 ^a	5,0±0,4 ^a	5,2±0,2 ^a	5,9±0,4 ^b	6,1±0,5 ^b
Kvapas	5,0±0,3 ^a	5,1±0,2 ^a	5,1±0,2 ^a	5,7±0,3 ^b	5,9±0,3 ^b
Skonis	5,2±0,3 ^a	5,1±0,5 ^a	5,1±0,5 ^a	6,1±0,3 ^b	6,5±0,4 ^b
Rūgštingumas	4,7±0,4 ^a	5,1±0,3 ^a	5,1±0,2 ^a	5,8±0,3 ^b	6,0±0,3 ^b
Priimtinumas	5,0±0,5 ^a	5,2±0,3 ^a	4,8±0,7 ^a	5,9±0,2 ^b	5,3±0,2 ^a

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±StN; a, b, c, d, e, f – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis toje pačioje eilutėje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$); Čia kontrolė – kvietinė duona be lubinų sėklų miltų priedo; NLM – nefermentuotų lubinų sėklų miltų priedas, FLM – fermentuotų lubinų sėklų miltų priedas.

Vertinant ryšį tarp duonos tekstūros rodiklių ir lubinų sėklų baltymų funkcinį savybių matoma, kad pagerėjusios fermentuoto LPI funkcinės savybės (emulsijos aktyvumas, putojimo geba, putų stabilumas) turėjo įtakos duonos specifinio tūrio, minkštimo aktyvumo, elastingumo ir tamprumo reikšmių padidėjimui, kietumo sumažėjimui bei kramtomumo padidėjimui.

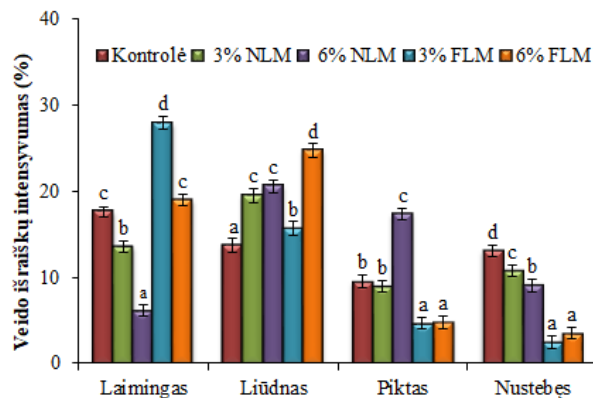
Fermentuotas lubinų sėklų miltų priedas ~12 % padidino duonos aktyvumą ir ~7 % – specifinį tūrį, tačiau ~27 % sumažino duonos kietumą bei 46 % padidino kramtomumą, lyginant su kontroline duona. Nefermentuotų lubinų sėklų miltų priedas turėjo kitokią įtaką duonos kokybei nei fermentuotas: tiriamųjų kepinų kietumas padidėjo ~26 %, o kramtomumas sumažėjo ~23 %; minkštimo aktyvumas, lyginant su kontroline duona, sumažėjo 11 %.

Kitų autorių tyrimais nustatyta, kad kvietinių miltų dalies pakeitimas lubinų miltais ar baltymų izoliatu gali turėti įtakos tešlos reologinėms savybėms ir galutinio produkto kokybei – tūriui, kepinio vidinei struktūrai bei tekstūrai (223). Tešlos reologinės savybės, nuo kurių priklauso produkto kokybė, keičiasi dėl glitimo kiekio sumažėjimo tešloje, kuris atsiranda dalį kvietinių miltų pakeitus kitomis baltyminėmis medžiagomis, neturinčiomis ar turinčiomis mažiau glitimo. Tokiems pokyčiams labiausiai įtakos turi ankštinių javų sėklų priedo kiekis. Doxastakio ir kt. (271) tyrimas parodė, kad 5 % lubinų priedas pagerino tešlos reologines savybes, tačiau, didinant priedo kiekį kepinio receptūroje, gali būti pasiektas priešingas efektas. Kvietinių-ankštinių javų sėklų miltų tešla turi didesnę vandens absorbciją ir mažesnę stabilumą (272). Stabilesnis dujų susidarymas kvietinėje tešloje gali būti gautas panaudojus lubinų baltymus, nors pastarieji nėra tokie elastingi kaip kviečių glitimas ir sąlygoja mažiau akyto minkštimo susidarymą (273). Šio tyrimo rezultatai parodė, kad lubinų sėklų miltų fermentacija pieno rūgšties bakterijomis turi teigiamą įtaką kvietinės duonos kokybei. Baltymų funkcinių savybių pokyčiai, kurie yra svarbūs tešlos vandens absorbcijos didinimui, didžiąja dalimi yra nulemti pH kitimo fermentacijos metu (274). FLM turi geresnes funkcines savybes, stiprina tešlos glitimo tinklą ir sumažina tikimybę praskysti kepinų ruošiniams kildinimo metu, dėl ko susiformuoja didesnio akytumo minkštimas. FLM sumažina duonos minkštimo kietumą bei turėjo kitokią įtaką tekstūros savybėms nei nefermentuotas priedas, o tai labiausiai sietina su fermentacijos metu vykstančiais rūgštingumo bei baltymų pokyčiais.

Juslinė analizė. Duonos su LM priedu juslinės savybės vertintos tradiciniu metodu ir „FaceReader“ programine įranga. Kvietinės duonos su lubinų sėklų miltų priedu juslinės analizės rezultatai pateikti 3.10 lentelėje. Atlikus statistinę analizę nustatyta, kad lubinų sėklų miltų priedo rūšis (nefermentuotas ir fermentuotas) bei priedo kiekis (3 g/100 g ir 6 g/100 g) turėjo statistiškai reikšmingą ($p < 0,0001$) įtaką duonos jusliniams rodikliams. Nustatyta reikšminga abiejų faktorių (priedo rūšies ir kiekio) sąveikos įtaka plutos spalvai ($F(20,27)=0,74$; $p < 0,0001$), kvapui ($F(31,20)=0,52$; $p < 0,0001$), skoniui ($F(78,0)=1,56$; $p < 0,0001$), rūgštingumui ($F(33,50)=0,67$; $p < 0,0001$) ir priimtinumui ($F(36,75)=0,49$; $p < 0,0001$). 6 g/100 g FLM priedo turinti duona pasižymėjo intensyviausia spalva, kvapu, skoniu ir rūgštingumu. Kepinys su mažesniu FLM kiekiu (3 g/100 g) buvo priimtinesnis vartotojams. Vertinant tiriamos duonos su lubinų sėklų miltų priedu juslinių rodiklių ir lubinų sėklų baltymų funkcinių savybių ryšį galima teigti, jog tirti jusliniai rodikliai buvo intensyvesni, kai fermentuotas LPI pasižymėjo didesniu emulsijos aktyvumu, putojimo geba bei putų stabilumu. Duona su FLM pasižymėjo tamsesne plutos spalva nei kontrolinė duona. Šiuos pokyčius galima paaiškinti tuo, kad, dėl padidėjusio amilazių ir proteazių aktyvumo lubinų sėklų miltų fermentacijos su PRB metu, fermentuotuose produktuose susidarė didesni redukuojančių cukrų ir tirpiųjų baltymų kiekiai (275). LM fermentacijos metu, endogeninės proteazės hidrolizuoja baltymus iki aminorūgščių ir smulkių peptidų, kurie yra skonio ir kvapo junginių pirmtakai. Dėl šių procesų, taip pat ir organinių rūgščių susidarymo lubinų fermentacijos metu, duona su FLM priedu pasižymėjo stipresniu skoniu, aromatu ir rūgštingumu, lyginant su kontroliniu mėginiu ir duona, ruošta su nefermentuotais LM.

Tradiciniai juslinės analizės metodai, naudojami įvairiems maisto produktams vertinti dar prieš jiems patenkant į rinką, dažnai nėra pakankamai objektyvūs, norint sužinoti gaminio priimtinumą vartotojui (225). Šie metodai yra paremti sąmoningu ir racionaliu sprendimų priėmimo procesu. Tačiau produktų priimtumas / tinkamumas realiame gyvenime dažniausiai yra nulemtas nevalingo pasirinkimo. Todėl vartotojų emocijų intensyvumo matavimas, vertinant naujus produktus, gali būti perspektyvus metodas, leidžiantis praplėsti gaminių analizės ribas ir įvertinti ryšį tarp vartotojo emocijų ir produkto priimtumo.

„FaceReader“ programine įranga fiksuoti vertintojų veido išraiškų intensyvumai valgant tiriamąją duoną pateikti 3.5 paveiksle. Atlikus statistinę analizę nustatyta, kad LM priedo rūšis (nefermentuotas ir fermentuotas) bei priedo kiekis (3 g/100 g ir 6 g/100 g) turėjo statistiškai reikšmingą ($p < 0,0001$) įtaką veido išraiškų intensyvumui. Nustatyta reikšminga abiejų faktorių (priedo rūšies ir kiekio) sąveikos įtaka išraiškoms „laimingas“ ($F(201,43)=94,01$; $p < 0,0001$), „liūdnas“ ($F(54,10)=23,41$; $p < 0,0001$), „piktas“ ($F(218,12)=60,83$; $p < 0,0001$) ir „nustebęs“ ($F(36,20)=26,19$; $p < 0,0001$).



3.5 pav. Veido išraiškų intensyvumai fiksuoti „Facereader“ programine įranga vertinant duoną su fermentuotu ir nefermentuotu lubinų sėklų miltų priedu; Čia kontrolė – kvietinė duona be lubinų sėklų miltų priedo; NLM – nefermentuoti lubinų sėklų miltai, FLM – fermentuoti lubinų sėklų miltai. *Pastaba:* a, b, c, d – vidurkiaiai, esant tai pačiai veido išraiškai, pažymėti skirtingomis raidėmis statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$)

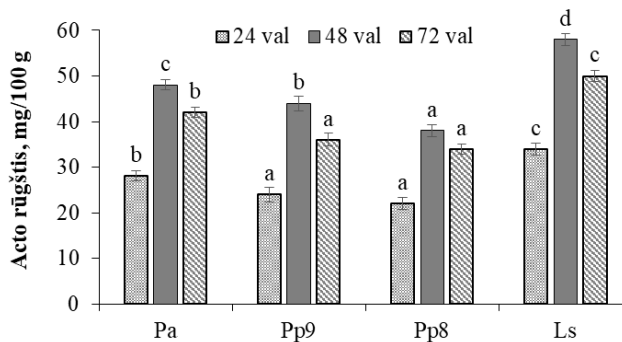
Veido išraiška „laimingas“ buvo intensyviausia analizuojant tuos mėginius, kurie pagal juslinės analizės testą vertintojams buvo priimtinausi. Tiriamųjų mėginių su 3 % ir 6 % FLM priedu sukeltos veido išraiškos „laimingas“ intensyvumas buvo vidutiniškai 2,3 karto didesnis nei vertinant duoną su nefermentuotais LM priedais. Veido išraiškų „piktas“ ir „nustebęs“ intensyvumas, vertinant duoną su 3 % ir 6 % NLM priedu, užfiksuotas atitinkamai 2,6 ir 3,3 karto didesnis nei duonos su fermentuotu lubinų sėklų miltų priedu. Nustatyta teigiama priklausomybė tarp išraiškos „laimingas“ ir kepinio priimtumo ($r = 0,73$; $p < 0,05$) bei neigiama

priklausomybė tarp išraiškos „liūdnas“ ir kepinio priimtino (r = -0,58; p < 0,05). Gauti rezultatai rodo, kad emocijų analizavimo programinės įrangos taikymas kepinų priimtino vertinimui gali būti svarbi priemonė norint gauti papildomos informacijos apie vartotojų pojūčius ir taip praplėsti juslinio vertinimo ribas.

3.2. Biodujų gamybos iš lubinų sėklų biomasės

Lubinų sėklų perdirbimo metu susidarę dideli kiekiai lignoceliuliozinės biomasės gali būti substratu kitiems vertingiems produktams gaminti. Didžiąją dalį biomasės sudaro sudėtiniai angliavandeniai, kuriuos bioprosesų metu mikroorganizmai gali panaudoti biodujų ar pieno rūgšties gamybai. Biodujos, kurios tampa vis svarbesniu atsinaujinačios energijos šaltiniu, gaminamos anaerobiniu būdu skaidant įvairius substratus, turinčius angliavandenių, riebalų ir baltymų. Substrato skaidymo metu visi proceso etapai vyksta viename bioreaktoriuje. Tokios sistemos efektyvumas gali sumažėti, nes dažniausiai substrate yra didelis kiekis organinių junginių, kurie gali turėti įtakos mikroorganizmų veiklai, hidrolizės ir sintezės procesų greičiui. Siekiant efektyvesnio biodujų susidarymo ir didesnės metano išeigos, proceso išskirstymas į keletą etapų galėtų suteikti praktinės naudos. Pienarūgštės fermentacijos metu susidaro organinės rūgštys, riebalų rūgštys, mažos molekulinės masės peptidai ir anglies dioksidas. Visi šie junginiai gali toliau dalyvauti metagenezės procese ir padidinti metano išeigą. Atsižvelgiant į tai, svarbu įvertinti kelių etapų biodujų gamybos iš lubinų sėklų biomasės efektyvumą.

PRB fermentacijos sąlygų parinkimas acetogenezės etapui. Lakiosios rūgštys yra svarbios biodujų susidarymo procese, todėl šiuo tyrimu parinkta PRB padermė, intensyviausiai produkuojanti lakiąsias rūgštis hidrolizuotoje lubinų sėklų biomasėje (žr. 3.6 pav.). Nustatyta, kad PRB padermė ir fermentacijos trukmė turėjo reikšmingą įtaką acto rūgščiai susidaryti.

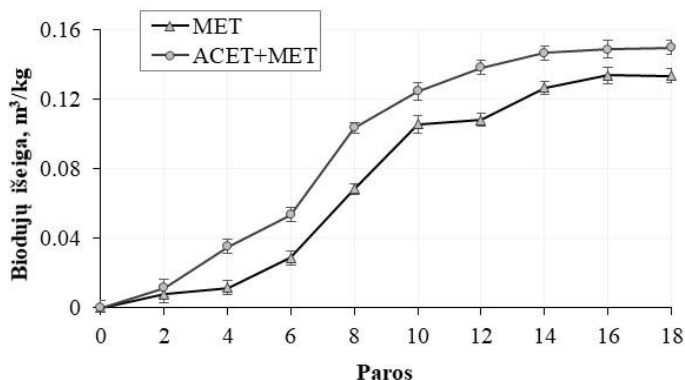


3.6 pav. Įvairių PRB padermių įtaka acto rūgšties susidarymui lubinų sėklų biomasės fermentacijos metu. Čia: Pa – *P. acidilactici* KTU05-7; Pp9 – *P. pentosaceus* KTU05-9; Pp8 – *P. pentosaceus* KTU05-8; Ls – *L. sakei* KTU05-6. Pastaba: a, b, c, d – vidurkiai, esant tai pačiai fermentacijos trukmei, pažymėti skirtingomis raidėmis statistiškai reikšmingai skiriasi (p < 0,05)

Rezultatai rodo, kad efektyviausiai acto rūgštis susidarė po 48 val. PRB fermentacijos. Tuo metu daugiausia acto rūgšties nustatyta *L. sakei* KTU05-6 (*Ls*) fermentuotoje biomasėje (58 mg/100 g), o mažiausia – fermentacijos su *P.*

pentosaceus KTU05-8 (Pp8) metu (38 mg/100 g). *P. acidilactici* KTU05-7 ir *P. pentosaceus* KTU05-9 (Pp9) fermentuotoje lubinų terpėje nustatyta, atitinkamai 17 ir 24 % mažiau acto rūgšties, lyginant su *L.sakei* KTU05-6. Ilgesnė PRB fermentacija (> 48 val.) sumažino acto rūgšties susidarymą vidutiniškai 14 % visose fermentacijos terpėse. Pagal gautus duomenimis, acetogenezės etape lubinų sėklų biomasei apdoroti pasirinkta 48 val. fermentacija su *Ls*.

Biodujų susidarymas ir sudėtis. Biodujų gamybos iš lubinų sėklų biomasės rezultatai taikant skirtingas technologines schemas pateikti 3.7 pav. Iš biodujų susidarymo kreivių matyti, kad vienpakopio ir dvipakopio proceso metu susidarė atitinkamai: 0,135 ir 0,150 m³/kg biodujų, t. y., lyginant su vienpakopiu. Vidutiniškai 11 % didesnis biodujų kiekis susidarė dvipakopio anaerobinio skaidymo metu, taikant acetogenezę prieš metanogenezę. Tuščiame mėginyje, kuris ruoštas tik su dumbly be substrato, biodujų gamyba buvo 0,02 m³/kg ir tai rodo, kad tyrimui naudotas dumblys gali pats gaminti tam tikrą biodujų kiekį. Intensyvesnis biodujų susidarymas buvo mėginiuose po 6-os anaerobinio skaidymo dienos. Biodujų kiekis palaipsniui didėjo visuose mėginiuose, tačiau stabilizavosi skirtingu metu: po 14-os dienos – taikant dvipakopį, o po 16-os – vienpakopį procesą.



3.7 pav. Biodujų išeigos iš lubinų sėklų biomasės priklausomybė nuo anaerobinio skaidymo dienų skaičiaus, taikant įvairias technologines schemas. Čia MET – vienpakopis procesas (metanogenezė), ACET+MET – dvipakopis procesas (acetogenezė ir metanogenezė).

Vertinant biodujų sudėtį anaerobinio skaidymo pabaigoje nustatyta, kad 26 % daugiau metano susidarė taikant kartu acetogenezės ir metanogenezės procesus (žr. 3.11 lent.). Vienpakopio ir dvipakopio skaidymo metu gautas CO₂ kiekis buvo atitinkamai: 8,2 ir 4,5 %, o H₂S –190 ir 170 ppm, todėl galima teigti, kad didesnis metano grynumas gali būti gautas taikant dviejų pakopų technologinę schemą.

3.11 lentelė. Technologinės biodujų gamybos schemos įtaka biodujų sudėčiai

Sudėtis, %	MET	ACET+MET	TM
METANAS	54±2,2 ^b	68±3,1 ^c	18±2,8 ^a
CO₂	8,2±1,3 ^b	4,5±1,1 ^a	3,1±1,5 ^a
H₂S (ppm)	190±4,5 ^c	170±4,9 ^b	25±2,3 ^a
Kiti komponentai	37,8 ^b	27,5 ^a	78,9 ^c

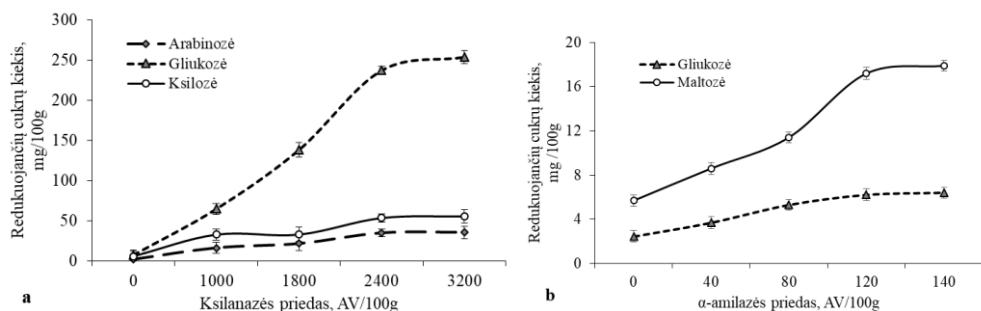
Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės $\pm$ StN; Čia MET – viapakopis procesas (metanogenezė), ACET+MET – dvapakopis procesas (acetogenezė ir metanogenezė), TM – mėginys be substrato (lubinų sėklų biomasės). a, b, c, – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis toje pačioje eilutėje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$).

Atlikti tyrimai leidžia teigti, kad lignoceliuliozinė lubinų sėklų biomasė, sudėtyje turinti didelį kiekį angliavandenių, gali būti tinkamas substratas biodujoms gaminti. Taikant dviejų etapų biodujų išgavimo technologinę schemą, kai acetogenezės etape vyksta substrato fermentacija su PRB, galima gauti efektyvesnę metano gamybą anaerobinio procesų metu. Biodujų išgavimas yra kompleksinis procesas, reikalaujantis subalansuoto sudėtinių etapų vyksmo. Proceso kinetiką apibrėžti sudėtinga, nes substrato junginių hidrolizė priklauso nuo daugelio skirtingų parametrų: substrato dalelių dydžio, fermentų aktyvumo, temperatūros ir pH vertės. Pritaikius fermentaciją su PRB dar acetogenezės etapo metu, galima palengvinti substrato hidrolizę, lengviau kontroliuoti pH, intensyvinti lakiųjų rūgščių susidarymą acidogenezės metu bei sutrumpinti metano gamybos trukmę.

3.3. Pieno rūgšties gamyba iš lubinų sėklų biomasės

Fermentinė pieno rūgšties gamyba turi daugiau privalumų nei cheminė sintezė, nes jos metu galima naudoti atsinaujinančios energijos šaltinius bei gauti optiškai grynus pieno rūgšties streoizomerus (188). Fermentinei PR gamybai gali būti naudojami įvairūs substratai, kurių sudėtyje yra didelis kiekis fermentuojamų angliavandenių. Dažniausiai tokiais substratais gali būti išrūgos, melasa, krakmolo produktai ir lignoceliuliozinės medžiagos.

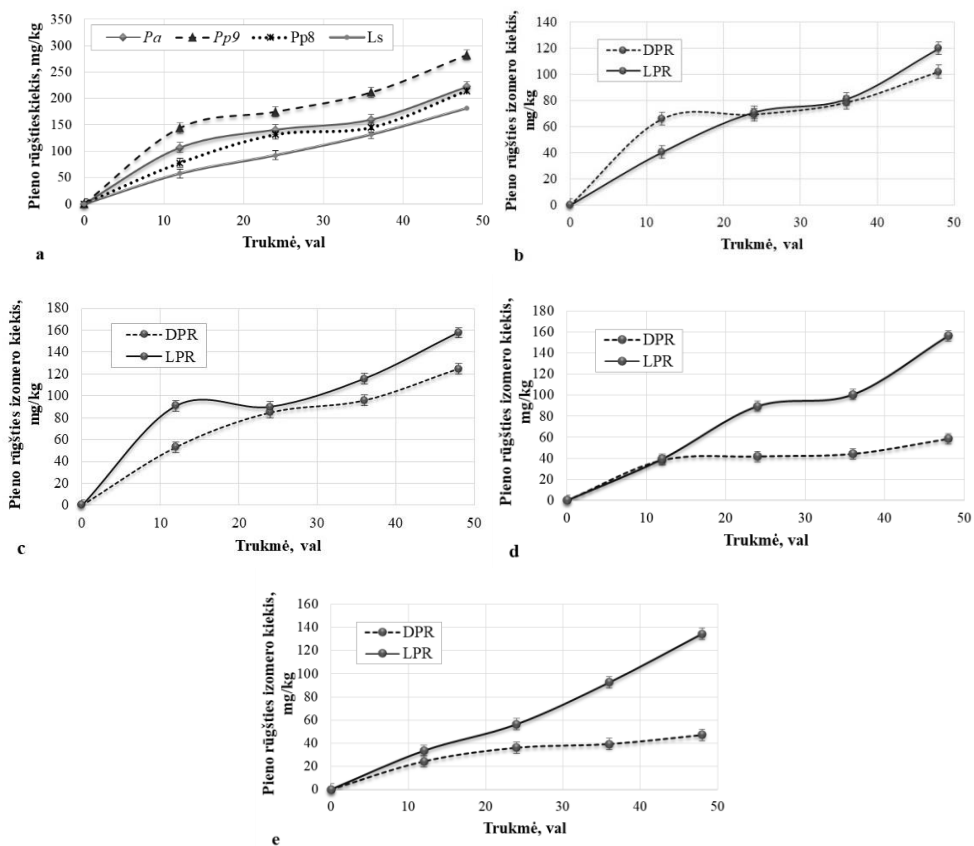
Lubinų sėklų biomasės hidrolizė amilolitiniais ir ksilanolitiniais fermentais prieš fermentaciją su PRB gali padidinti fermentuojamų sacharidų kiekį bei gerinti fermentacijos efektyvumą. Šioje tyrimų dalyje tirta lubinų sėklų biomasės polisacharidų hidrolizei naudotų fermentinių preparatų įtaka redukuojančių cukrų kiekiui (žr. 3.7 pav.). Fermentinės hidrolizės metu lubinų biomasėje, lyginant su nehidrolizuotu mėginiu, daugiausia gliukozės susidarė naudojant 2400 AV ksilanazės (žr. 3.7 pav., a). Šiuo atveju ksilozės ir arabinozės susidarė atitinkamai 9 ir 18 kartų daugiau nei be polisacharidų hidrolizės. Taip pat nustatyta, kad lubinų biomasėje, fermentuotoje su 120 AV bakterine α -amilaze, gliukozės ir maltozės susidarė atitinkamai 2,5 ir 3 kartais daugiau, palyginus su nehidrolizuotu mėginiu (žr. 3.7 pav., b). Didesnis šių fermentų aktyvumas neturėjo reikšmingos įtakos tolimesniam monosacharidų susidarymui.



3.7 pav. Ksilanazės (a) ir amilazės (b) priedo įtaka redukuojantiems cukrums susidaryti lubinų sėklų biomasėje

Pieno rūgšties susidarymo lubinų sėklų biomasėje priklausomybė nuo fermentacijos trukmės ir naudotų PRB padermių parodyta 3.8 paveikslo a dalyje. PR susidarymas didėjo, ilgėjant fermentacijos trukmei. Fermentacijos metu gautas PR kiekis buvo 182–282 mg/kg. Lyginant su kitomis PRB padermėmis, vidutiniškai 38 % didesnis PR kiekis (282 mg/kg) susidarė fermentuotoje su *P. pentosaceus* KTU05-9 lubinų sėklų biomasėje (žr. 8 pav., a). Pasirinktos PRB padermės fermentacijos metu gamino L(+)- ir D(–)-pieno rūgšties izomerų mišinį (žr. 3.8 pav., b, c, d, e). Izomerų susidaryme svarbiausi skirtumai gauti po 12 val. fermentacijos. *P. acidilactici* KTU05-7 intensyviau produkavo D(–)-pieno rūgšties izomerą (66 mg/kg), *Pp9* – L(+)-pieno rūgšties izomerą (91 mg/kg), o *Pp8* ir *Ls* – beveik vienodus abiejų izomerų kiekius (atitinkamai 39 ir 34 mg/kg). Tačiau po 24 val. fermentacijos, naudojant *Pa* ir *Pp9*, abiejų izomerų kiekiai tapo panašūs ir D/L santykis fermentuotoje terpėje buvo atitinkamai 0,97 ir 0,94. Fermentuotoje su *Pp8* ir *Ls* terpėje intensyviau susidarė L(+)-pieno rūgštis, D(–)-pieno rūgšties kiekis fermentacijos metu kito nežymiai, o D/L buvo atitinkamai 0,46 ir 0,64. Fermentacijos pabaigoje visais atvejais vyravo L(+)-pieno rūgšties izomeras: raceminiame mišinyje jis sudarė 54 % (*P. acidilactici* KTU05-7), 56 % (*P. pentosaceus* KTU05-9), 72 % (*P. pentosaceus* KTU05-8) ir 74 % (*L. sakei* KTU05-6) nuo bendro PR kiekio.

Tyrimas parodė, kad pieno rūgšties išėigai bei L(+)- ir D(–) izomerams susidaryti įtakos turėjo naudojama PRB padermė ir fermentacijos trukmė. Pasirinktos PRB padermės kietafazės fermentacijos sąlygose gebėjo gaminti pieno rūgštį lubinų sėklų biomasėje, likusioje po baltymų išskyrimo ir daugiausiai gamino vertingą L(+)-pieno rūgšties izomerą. Tačiau susidariusios PR kiekis buvo mažesnis, lyginant su kitų tyrėjų rezultatais, gautais fermentuojant įvairių rūšių augalinę žaliavą, pvz., PR kiekis kukurūzų biomasės *B. coagulans* LA204 fermentacijos metu buvo 96 g/l (204), cukranendrių biomasės *Lc. lactis* OI-1 – 11 g/l (205), baltųjų ryžių sėlenų hidrolizato *Lb. Rhamnosus* LA-O4-1 – 82 g/l (206), kviečių sėlenų *P. pentosaceus*9 – 38 g/l (203).



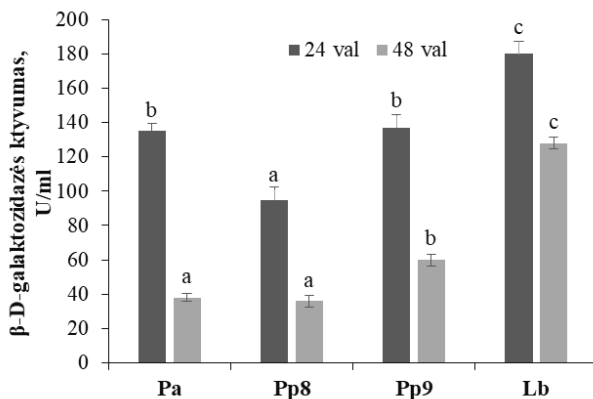
3.8 pav. Pieno rūgšties (a) ir jos izomerų susidarymo lubinų sėklų biomasėje priklausomybė nuo kietafazės fermentacijos trukmės ir PRB padermės: *P. acidilactici* KTU05-7 (b), *P. pentosaceus* KTU05-9 (c), *P. pentosaceus* KTU05-8 (d), *L. sakei* KTU05-6 (e); Čia DPR – D(–)-pieno rūgštis, LPR – L(+)-pieno rūgštis

3.4. Pieno rūgšties gamyba iš šalutinių sūrių gamybos produktų

Pieno rūgšties susidarymas tirtas *Pediococcus spp.* padermėmis fermentuojant sūrinės išrūgas ir išrūgų permiatą, gautą ultrafiltracijos būdu pašalinus baltymus, o gauti rezultatai lyginti su dažnai pieno pramonėje naudojama PRB paderme – *L. bulgaricus*.

PRB β -D-galaktozidazės aktyvumas. PRB gali turėti laktazinį aktyvumą, todėl svarbu įvertinti jo įtaką substrate esančios laktozės hidrolizei fermentacijos metu. PRB laktazinio aktyvumo, fermentuojant išrūgas, rezultatai pateikti 3.9 paveiksle. Nustatyta, kad PRB padermės turėjo skirtingą aktyvumą, kuris priklausė ir nuo fermentacijos trukmės ($p < 0,05$). Vertinant įvairias *Pediococcus* padermes, po 24 val. kultivavimo išrūgų terpėje, didžiausias aktyvumas nustatytas *P. pentosaceus* KTU05-9 ir *P. acidilactici* KTU05-7, kuris buvo atitinkamai: 137,6 U/ml ir 135 U/ml, tačiau buvo vidutiniškai 24 % mažesnis nei *L. bulgaricus*. Po 48 val. fermentacijos *Pp9*

turėjo didžiausią laktazinį aktyvumą (57 U/ml), tačiau visų tirtų *Pediococcus* padermių laktazinis aktyvumas buvo 65 % mažesnis nei *L. bulgaricus*. Ilgėjant fermentacijos trukmei (>24 val.), visų PRB β -D-galaktozidazės aktyvumas sumažėjo vidutiniškai 66 %.

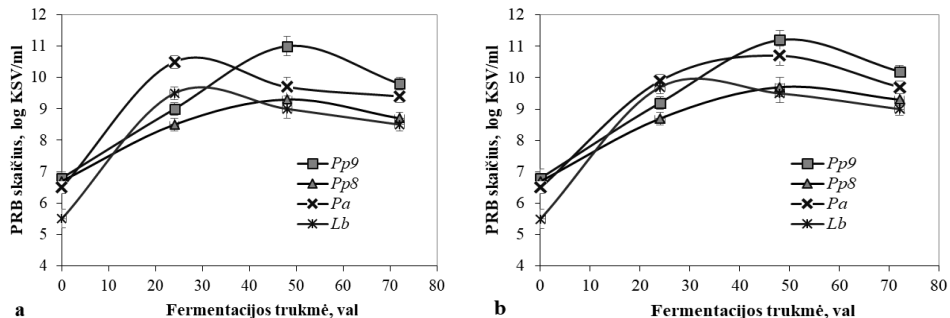


3.9 pav. Laktazinio aktyvumo priklausomybė nuo PRB padermės fermentuojamų išrūgų terpėje. Čia Pp8 – *P. pentosaceus* KTU05-8; Pp9 – *P. pentosaceus* KTU05-9; Pa – *P. acidilactici* KTU05-7; Lb – *L. bulgaricus*. Pastaba: a, b, c – vidurkiai, esant tai pačiai fermentacijos trukmei, pažymėti skirtingomis raidėmis statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$)

PRB β -D-galaktozidazės aktyvumas yra naudingas norint efektyviau vykdyti laktozės hidrolizę, sumažinti fermentinių preparatų naudojimą bei spartinti fermentacijos procesus. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad tirtos *Pediococcus* padermės turi skirtingą laktazinį aktyvumą, tačiau jis mažėja ilginant fermentacijos trukmę. Chanalia ir kt. (276) išskyrė β -D-galaktozidazę iš *P. acidilactici*, kuri pasižymėjo dideliu laktozės hidrolizės laipsniu ir sintetino prebiotinius galaktooligosacharidus. Schwabo ir kt. (277) tyrimas taip pat patvirtino, kad β -D-galaktozidazės, išskirtos iš *Lactobacillus* ir *Bifidobacterium*, gali efektyviai hidrolizuoti laktozę ir sintetinti tokius vertingus junginius, kaip galaktooligosacharidai ir heterooligosacharidai.

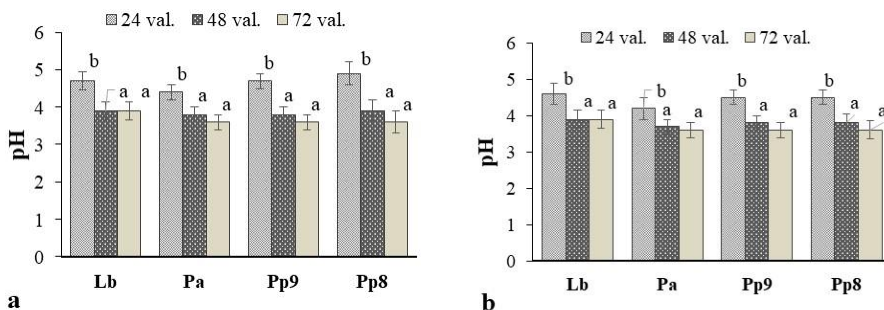
PRB adaptacija fermentacijos terpėse. Iš 3.10 paveiksle pateiktos PRB dauginimosi priklausomybės nuo fermentacijos trukmės matyti, kad *Pediococcus* padermės gerai adaptavosi tiek išrūgų, tiek išrūgų permiato terpėse. PRB ląstelių skaičius iš pradžių padidėjo, o ilgėjant fermentacijos trukmei ėmė mažėti. Nustatytas reikšmingas *P. acidilactici* KTU05-7 ląstelių skaičiaus padidėjimas po 24 val. kultivavimo išrūgų terpėje (10,6 log KSV/ml) ir po 48 val. išrūgų permiato terpėje (10,7 log KSV/ml). Didžiausias *P. pentosaceus* KTU05-9 ir *P. pentosaceus* KTU05-8 ląstelių skaičius gautas po 48 val. fermentacijos ir buvo atitinkamai: 11 ir 9,3 log KSV/ml (išrūgų terpėje) bei 11,2 ir 9,7 log KSV/ml (išrūgų permiato terpėje). *L. bulgaricus* ląstelių daugiausia rasta po 24 val. fermentacijos išrūgų ir permiato terpėse, atitinkamai: 9,5 ir 9,7 log KSV/ml. Ilgėjant fermentacijai (>48 val.), PRB ląstelių skaičius mažėjo vidutiniškai 25 %. Iš gautų rezultatų matyti, kad geriausiai

abiejose terpėse kultivavosi *P. pentosaceus* KTU05-9 ir *P. acidilactici* KTU05-7 padermės, o intensyviau jos dauginosi išrūgų permiato terpėje.



3.10 pav. PRB dauginimosi išrūgų (a) ir permiato (b) terpėse priklausomybė nuo fermentacijos trukmės; Čia Pp8 – *P. pentosaceus* KTU05-8; Pp9 – *P. pentosaceus* KTU05-9; Pa – *P. acidilactici* KTU05-7; Lb – *L. bulgaricus*

pH vertės pokyčiai sūrinių išrūgų ir išrūgų permiato fermentacijos metu. Iš 3.11 paveikslą matyti, kad reikšmingas pH vertės sumažėjimas tiek išrūgose, tiek išrūgų permiato nustatytas po 48 val. fermentacijos: pH vertė sumažėjo 39 % fermentacijos su *P. pentosaceus* KTU05-9 ir *P. acidilactici* KTU05-7 metu bei 37 % – su *P. pentosaceus* KTU05-8 ir *L. bulgaricus*. Ilgesnė fermentacija (>48 val.) neturėjo reikšmingos įtakos pH vertės pokyčiams.



3.11 pav. PRB padermių įtaka pH vertės pokyčiams sūrinių išrūgų (a) ir išrūgų permiato (b) fermentacijos metu; Čia Pp8 – *P. pentosaceus* KTU05-8; Pp9 – *P. pentosaceus* KTU05-9; Pa – *P. acidilactici* KTU05-7; Lb – *L. bulgaricus*. Pastaba: a, b – vidurkiai, esant tai pačiai PRB padermei, pažymėti skirtingomis raidėmis statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$)

Šis tyrimas parodė, kad, fermentuojant šalutinius pieno perdirbimo produktus su *Pediococcus* padermėmis, vyko organinių rūgščių gamyba naudojant fermentuojamus angliavandenius, todėl fermentuojamos terpės pH vertė sumažėjo. Literatūroje nurodoma, kad pH vertės pokyčius nulemia PRB padermių metabolizmo produktai, kurių susidarymas labiausiai priklauso nuo terpės sudėties, temperatūros ir fermentacijos trukmės (195, 278). Atsižvelgiant į prieš tai gautus PRB skaičiaus

kitimo rezultatus (žr. 3.10 pav.) galima teigti, kad pH vertė lemia ir tolimesnį PRB dauginimosi aktyvumą fermentacijos metu, nes labai žema terpės pH vertė gali paveikti mikroorganizmų ląsteles dvejopai: sustabdyti fermentų veiklą ir taip sumažinti maisto medžiagų patekimą į ląstelę arba sutrikdyti fermentų, atsakingų už naujos protoplazmos, RNR ir kitų baltymų sintezę, veiklą. pH vertės mažėjimas ilgėjant fermentacijos trukmei galėjo turėti įtakos ir prieš tai tyrime nustatytam PRB laktazinio aktyvumo mažėjimui (žr. 3.9 pav.). Panašūs rezultatai buvo gauti Daso ir kt. (279) tyrimo metu. Rezultatai parodė, kad β -D-galaktozidazės aktyvumas sumažėjo esant $\text{pH} < 5$, todėl lėtėjo laktozės hidrolizė. Buvo gauta stipri priklausomybė tarp pH vertės ir angliavandenių hidrolizės laipsnio.

Pieno rūgšties susidarymas. PRB padermės įtaka pieno rūgšties izomerų susidarymui sūrinėse išrūgose ir išrūgų permiate fermentacijos metu pateikta 3.12 lentelėje. Nustatyta, kad, lyginant su sūrinių išrūgų fermentacijos terpe, vidutiniškai 16 % didesnis PR kiekis susidarė fermentuotame išrūgų permiate. PR susidarė daugiau ilgėjant fermentacijos trukmei, tačiau ilgesnė nei 72 val. fermentacija neturėjo statistiškai reikšmingos ($p < 0,05$) įtakos PR kiekiui. *Pediococcus spp.* padermė turėjo statistiškai reikšmingą ($p < 0,05$) įtaką PR susidaryti. Didžiausią PR kiekį (27–34 g/l) abiejose fermentacijos terpėse produkavo *P. acidilactici* KTU05-7, nes susidariusios PR buvo vidutiniškai 16 % daugiau nei *Pp8* ar *Pp9* fermentacijos metu. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp PR kiekio, gauto su *Lb* ir *Pa* fermentuotose terpėse, nebuvo nustatyti. Vertinant rezultatus gauta, kad antrajame fermentacijos etape (nuo 24 iki 72 val.), esant pH vertėms 3,7–3,9, *P. acidilactici* KTU05-7 produkavo 20 % (sūrinių išrūgų terpėje) ir 36 % (išrūgų permiato terpėje) daugiau PR nei *L. bulgaricus*. Tai leidžia teigti, kad *P. acidilactici* KTU05-7 gali efektyviau gaminti PR nei *L. bulgaricus* esant žemoms pH vertėms. Taip pat nustatyti statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) skirtumai tarp *L. bulgaricus* ir *Pediococcus spp.* padermių sintetinamų PR izomerų. Fermentacijos su *Pediococcus* padermėmis metu vyravo L(+)-pieno rūgšties izomero (LPR) susidarymas. Fermentacijos su *Pp9* ir *Pp8* metu nustatytas LPR kiekis raceminiame mišinyje buvo ~ 70 %. Per 48 fermentacijos valandas *Pa* sintetino L(+)-pieno rūgšties izomerą, o *Lb* – D(–)-pieno rūgšties izomerą (DPR), tačiau fermentacijos trukmei pailgėjus iki 72 val., fermentacijos terpėse su *Pa* gautas DPR (~ 6 % bendrojo PR kiekio), o *Lb* – LPR (~ 4 % bendrojo PR kiekio).

Rezultatai parodė, kad fermentacijos metu susidariusios PR kiekis kito priklausomai nuo fermentuojamos terpės, PRB padermės ir fermentacijos trukmės. PRB sintetinas organinės rūgšties sukelė pH vertės mažėjimą fermentacijos metu, kuris galėjo turėti įtakos mikroorganizmų dauginimuisi ir PR susidarymo efektyvumui (280). PR yra silpna rūgštis, kuri iš dalies disocijuoja vandenyje ir gali pasižymėti inhibiciniu efektu mikroorganizmų ląstelių metabolizmui. Šiame tyrime naudotos *Pediococcus spp.* padermės, išskirtos iš terpės, kurios pH vertė 3,2–4,2, išlaiko savo gyvybingumą esant žemai terpės pH vertei ir, kaip rodo šio tyrimo rezultatai, tokiu būdu galėjo pagaminti daugiau PR. Naudojant tokias PRB, sumažėtų poreikis taikyti šarminimo procedūrą, kurios metu PR su šarminimo agentais ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ ar CaCO_3) formuoja laktatus, taip mažindami ištirpusios rūgšties kiekį terpėje. Šarminimas turi ne tik neigiamą poveikį PR išskyrimo iš terpės procesams, bet ir sudaro didelius kiekius atliekų (pvz., gipso), todėl pramonėje nėra pageidautinas.

3.12 lentelė. *Pediococcus* spp. padermių įtaka pieno rūgšties izomerų susidarymui išrūgų ir išrūgų permiato terpėse fermentacijos metu

PRB	Pieno rūgštis, g/l			L(+)-pieno rūgštis, g/l			D(–)-pieno rūgštis, g/l		
	24 val.	48 val.	72 val.	24 val.	48 val.	72 val.	24 val.	48 val.	72 val.
Sūrinės išrūgos									
<i>Kontrolė</i>	19,1±0,4 ^{bc}	26,6±0,5 ^b	27,0±0,3 ^b	0,0	0,0	0,9±0,5 ^a	19,1±0,5 ^b	26,6±0,4 ^c	27,0±0,5 ^c
<i>Pa</i>	17,4±0,3 ^b	24,5±0,5 ^b	26,9±0,4 ^b	17,4±0,4 ^d	24,5±0,3 ^c	25,0±0,4 ^c	0,0	0,0	0,8±0,3 ^a
<i>Pp9</i>	17,3±0,1 ^b	25,5±0,6 ^b	26,1±0,5 ^b	13,2±0,1 ^c	16,3±0,4 ^b	16,8±0,4 ^b	4,1±0,1 ^a	9,2±0,2 ^b	9,3±0,3 ^b
<i>Pp8</i>	12,2±0,1 ^a	21,5±0,2 ^a	22,9±0,4 ^a	7,1±0,1 ^a	12,7±0,2 ^b	13,9±0,4 ^b	5,1±0,1 ^a	9,4±0,3 ^b	8,9±0,5 ^b
Išrūgų permiatas									
<i>Kontrolė</i>	21,9±0,5 ^c	34,1±0,4 ^c	34,1±0,6 ^c	0,0	0,0	1,5±0,2 ^a	21,9±0,6 ^b	34,0±0,6 ^d	32,6±0,4 ^d
<i>Pa</i>	17,3±0,4 ^b	31,8±0,3 ^c	33,9±0,3 ^c	17,3±0,4 ^d	31,8±0,5 ^d	31,0±0,3 ^d	0,0	0,0	2,9±0,3 ^a
<i>Pp9</i>	13,9±0,2 ^a	27,6±0,3 ^b	28,9±0,5 ^b	11,3±0,3 ^{bc}	22,2±0,6 ^c	21,9±0,4 ^c	2,6±0,4 ^a	5,4±0,3 ^a	4,4±0,5 ^a
<i>Pp8</i>	14,4±0,2 ^a	25,7±0,4 ^b	26,8±0,3 ^b	10,4±0,3 ^b	21,2±0,4 ^c	21,6±0,2 ^c	3,1±0,4 ^a	4,5±0,3 ^a	2,8±0,5 ^a

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±StN; čia *Kontrolė* – fermentuota su *L. bulgaricus*, PRB – pieno rūgšties bakterijos, Pp8 – *P. pentosaceus* KTU05-8; Pp9 – *P. pentosaceus* KTU05-9; Pa – *P. acidilactici* KTU05-7; a, b, c, d – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis tame pačiame stulpelyje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$)

Šio tyrimo metu taip pat buvo nustatyta, kad pasirinktos PRB padermės produkavo L(+)- ir D(-)-pieno rūgšties izomerų mišinį, kuriame atskirų izomerų kiekis kito priklausomai nuo PRB padermės ir fermentacijos trukmės. Literatūroje nurodoma, kad fermentuojant angliavandenius, PRB gali gaminti vienos rūšies izomerą arba jų raceminį mišinį. PR izomerų susidarymą lemia fermento laktato dehidrogenazės forma (281, 282). Keletas *Lactobacilli* padermių fermentacijos metu sintetina L(+)-izomerus, tačiau suaktyvėjęs fermentas racemazė paverčia šiuos izomerus į D(-)-pieno rūgštį kol pasiekama pusiausvyra ir sudaromas raceminis mišinys (282). Priklausomai nuo substrato sudėties ir fermentacijos režimo, *Lb. delbrueckii* gali gaminti vienos rūšies izomerą arba L(+)- ir D(-)-pieno rūgšties mišinį, kuriame pastarasis izomeras yra vyraujantis (212). Taigi, raceminio mišinio kompozicijai ir vyraujančio PR izomero kiekiui reikšmingą įtaką turi ir pH pokyčiai, maistinės medžiagos, substrato rūšis, temperatūra, aeracija ar gamybos proceso tipas (283, 284).

3.5. Membraninių technologijų panaudojimas pieno rūgščiai išgauti

PR išskyrimas ir gryninimas yra vienas brangiausių PR gamybos etapų, todėl tam atlikti taikomos įvairios technologijos (214). Tačiau dauguma metodų reikalauja keleto PR išskyrimo etapų, nes negali užtikrinti visiško mikroorganizmų ląstelių atskyrimo iš terpės. Todėl šiuo metu daug dėmesio susilaukia membraninės technologijos, kurios taikomos norint išgauti junginius, nes nereikia keisti medžiagos agregatinės būsenos, todėl sumažėja energijos sąnaudos. Be to, tai ekologiškas metodas, nereikalaujantis jokio papildomo cheminio terpės paruošimo. Remiantis atliktais ekonominiais skaičiavimais, membraninės technologijos gali gerokai sumažinti PR gamybos išlaidas, lyginant su kitais metodais. Vis tik membraninio filtravimo efektyvumui gali turėti įtakos ne tik membranų parametrai, bet ir pienarūgštės fermentacijos procesų sąlygos (285). Įvertinant tai, PR išskirti ir gryninti buvo pasirinkta nanofiltracija ir atvirkštinis osmosas, o eksperimentui vykdyti parinkta išrūgų permiato terpė, kuriai papildomai taikyta hidrolizė fermentiniu preparatu β -D-galaktozidaze, fermentacija su *P. acidilactici* KTU05-7 ir *L. bulgaricus*, nes šioje terpėje PRB produkavo didžiausią pieno rūgšties kiekį (žr. skyr. 3.4).

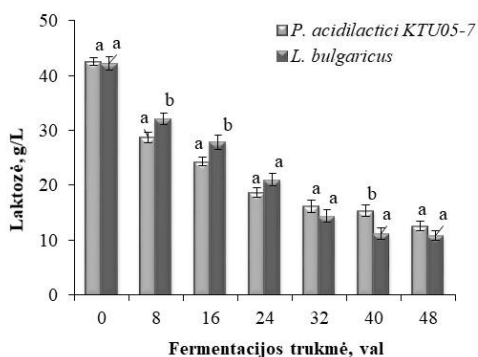
Eksperimento metu tirta fermentacijos trukmės įtaka PRB dauginimuisi ir pH vertės pokyčiams išrūgų permiato terpėje (žr. 3.13 lentelė). PRB dauginimasis didėjo, ilgėjant fermentacijos trukmei, o abiejų PRB dauginimosi greitis terpėje buvo skirtingas. Po 36 val. fermentacijos su *P. acidilactici* KTU05-7 ląstelių skaičius buvo 4,8 % didesnis nei *L. bulgaricus*, tačiau fermentacijos pabaigoje reikšminių skirtumų tarp abiejų PRB padermių skaičiaus nebuvo nustatyta. Terpės pH vertė mažėjo fermentacijos metu dėl PRB produkuojamų organinių rūgščių kiekio (žr. 3.13 lentelė). Fermentacijos su *Pa* metu pH vertė mažėjo sparčiau nei *L. bulgaricus*, po 24 val. *Pa* terpės rūgštingumas buvo 13 % mažesnis nei *Lb. Pa* ir *Lb* fermentacijos pabaigoje pH vertė buvo atitinkamai 3,7 ir 3,9.

3.13 lentelė. Fermentacijos trukmės įtaka PRB skaičiaus ir pH vertės kitimui hidrolizuotame išrūgų permiame

PRB	Fermentacijos trukmė, val				
	0	12	24	36	48
PRB skaičius, log KSV/ml					
Pa	7,20±0,20 ^a	7,35±0,15 ^a	7,45±0,35 ^a	7,90±0,15 ^b	8,51±0,10 ^a
Lb	7,20±0,20 ^a	7,20±0,20 ^a	7,25±0,20 ^a	7,45±0,15 ^a	8,40±0,10 ^a
pH					
Pa	6,1±0,4 ^a	4,7±0,2 ^a	4,1±0,1 ^a	3,8±0,2 ^a	3,7±0,3 ^a
Lb	6,0±0,6 ^a	5,0±0,3 ^a	4,7±0,2 ^b	4,1±0,2 ^a	3,9±0,2 ^a

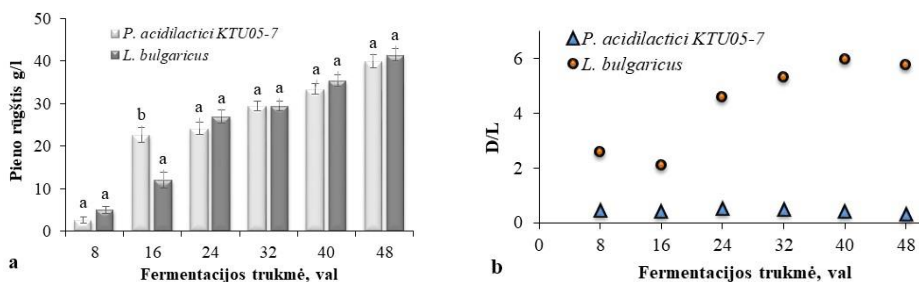
Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±StN; čia PRB – pieno rūgšties bakterijos; Pa – *P. acidilactici* KTU05-7; Lb – *L. bulgaricus*; a, b – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis tame pačiame stulpelyje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$).

Komercinių fermentinių preparatų panaudojimas laktozės hidrolizei palengvina fermentuojamo substrato prieinamumą PRB ir kartu intensyvina PR sintezę. Po fermentinės išrūgų permiato hidrolizės β-D-galaktozidaze, pradinis laktozės kiekis sumažėjo 27 %. Laktozės kiekio mažėjimo PRB fermentacijos metu rezultatai pateikti 3.12 paveiksle. Intensyvesnė laktozės hidrolizė vyko pirmajame fermentacijos etape (24 val.) ir buvo 56 % (Pa) ir 50 % (Lb), o vėliau disacharido fermentinis skaidymas lėtėjo. Nustatyta, kad po 48 val., fermentuojant su *P. acidilactici* KTU05-7 ir *L. bulgaricus*, laktozės hidrolizė buvo atitinkamai 71 % ir 74 %. Hidrolizės etapas šiame tyrime buvo pasirinktas remiantis literatūroje pateiktais duomenimis apie bioprocesų taikymą fermentinės pieno rūgšties gamybai, kai substrato hidrolizė į lengviau fermentuojamus monosacharidus atliekama prieš PRB fermentaciją arba šio proceso metu (212, 286). Be to, tyrime naudotos PRB turėjo tam tikrą laktazinį aktyvumą (žr. skyr. 3.4), todėl papildomai naudojant apdorojimą fermentiniais preparatais galima pagreitinti angliavandenių hidrolizę ir sumažinti fermentacijos trukmę (287, 288).



3.12 pav. Fermentacijos trukmės įtaka laktozės hidrolizei išrūgų permiame. *Pastaba:* a, b – vidurkiai, esant tai pačiai fermentacijos trukmei, pažymėti skirtingomis raidėmis statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$)

L(+)- ir D(-)-pieno rūgšties izomerų susidarymas. Pagal pieno rūgšties susidarymą ir jos izomerų pasiskirstymą hidrolizuotame išrūgų permiate nustatyta, kad PR kiekis didėjo ilgėjant fermentacijos trukmei, o izomerų pasiskirstymui reikšmingą įtaką turėjo PRB padermė ($p < 0,05$) (žr. 3.13 pav.). PR išeiga po 48 val. fermentacijos su *P. acidilactici* KTU05-7 ir *L. bulgaricus* buvo atitinkamai 1,03 g/g ir 1,05 g/g. Nuo 24 val iki fermentacijos pabaigos *P. acidilactici* KTU05-7 produkavo 9,4 % daugiau PR nei *L. bulgaricus* (žr. 3.13 pav., a). Fermentacijos su *Pa* metu nustatytas vidutinis D/L rodiklis – 0,4, kuris rodo vyraujančią L(+)-pieno rūgšties izomero susidarymą, jo kiekis kito nuo 64 iki 76 %. Fermentuotame su *Lb* išrūgų permiate daugiausia susidarė D(–)-pieno rūgšties, jos kiekis kito nuo 68 iki 86 %, o nustatytas vidutinis D/L rodiklis buvo 4,5. Fermentacijos pabaigoje, D/L rodiklis buvo 0,3 (*Pa*) ir 5,7 (*Lb*) (žr. 3.13 pav., b).



3.13 pav. Fermentacijos trukmės įtaka pieno rūgšties (a) ir jos izomerų (b) susidarymui išrūgų permiate fermentuotame su *P. acidilactici* KTU05-7 ir *L. bulgaricus*. Čia D/L – D(–)- ir L(+)- pieno rūgšties izomerų santykis. *Pastaba:* a, b – vidurkiai, esant tai pačiai fermentacijos trukmei, pažymėti skirtingomis raidėmis statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$)

PR koncentravimas ir gryninimas. PR išskirti iš fermentacijos terpės panaudota filtracijos sistema, sudaryta iš nanofiltracijos ir atvirkštinio osmoso membranų. Prieš pradėdant filtraciją nustatyta, kad fermentacija su skirtingomis PRB turėjo įtakos fermentuoto išrūgų permiato paruošimui prieš filtraciją. Vizualiai vertinant fermentuotus produktus, pastebėtos *L. bulgaricus* permiato paviršiuje koaguliavusios baltymų dalelės, kurios nesusiformavo su *P. acidilactici* KTU05-7 fermentuotame išrūgų permiate. Manoma, kad baltymai šiose terpėse koaguliuoja dėl smarkiai sumažėjusios pH vertės. Skirtumus, atsiradusius šio tyrimo metu, galėjo lemti nevienodas PRB padermių proteolitis aktyvumas. Atskiro tyrimo metu įvertinus *Lb* ir *Pa* proteolitinį aktyvumą nustatyta, kad pastaroji padermė pasižymėjo didesne geba (0,3 PU/mL) hidrolizuoti baltymus, todėl jos fermentuotame išrūgų permiate nebuvo pastebėtos koaguliavusių baltymų dalelės. Didelis mikroorganizmų ląstelių ir kitų neištirpusių stambiamolekulių junginių kiekis, esantis fermentacijos terpėje, gali suformuoti papildomą sluoksnį ant membranos paviršiaus ir užkimšti membranos poras, dėl ko sukeliamas srauto slopinimas ir sumažinamas filtravimo našumas. Todėl prieš nanofiltraciją baltyminės medžiagos atskirtos nuo *Lb* fermentacijos terpės filtruojant.

Nanofiltracijos ir filtracijos atvirkštiniu osmosu įtaka pieno rūgšties izomerų ir laktozės kiekiui retentate ir permeate, filtruojant su *Pa* ir *Lb* fermentuotus mėginius, pateikta 3.14 lentelėje. Laktozės sulaikymas nanofiltracijos metu siekė 89 (*P. acidilactici* KTU05-7) ir 85 % (*L. bulgaricus*). Pieno rūgšties kiekis po nanofiltracijos *P. acidilactici* KTU05-7 i ir *L. bulgaricus* permeate buvo atitinkamai 55,5 g/L ir 54,9 g/L. Taikant atvirkštinį osmosą, nustatytas koncentruotos PR kiekis *Pa* ir *Lb* retentatuose buvo atitinkamai 4 ir 3 kartus didesnis nei permiatuose po nanofiltracijos, o PR sulaikymas buvo 82 % (*Pa*) ir 80 % (*Lb*). Po membraninės filtracijos nustatyta tokia pati pieno rūgšties izomerų pasiskirstymo tendencija, kaip ir PRB fermentacijos pabaigoje: didesni L(+)-pieno rūgšties izomero kiekiai vyravo RO retentate, fermentuotame su *P. acidilactici* KTU05-7 ($D/L=0,3$), o D(–)-pieno rūgšties – retentate, fermentuotame su *L. bulgaricus* ($D/L=5,6$).

3.14 lentelė. Nanofiltracijos ir filtracijos atvirkštiniu osmosu įtaka pieno rūgšties izomerų ir laktozės kiekiui retentate ir permeate

Mebraniniai procesai	<i>P. acidilactici</i> KTU05-7	<i>L. bulgaricus</i>
Nanofiltracija:		
Retentato kiekis, l	56	45
LPR, g/L	9,7±0,68 ^b	1,7±0,54 ^a
DPR, g/L	3,2±0,34 ^a	10,1±0,24 ^b
Laktozė, g/L	28,9±0,25 ^a	30,7±0,18 ^a
Permianto kiekis, l	94	105
LPR, g/L	42,3±0,27 ^b	8,1±0,54 ^a
DPR, g/L	13,2±0,18 ^a	46,8±0,76 ^b
Laktozė, g/L	1,4±0,2 ^a	1,6±0,2 ^a
Atvirkštinis osmosas:		
Retentato kiekis, l	18,4	30
LPR, g/L	176,0±0,97 ^b	23,9±0,99 ^a
DPR, g/L	56,7±0,98 ^a	135,1±0,97 ^b
Permianto kiekis, l	70,6	70
LPR, g/L	7,4±0,18 ^b	1,9±0,48 ^a
DPR, g/L	2,4±0,24 ^a	9,0±0,43 ^b

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±StN; Čia LPR – L(+)-pieno rūgšties izomeras; DPR – D(–)-pieno rūgšties izomeras; a, b – vidurkiai, pažymėti skirtingomis raidėmis toje pačioje eilutėje statistiškai reikšmingai skiriasi ($p < 0,05$).

Membraninio filtravimo parametrai (srauto greitis, našumas, transmembraninis slėgis ir koncentravimo faktorius), gauti filtruojant su skirtingomis PRB fermentuotą terpę, pateikti 3.15 lentelėje. Vertinant šiuos rodiklius nustatyta, kad srauto greitis ir procesų našumas mažėjo, o transmembraninis slėgis didėjo, ilgėjant filtracijos trukmei. Esant didesniai srauto greičiui, fermentacijos terpėje esančios molekulės greičiau pašalinamos nuo membranos paviršiaus ir proceso našumas didėja. *P. acidilactici* KTU05-7 fermentacijos terpės nanofiltracijos metu bendras našumo sumažėjimas buvo lėtesnis nei *L. bulgaricus* filtracijos metu. Tačiau atvirkštinio osmoso metu, didesnis pieno rūgšties filtravimo našumas nustatytas *L. bulgaricus* fermentacijos terpės filtravimo metu. Našumo mažėjimas yra susijęs su membranų

porų užteršimu ir koncentracijos poliarizacija, kuri vyksta dėl padidėjusios junginių koncentracijos arti membranos paviršiaus (289, 290).

3.15 lentelė. Skirtingomis pieno rūgšties bakterijomis fermentuoto išrūgų permiato įtaka membraninio filtravimo parametrų kitimui

Mėginiai	Trukmė (val:min)	Qp	TMP	VCF	J
Nanofiltracija					
<i>P. acidilactici</i> KTU05-9	0:00	0,15	12,75	1,00	20,00
	0:20	0,12	14,25	1,00	16,00
	1:10	0,05	19,25	2,68	6,67
<i>L. bulgaricus</i>	0:00	0,28	12,75	1,00	37,33
	0:20	0,20	12,75	1,00	26,67
	1:10	0,04	20,25	3,33	5,33
Atvirkštinis osmosas					
<i>P. acidilactici</i> KTU05-9	0:00	0,29	14,25	1,00	38,67
	0:20	0,12	16,25	4,84	16,00
<i>L. bulgaricus</i>	0:00	0,14	9,25	1,00	38,67
	0:10	0,21	13,25	1,00	28,00
	0:15	0,17	14,25	16,67	22,67

Čia Qp – srauto greitis (m^3h^{-1}); TMP – transmembraninis slėgis (bar); VCF – koncentravimo faktorius; J – našumas ($\text{Lm}^{-2}\text{h}^{-1}$)

Dėl užsikimšusių porų ant membranos paviršiaus formuojasi papildomas sluoksnis, tačiau, kai pasiekama pusiausvyra tarp sluoksnio formavimosi ir suardymo, membranos pralaidumas tampa stabilus (291). Membraninių technologijų panaudojimas pieno rūgščiai išskirti ir gryninti iš fermentacijos terpių leidžia padidinti gamybos efektyvumą ir yra ekonomiškai naudingas sprendimas. Šios technologijos nėra kenksmingos aplinkai, nes nenaudojami jokie papildomi chemikalai gryninimo procese (214).

IŠVADOS

1. Lubinų sėklų miltų kietafazė fermentacija pieno rūgšties bakterijomis padidino tirpiųjų baltymų kiekį ir pagerino baltymų *in vitro* virškinamumą, sumažino tripsino inhibitorių aktyvumą ir pagerino lubinų sėklų baltymų funkcines savybes (emulsavimo ir putojimo).
2. Nefermentuotų lubinų sėklų miltų apdorojimas mažo dažnio ultragarsu sumažino bendrą mikroorganizmų skaičių, fermentų (amilazinio, proteazinio ir ksilanazinio) bei tripsino inhibitorių aktyvumą, padidino baltymų *in vitro* virškinamumą ir pagerino lubinų sėklų baltymų funkcines savybes.
3. Nustatyta, kad fermentuoti lubinų sėklų miltai yra tinkamas priedas kvietinei duonai ruošti. Fermentuotas lubinų sėklų miltų priedas, palyginti su nefermentuotu, turėjo statistiškai reikšmingą įtaką ($p < 0,05$) kepinio savitojo tūrio ir minkštimo aktyumo padidėjimui, kepininių tekstūrai ir juslinėms savybėms.
4. Biodujų gamybai, iš lubinų sėklų biomasės, taikant dvipakopį (acetogenezės ir metanogenezės) anaerobinio skaidymo procesą, metano susidaro 26 % daugiau nei vienpakopio proceso metu. Dvipakopis procesas sutrumpina substrato anaerobinio skaidymo trukmę ir padidina metano grynumo laipsnį. Acetogenezės procesui parinkta *L.sakei* padermė, produkuojanti didžiausią acto rūgšties kiekį fermentacijos metu.
5. Pieno rūgšties ir jos izomerų susidarymas iš lubinų sėklų lignoceliuliozinės biomasės priklausė nuo PRB padermės ir fermentacijos trukmės. *P. pentosaceus* KTU05-9 produkavo 38 % didesnę pieno rūgšties kiekį (282 mg/g), lyginant su kitomis tyrimui naudotomis PRB padermėmis. Raceminiame mišinyje vyravo L(+)-pieno rūgšties izomeras (iki 74 %).
6. Lyginant su sūrinėmis išrūgomis, didesnė pieno rūgšties išeiga nustatyta išrūgų permiate, fermentuotame su *L. bulgaricus* (*Lb*) ir *P. acidilactici* KTU05-7 (*Pa*) (0,78 g/g). *L. bulgaricus* sparčiau pieno rūgštį gamino iki 24 fermentacijos valandos, o *P. acidilactici* KTU05-7 – tolimesnės fermentacijos metu. *P. acidilactici* KTU05-7, įskaitant ir kitas *Pediococcus* padermes, daugiau produkavo L(+)-pieno rūgšties izomerą, o *L. bulgaricus* – D(–)-pieno rūgšties izomerą.
7. Įvertintas membraninių technologijų taikymas pieno rūgščiai išgauti ir gryninti iš fermentacijos terpės (išrūgų permiato). Po nanofiltracijos pieno rūgšties kiekis *Pa* ir *Lb* permiate padidėjo atitinkamai: 35 % ir 31 %, o po atvirkstinio osmoso retentate – atitinkamai 4 ir 3 kartais. Pieno rūgšties sulaikymas ant membranų buvo 82 % (*Pa*) ir 80 % (*Lb*). Po filtravimo membranomis didesnis L(+)- pieno rūgšties izomero kiekis vyravo *Pa* retentate, o D(–)- pieno rūgšties izomero – *Lb*.

LITERATŪRA

1. GRIGALIŪNAITĖ, B., BALČIŪNIENĖ, L. and JANČYS, Z. Pupinių (Fabaceae Lindl.) Šeimos Augalų Įvairių Veislių Antžeminės Dalies Mikromicetai. *Žemės Ūkio Mokslai*, 2006, no. 4. pp. 31-37.
2. ERBAŞ, M., CERTEL, M. and USLU, M. Some Chemical Properties of White Lupin Seeds (*Lupinus Albus* L.). *Food Chemistry*, 2005, vol. 89, no. 3. pp. 341-345.
3. CALABRÒ, S., et al. Characterization and Effect of Year of Harvest on the Nutritional Properties of Three Varieties of White Lupine (*Lupinus Albus* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, vol. 95, no. 15. pp. 3127-3136.
4. KOHAJDOVA, Z., KAROVICOVA, J. and SCHMIDT, S. Lupin Composition and Possible use in Bakery—a Review. *Czech J Food Sci*, 2011, vol. 29, no. 3. pp. 203-211.
5. MULAYIM, M. Sweet Lupins Versus Local Bitter Genotype: Agronomic Characteristic as Affected by Different Planting Densities in the Goller Region of Turkey. *Eur.J.Agr.*, 2002, vol. 17. pp. 181-189.
6. LUCAS, M.M., et al. The Future of Lupin as a Protein Crop in Europe. *Frontiers in Plant Science*, 2015, vol. 6. pp. 705.
7. GLADSTONES, J.S. Lupins of the Mediterranean Region and Africa, 1974.
8. WOLKO, B., et al. 9.1 Basic Information on *Lupinus* Genus 9.1. 1 Distribution and Centers of Diversity. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Legume Crops and Forages*, 2011, vol. 4. pp. 153.
9. BÄHR, M., et al. Chemical Composition of Dehulled Seeds of Selected Lupin Cultivars in Comparison to Pea and Soya Bean. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, vol. 59, no. 1. pp. 587-590.
10. GULEWICZ, P., et al. Effect of Germination on the Protein Fraction Composition of Different Lupin Seeds. *Food Chemistry*, 2008, vol. 107, no. 2. pp. 830-844.
11. DURANTI, M., et al. The Major Proteins of Lupin Seed: Characterisation and Molecular Properties for use as Functional and Nutraceutical Ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 2008, vol. 19, no. 12. pp. 624-633.
12. VILLARINO, C., et al. Nutritional, Health, and Technological Functionality of Lupin Flour Addition to Bread and Other Baked Products: Benefits and Challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, vol. 56, no. 5. pp. 835-857.
13. GRELA, E.R., et al. Chemical Composition of Leguminous Seeds: Part I—content of Basic Nutrients, Amino Acids, Phytochemical Compounds, and Antioxidant Activity. *European Food Research and Technology*, 2017, vol. 243, no. 8. pp. 1385-1395.

14. VILLARINO, C.B.J., et al. Optimization of Formulation and Process of Australian Sweet Lupin (ASL)-Wheat Bread. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, vol. 61, no. 2. pp. 359-367.
15. ARNOLDI, A., BOSCHIN, G., ZANONI, C. and LAMMI, C. The Health Benefits of Sweet Lupin Seed Flours and Isolated Proteins. *Journal of Functional Foods*, 2015, vol. 18. pp. 550-563.
16. CABELLO-HURTADO, F., et al. Proteomics for Exploiting Diversity of Lupin Seed Storage Proteins and their use as Nutraceuticals for Health and Welfare. *Journal of Proteomics*, 2016, vol. 143. pp. 57-68.
17. LIMA, A.I.G., MOTA, J., MONTEIRO, S.A.V.S. and FERREIRA, R.M.S.B. Legume Seeds and Colorectal Cancer Revisited: Protease Inhibitors Reduce MMP-9 Activity and Colon Cancer Cell Migration. *Food chemistry*, 2016, vol.197. pp. 30-38.
18. WOLKO, B., et al. 9.1 Basic Information on Lupinus Genus 9.1. 1 Distribution and Centers of Diversity. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Legume Crops and Forages*, 2011, vol. 4. pp. 153.
19. HIRAI, M.Y., SUZUKI, H., YAMAZAKI, M. and SAITO, K. Biochemical and Partial Molecular Characterization of Bitter and Sweet Forms of *Lupinus Angustifolius*, an Experimental Model for Study of Molecular Regulation of Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2000, vol. 48, no. 10. pp. 1458-1461.
20. SBIHI, H.M., NEHDI, I.A., TAN, C.P. and AL-RESAYES, S.I. Bitter and Sweet Lupin (*Lupinus Albus* L.) Seeds and Seed Oils: A Comparison Study of their Compositions and Physicochemical Properties. *Industrial Crops and Products*, 2013, vol. 49. pp. 573-579.
21. FERNANDEZ-OROZCO, R., et al. Fermentation as a Bio-Process to Obtain Functional Soybean Flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, vol. 55, no. 22. pp. 8972-8979.
22. EGOUNLETY, M. and AWORH, O. Effect of Soaking, Dehulling, Cooking and Fermentation with *Rhizopus Oligosporus* on the Oligosaccharides, Trypsin Inhibitor, Phytic Acid and Tannins of Soybean (*Glycine Max* Merr.), Cowpea (*Vigna Unguiculata* L. Walp) and Groundbean (*Macrotyloma Geocarpa* Harms). *Journal of Food Engineering*, 2003, vol. 56, no. 2-3. pp. 249-254.
23. REFSTIE, S., et al. Lactic Acid Fermentation Eliminates Indigestible Carbohydrates and Antinutritional Factors in Soybean Meal for Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Aquaculture*, 2005, vol. 246, no. 1-4. pp. 331-345.
24. HONG, K., LEE, C. and KIM, S.W. *Aspergillus Oryzae* GB-107 Fermentation Improves Nutritional Quality of Food Soybeans and Feed Soybean Meals. *Journal of Medicinal Food*, 2004, vol. 7, no. 4. pp. 430-435.

25. FRITSCH, C., VOGEL, R. and TOELSTEDE, S. Fermentation Performance of Lactic Acid Bacteria in Different Lupin Substrates—Influence and Degradation Ability of Antinutritives and Secondary Plant Metabolites. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, vol. 119, no. 4. pp. 1075-1088.
26. BARTKIENE, E., et al. Effect of Lactic Acid Fermentation of Lupine Wholemeal on Acrylamide Content and Quality Characteristics of Wheat-Lupine Bread. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2013, vol. 64, no. 7. pp. 890-896.
27. BARTKIENE, E., et al. Solid State Fermentation with Lactic Acid Bacteria to Improve the Nutritional Quality of Lupin and Soya Bean. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, vol. 95, no. 6. pp. 1336-1342.
28. BARTKIENE, E., et al. Nutritional and Quality Aspects of Wheat Sourdough Bread using *L. Luteus* and *L. Angustifolius* Flours Fermented by *Pediococcus Acidilactici*. *International Journal of Food Science & Technology*, 2011, vol. 46, no. 8. pp. 1724-1733.
29. YADA, R.Y. *Proteins in Food Processing*. Woodhead Publishing, 2017.
30. ARYEE, A.N. and BOYE, J.I. Comparative Study of the Effects of Processing on the Nutritional, Physicochemical and Functional Properties of Lentil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, vol. 41, no. 1.
31. BARBANA, C. and BOYE, J.I. In Vitro Protein Digestibility and Physico-Chemical Properties of Flours and Protein Concentrates from Two Varieties of Lentil (*Lens Culinaris*). *Food & Function*, 2013, vol. 4, no. 2. pp. 310-321.
32. NIETO-NIETO, T.V., WANG, Y.X., OZIMEK, L. and CHEN, L. Inulin at Low Concentrations significantly Improves the Gelling Properties of Oat protein—A Molecular Mechanism Study. *Food Hydrocolloids*, 2015, vol. 50. pp. 116-127.
33. MOHAMED, A., et al. Oats Protein Isolate: Thermal, Rheological, Surface and Functional Properties. *Food Research International*, 2009, vol. 42, no. 1. pp. 107-114.
34. TCHOLAKOVA, S., DENKOV, N.D., IVANOV, I.B. and CAMPBELL, B. Coalescence Stability of Emulsions Containing Globular Milk Proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2006, vol. 123. pp. 259-293.
35. DAY, L. Proteins from Land Plants—potential Resources for Human Nutrition and Food Security. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, vol. 32, no. 1. pp. 25-42.
36. MEDRANO, 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. pp. 187-193.
37. NIETO, T.V.N., WANG, Y., OZIMEK, L. and CHEN, L. Improved Thermal Gelation of Oat Protein with the Formation of Controlled Phase-Separated Networks using Dextrin and Carrageenan Polysaccharides. *Food Research International*, 2016, vol. 82. pp. 95-103.

38. VASBINDER, A.J., VAN DE VELDE, F. and DE KRUIF, C.G. Gelation of Casein-Whey Protein Mixtures. *Journal of Dairy Science*, May, 2004, vol. 87, no. 5. pp. 1167-1176 ISSN 0022-0302; 0022-0302.
39. TARHAN, O., et al. Rheological and Structural Characterization of Whey Protein Gelation Induced by Enzymatic Hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 2016, vol. 61. pp. 211-220.
40. CHOVE, B.E., GRANDISON, A.S. and LEWIS, M.J. Emulsifying Properties of Soy Protein Isolates obtained by Microfiltration. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002, vol. 82, no. 3. pp. 267-272.
41. BATISTA, A.P., et al. et al. Accessing Gelling Ability of Vegetable Proteins using Rheological and Fluorescence Techniques. *International Journal of Biological Macromolecules* vol. 36, no. 3. pp. 135-143.
42. BERGHOUT, J., BOOM, R. and VAN DER GOOT, A. Understanding the Differences in Gelling Properties between Lupin Protein Isolate and Soy Protein Isolate. *Food Hydrocolloids*, 2015, vol. 43. pp. 465-472.
43. DAMODARAN, S. Amino Acids, Peptides and Proteins. *Fennema's Food Chemistry*, 2008, vol. 4. pp. 217-329.
44. USTUNOL, Z. Physical, Chemical, and Processing-Induced Changes in Proteins. *Applied Food Protein Chemistry*. Z.Ustunol, Ed. Wiley: Chichester, UK, 2014, vol. 10, no. 9781118860588. pp. 23-46.
45. SOLTANIZADEH, N., et al. Solid-State Protein–Carbohydrate Interactions and their Application in the Food Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, vol. 13, no. 5. pp. 860-870.
46. GALLO, M., et al. The Interaction of Cocoa Polyphenols with Milk Proteins Studied by Proteomic Techniques. *Food Research International*, 2013, vol. 54, no. 1. pp. 406-415.
47. DE FREITAS, V. and MATEUS, N. Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol. 49, no. 2. pp. 940-945.
48. LI-CHAN, E. Properties of Proteins in Food Systems: An Introduction. *Proteins in Food Processing*, 2004. pp. 2-26.
49. KUMAGAI, H. Chemical and Enzymatic Protein Modifications and Functionality Enhancement. *Food Proteins and Peptides: Chemistry, Functionality, Interactions, and Commercialization*, 2012. pp. 165.
50. DAY, L., XU, M., LUNDIN, L. and WOOSTER, T.J. Interfacial Properties of Deamidated Wheat Protein in Relation to its Ability to Stabilise Oil-in-Water Emulsions. *Food Hydrocolloids*, 2009, vol. 23, no. 8. pp. 2158-2167.

51. LIU, Y., et al. Effects of Glutaminase Deamidation on the Structure and Solubility of Rice Glutelin. *LWT-Food Science and Technology*, 2011, vol. 44, no. 10. pp. 2205-2210.
52. FLORES, I., et al. Emulsifying Properties of Chemically Deamidated Corn (Zea Mays) Gluten Meal. *Food Science and Technology International*, 2010, vol. 16, no. 3. pp. 241-250.
53. ZHAO, J., TIAN, Z. and CHEN, L. Effects of Deamidation on Structure and Functional Properties of Barley Hordein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, vol. 58, no. 21. pp. 11448-11455.
54. SUPPAVORASATIT, I., DE MEJIA, E.G. and CADWALLADER, K.R. Optimization of the Enzymatic Deamidation of Soy Protein by Protein-Glutaminase and its Effect on the Functional Properties of the Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, vol. 59, no. 21. pp. 11621-11628.
55. KRAUSE, J., BAGGER, C. and SCHWENKE, K. Rheological Properties of Modified Lupin Proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2001, vol. 45, no. 6. pp. 412-415.
56. WHITEHURST, R. and VAN OORT, M. *Enzymes in Food Technology*. 2nd Eds, 2010.
57. POPINEAU, Y., HUCHET, B., LARRÉ, C. and BÉROT, S. Foaming and Emulsifying Properties of Fractions of Gluten Peptides obtained by Limited Enzymatic Hydrolysis and Ultrafiltration. *Journal of Cereal Science*, 2002, vol. 35, no. 3. pp. 327-335.
58. KIM, S.Y., PARK, P.S. and RHEE, K.C. Functional Properties of Proteolytic Enzyme Modified Soy Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, vol. 38, no. 3. pp. 651-656.
59. RIBOTTA, P.D., COLOMBO, A. and ROSELL, C.M. Enzymatic Modifications of Pea Protein and its Application in Protein–cassava and Corn Starch Gels. *Food Hydrocolloids*, 2012, vol. 27, no. 1. pp. 185-190.
60. CHABANON, G., et al. Hydrolysis of Rapeseed Protein Isolates: Kinetics, Characterization and Functional Properties of Hydrolysates. *Process Biochemistry*, 2007, vol. 42, no. 10. pp. 1419-1428.
61. PARAMAN, I., HETTIARACHCHY, N., SCHAEFER, C. and BECK, M.I. Hydrophobicity, Solubility, and Emulsifying Properties of Enzyme-Modified Rice Endosperm Protein. *Cereal Chemistry*, 2007, vol. 84, no. 4. pp. 343-349.
62. PANYAM, D. and KILARA, A. Enhancing the Functionality of Food Proteins by Enzymatic Modification. *Trends in Food Science & Technology*, 1996, vol. 7, no. 4. pp. 120-125.

63. HOFVENDAHL, K. and HAHN-HÄGERDAL, B. Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources¹. *Enzyme and Microbial Technology*, 2, 2000, vol. 26, no. 2–4. pp. 87-107 ISSN 0141-0229.
64. CARR, F.J., CHILL, D. and MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 2002, vol. 28, no. 4. pp. 281-370.
65. GHAFAR, T., et al. Recent Trends in Lactic Acid Biotechnology: A Brief Review on Production to Purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 2014, vol. 7, no. 2, pp. 222-229.
66. KÖNIG, H. and FRÖHLICH, J. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in WineSpringer, 2017 *Lactic Acid Bacteria*, pp. 3-41.
67. LEROY, F. and DE VUYST, L. Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures for the Food Fermentation Industry. *Trends in Food Science & Technology*, 2004, vol. 15, no. 2. pp. 67-78.
68. KACZMARSKA, K.T., CHANDRA-HIOE, M.V., FRANK, D. and ARCOT, J. Aroma Characteristics of Lupin and Soybean After Germination and Effect of Fermentation on Lupin Aroma. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, vol. 87, pp. 225-233.
69. SCHINDLER, S., et al. Lactic Fermentation to Improve the Aroma of Protein Extracts of Sweet Lupin (*Lupinus Angustifolius*). *Food Chemistry*, 2011, vol. 128, no. 2. pp. 330-337.
70. COSTA, J.A.V., TREICHEL, H., KUMAR, V. and PANDEY, A. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering A. PANDEY, C. LARROCHE and C.R. SOCCOL eds., Elsevier, 2018 *Chapter 1 - Advances in Solid-State Fermentation*, pp. 1-17 ISBN 9780444639905.
71. PANDEY, A. A. Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, vol.13, no.2-3, pp.81-84.
72. PANDEY, A., SOCCOL, C.R. and MITCHELL, D. New Developments in Solid State Fermentation: I-Bioprocesses and Products. *Process Biochemistry*, 2000, vol.35 no.10, pp.1153-1169.
73. EL-BAKRY, M., et al. From Wastes to High Value Added Products: Novel Aspects of SSF in the Production of Enzymes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2015, vol. 45, no. 18. pp. 1999-2042.
74. AKILANDESWARI, P. and PRADEEP, B. Exploration of Industrially Important Pigments from Soil Fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, vol. 100, no. 4. pp. 1631-1643.
75. MADEIRA JUNIOR, J.V., TEIXEIRA, C.B. and MACEDO, G.A. Biotransformation and Bioconversion of Phenolic Compounds Obtainment: An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2015, vol. 35, no. 1. pp. 75-81.

76. MANPREET, S., et al. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2005, vol. 2, no. 1. pp. 1-9.
77. LIU, K.S. and HSIEH, F. Protein–protein Interactions in High Moisture-Extruded Meat Analogs and Heat-Induced Soy Protein Gels. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2007, vol. 84, no. 8. pp. 741-748.
78. YAO, G., LIU, K. and HSIEH, F. A New Method for Characterizing Fiber Formation in Meat Analogs during High-moisture Extrusion. *Journal of Food Science*, 2004, vol. 69, no. 7. pp. 303-307.
79. LAMPART-SZCZAPA, E., et al. Some Functional Properties of Lupin Proteins Modified by Lactic Fermentation and Extrusion. *Food Chemistry*, 5, 2006, vol. 96, no. 2. pp. 290-296 ISSN 0308-8146.
80. GALAZKA, V.B., DICKINSON, E. and LEDWARD, D.A. Influence of High Pressure Processing on Protein Solutions and Emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2000, vol. 5, no. 3-4. pp. 182-187.
81. APICHARTSRANGKOON, A., LEDWARD, D., BELL, A. and BRENNAN, J. Physicochemical Properties of High Pressure Treated Wheat Gluten. *Food Chemistry*, 1998, vol. 63, no. 2. pp. 215-220.
82. KIEFFER, R., SCHURER, F., KÖHLER, P. and WIESER, H. Effect of Hydrostatic Pressure and Temperature on the Chemical and Functional Properties of Wheat Gluten: Studies on Gluten, Gliadin and Glutenin. *Journal of Cereal Science*, 2007, vol. 45, no. 3. pp. 285-292.
83. AÑÓN, M., DE LAMBALLERIE, M. and SPERONI, F. Influence of NaCl Concentration and High Pressure Treatment on Thermal Denaturation of Soybean Proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2011, vol. 12, no. 4. pp. 443-450.
84. CHAPLEAU, N. and DE LAMBALLERIE-ANTON, M. Improvement of Emulsifying Properties of Lupin Proteins by High Pressure Induced Aggregation. *Food Hydrocolloids*, 2003, vol. 17, no. 3. pp. 273-280.
85. HUANG, G., et al. Effects of Ultrasound on Microbial Growth and Enzyme Activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016.
86. KENTISH, S. and ASHOKKUMAR, M. Ultrasound technologies for food and bioprocessingSpringer, 2011 *The Physical and Chemical Effects of Ultrasound*, pp. 1-12.
87. AWAD, T., et al. Applications of Ultrasound in Analysis, Processing and Quality Control of Food: A Review. *Food Research International*, 2012, vol. 48, no. 2. pp. 410-427.

88. GALLEGO-JUÁREZ, J.A., RODRIGUEZ, G., ACOSTA, V. and RIERA, E. Power Ultrasonic Transducers with Extensive Radiators for Industrial Processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2010, vol. 17, no. 6. pp. 953-964.
89. CHEMAT, F. and KHAN, M.K. Applications of Ultrasound in Food Technology: Processing, Preservation and Extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2011, vol. 18, no. 4. pp. 813-835.
90. OJHA, K.S., et al. Ultrasound Technology for Food Fermentation Applications. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, vol. 34. pp. 410-417.
91. O'DONNELL, C., TIWARI, B., BOURKE, P. and CULLEN, P. Effect of Ultrasonic Processing on Food Enzymes of Industrial Importance. *Trends in Food Science & Technology*, 2010, vol. 21, no. 7. pp. 358-367.
92. ASHOKKUMAR, M. The Characterization of Acoustic Cavitation Bubbles—an Overview. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2011, vol. 18, no. 4. pp. 864-872.
93. CHANDRAPALA, J., OLIVER, C., KENTISH, S. and ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in Food Processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2012, vol. 19, no. 5. pp. 975-983.
94. JAMBRAK, A.R., et al. Effect of Ultrasound Treatment on Solubility and Foaming Properties of Whey Protein Suspensions. *Journal of Food Engineering*, 2008, vol. 86, no. 2. pp. 281-287.
95. GÜLSEREN, İ, GÜZEY, D., BRUCE, B.D. and WEISS, J. Structural and Functional Changes in Ultrasonicated Bovine Serum Albumin Solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2007, vol. 14, no. 2. pp. 173-183.
96. GÜZEY, D., GÜLSEREN, İ, BRUCE, B. and WEISS, J. Interfacial Properties and Structural Conformation of Thermosonicated Bovine Serum Albumin. *Food Hydrocolloids*, 2006, vol. 20, no. 5. pp. 669-677.
97. HU, H., et al. Effects of Ultrasound on Structural and Physical Properties of Soy Protein Isolate (SPI) Dispersions. *Food Hydrocolloids*, 2013, vol. 30, no. 2. pp. 647-655.
98. ARZENI, C., et al. Comparative Study of High Intensity Ultrasound Effects on Food Proteins Functionality. *Journal of Food Engineering*, 2012, vol. 108, no.3, pp. 463-472.
99. O'SULLIVAN, J., MURRAY, B., FLYNN, C. and NORTON, I. The Effect of Ultrasound Treatment on the Structural, Physical and Emulsifying Properties of Animal and Vegetable Proteins. *Food hydrocolloids* 2016, vol.53, pp. 141-154.
100. JAMBRAK, A.R., et al. Physical Properties of Ultrasound Treated Soy Proteins. *Journal of Food Engineering*, 2009, vol. 93, no. 4. pp. 386-393.
101. CHEN, L., CHEN, J., REN, J. and ZHAO, M. Effects of Ultrasound Pretreatment on the Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolates and on the Emulsifying

Properties of Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, vol. 59, no. 6. pp. 2600-2609.

102. MORALES, R., MARTÍNEZ, K.D., PIZONES RUIZ-HENESTROSA, V.M. and PILOSO, A.M.R. Modification of Foaming Properties of Soy Protein Isolate by High Ultrasound Intensity: Particle Size Effect. *Ultrasonics sonochemistry*, 2015, vol. 26, pp. 48-55.

103. QIN, X., et al. Transglutaminase-Induced Gelation Properties of Soy Protein Isolate and Wheat Gluten Mixtures with High Intensity Ultrasonic Pretreatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016, vol. 31. pp. 590-597.

104. ABID, M., et al. Thermosonication as a Potential Quality Enhancement Technique of Apple Juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, vol. 21, no. 3. pp. 984-990.

105. CAMERON, M., MCMASTER, L.D. and BRITZ, T.J. Impact of Ultrasound on Dairy Spoilage Microbes and Milk Components. *Dairy Science & Technology*, 2009, vol. 89, no. 1. pp. 83-98.

106. MARTÍN, J.F.G., GUILLEMET, L., FENG, C. and SUN, D. Cell Viability and Proteins Release during Ultrasound-Assisted Yeast Lysis of Light Lees in Model Wine. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141, no. 2. pp. 934-939.

107. MONCADA, M., ARYANA, K.J. and BOENEKE, C. Effect of Mild Sonication Conditions on the Attributes of *Lactobacillus Delbrueckii* Ssp. *Bulgaricus* LB-12. *Advances in Microbiology*, 2012, vol. 2, no. 02. pp. 104.

108. MONSEN, T., LOVGREN, E., WIDERSTROM, M. and WALLINDER, L. In Vitro Effect of Ultrasound on Bacteria and Suggested Protocol for Sonication and Diagnosis of Prosthetic Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, vol. 47, no. 8. pp. 2496-2501 ISSN 1098-660X; 0095-1137.

109. LENTACKER, I., et al. Understanding Ultrasound Induced Sonoporation: Definitions and Underlying Mechanisms. *Advanced drug delivery reviews*, 2014, vol. 72, pp.49-64.

110. DELALANDE, A., et al. Sonoporation at a Low Mechanical Index. *Bubble Science, Engineering & Technology*, 2011, vol. 3, no. 1. pp. 3-12.

111. PITT, W.G. and ROSS, S.A. Ultrasound Increases the Rate of Bacterial Cell Growth. *Biotechnology Progress*, 2003, vol. 19, no. 3. pp. 1038-1044.

112. WU, T., et al. Ultrasonic Disruption of Yeast Cells: Underlying Mechanism and Effects of Processing Parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2015, vol. 28. pp. 59-65.

113. CICCOLINI, L., et al. Low Frequency Thermo-Ultrasonication of *Saccharomyces Cerevisiae* Suspensions: Effect of Temperature and of Ultrasonic Power. *Chemical Engineering Journal*, 1997, vol. 65, no. 2. pp. 145-149.

114. GUERRERO, S., LÓPEZ-MALO, A. and ALZAMORA, S. Effect of Ultrasound on the Survival of *Saccharomyces Cerevisiae*: Influence of Temperature, pH and Amplitude. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2001, vol. 2, no. 1. pp. 31-39.
115. MARX, G., MOODY, A. and BERMÚDEZ-AGUIRRE, D. A Comparative Study on the Structure of *Saccharomyces Cerevisiae* Under Nonthermal Technologies: High Hydrostatic Pressure, Pulsed Electric Fields and Thermo-Sonication. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, vol. 151, no. 3. pp. 327-337.
116. YAMAMOTO, K., et al. Effect of Ultrasonic Frequency and Power on the Disruption of Algal Cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2015, vol. 24. pp. 165-171.
117. GAO, S., LEWIS, G.D., ASHOKKUMAR, M. and HEMAR, Y. Inactivation of Microorganisms by Low-Frequency High-Power Ultrasound: 1. Effect of Growth Phase and Capsule Properties of the Bacteria. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, vol. 21, no. 1. pp. 446-453.
118. HUANG, G., et al. Effects of Ultrasound on Microbial Growth and Enzyme Activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, vol. 37. pp. 144-149.
119. BARTON, S., BULLOCK, C. and WEIR, D. The Effects of Ultrasound on the Activities of some Glycosidase Enzymes of Industrial Importance. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, vol. 18, no. 3. pp. 190-194.
120. ŞENER, N., APAR, D.K. and ÖZBEK, B. A Modelling Study on Milk Lactose Hydrolysis and B-Galactosidase Stability Under Sonication. *Process Biochemistry*, 2006, vol. 41, no. 7. pp. 1493-1500.
121. VERCET, A., et al. The Effects of Manothermosonication on Tomato Pectic Enzymes and Tomato Paste Rheological Properties. *Journal of Food Engineering*, 2002, vol. 53, no. 3. pp. 273-278.
122. CRUZ, R.M., VIEIRA, M.C. and SILVA, C.L. Effect of Heat and Thermo-sonication Treatments on Peroxidase Inactivation Kinetics in Watercress (*Nasturtium Officinale*). *Journal of Food Engineering*, 2006, vol. 72, no. 1. pp. 8-15.
123. VERCET, A., BURGOS, J., CRELIER, S. and LOPEZ-BUESA, P. Inactivation of Proteases and Lipases by Ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2001, vol. 2, no. 2. pp. 139-150.
124. RASO, J. and BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Nonthermal Preservation of Foods using Combined Processing Techniques, 2003.
125. FENG, H., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. and WEISS, J. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, 2011.
126. MASON, T., LORIMER, J., BATES, D. and ZHAO, Y. Dosimetry in Sonochemistry: The use of Aqueous Terephthalate Ion as a Fluorescence Monitor. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1994, vol. 1, no. 2. pp. S91-S95.

127. ÖZBEK, B. and ÜLGEN, K.Ö. The Stability of Enzymes After Sonication. *Process Biochemistry*, 2000, vol. 35, no. 9. pp. 1037-1043.
128. SALA, F., et al. New methods of food preservation Springer, 1995 *Effect of Heat and Ultrasound on Microorganisms and Enzymes*, pp. 176-204.
129. BOYE, J.I., et al. Comparison of the Functional Properties of Pea, Chickpea and Lentil Protein Concentrates Processed using Ultrafiltration and Isoelectric Precipitation Techniques. *Food Research International*, 2010, vol.43, no.2, pp.537-546.
130. BOYE, J., ZARE, F. and PLETCH, A. Pulse Proteins: Processing, Characterization, Functional Properties and Applications in Food and Feed. *Food Research International*, 2010, vol. 43, no. 2. pp. 414-431.
131. JAYASENA, V., CHIH, H.J. and NASAR-ABBAS, S. Efficient Isolation of Lupin Protein. *Food Australia*, 2011, vol. 63, no. 7. pp. 306-309.
132. WÄSCHE, A., MÜLLER, K. and KNAUF, U. New Processing of Lupin Protein Isolates and Functional Properties. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2001, vol. 45, no. 6. pp. 393-395.
133. MURANYI, I.S., et al. Protein Distribution in Lupin Protein Isolates from *Lupinus Angustifolius* L. Prepared by various Isolation Techniques. *Food chemistry*, 2016, vol. 207. pp. 6-15.
134. WANDERSLEBEN, T., et al. Enhancement of Functional and Nutritional Properties of Bread using a Mix of Natural Ingredients from Novel Varieties of Flaxseed and Lupine. *LWT*, 2018.
135. ANTON, A.A., et al. Influence of Added Bean Flour (*Phaseolus Vulgaris* L.) on some Physical and Nutritional Properties of Wheat Flour Tortillas. *Food Chemistry*, 2008, vol. 109, no. 1. pp. 33-41.
136. DUODU, K.G. and MINNAAR, A. Flour and breads and their fortification in health and disease prevention Elsevier, 2011 *Legume Composite Flours and Baked Goods: Nutritional, Functional, Sensory, and Phytochemical Qualities*, pp. 193-203.
137. DHINGRA, S. and JOOD, S. Organoleptic and Nutritional Evaluation of Wheat Breads Supplemented with Soybean and Barley Flour. *Food Chemistry*, 2002, vol. 77, no. 4. pp. 479-488.
138. FENN, D., et al. Wheat-Legume Composite Flour Quality. *International Journal of Food Properties*, 2010, vol. 13, no. 2. pp. 381-393.
139. MUBARAK, A. Chemical, Nutritional and Sensory Properties of Bread Supplemented with Lupin Seed (*Lupinus Albus*) Products. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2001, vol. 45, no. 4. pp. 241-245.
140. DOXASTAKIS, G., et al. Lupin, Soya and Triticale Addition to Wheat Flour Doughs and their Effect on Rheological Properties. *Food Chemistry*, 2002, vol. 77, no. 2. pp. 219-227.

141. JAYASENA, V. and NASAR-ABBAS, S.M. Effect of Lupin Flour Incorporation on the Physical Characteristics of Dough and Biscuits. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2011, vol. 3, no. 3. pp. 140-147.
142. NASAR-ABBAS, S.M. and JAYASENA, V. Effect of Lupin Flour Incorporation on the Physical and Sensory Properties of Muffins. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2012, vol. 4, no. 1. pp. 41-49.
143. LEVENT, H. and BILGIÇLI, N. Enrichment of Gluten-Free Cakes with Lupin (*Lupinus Albus L.*) Or Buckwheat (*Fagopyrum Esculentum M.*) Flours. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2011, vol. 62, no. 7. pp. 725-728.
144. ARCHER, B.J., JOHNSON, S.K., DEVEREUX, H.M. and BAXTER, A.L. Effect of Fat Replacement by Inulin Or Lupin-Kernel Fibre on Sausage Patty Acceptability, Post-Meal Perceptions of Satiety and Food Intake in Men. *British Journal of Nutrition*, 2004, vol. 91, no. 4. pp. 591-599.
145. YAP, L.S. *Determination of the Functionality of Novel Lupin Based Ingredients in Ice Cream*. Curtin University of Technology., 2006.
146. MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. and GÓMEZ, R. Characterization of Bifidobacteria as Starters in Fermented Milk Containing Raffinose Family of Oligosaccharides from Lupin as Prebiotic. *International Dairy Journal*, 2007, vol. 17, no. 2. pp. 116-122.
147. RODGERS, S. Value Adding with Functional Meals. *Food Service Technology*, 2004, vol. 4, no. 4. pp. 149-158.
148. BELSKI, R., et al. Effects of Lupin-Enriched Foods on Body Composition and Cardiovascular Disease Risk Factors: A 12-Month Randomized Controlled Weight Loss Trial. *International Journal of Obesity*, 2011, vol. 35, no. 6. pp. 810.
149. HODGSON, J., et al. Effects of Increasing Dietary Protein and Fibre Intake with Lupin on Body Weight and Composition and Blood Lipids in Overweight Men and Women. *International Journal of Obesity*, 2010, vol. 34, no. 6. pp. 1086.
150. LEE, Y.P., et al. Effects of Lupin Kernel Flour-enriched Bread on Blood Pressure: A Controlled Intervention Study-. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2009, vol. 89, no. 3. pp. 766-772.
151. LEE, Y.P., et al. Lupin-Enriched Bread Increases Satiety and Reduces Energy Intake Acutely-. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, vol. 84, no. 5. pp. 975-980.
152. HALL, R. and JOHNSON, S. Sensory Acceptability of Foods Containing Australian Sweet Lupin (*Lupinus Angustifolius*) Flour. *Journal of Food Science*, 2004, vol. 69, no. 2.
153. BALLESTER, D., et al. Bread Quality and Nutritional Value of 'Marraqueta' and 'Hallulla'supplemented with Full-fat Sweet Lupin Flour (*Lupinus Albus Cv.*

Multolupa). *International Journal of Food Science & Technology*, 1988, vol. 23, no. 3. pp. 225-231.

154. PFALTZGRAFF, L.A., COOPER, E.C., BUDARIN, V. and CLARK, J.H. Food Waste Biomass: A Resource for High-Value Chemicals. *Green Chemistry*, 2013, vol. 15, no. 2. pp. 307-314.

155. MENON, V. and RAO, M. Trends in Bioconversion of Lignocellulose: Biofuels, Platform Chemicals & biorefinery Concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2012, vol. 38, no.4. pp.522-550.

156. FITZPATRICK, M., CHAMPAGNE, P., CUNNINGHAM, M.F. and WHITNEY, R.A. A Biorefinery Processing Perspective: Treatment of Lignocellulosic Materials for the Production of Value-Added Products. *Bioresour technology*, 2010, vol.101, no.23. pp.8915-8922.

157. WEILAND, P. Biogas Production: Current State and Perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, vol. 85, no. 4. pp. 849-860.

158. DEMIREL, B., YENIGUN, O. and ONAY, T.T. Anaerobic Treatment of Dairy Wastewaters: A Review. *Process Biochemistry*, 2005, vol. 40, no. 8. pp. 2583-2595.

159. CHANDRA, R., TAKEUCHI, H. and HASEGAWA, T. Methane Production from Lignocellulosic Agricultural Crop Wastes: A Review in Context to Second Generation of Biofuel Production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2012, vol.16, no.3. pp. 1462-1476.

160. DEUBLEIN, D. and STEINHAUSER, A. *Utilization of Gas to Generate Current and Heat*. Wiley Online Library, 2008.

161. GERARDI, M.H. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. John Wiley & Sons, 2003.

162. ZEIKUS, J.G. The Biology of Methanogenic Bacteria. *Bacteriological Reviews*, Jun, 1977, vol. 41, no. 2. pp. 514-541 ISSN 0005-3678; 0005-3678.

163. CHEREMISINOFF, N.P. *Biotechnology for Waste and Wastewater Treatment*. Elsevier, 1997.

164. LUNGK HIMBA, H.M., KARKI, A.B. and SHRESTHA, J.N. Biogas Production from Anaerobic Digestion of Biodegradable Household Wastes. *Nepal Journal of Science and Technology*, 2010, vol. 11. pp. 167-172.

165. ZEEMAN, G., KOSTER-TREFFERS, M. and HALM, H. *Anaerobic Digestion of Dairy Cow Slurry*. , 1983.

166. PLEISSNER, D. and VENUS, J. Green Technologies for the Environment ACS Publications, 2014 *Agricultural Residues as Feedstocks for Lactic Acid Fermentation*, pp. 247-263.

167. ABDOUN, E. and WEILAND, P. Optimization of Monofermentation from Renewable Raw Materials by the Addition of Trace Elements. *Bornimer Agrartechnische Berichte*, 2009, vol. 68. pp. 69-78.
168. LEHTOMÄKI, A., VIINIKAINEN, T.A. and RINTALA, J.A. Screening Boreal Energy Crops and Crop Residues for Methane Biofuel Production. *Biomass and Bioenergy*, 2008, vol. 32, no.6. pp. 541-550.
169. JENSEN, E.S., et al. Legumes for Mitigation of Climate Change and the Provision of Feedstock for Biofuels and Biorefineries. A Review. *Agronomy for Sustainable Development*, 2012, vol. 32, no. 2. pp. 329-364.
170. BRAUN, R. Improvement of crop plants for industrial end usesSpringer, 2007 *Anaerobic Digestion: A Multi-Faceted Process for Energy, Environmental Management and Rural Development*, pp. 335-416.
171. TAHERZADEH, M.J. and KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, vol. 9, no. 9. pp. 1621-1651.
172. MSHANDETE, A., et al. Effect of Particle Size on Biogas Yield from Sisal Fibre Waste. *Renewable Energy*, 2006, vol. 31, no. 14. pp. 2385-2392.
173. MLADENOVSKA, Z., et al. Thermal Pretreatment of the Solid Fraction of Manure: Impact on the Biogas Reactor Performance and Microbial Community. *Water Science and Technology*, 2006, vol. 53, no. 8. pp. 59-67.
174. GERHARDT, M., PELENC, V. and BÄUML, M. Application of Hydrolytic Enzymes in the Agricultural Biogas Production: Results from Practical Applications in Germany. *Biotechnology Journal*, 2007, vol. 2, no. 12. pp. 1481-1484.
175. ROMANO, R.T., ZHANG, R., TETER, S. and MCGARVEY, J.A. The Effect of Enzyme Addition on Anaerobic Digestion of Jose Tall Wheat Grass. *Bioresource Technology*, 2009, vol. 100, no. 20. pp. 4564-4571.
176. MORGAVI, D., et al. Resistance of Feed Enzymes to Proteolytic Inactivation by Rumen Microorganisms and Gastrointestinal Proteases. *Journal of Animal Science*, 2001, vol. 79, no. 6. pp. 1621-1630.
177. OUYANG, J., et al. Open Fermentative Production of L-Lactic Acid by *Bacillus* Sp. Strain NL01 using Lignocellulosic Hydrolyzates as Low-Cost Raw Material. *Bioresource Technology*, 2013, vol. 135. pp. 475-480.
178. TASHIRO, Y., et al. Continuous D-Lactic Acid Production by a Novelthermotolerant *Lactobacillus Delbrueckii* Subsp. *Lactis* QU 41. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, vol. 89, no. 6. pp. 1741-1750.
179. OSHIRO, M., et al. Kinetic Modeling and Sensitivity Analysis of Xylose Metabolism in *Lactococcus Lactis* IO-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, vol. 108, no. 5. pp. 376-384.

180. SINGHVI, M., et al. D-(–)-Lactic Acid Production from Cellobiose and Cellulose by *Lactobacillus Lactis* Mutant RM2-2 4. *Green Chemistry*, 2010, vol. 12, no. 6. pp. 1106-1109.
181. KOMESU, A., et al. Lactic Acid Production to Purification: A Review. *BioResources*, 2017, vol. 12, no. 2.
182. DATTA, R. and HENRY, M. Lactic Acid: Recent Advances in Products, Processes and Technologies—a Review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2006, vol. 81, no. 7. pp. 1119-1129.
183. NOLLET, L.M. and RUIZ-CAPILLAS, C. *Flow Injection Analysis of Food Additives*. CRC Press, 2015.
184. JOHN, R.P., ANISHA, G., NAMPOOTHIRI, K.M. and PANDEY, A. Direct Lactic Acid Fermentation: Focus on Simultaneous Saccharification and Lactic Acid Production. *Biotechnology Advances*, 2009, vol. 27, no. 2. pp. 145-152.
185. TSUJI, H. and FUKUI, I. Enhanced Thermal Stability of Poly (Lactide) s in the Melt by Enantiomeric Polymer Blending. *Polymer*, 2003, vol. 44, no. 10. pp. 2891-2896.
186. DE JONG, S., et al. Physically Crosslinked Dextran Hydrogels by Stereocomplex Formation of Lactic Acid Oligomers: Degradation and Protein Release Behavior. *Journal of Controlled Release*, 2001, vol. 71, no. 3. pp. 261-275.
187. GAO, C., MA, C. and XU, P. Biotechnological Routes Based on Lactic Acid Production from Biomass. *Biotechnology Advances*, 2011, vol. 29, no. 6. pp. 930-939.
188. WEE, Y., KIM, J. and RYU, H. Biotechnological Production of Lactic Acid and its Recent Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, vol. 44, no. 2. pp. 163-172.
189. OKANO, K., et al. Biotechnological Production of Enantiomeric Pure Lactic Acid from Renewable Resources: Recent Achievements, Perspectives, and Limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, vol. 85, no. 3. pp. 413-423.
190. JOHN, R.P., NAMPOOTHIRI, K.M. and PANDEY, A. Fermentative Production of Lactic Acid from Biomass: An Overview on Process Developments and Future Perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, vol. 74, no. 3. pp. 524-534.
191. NOLASCO-HIPOLITO, C., et al. Synchronized Fresh Cell Bioreactor System for Continuous L-(+)-Lactic Acid Production using *Lactococcus Lactis* IO-1 in Hydrolysed Sago Starch. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, vol. 93, no. 3. pp. 281-287.
192. KADAM, S.R., et al. Strain Improvement of *Lactobacillus Delbrueckii* NCIM 2365 for Lactic Acid Production. *Process Biochemistry*, 2006, vol. 41, no. 1. pp. 120-126.

193. TANGO, M. and GHALY, A. A Continuous Lactic Acid Production System using an Immobilized Packed Bed of *Lactobacillus Helveticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, vol. 58, no. 6. pp. 712-720.
194. ROJAN, P.J., NAMPOOTHIRI, K.M., NAIR, A.S. and PANDEY, A. L (+)-Lactic Acid Production using *Lactobacillus Casei* in Solid-State Fermentation. *Biotechnology Letters*, 2005, vol. 27, no. 21. pp. 1685-1688.
195. PANESAR, P.S., KENNEDY, J.F., GANDHI, D.N. and BUNKO, K. Bioutilisation of Whey for Lactic Acid Production. *Food Chemistry*, 2007, vol. 105, no. 1. pp. 1-14.
196. ABDEL-RAHMAN, M.A., TASHIRO, Y. and SONOMOTO, K. Lactic Acid Production from Lignocellulose-Derived Sugars using Lactic Acid Bacteria: Overview and Limits. *Journal of Biotechnology*, 2011, vol. 156, no. 4. pp. 286-301.
197. PANDEY, A. *Solid-State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications*. Asiatech Publishers, 2001.
198. YANG, S.J., et al. Efficient Degradation of Lignocellulosic Plant Biomass, without Pretreatment, by the Thermophilic Anaerobe "*Anaerocellum Thermophilum*" DSM 6725. *Applied and Environmental Microbiology*, 20090522, Jul, 2009, vol. 75, no. 14. pp. 4762-4769 ISSN 1098-5336; 0099-2240.
199. BALAT, M. Production of Bioethanol from Lignocellulosic Materials Via the Biochemical Pathway: A Review. *Energy Conversion and Management*, 2011, vol. 52, no. 2. pp. 858-875.
200. ABDEL-RAHMAN, M.A., TASHIRO, Y. and SONOMOTO, K. Recent Advances in Lactic Acid Production by Microbial Fermentation Processes. *Biotechnology advances*, 2013, vol. 31, no.6. pp.877-902.
201. DEMIRBAS, A. Products from Lignocellulosic Materials Via Degradation Processes. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 2007, vol. 30, no. 1. pp. 27-37.
202. KNAUF, M. and MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic Biomass Processing: A Perspective. *International Sugar Journal*, 2004, vol. 106, no. 1263. pp. 147-150.
203. JUODEIKIENE, G., et al. Bioconversion of Agro-industrial By-products to Lactic Acid using *Lactobacillus Sakei* and Two *Pediococcus* Spp. Strains. *International Journal of Food Science & Technology*, 2016, vol. 51, no. 12. pp. 2682-2691.
204. HU, J., et al. High-Titer Lactic Acid Production from NaOH-Pretreated Corn Stover by *Bacillus Coagulans* LA204 using Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation Under Non-Sterile Condition. *Bioresource Technology*, 2015, vol. 182. pp. 251-257.

205. LAOPAIBOON, P., THANI, A., LEELAVATCHARAMAS, V. and LAOPAIBOON, L. Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse for Lactic Acid Production. *Bioresource Technology*, 2010, vol. 101, no. 3. pp. 1036-1043.
206. LI, Z., et al. Utilization of White Rice Bran for Production of L-Lactic Acid. *Biomass and Bioenergy*, 2012, vol. 39. pp. 53-58.
207. CARVALHO, F., PRAZERES, A.R. and RIVAS, J. Cheese Whey Wastewater: Characterization and Treatment. *Science of the Total Environment*, 2013, vol. 445. pp. 385-396.
208. P. Jelen. Encyclopedia of dairy sciences H. Roginski and J.W. Fuquay eds., London: Elsevier, 2003 *Whey Processing*, pp. 2739-2751.
209. KIM, H., et al. *Production of Lactic Acid from Cheese Whey by Batch and Repeated Batch Cultures of Lactobacillus Sp. RKY2*. Springer, 2006.
210. LI, Y., SHAHBAZI, A., COULIBALY, S. and MIMS, M.M. Applied Biochemistry and Biotechnology Springer, 2007 *Semicontinuous Production of Lactic Acid from Cheese Whey using Integrated Membrane Reactor*, pp. 897-907.
211. BÜYÜKKILECI, A.O. and HARSA, S. Batch Production of L-(+) Lactic Acid from Whey by *Lactobacillus Casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2004, vol. 79, no. 9. pp. 1036-1040.
212. HOFVENDAHL, K. and HAHN-HÄGERDAL, B. Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources 1. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, vol. 26, no. 2. pp. 87-107.
213. LÓPEZ-GARZÓN, C.S. and STRAATHOF, A.J. Recovery of Carboxylic Acids Produced by Fermentation. *Biotechnology Advances*, 2014, vol. 32, no. 5. pp. 873-904.
214. PAL, P., SIKDER, J., ROY, S. and GIORNO, L. Process Intensification in Lactic Acid Production: A Review of Membrane Based Processes. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2009, vol. 48, no. 11. pp. 1549-1559.
215. IDLER, C., VENUS, J. and KAMM, B. Microorganisms in Biorefineries Springer, 2015 *Microorganisms for the Production of Lactic Acid and Organic Lactates*, pp. 225-273.
216. VAN REIS, R. and ZYDNEY, A. Bioprocess Membrane Technology. *Journal of Membrane Science*, 2007, vol. 297, no.1-2. pp. 16-50
217. TIMMER, J., KROMKAMP, J. and ROBBERTSEN, T. Lactic Acid Separation from Fermentation Broths by Reverse Osmosis and Nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 1994, vol. 92, no. 2. pp. 185-197.
218. BOUCHOUX, A., ROUX-DE BALMANN, H. and LUTIN, F. Nanofiltration of Glucose and Sodium Lactate Solutions: Variations of Retention between Single-and Mixed-Solute Solutions. *Journal of Membrane Science*, 2005, vol. 258, no. 1-2. pp. 123-132.

219. LI, Y., SHAHBAZI, A., WILLIAMS, K. and WAN, C. Separate and Concentrate Lactic Acid using Combination of Nanofiltration and Reverse Osmosis Membranes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, vol. 147, no. 1-3. pp. 1-9.
220. JAYASENA, V., CHIH, H.J. and NASAR-ABBAS, S. Functional Properties of Sweet Lupin Protein Isolated and Tested at various pH Levels. *Res.J.Agric.Biol.Sci*, 2010, vol. 6. pp. 130-137.
221. JUODEIKIENE, G., et al. Evaluation of the Potential of Utilizing Lactic Acid Bacteria and Dairy Wastewaters for Methane Production. *Energy Exploration & Exploitation*, 2017, vol. 35, no. 3. pp. 388-402.
222. SUN, X.D. and ARNTFIELD, S.D. Gelation Properties of Salt-Extracted Pea Protein Induced by Heat Treatment. *Food Research International*, 2010, vol. 43, no. 2. pp. 509-515.
223. LQARI, H., VIOQUE, J., PEDROCHE, J. and MILLÁN, F. Lupinus Angustifolius Protein Isolates: Chemical Composition, Functional Properties and Protein Characterization. *Food Chemistry*, 2002, vol. 76, no. 3. pp. 349-356.
224. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, Nov, 1951, vol. 193, no. 1. pp. 265-275 ISSN 0021-9258; 0021-9258.
225. DANNER, L., SIDORKINA, L., JOEHL, M. and DUERRSCHMID, K. Make a Face! Implicit and Explicit Measurement of Facial Expressions Elicited by Orange Juices using Face Reading Technology. *Food Quality and Preference*, 3, 2014, vol. 32, Part B. pp. 167-172 ISSN 0950-3293.
226. HE, W., BOESVELDT, S., DE GRAAF, C. and DE WIJK, R.A. The Relation between Continuous and Discrete Emotional Responses to Food Odors with Facial Expressions and Non-Verbal Reports. *Food Quality and Preference*, 3, 2016, vol. 48, Part A. pp. 130-137 ISSN 0950-3293.
227. MOZURIENE, E., et al. The Effect of Savoury Plants, Fermented with Lactic Acid Bacteria, on the Microbiological Contamination, Quality, and Acceptability of Unripened Curd Cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 2016.
228. CUPP-ENYARD, C. Sigma's Non-Specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 20080917, Sep 17, 2008, vol. (19). pii: 899. doi, no. 19. pp. 10.3791/899 ISSN 1940-087X; 1940-087X.
229. NGUYEN, Q.D., et al. Purification and Characterisation of Amylolytic Enzymes from Thermophilic Fungus *Thermomyces Lanuginosus* Strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, vol. 31, no. 3. pp. 345-352.
230. MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, vol. 31, no. 3. pp. 426-428.
231. ANSARI, S.A. and HUSAIN, Q. Lactose Hydrolysis from Milk/Whey in Batch and Continuous Processes by Concanavalin A-Celite 545 Immobilized *Aspergillus*

Oryzae B Galactosidase. *Food and Bioproducts Processing*, 4, 2012, vol. 90, no. 2. pp. 351-359 ISSN 0960-3085.

232. BARTKIENE, E., et al. The Nutritional and Safety Challenges Associated with Lupin Lacto-Fermentation. *Frontiers in Plant Science*, 2016, vol. 7. pp. 951.

233. GRANITO, M. and ALVAREZ, G. Lactic Acid Fermentation of Black Beans (*Phaseolus Vulgaris*): Microbiological and Chemical Characterization. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, vol. 86, no. 8. pp. 1164-1171.

234. JUODEIKIENĖ, G., et al. Effect of Novel Fermented Products on the Microbiological Parameters and Anti-Staling Activity of Wheat Bread. *Food Chemistry and Technology (Maisto Chemija Ir Technologija)*, 2009, vol. 43, no. 2. pp. 36-46.

235. PANDEY, A. Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 3, 2003, vol. 13, no. 2–3. pp. 81-84 ISSN 1369-703X.

236. WANG, L. and YANG, S. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources S. YANG ed., Amsterdam: Elsevier, 2007 *Chapter 18 - Solid State Fermentation and its Applications*, pp. 465-489 ISBN 9780444521149.

237. DIGAITIENE, A., et al. Lactic Acid Bacteria Isolated from Rye Sourdoughs Produce Bacteriocin-like Inhibitory Substances Active Against *Bacillus Subtilis* and Fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, vol. 112, no. 4. pp. 732-742.

238. DIGAITIENE, A., HANSEN, A., JUODEIKIENE, G. and JOSEPHSEN, J. Microbial Population in Lithuanian Spontaneous Rye Sourdoughs. *Ekologija i Technika*, 2005, vol. 13, no. 5. pp. 193-198.

239. LAMPART-SZCZAPA, E., et al. Some Functional Properties of Lupin Proteins Modified by Lactic Fermentation and Extrusion. *Food Chemistry*, 2006, vol. 96, no. 2. pp. 290-296.

240. DI CAGNO, R., et al. Proteolysis by Sourdough Lactic Acid Bacteria: Effects on Wheat Flour Protein Fractions and Gliadin Peptides Involved in Human Cereal Intolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, Feb, 2002, vol. 68, no. 2. pp. 623-633 ISSN 0099-2240; 0099-2240.

241. CLARKE, C., SCHOBER, T. and ARENDT, E. Effect of Single Strain and Traditional Mixed Strain Starter Cultures on Rheological Properties of Wheat Dough and on Bread Quality. *Cereal Chemistry*, 2002, vol. 79, no. 5. pp. 640.

242. ŞİMŞEK, Ö, ÇON, A.H. and TULUMOG˘LU, Ş. Isolating Lactic Starter Cultures with Antimicrobial Activity for Sourdough Processes. *Food Control*, 2006, vol. 17, no. 4. pp. 263-270.

243. 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. pp. 203-208.

244. ARYEE, A., AGYEI, D. and UDENIGWE, C. Impact of Processing on the Chemistry and Functionality of Food Proteins. *Proteins in Food Processing*, 2017. pp. 27.
245. HANSEN, ÅS. Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology Marcel Dekker Incorporated, 2004 *Sourdough Bread*, pp. 729-755.
246. ARZENI, C., et al. Comparative Study of High Intensity Ultrasound Effects on Food Proteins Functionality. *Journal of Food Engineering*, 2, 2012, vol. 108, no. 3. pp. 463-472 ISSN 0260-8774.
247. JOYCE, E., PHULL, S., LORIMER, J. and MASON, T. The Development and Evaluation of Ultrasound for the Treatment of Bacterial Suspensions. A Study of Frequency, Power and Sonication Time on Cultured Bacillus Species. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2003, vol. 10, no. 6. pp. 315-318.
248. SCHERBA, G., WEIGEL, R.M. and O'BRIEN, W.D., Jr. Quantitative Assessment of the Germicidal Efficacy of Ultrasonic Energy. *Applied and Environmental Microbiology*, Jul, 1991, vol. 57, no. 7. pp. 2079-2084 ISSN 0099-2240; 0099-2240.
249. PAGÁN, R., MANAS, P., ALVAREZ, I. and CONDÓN, S. Resistance of *Listeria Monocytogenes* to Ultrasonic Waves Under Pressure at Sublethal (Manosonication) and Lethal (Manothermosonication) Temperatures. *Food Microbiology*, 1999, vol. 16, no. 2. pp. 139-148.
250. CRUZ-CANSINO, N.d.S., et al. Effect of Ultrasound on Survival and Growth of *Escherichia Coli* in Cactus Pear Juice during Storage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, vol. 47, no. 2. pp. 431-437.
251. JUODEIKIENE, G., et al. Solid-State Fermentation of *Silybum Marianum* L. Seeds used as Additive to Increase the Nutritional Value of Wheat Bread. *Food Technology and Biotechnology*, 2013, vol. 51, no. 4. pp. 528-538.
252. JIANG, L., et al. Effects of Ultrasound on the Structure and Physical Properties of Black Bean Protein Isolates. *Food Research International*, 8, 2014, vol. 62. pp. 595-601 ISSN 0963-9969.
253. MIRMOGHATAIE, L., SHOJAEE ALIABADI, S. and HOSSEINI, S.M. Recent Approaches in Physical Modification of Protein Functionality. *Food chemistry*, 2016, vol. 199, pp. 619-627.
254. HU, H., et al. Effects of Ultrasound on Structural and Physical Properties of Soy Protein Isolate (SPI) Dispersions. *Food Hydrocolloids*, 2013, vol. 30, no. 2. pp. 647-655.
255. SINGHAL, A., KARACA, A.C., TYLER, R. and NICKERSON, M. Grain Legumes In Tech, 2016 *Pulse Proteins: From Processing to Structure-Function Relationships*.

256. BARTKIENE, E., et al. Influence of the Addition of Lupin Sourdough with Different Lactobacilli on Dough Properties and Bread Quality. *International Journal of Food Science & Technology*, 2013, vol. 48, no. 12. pp. 2613-2620.
257. O'SULLIVAN, J., MURRAY, B., FLYNN, C. and NORTON, I. The Effect of Ultrasound Treatment on the Structural, Physical and Emulsifying Properties of Animal and Vegetable Proteins. *Food Hydrocolloids*, 2016, vol. 53. pp. 141-154.
258. MADADLOU, A., et al. Acid-Induced Gelation Behavior of Sonicated Casein Solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2010, vol. 17, no. 1. pp. 153-158.
259. CHANDRAPALA, J., ZISU, B., KENTISH, S. and ASHOKKUMAR, M. Influence of Ultrasound on Chemically Induced Gelation of Micellar Casein Systems. *Journal of Dairy Research*, 2013, vol. 80, no. 2. pp. 138-143.
260. HU, H., et al. Acid-Induced Gelation Behavior of Soybean Protein Isolate with High Intensity Ultrasonic Pre-Treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, vol. 20, no. 1. pp. 187-195.
261. ZHANG, P., et al. Effect of High Intensity Ultrasound on Transglutaminase-Catalyzed Soy Protein Isolate Cold Set Gel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016, vol. 29. pp. 380-387.
262. HU, H., et al. Effect of Ultrasound Pre-Treatment on Formation of Transglutaminase-Catalysed Soy Protein Hydrogel as a Riboflavin Vehicle for Functional Foods. *Journal of Functional Foods*, 2015, vol. 19. pp. 182-193.
263. JUODEIKIENE, G., et al. The Impact of Novel Fermented Products Containing Extruded Wheat Material on the Quality of Wheat Bread. *Food Technology and Biotechnology*, 2011, vol. 49, no. 4. pp. 502-510.
264. MARTÍNEZ, M.M. and GÓMEZ, M. Insight of the A-Amylase Family of Enzymes. *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*, 2017. pp. 21.
265. FERNANDES, P. and CARVALHO, F. Enzymes in Food Processing. *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable use Options of Waste Biomass*, 2016. pp. 173.
266. SZABÓ, O.E. and CSISZÁR, E. The Effect of Low-Frequency Ultrasound on the Activity and Efficiency of a Commercial Cellulase Enzyme. *Carbohydrate Polymers*, 2013, vol. 98, no. 2. pp. 1483-1489.
267. GASPAROTTO, J.M., et al. Ultrasound-Assisted Hydrolysis of Sugarcane Bagasse using Cellulolytic Enzymes by Direct and Indirect Sonication. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 2015, vol. 4, no. 4. pp. 480-485 ISSN 1878-8181.
268. KADKHODAEI, R. and POVEY, M.J. Ultrasonic Inactivation of Bacillus A-Amylase. I. Effect of Gas Content and Emitting Face of Probe. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2008, vol. 15, no. 2. pp. 133-142.

269. OLIVEIRA, H.M., et al. Does Ultrasound Improve the Activity of Alpha Amylase? A Comparative Study Towards a Tailor-made Enzymatic Hydrolysis of Starch. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, vol. 84, pp. 674-685.
270. THAKUR, B. and NELSON, P. Inactivation of Lipoxygenase in Whole Soy Flour Suspension by Ultrasonic Cavitation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 1997, vol. 41, no. 5. pp. 299-301.
271. DOXASTAKIS, G., et al. Lupin, Soya and Triticale Addition to Wheat Flour Doughs and their Effect on Rheological Properties. *Food Chemistry*, 2002, vol. 77, no. 2. pp. 219-227.
272. DUODU, K., et al. Legume Composite Flours and Baked Goods: Nutritional, Functional, Sensory, and Phytochemical Qualities. *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*, 2011. pp. 193-203.
273. PARASKEVOPOULOU, A., PROVATIDOU, E., TSOTSIOU, D. and KIOSSEOGLOU, V. Dough Rheology and Baking Performance of Wheat Flour–lupin Protein Isolate Blends. *Food Research International*, 2010, vol. 43, no. 4. pp. 1009-1016.
274. BARTKIENE, E., et al. Effect of Lactic Acid Fermentation of Lupine Wholemeal on Acrylamide Content and Quality Characteristics of Wheat-Lupine Bread. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2013, vol. 64, no. 7. pp. 890-896.
275. POUTANEN, K., FLANDER, L. and KATINA, K. Sourdough and Cereal Fermentation in a Nutritional Perspective. *Food Microbiology*, 2009, vol. 26, no. 7. pp. 693-699.
276. CHANALIA, P., GANDHI, D., ATTRI, P. and DHANDA, S. Purification and Characterization of B-Galactosidase from Probiotic *Pediococcus Acidilactici* and its use in Milk Lactose Hydrolysis and Galactooligosaccharide Synthesis. *Bioorganic Chemistry*, 2018.
277. SCHWAB, C., LEE, V., SØRENSEN, K.I. and GÄNZLE, M.G. Production of Galactooligosaccharides and Heterooligosaccharides with Disrupted Cell Extracts and Whole Cells of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *International dairy journal*, 2011, vol. 21, no. 10, pp. 748-754.
278. SANI, A., MORLON-GUYOT, J. and GUYOT, J. New Efficient Amylase-Producing Strains of *Lactobacillus Plantarum* and *L. Fermentum* Isolated from Different Nigerian Traditional Fermented Foods. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, vol. 72, no. 1. pp. 53-62.
279. DAS, B., et al. Lactose Hydrolysis by B-Galactosidase Enzyme: Optimization using Response Surface Methodology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015.

280. PANESAR, P.S., KENNEDY, J.F., KNILL, C.J. and KOSSEVA, M. Production of L () Lactic Acid using *Lactobacillus Casei* from Whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2010, vol. 53, no. 1. pp. 219-226.
281. GARVIE, E.I. Bacterial Lactate Dehydrogenases. *Microbiological Reviews*, Mar, 1980, vol. 44, no. 1. pp. 106-139 ISSN 0146-0749; 0146-0749.
282. NARAYANAN, N., ROYCHOUDHURY, P.K. and SRIVASTAVA, A. L () Lactic Acid Fermentation and its Product Polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2004, vol. 7, no. 2. pp. 167-178.
283. SEVERSON, D.K. and BARRETT, C.L. *Lactobacillus Delbrueckii* Ssp. *Bulgaricus* Strain and Fermentation Process for Producing L-(+)-Lactic Acid. *Biotechnology Advances*, 1996, vol. 3, no. 14. pp. 382.
284. HOFVENDAHL, K. and HAHN-HÄGERDAL, B. L-Lactic Acid Production from Whole Wheat Flour Hydrolysate using Strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, vol. 20, no. 4. pp. 301-307.
285. GONZÁLEZ, M., ALVAREZ, S., RIERA, F. and ALVAREZ, R. Economic Evaluation of an Integrated Process for Lactic Acid Production from Ultrafiltered Whey. *Journal of Food Engineering*, 2007, vol. 80, no. 2. pp. 553-561.
286. ØYAAS, J., STORRØ, I. and LEVINE, D. Uptake of Lactose and Continuous Lactic Acid Fermentation by Entrapped Non-Growing *Lactobacillus Helveticus* in Whey Permeate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, vol. 46, no. 3. pp. 240-249.
287. JUODEIKIENE, G., ZADEIKE, D., BARTKIENE, E. and KLUPSAITE, D. Application of Acid Tolerant *Pediococcus* Strains for Increasing the Sustainability of Lactic Acid Production from Cheese Whey. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, vol. 72. pp. 399-406.
288. MATIJEVIĆ, B., LISAK, K., BOŽANIĆ, R. and TRATNIK, L. Impact of Enzymatic Hydrolyzed Lactose on Fermentation and Growth of Probiotic Bacteria in Whey. *Mljekarstvo*, 2011, vol. 61, no. 2. pp. 154.
289. WOJTYNIAK, B. and SZANIAWSKA, D. Separation of Lactic Acid Solutions from Whey Fermentation Broth using Zirconium (IV) Hydrous Oxide Dynamically Formed Membranes. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2015, vol. 24, no. 3.
290. SILALAH, S.H. and LEIKNES, T. High Frequency Back-Pulsing for Fouling Development Control in Ceramic Microfiltration for Treatment of Produced Water. *Desalination and Water Treatment*, 2011, vol. 28, no. 1-3. pp. 137-152.
291. SONDH, R. and BHAVE, R. Role of Backpulsing in Fouling Minimization in Crossflow Filtration with Ceramic Membranes. *Journal of Membrane Science*, 2001, vol. 186, no. 1. pp. 41-52.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Straipsniai, susiję su disertacijos tema, Mokslinės informacijos instituto (Thomson Reuters Web of Knowledge) duomenų bazėse referuojamuose leidiniuose

1. Klupšaitė, D.; Juodeikienė, G.; Arbones, E.; Quintáns, A. P.; Žadeikė, D.; Bartkienė, E.; Glasner, C.; Dikiy, A.; Shumilina, E. A comparison study on the production and recovery of lactic acid by fermenting dairy by-products with *P. acidilactici* and *Lb. delbrückii* spp. *bulgaricus* // *Waste and biomass valorization*. Dordrecht: Springer. ISSN 1877-2641. ISSN 1877-265X. 2018, vol. 00, p. 1-10. DOI: 10.1007/s12649-017-0171-z. [IF: 1,337; AIF: 3,392; IF/AIF: 0,394; Q3 (2016, InCites JCR SCIE)].
2. Klupšaitė, D.; Juodeikienė, G.; Žadeikė, D.; Bartkienė, E.; Maknickienė, Z.; Liutkutė, G. The Influence of lactic acid fermentation on functional properties of narrow-leaved lupine protein as functional additive for higher value wheat bread // *LWT-Food science and technology*. Amsterdam: Elsevier. ISSN 0023-6438. ISSN 1096-1127. 2017, vol. 75, January, p. 180-186. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.08.058. [IF: 2,329; AIF: 2,326; IF/AIF: 1,001; Q1 (2016, InCites JCR SCIE)].
3. Juodeikienė, G.; Klupšaitė, D.; Žadeikė, D.; Čižeikienė, D.; Vidžiūnaitė, I.; Bartkienė, E.; Černauskas, D. Bioconversion of agro-industrial by-products to lactic acid using *Lactobacillus sakei* and two *Pediococcus* spp. strains // *International journal of food science and technology*. Edinburg: John Wiley & Sons. ISSN 0950-5423. 2016, vol. 51, iss. 12, p. 2682-2691. DOI: 10.1111/ijfs.13258. [IF: 1,640; AIF: 2,326; IF/AIF: 0,705; Q2 (2016, InCites JCR SCIE)].
4. Juodeikienė, G.; Žadeikė, D.; Bartkienė, E.; Klupšaitė, D. Application of acid tolerant *Pediococcus* strains for increasing the sustainability of lactic acid production from cheese whey // *LWT-Food science and technology*. Amsterdam: Elsevier. ISSN 0023-6438. ISSN 1096-1127. 2016, vol. 72, p. 399-406. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.05.023. [IF: 2,329; AIF: 2,326; IF/AIF: 1,001; Q1 (2016, InCites JCR SCIE)].

Kitų tarptautinių duomenų bazių leidiniuose (Periodiniuose leidiniuose ir vienkartinuose straipsniu rinkiniuose bei konferencijų pranešimu medžiagoje paskelbti straipsniai)

Nacionalinėse leidyklose

1. Klupšaitė, D.; Juodeikienė, G. Legume: composition, protein extraction and functional properties: a review = Ankštiniai augalai: sudėtis, baltymų ekstrakcija ir funkcinės savybės: apžvalga // *Cheminė technologija*. Kaunas: KTU. ISSN 1392-1231. ISSN 2029-719X. 2015, t. 66, Nr. 1, p. 5-12. DOI: 10.5755/j01.ct.66.1.12355.

Konferencijų pranešimai ir tezės

1. Klupšaitė, D.; Juodeikienė, G.; Žadeikė, D.; Bartkienė, E. Bioprocessing of *Lupinus angustifolius* seeds for the production of value-added products // FoodBalt – 2018 [elektroninis išteklius] : 12th Baltic conference on food science and technology "Food R&D in the Baltics and beyond", May 17-18, 2018 Kaunas, Lithuania : abstract book / Kaunas University of Technology. Department of Food Science and Technology. Kaunas: Kauno technologijos universitetas, 2018. eISBN 9786090214626. p. 16.
2. Juodeikienė, G.; Čižeikienė, D.; Glasner, C.; Bartkienė, E.; Klupšaitė, D.; Damašius, J.; Dikiy, A.; Shumilina, E.; Ilić, N.; Di Berardino, S.; Foncesa, C. Dairy wastewater recycling possibilities to biogas production applying lactic acid fermentation in the acidification stage // International conference on "Clean Energy for the World's Electricity Grids" : November 20-22, 2017, Genève, Switzerland / UNITED Scientific Group. [Plano]: UNITED Scientific Group. 2017, p. 36-36.
3. Klupšaitė, D.; Juodeikienė, G.; Žadeikė, D.; Bartkienė, E.; Maknickienė, Z. Impact of ultrasound treatment on *Lupinus angustifolius* protein, enzyme activities and microbiological contamination // Foodbalt 2017 : 11th Baltic Conference on Food Science and Technology "Food science and technology in a changing world", Jelgava, April 27-28, 2017 : abstract book / Latvia University of Agriculture Faculty of Food Technology. [S.l.]: [s.n.]. ISSN 2501-0190. 2017, p. 74.
4. Klupšaitė, D.; Juodeikienė, G.; Žadeikė, D.; Bartkienė, E.; Luque, R. Lupine biomass bioconversion to lactic acid and polymerization possibilities using zeolite // FP1306 COST Action "Valorisation of lignocellulosic biomass side streams for sustainable production of chemicals, materials and fuels using low environmental impact technologies" (LIGNOVAL): 3rd workshop and 4th MC meeting, Torremolinos, Spain, 27-28 March, 2017. [Torremolinos]: [s.n.]. 2017, p. 63.
5. Juodeikienė, G.; Klupšaitė, D.; Arbones, E.; Quintáns, A. P.; Žadeikė, D.; Bartkienė, E. Bioconversion possibilities of cheese permeate into lactic acid by using membrane filtration techniques // 4th international ISEKI Food conference "Responsible research and innovation in the food value chain", 6-8 July, 2016, Vienna, Austria : book of abstracts. Vienna: ISEKI-Food Association, 2016. ISBN 9783900932343. p. 165.
6. Bartkienė, E.; Bartkevics, V.; Krunglevičiūtė, V.; Juodeikienė, G.; Jakobsone, I.; Mozūrienė, E.; Žadeikė, D.; Čižeikienė, D.; Klupšaitė, D. The Use of enzymatic treatment and fermentation with *P. acidilactici* BaltBio01 MSCL P1480 for industrial cereal by-products on purpose to produce food/feed stock with high amount of lactic acid bacteria // The Vital Nature Sign : 10th International Scientific Conference "The Vital Nature Sign" : May 19-20, 2016, Vilnius, Lithuania : abstract book / Editors: dr. Nicola Tiso, dr. Vilma

Kaškonienė ; Vytautas Magnus University. Kaunas: Vytautas Magnus University. ISSN 2335-8653. 2016, p. 129-129.

7. Juodeikienė, G.; Klupšaitė, D.; Arbones, E.; Quintáns, A. P.; Žadeikė, D.; Bartkienė, E. The possibilities of lactic acid bio-production from food industry by-products by using membrane filtration techniques // Chemistry and chemical technology: international conference of Lithuanian Society of Chemistry: Lithuanian Academy of Science, Vilnius, Lithuania, April 28-29, 2016: book of abstracts / Fizinių ir technologijos mokslų centras, Vilniaus universitetas, Lietuvos mokslų akademija, Kauno technologijos universitetas. [S.l.]: [s.n.], 2016. ISBN 9786099551135. p. 36.
8. Juodeikienė, G.; Bartkienė, E.; Bašinskienė, L.; Žadeikė, D.; Čižeikienė, D.; Klupšaitė, D. Bio-conversion possibilities of lignocellulosic waste and lactic acid stereoisomers // FP1306 COST Action : Joint WG1 & WG2 Meeting : 21-22 September, 2015, Bucharest, Romania. Bucharest: COST. 2015, p. 21.
9. Christoph, G.; Juodeikienė, G.; Čižeikienė, D.; Damašius, J.; Shumilina, E.; Dikiy, A.; Foncesa, C.; Di Berardino, S.; Ilić, N.; Bartkienė, E.; Klupšaitė, D. Biorecycling of dairy industry residues to organic acids isomers and other metabolites by using bacteriocins producing lab // IDF World dairy summit 2015 : Closing the nutritional gap with sustainable dairy, Vilnius, Lithuania, September 20-24, 2015 [elektroninis išteklius]. [S.l.]: [s.n.]. 2015, p. 1.
10. Klupšaitė, D.; Juodeikienė, G.; Žadeikė, D.; Bašinskienė, L.; Maknickienė, Z.; Bartkienė, E. Effect of lactic acid bacteria fermentation on lupine functional properties //10th Baltic Conference on Food Science and Technology "Future Food: Innovations, Science and Technology" – FoodBalt - 2015 : Abstract book : May 21-22, 2015, Kaunas, Lithuania / [Editors of abstract book: Aušra Šipailienė, Vaida Kitrytė]. Kaunas: Kaunas University of Technology, 2015. ISBN 9786090211380. p. 102-102, no. PP54.

KITOS PUBLIKACIJOS

1. Juodeikienė, G.; Žadeikė, D.; Klupšaitė, D.; Černauskas, D.; Bartkienė, E.; Lėlė, V.; Steiblienė, V.; Adomaitienė, V. Effects of emotional responses to certain foods on the prediction of consumer acceptance // Food research international. Amsterdam: Elsevier. ISSN 0963-9969. eISSN 1873-7145. 2018, vol. 112, p. 361-368. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.06.064.
2. Bartkienė, E.; Bartkevics, V.; Ikkere, L. E.; Pugajeva, I.; Zavistanavičiūtė, P.; Lėlė, V.; Ružauskas, M.; Bernatoniene, J.; Jakštas, V.; Klupšaitė, D.; Žadeikė, D.; Viškelis, P.; Juodeikienė, G. The effects of ultrasonication, fermentation with *Lactobacillus* sp., and dehydration on the chemical composition and microbial contamination of bovine colostrum // Journal of Dairy Science. New York : Elsevier. ISSN 0022-0302. 2018, Vol. 00, iss. 00, p. 1-12.
3. Bartkienė, E.; Šakienė, V.; Bartkevics, V.; Wiacek, C.; Rusko, J.; Lėlė, V.; Ružauskas, M.; Juodeikienė, G.; Klupšaitė, D.; Bernatoniene, J.; Jakštas, V.; Braun, P.G. Nutraceuticals in gummy candies form prepared from lacto-

fermented lupine protein concentrates, as high-quality protein source, incorporated with Citrus paradise L. essential oil and xylitol // International journal of food science & technology. Oxford : Wiley. ISSN 0950-5423. 2018, Vol. 00, p. 1-11.

4. Bartkienė, E.; Ružauskas, M.; Krunglevičiūtė, V.; Zavistanavičiūtė, P.; Bernatienė, J.; Jakštas, V.; Ivanauskas, L.; Žadeikė, D.; Klupšaitė, D.; Viškelis, P.; Bendoraitienė, J.; Navikaitė-Šnipaitienė, V.; Juodeikienė, G. Development of antimicrobial gummy candies with addition of bovine colostrum, essential oils and probiotics // International journal of food science & technology. Oxford: Wiley. ISSN 0950-5423. ISSN 1365-2621. 2018, vol. 00, iss. 00, p. 1-9.
5. Juodeikienė, G.; Vidmantienė, D.; Bašinskienė, L.; Černauskas, D.; Klupšaitė, D.; Bartkienė, E.; Petrauskas, A.; De Koe, W. J. Recent advances in the rapid acoustic screening of deoxynivalenol in wheat grains // World mycotoxin journal. Wageningen: Wageningen Academic Publishers. ISSN 1875-0710. 2014, vol. 7, no. 4, p. 517-525.

INFORMACIJA APIE DISERTACIJOS AUTORE

Dovilė Klupšaitė, g. 1989-08-09, Kaunas, Lietuva

1996–2000 m. Kazliškių pradinė mokykla

2000–2008 m. Kauno “Aušros” gimnazija, vidurinis išsilavinimas

2008–2012 m. Kauno technologijos universitetas, chemijos inžinerijos bakalauro laipsnis

2012–2014 m. Kauno technologijos universitetas, maisto technologijų magistro laipsnis su pagyrimu

2014–2018 m. Kauno technologijos universitetas, chemijos inžinerijos (05T) doktorantūros studijos

2015-06 ir 2016-05 stažuotės Santiago de Compostela universitete (Ispanija)

2016-09–2016-12 stažuotė Kordobos universitete (Ispanija)

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovei prof. habil. dr. Gražinai Juodeikienei už disertacijos idėją ir vadovavimą moksliniams tyrimams, pagalbą rengiant publikacijas ir disertaciją, paskatinimą, motyvaciją ir visokeriopą paramą doktorantūros studijų metu. Taip pat norėčiau padėkoti Maisto mokslo ir technologijos katedros kolegoms, ypatingai prof. habil. dr. G. Juodeikienės mokslo grupei; Santiago De Compostela ir Kordobos universitetų kolegoms; prof. Elenai Bartkienei, Santino Di Berardino ir Willem De Koe už pagalbą, paramą ir vertingos mokslines konsultacijas. Esu dėkinga Lietuvos mokslo tarybai už finansinę paramą. Šilčiausius padėkos žodžius skiriu savo mylimai mamai ir krikštatėviui už jų neišsenkančią kantrybę, supratimą, paramą, rūpestį ir paskatinimą.

SL344. 2018-12-03, 13,75 leidyb. apsk. I. Tiražas 12 egz. Užsakymas 315.
Išleido Kauno technologijos universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44249 Kaunas
Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas