



Kauno technologijos universitetas

Cheminės Technologijos fakultetas

Biotechnologinių priemonių ir ultragarso taikymas glitimo detoksikacijai grūdų produktuose

Baigiamasis magistro projektas

Gerda Puidokaitė

Projekto autorė

Dr. Daiva Žadeikė

Vadovė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės Technologijos fakultetas

Biotechnologinių priemonių ir ultragarso taikymas glitimo detoksikacijai grūdų produktuose

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Gerda Puidokaitė

Projekto autorė

Dr. Daiva Žadeikė

Vadovė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Recenzentė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės Technologijos fakultetas

Gerda Puidokaitė

Biotechnologinių priemonių ir ultragarso taikymas glitimo detoksikacijai grūdų produktuose

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Gerdos Puidokaitės, baigiamasis projektas tema „Biotechnologinių priemonių ir ultragarso taikymas glitimo detoksikacijai grūdų produktuose“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Puidokaitė, Gerda. Biotechnologinių priemonių ir ultragarso taikymas glitimo detoksikacijai grūdų produktuose. Magistro baigiamasis projektas / vadovė dr. Daiva Žadeikė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės Technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Biotechnologija.

Reikšminiai žodžiai: prolaminai, glitimas, baltymų frakcijos, celiakija, fermentacija, pieno rūgšties bakterijos, ultragarasas.

Kaunas, 2019. 64 p.

Santrauka

Duonos kepiniai šiuo metu gaminami, taikant greitas technologijas, kuriose ilgas raugų fermentacijos procesas, naudojant pieno rūgšties bakterijas, yra visiškai pakeičiamas cheminiais priedais. Šioje technologijoje grūdų komponentai, pavyzdžiui, baltymai, gamybos proceso metu nėra suskaidomi, dėl to susidaro mažiau virškinamų dalelių, kurios gali sukelti įvairias alergines reakcijas. Šiame projekte tirtos bakterinės kilmės proteolitinių fermentų ir ultragarso panaudojimo galimybės efektyviam glitimo baltymų kieki sumažinimui javų grūdų produktuose. Darbe pilno grūdo kvietinių miltų apdorojimui taikyta fermentacija skirtingomis pieno rūgšties bakterijomis, vertinant terpės rūgštingumo pokyčius, bakterijų proteolitinį aktyvumą bei tirpiųjų baltymų susidarymą fermentacijos terpėje. Pieno rūgšties bakterijų fermentinės sistemos aktyvinimui ir žaliavos apdorojimui naudotas 37 kHz dažnio (intensyvumas 100%, galingumas 70 W) ultragarasas. Eksperimento metu vertinta apdorojimo ultragarsu įtaka mikroorganizmų proteolitiniam aktyvumui ir kompleksinio apdorojimo ultragarsu ir fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis poveikis kviečių glitimo frakcijų baltymų pokyčiams bei taikytų priemonių įtaka tešlos tekstūros parametrams. Tiriamojo darbo metu atrinkti didžiausiu proteolitinio aktyvumu pilno grūdo kvietinių miltų terpėje pasižymintys mikroorganizmai ir parinktos optimalios fermentacijos sąlygos. Nustatyta, kad pilno grūdo kvietinių miltų terpėje didžiausiu proteolitinio aktyvumu po 24 h fermentacijos pasižymėjo *Lactobacillus brevis* LUHS140 (0,011 AV/ml). Apdorojimas 30 min ultragarsu *Lactobacillus brevis* LUHS140 proteolitinį aktyvumą padidino 2 kartus. Vertinant pieno rūgšties bakterijų proteolizės ir ultragarso įtaką glitimo baltymų frakcijų pokyčiams, nustatyta, kad, fermentuojant gryną glitimą *Lactobacillus brevis* LUHS140, gliadinų kiekis sumažėjo 2,3 karto, lyginant su neapdorotu mėginiu, o papildomas apdorojimas ultragarsu leido sumažinti gliadinų kiekį 6,3 karto. Ultragarso ir fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis taikymas leido sumažinti gliadinų kiekį tešloje 3,8 karto, o kompleksinis ultragarso, pieno rūgšties bakterijų ir *Saccharomyces cerevisiae* mielių panaudojimas gliadinų kiekį papildomai sumažino 50 % (iki 0,16 mg/g). Kokybinė gliadinų analizė patvirtino, kad ultragarso ir pieno rūgšties bakterijų proteolitinių fermentų poveikyje gryno glitimo gliadinų frakcija yra pilnai suhidrolizuojama. Priešingai nei gliadinai, visais atvejais gliuteninai nebuvo taip efektyviai paveikti taikomų priemonių. Taikytos biotechnologinės priemonės ir apdorojimas ultragarsu blogino tešlos tekstūros parametrus, tačiau tai tik patvirtina efektyvią prolaminų hidrolizę. Tiriamajame darbe pateikta technologija gali būti pritaikyta fermentuotų produktų be glitimo ar su sumažintu glitimo kiekiu gamybai.

Puidokaitė, Gerda. Application of Biotechnological Tools and Ultrasound for the Gluten Detoxification in Cereal-Based Products. Master's Final Degree Project / supervisor dr. Daiva Žadeikė; Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology.

Study field and area: Technology Sciences, Biotechnology.

Keywords: prolamins, gluten, protein fractions, celiac disease, fermentation, lactic acid bacteria, ultrasound.

Kaunas, 2019. 64 p.

Summary

Bread bakery products are currently produced using rapid technologies, where the long fermentation process with lactic acid bacteria is completely changed by chemical additives. In this technology, grain components, such as proteins, are not degraded during the production process resulting in less digestible food components that can cause various allergic reactions. In this project, the possibilities of using proteolytic enzymes of bacterial origin and ultrasound for efficient reduction of gluten protein in cereal products were investigated. For the treatment of whole grain wheat flour, fermentation with different lactic acid bacteria was used evaluating the changes in the acidity of the medium and lactic acid bacteria proteolytic activity and formation of soluble proteins in the fermentation medium. An ultrasound of 37 kHz frequency (intensity 100%, power 70 W) was used for the activation of lactic acid bacteria enzyme system and raw material treatment. The effect of ultrasound treatment on lactic acid bacteria proteolytic activity and the effect of complex ultrasound treatment and lactic acid bacteria fermentation on wheat gluten fraction protein changes and the influence of applied measures on the parameters of dough texture were evaluated. During the experiment, microorganisms with highest proteolytic activity in whole grain wheat flour medium as well as optimal fermentation conditions were selected. It was found that *Lactobacillus brevis* LUHS140 had the highest proteolytic activity (0.011 AV/ml) in tested medium after 24 h of fermentation. Also, *Lactobacillus brevis* LUHS140 proteolytic activity increased two times after 30 min of ultrasound treatment. Evaluating the effect of lactic acid bacteria proteolysis and ultrasound on changes in gluten protein fractions provided the findings showing that by fermenting pure gluten with *Lactobacillus brevis* LUHS140 it is possible to decrease the amount of gliadins 2,3 times in comparison to an unprocessed gluten. Additional ultrasound treatment reduced the gliadins 6,3 times. Combined application of ultrasound and lactic acid bacteria fermentation allowed to reduce the amount of gliadins 3,8 times. Combined application of ultrasound, lactic acid bacteria fermentation and *Saccharomyces cerevisiae* yeast reduced the amount of gliadins by further 50 % (till 0,16 mg/g). The qualitative analysis of gliadins confirmed that ultrasound and lactic acid bacteria proteolytic enzymes affected the full hydrolysis of the gliadin fraction of pure gluten. In all cases, glutenins were not affected as much by the applied measures as gliadins. Applied biotechnological measures and application of ultrasound lowered the texture parameters of the dough, which proves a high degree of hydrolysis of prolamins. This technology may be applied to produce fermented products without gluten or with a smaller gluten amount.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	8
Įvadas.....	9
1. Literatūros apžvalga	11
1.1. Kviečių grūdų pagrindiniai sudėties komponentai	11
1.1.1. Glitimo baltymai.....	11
1.2. Glitimo sukeltos ligos ir toksiškumas.....	14
1.2.1. Celiakija.....	14
1.2.2. Glitimo baltymų toksiškumas.....	16
1.2.3. Dieta be glitimo	17
1.3. Biotechnologiniai glitimo baltymų detoksikacijos būdai	18
1.3.1. Proteolitinių fermentų vartojimas su maistu.....	18
1.3.2. Mikroorganizmų panaudojimas glitimo suskaidymui maisto gamybos grandinėje.....	18
1.3.3. Kiti detoksikacijos būdai	21
1.4. Ultragarso kavitacijos taikymas biotechnologinių procesų valdymui.....	21
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	25
2.1. Medžiagos ir mikroorganizmai.....	25
2.2. Aparatūra	25
2.3. Tyrimo metodai	25
2.3.1. Fermentacija pieno rūgšties bakterijomis.....	25
2.3.2. pH ir bendro titruojamojo rūgštingumo nustatymas.....	26
2.3.3. Baltymų kiekio nustatymas spektrofotometriu metodu.....	26
2.3.4. Proteolitinio aktyvumo nustatymas	26
2.3.5. Fermentacijos terpės apdorojimas ultragarsu	28
2.3.6. Glitimo baltymų ekstrakcija	28
2.3.7. Baltymų kiekio nustatymas Bradfordo metodu.....	28
2.3.8. Baltymų elektroforezė natrio dodecilsulfato–poliakrilamido gelyje.....	29
2.3.9. Baltymų kapiliarinė elektroforezė	31
2.3.10. Molekulinių sietų chromatografija	32
2.3.11. Tešlos tekstūros parametrų nustatymas	33
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	35
3.1. Pieno rūgšties bakterijų gyvybingumo kvietinių miltų terpėje įvertinimas.....	35
3.1.1. Terpės rūgštingumo kitimas fermentacijos metu	35
3.1.2. Pieno rūgšties bakterijų proteolitinio aktyvumo įvertinimas fermentacijos terpėje.....	36
3.1.3. Tirpiųjų baltymų pokyčių įvertinimas fermentacijos terpėje	37
3.2. Ultragarso kavitacijos įtaka mikroorganizmų bioaktyvumui	39
3.2.1. Kviečių terpės apdorojimo ultragarsu įtaka mikroorganizmų bioaktyvumui.....	39
3.2.2. Optimalių apdorojimo ultragarsu sąlygų įtaka mikroorganizmų bioaktyvumui	41
3.3. Apdorojimo ultragarsu ir fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis įtaka glitimo baltymų frakcijų suskaidymui	43
3.4. Apdorojimo ultragarsu ir fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis įtaka viso grūdo kvietinių miltų glitimo baltymų frakcijų suskaidymui	48
3.5. Biotechnologinių priemonių ir ultragarso įtaka tešlos tekstūros savybėms	52
Rekomendacijų dalis	56

Išvados	58
Literatūros sąrašas	59
Priedai.....	65

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

DTT – ditiotreitolis

MRS – De Man, Rogosa ir Sharpe maitinamoji terpė

NDS – natrio dodecilsulfatas

NDS–PAGE – natrio dodecilsulfato – poliakrilamido gelio elektroforezė

PRB – pieno rūgšties bakterijos

TCA – trichloracto rūgštis

TFA – trifluoracto rūgštis

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilendiaminas

TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-propano-1,3-diolis

ŽLA – žmogaus leukocitų antigenas

Įvadas

Pastaruoju metu susirgimų celiakija, kurią sukelia įvairių grūdų baltymai, apibūdinami kaip gliutenas, nustatoma maždaug 0,5 – 2 % visų gyventojų daugelyje Europos šalių ir JAV. Dėl didelio glutamino kiekio ir specifinių sekų modelių glitimo prolaminais yra atsparūs virškinimo trakto proteolitiniams fermentams ir taip veikia žarnyno pralaidumą [1]. Šiuo metu vienintelis efektyvus ligos gydymas yra dieta be glitimo, tačiau ši dieta negali būti laikoma sveikos mitybos pavyzdžiu, kadangi produktai be glitimo dažnai yra gaminami iš krakmolo ar rafinuotų miltų, kuriems būdingas mažas skaidulinių medžiagų kiekis [2]. Pagal Pasaulio sveikatos organizacijos komisijos ir FAO rekomendacijas, išskiriami maisto produktai be glitimo, kurių sudėtyje glitimo lygis yra <20 ppm ir produktai su sumažintu glitimo kiekiu, kai glitimo lygis yra <200 ppm [3]. Šiai dienai vartotojai jau gali įsigyti maisto produktų be glitimo, tačiau vis dar nepakankamai atlikta tyrimų ir sukurta technologijų, gerinančių tokių produktų kokybę ir mažinančių kainą, kadangi tokie produktai yra kur kas brangesni, lyginant su įprastiniais.

Duonos kepinių gamybai šiuo metu taikomos greitos technologijos, kuriose ilgas raugų fermentacijos procesas, naudojant proteolitines pieno rūgšties bakterijas ir *Saccharomyces cerevisiae* mieles, yra visiškai pakeičiamas cheminiais priedais. Šioje technologijoje grūdų komponentai, pavyzdžiui, baltymai, gamybos metu nėra suskaidomi, dėl to atsiranda mažiau virškinamų maisto produktų, kurie gali sukelti įvairias alergines reakcijas [4]. Maisto ir biotechnologijos pramonės daro labai didelę pažangą, siekiant pagerinti glitimo netoleruojančių žmonių kasdienybę. Fermentuoti pieno rūgšties bakterijomis raugai gali būti pritaikomi maisto produktų be glitimo gamyboje, siekiant pagerinti šių produktų tekstūrą, maistines ir juslines savybes. Šio biotechnologinio proceso efektyvumą galima padidinti, atrenkant mikroorganizmus, gebančius efektyviai hidrolizuoti vandenyje netirpius baltymus, tokius kaip gliadinai, taip sumažinant jų toksišką poveikį, ir parenkant optimalias fermentacijos sąlygas. Taip pat fermentacijos efektyvumą galima padidinti ultragarso kavitacija. Pastaruoju metu ultragarso panaudojimu paremtos technologijos yra pripažintos kaip efektyvus ir aplinką tausojantis pirminio apdorojimo būdas, pagerinantis ne tik baltymų hidrolizės laipsnį, bet ir įtakojantis bakterijų augimo intensyvumą [5]. Vis dėlto tyrimų duomenys parodė, kad būtina optimizuoti apdorojimo ultragarsu sąlygas procesui kontroliuoti.

Darbo tikslas: įvertinti bakterinės kilmės proteolitinių fermentų ir ultragarso panaudojimo galimybes efektyviam glitimo baltymų kiekio sumažinimui maisto produktuose.

Darbo uždaviniai:

1. Pieno rūgšties bakterijų (PRB), pasižyminčių proteolitiniu aktyvumu kvietinių miltų terpėje, parinkimas:
 - a) PRB proteolitinio aktyvumo nustatymas;
 - b) baltymų pokyčių fermentacijos terpėje įvertinimas;
 - c) fermentacijos sąlygų parinkimas.
2. Ultragarso kavitacijos įtakos mikroorganizmų bioaktyvumui įvertinimas:
 - a) optimalių apdorojimo ultragarsu sąlygų parinkimas, įvertinant PRB proteolitinį aktyvumą;
 - b) terpės pH ir bendro titruojamojo rūgštingumo įvertinimas.
3. Apdorojimo ultragarsu ir fermentacijos atrinktomis PRB įtakos glitimo baltymų frakcijų hidrolizei įvertinimas:
 - a) gliadinų ir gliuteninų išskyrimas iš fermentacijos terpės;

- b) kiekybinė gliadinų analizė;
 - c) kokybinė gliadinų ir gliuteninų analizė, taikant molekulinę sietų chromatografiją, natrio dodecilsulfato – poliakrilamido gelio elektroforezę ir kapiliarinę elektroforezę.
4. Biotechnologinių priemonių ir ultragarso įtakos kvietinės tešlos tekstūros savybėms įvertinimas ir rekomendacijų pateikimas.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Kviečių grūdų pagrindiniai sudėties komponentai

Kviečiai yra labiausiai pasaulyje paplitusi grūdų rūšis. Duonos kviečiai (lot. *Triticum aestivum*) gamina vienasėklius vaisius, kurie yra vadinami grūdais arba branduoliais. *Triticeae grupėje* yra penkios gentys, t. y. *Aegilops*, *Elymus*, *Hordeum*, *Secale* ir *Triticum*. Laukinės rūšys yra diploidai, pavyzdžiui, genomo pavadinimas AA (*Triticum monococcum*), DD (*T. tauschii*) ir SS (*T. speltoides*); tetraploidai, pavyzdžiui, genomo pavadinimas AABB (*T. turgidum*) arba AAGG (*T. timopheevi*) [6]. Pasaulyje daugiausia auginami ir naudojami heksaploidiniai kviečiai yra *Triticum aestivum*, genomas AABBDD, o chromosomų rinkinį sudaro 42 chromosomos [6].

Kviečių grūdų pagrindiniai sudėties komponentai yra polisacharidai (60 – 75 %) , lipidai (2 %) bei baltymai (10 – 18 %) [6,7]. Be paminėtų, mažesniais kiekiais yra aptinkama ir fitino rūgštis, ferulo rūgštis, vitamino E, betaino, cholino, niacino, pantoteno rūgštis, riboflavino, biotino, tiamino, piridoksino, liuteino, glutationo, cinko, geležies, mangano bei seleno [8]. Krakmolas yra svarbiausias daugelio grūdų atsarginis polisacharidas. Kviečiuose krakmolo daugiausia aptinkama grūdų endosperme. Jį sudaro gliukozės polimerai, amilozė ir amilopektinas. Lipidų kviečių grūduose yra randama nedaug. Pagrindiniai lipidai, įeinantys į grūdų sudėtį, yra palmitino ir linolo rūgštys, riebaluose tirpūs vitaminai bei fitosteroliai [6]. Tyrėjas Osbornas teigė, kad augalų audiniuose esantys baltymai yra keturių pagrindinių tipų: albuminai (tirpūs vandenyje ir praskiestuose buferiuose), globulinai (tirpūs druskos tirpaluose), gliadinai (tirpūs 70 – 90 % etanolyje) ir gliuteninai (tirpūs praskiestose rūgštyse ar šarmų tirpaluose) [6]. Kviečių grūdų baltymai taip pat gali būti suskirstyti į struktūrinius ir rezervinius baltymus. Struktūriniai arba metaboliniai baltymai susideda iš albumino, globulino ir amfifilinių¹ baltymų. Glitimo baltymai yra pagrindiniai kviečių rezerviniai baltymai ir sudaro maždaug 75 – 80 % visų kviečių baltymų [9]. Kviečių rezerviniai baltymai atlieka svarbų vaidmenį formuojant stiprią tešlą, kuri užlaiko CO₂ dujas ir galima iš jos gaminti purius kepinus. Dėl šių savybių kviečiai tinka daugeliui maisto produktų – duonos, makaronų, sausainių, pyragų ir kitų maisto produktų gaminiui.

1.1.1. Glitimo baltymai

Kviečių rezerviniai baltymai yra bendrai vadinami prolaminais, nes jie turi didelį aminorūgščių – prolino ir glutamino kiekį. Pagal kitą klasifikavimo sistemą prolaminai yra suskirstyti į tokias tris grupes: turinčius daug sieros, turinčius mažai sieros ir didelės molekulinės masės gliutenino subvienetus. Daug sieros turintys prolaminai yra β-, γ- gliadinai bei mažos molekulinės masės gliuteninai. Mažai sieros turintys prolaminai yra ω-gliadinai [6].

Glitimo baltymai yra brandžių grūdų endosperme, kur aplink krakmolo granules susidaro nuolatinė matrica. Glitimo sudėtyje yra šimtai baltymų komponentų, kurie yra arba monomerai, arba sujungti tarpusavyje disulfidinėmis jungtimis kaip oligopolimerai. Įvairių glitimo baltymų tipai ir jų savybės apibendrinti 1.1 lentelėje [10].

¹ Amfifiliniai baltymai – tai tokie baltymai, kurie turi hidrofilinę ir hidrofobinę dalis.

1.1. lentelė. Kviečių glitimo baltymų klasifikacija ir savybės

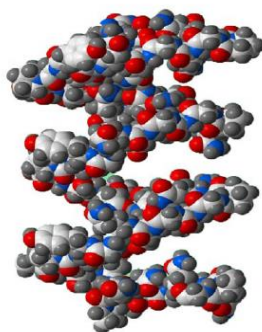
Grupė	Struktūra	Bendra dalis, %	Molekulinė masė, Da	Aminorūgščių sudėtis, mol %
Didelės molekulinės masės gliuteninai	Polimerinė	6 – 10	65 – 90000	30 – 35 Gln 10 – 16 Pro 15 – 20 Gly 0,5 – 1,5 Cys 0,7 – 1,4 Lys
Mažos molekulinės masės gliuteninai	Polimerinė	70 – 80	30 – 45000	30 – 40 Gln 15 – 20 Pro 2 – 3 Cys <1 Lys
α -Gliadinai β -Gliadinai γ -Gliadinai	Monomerinė Monomerinė Monomerinė	70 – 80	30 – 45000	30 – 40 Gln 15 – 20 Pro 2 – 3 Cys <1.0 Lys
ω -Gliadinai	Monomerinė	10 – 20	40 – 75000	40 – 50 Gln 20 – 30 Pro 8 – 9 Phe 0 Cys 0 – 0,5 Lys

Glitimo aminorūgščių sudėtyje cisteino kiekis yra gan mažas, tačiau labai svarbus glitimo struktūrai ir funkcionalumui. Cisteinas (oksiduota forma) paprastai sudaro disulfidines jungtis tarp vidinių ir išorinių baltymų grandžių [11].

Gliadinai yra monomeriniai baltymai, sudaryti iš vienos polipeptidų grandinės. Jie sudaro nuo 30 iki 40 % viso miltų baltymų kiekio. Gliadinai yra 70 % alkoholyje tirpių baltymų polimorfis mišinys [12]. Gliadinuose susidariusios jungiamosios grandinės – tai cisteino disulfidiniai tilteliai. Gliadinuose gausu prolino ir glutamino, tačiau mažai randama įkrautų aminorūgščių. Gliadinų molekulinė masė svyruoja tarp 30 – 80 kDa ir jie yra suskirstyti į keturias: α , β , γ ir ω grupes, remiantis poliakrilamido gelio elektroforezės rezultatais. Pagal Wieser [13] gliadinai grupuojami į tokias klases: $\omega 5$ -, $\omega 1$ - ir 2, α / β - ir γ -gliadinus. Šis suskirstymas pagrįstas aminorūgščių sekomis ir sudėtimi bei įvairių klasių gliadinų molekulinėmis masėmis. α , β ir γ gliadinai turi tarp grandinės disulfidinių jungčių, o ω -gliadinai neturi cisteino. α -gliadinų N-galinis domenas susideda iš penkių liekanų ir centrinis domenas iš 113 – 134 aminorūgščių liekanų [14]. α - ir γ - gliadinų C-galinis domenas yra sudarytas iš 150 aminorūgščių liekanų. Hidratuoti gliadinai yra mažai elastingi. Jie daugiausia įtakoja tešlos sistemos klampumą ir pakilimą.

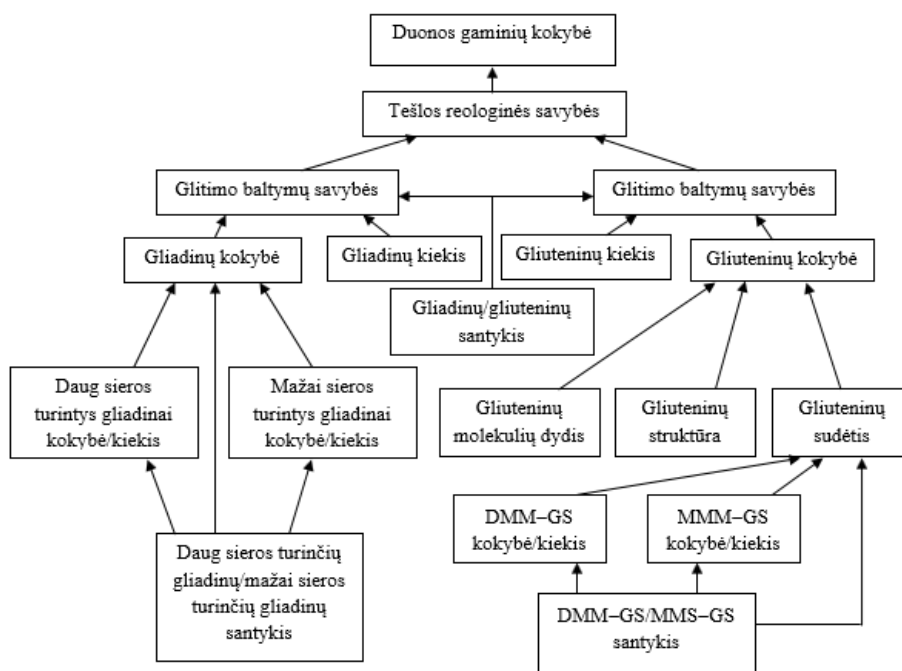
Gliuteninai yra polimeriniai baltymai. Gliuteninai ir gliadinai turi labai panašią aminorūgščių sudėtį – gliuteninai pasižymi dideliu glutamino ir prolino kiekiu ir turi mažai įkrautų aminorūgščių [15]. Kvietinių miltų tešlos savybės labai priklauso nuo gliuteninų molekulinės masės pasiskirstymo. Gliuteninai dažniausiai įtakoja glitimo elastingumą [15]. Be to, jie gali sudaryti didžiausius ir sudėtingiausius gamtoje esančius baltyminius polimerus, kurių molekulinė masė gali siekti ir 10 milijonų daltonų. Kviečiuose yra dvi gliuteninų pagrindinės grupės: didelės molekulinės masės ir mažos molekulinės masės gliuteninai, kurie yra išskiriami skaidant disulfidines jungtis su

redukuojančiais agentais ir vėliau identifikuojami elektroforezės metodu [15]. Remiantis molekulių elektroforetiniu judriu, gliutenino subvienetai dar yra suskirstyti į keturis pogrupius, t. y. A, B, C ir D. Nustatyta, kad pogrupis A yra DMM-GS (didelės molekulinės masės gliutenino subvienetai), o pogrupiai B, C ir D vadinami MMM-GS (mažos molekulinės masės gliutenino subvienetai) [6]. Didelės molekulinės masės gliuteninų struktūros modelis pavaizduotas 1.1 paveiksle. Stresinėmis sąlygomis gliutenino susipynusi ir nekovalentiškai susieta struktūra suteikia atsparumą deformacijai, kuri pasireiškia padidėjusiu elastingumu [16].



1.1. pav. Gliutenino β -spiralinis modelis. Atomai yra pavaizduoti spalvomis: balta (anglis), mėlyna (azotas), raudona (deguonis) ir pilka (vandenilis)

Glitimo baltymai suteikia produktams iš kviečių miltų unikalias elastingumo ir puikias technologines savybes. Glitimo baltymų tinklas atlieka svarbų vaidmenį išlaikant anglies dioksidą fermentacijos metu ir pradiniam kepinimo etape [15]. Dujų sulaikymo pajėgumas lemia kepinio tūrį ir struktūrą. Be to, šie baltymai apsprendžia ir optimaliai sumaišytos tešlos reologines savybes (1.2 pav.) [17].



1.2 pav. Kviečių tešlos reologines savybes lemiantys veiksniai

Mokslininkas Goesaert ir kt. ištyrė [15], kad du pagrindiniai veiksniai, lemiantys kepinų kokybę iš kviečių miltų, yra šie:

- Pirmasis veiksnys yra glitimo ir gliutenino kiekių santykis. Didelės gliuteninų molekulės sudaro išsistą tinklą, užtikrinantį stiprumą (atsparumą deformacijai) ir tešlos elastingumą. Taip pat manoma, kad monomeriniai gliadinai veikia gliutenino polimerinę sistemą kaip plastifikatoriai ir taip suteikia plastiškumo / klampumo miltų tešlai.
- Antrasis veiksnys yra gliuteninų kokybė. Duonos kepimo rezultatą lemia gliuteninų sudėtis, struktūra bei molekulių dydis. Gliuteninų sudėtis turi įtakos cheminėms sąveikoms, kurios lemia tešlos elastingumą. Yra žinoma, kad daugiau nei 20 skirtingų DMM-GS ir daugiau nei 40 skirtingų MMM-GS iki šiol buvo aptikti įvairių veislių kviečiuose ir tai paaiškina didžiulį gliuteninų sudėties skirtumą tarp skirtingų kviečių veislių, todėl galime teigti, kad ne visos veislės pasižymi labai gera glitimo kokybe. Struktūros skirtumai atsiranda dėl grandinių šakotumo laipsnio, o molekulių dydžio skirtumai dėl DMM-GS ir MMM-GS santykio bei skirtingo cisteino likučių kiekio, kadangi šis dalyvauja skersinių ryšių susidaryme ir yra svarbus polimero dydžiui [16].

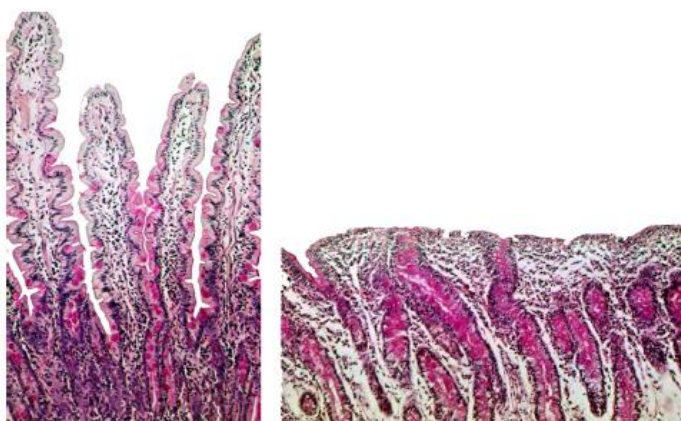
1.2. Glitimo sukeltos ligos ir toksiškumas

Kviečių baltymo glitimo netoleravimas gali pasireikšti trimis formomis: autoimunine celiakija, alergija kviečių baltymams ir ne celiakininiu jautrumu glitimui [18]. Alergiją kviečiams apibrėžiama kaip imunoglobulino E (IgE) sukelta imunologinė reakcija kviečių baltymams. Ji gali pasireikšti įkvėpus miltų ar dulkių ir yra pripažinta kaip viena iš dažniausių profesinės astmos formų [18].

Neceliakinis jautrumas glitimui pasireiškia skrandžio ir žarnyno sutrikimais. Taip pat raumenų, kaulų skausmu, nuovargiu ir neurologiniais sutrikimais. Atlikti tyrimai parodė, kad hiperjautrumo glitimui sukelti simptomai atsiranda greičiau nei celiakijos simptomai ir jau po trijų dienų maisto produktų su glitimu vartojimo pacientai jaučia didelius pilvo skausmus [19]. Glitimą pašalinus iš dietos simptomai greitai išnyksta. Hiperjautrumu glitimui sergantys žmonės neturi nei alergijos kviečiams, nei celiakijos, todėl nustatant hiperjautrumą kitų ligų buvimas turi būti patikrintas ir atmestas.

1.2.1. Celiakija

Celiakija yra plonosios žarnos liga, kuriai būdingas kviečių, miežių ir rugių baltymų lemiamas gleivinės pažeidimas bei sutrikusi maisto medžiagų absorbcija [20]. Plonųjų žarnų gleivinės pakitimai užfiksuoti kapsuline endoskopija ir pateikti 1.3 paveiksle. Daugiau kaip trečdaliui pacientų, kuriems diagnozuota celiakija, nustatyti dvylikapirštės žarnos gleivinės pokyčiai [18]. Celiakija yra apibūdinama kaip sisteminė autoimuninė liga, pasireiškianti genetiškai jautriems asmenims, kurie turi ŽLA haplotipų žymenis DQ2 / DQ8. Klasikiniai celiakijos pažeidimai pasižymi limfocitų infiltracija epitelyje ir po juo esančiu jungiamojo audinio sluoksnyje (lot. *lamina propria*), žarnų gaurelių atrofija bei kriptų hiperplazija. Šie visi pažeidimai nustatomi biopsijos būdu.



1.3 pav. Įprastos (kairiosios) ir celiakijos pažeistos atrofinės (dešinės) žarnyno gleivinės skerspjūvis

Glitimo baltymai išprovokuoja T limfocitų autoimuninį atsaką. Šie baltymai nėra galutinai suskaidomi virškinimo fermentų, todėl prasiskverbia pro žarnyno sienelę. Čia skaidomi audinių transglutaminazės iki glutamo rūgščių. Pastarosios turi savybę jungtis su specifiniais ŽLA receptoriais, esančiais antigeną pateikiančių ląstelių paviršiuje. Taip organizme sukeliama uždegimo reakcija. Celiakija sukelia žarnų, odos, kepenų, sąnarių, gimdos, širdies, smegenų ir kitų organų pažeidimus [20]. Klasikiniai su celiakija susiję simptomai vaikams yra viduriavimas, pilvo pūtimas ir nesugebėjimas sutelkti dėmesio [21]. Paaugliai bei suaugusieji kankinasi nuo viduriavimo, vidurių užkietėjimo, svorio netekimo, silpnumo, pilvo skausmo ir vėmimo. Be klasikinių simptomų, suaugusieji kenčia ir nuo mineralų bei vitaminų trūkumo, ko pasekoje išsivysto anemija, opinis stomatitas, kaulų skausmai ir lūžiai, osteoporozė, dantų emalio suplonėjimas, augimo sutrikimas, nemiga, nevaisingumas [1,18,21]. Be to, nedidelis skaičius pacientų turi ir tokius neurologinius ar psichikos sutrikimus kaip depresija, nerimas, periferinė neuropatija, migrena ar epilepsija [18]. Celiakija yra susijusi ir su viena dermatito forma, lotyniškai vadinama *Dermatitis Herpetiformis* [18,21]. Nors tai ir nedažna odos liga, kuri paveikia apie 10 – 20 % pacientų, sergančių celiakija, tačiau sukelia labai stiprius odos pažeidimus, t. y. niežulį, pūsles, bėrimus, kurie dažniausiai aptinkami ant alkūnių, kelių, sėdmenų, nugaros, tačiau gali būti paplitę ir visose kitose kūno vietose (1.4 pav.) [18].



1.4 pav. Ligai *Dermatitis Herpetiformis* odos pažeidimai

Taip pat apie 20 % pacientų, sergančių celiakija, pasireiškia ir glitimo ataksija [18]. Glitimo ataksija yra neurologinis sutrikimas, pasireiškiantis nevalingų galūnių valdymu bei eisenos sutrikimais.

Seniau manyta, kad celiakija pasireiškia tik vaikams, tačiau mokslininkai nustatė, kad įvairaus amžiaus žmonės yra šioje rizikos grupėje. Naujausi tyrimai parodė, kad Europoje celiakija pasireiškia maždaug 0,5 – 2 % visų gyventojų, panašiai kaip ir JAV [4]. Paplitimas šiuo metu šios ligos labai išaugo, bet tai gali būti susiję su geresniu ligos ir su ja susijusių sutrikimų identifikavimu [21,22]. Rizikos grupėms susirgti celiakija priskiriami: ligonių pirmojo laipsnio giminaičiai; žmonės, turintys Dauno sindromą; autoimuninėmis ligomis sergantieji, pavyzdžiui, pirmojo laipsnio cukriniu diabetu ar autoimuniniu tiroiditu [22,23]. Iš viso apie 30 % suaugusiųjų celiakija sergančių pacientų turi vieną ar daugiau autoimuninių sutrikimų [22].

Plonosios žarnos gleivinės atrofijos laipsnio nustatymas yra pagrindinė diagsnotika taikoma nustatant celiakiją [20]. Tačiau yra taikomi ir serologiniai neinvaziniai metodai celiakijos atpažinimui. Tai būtų tokie kaip IgA klasės cirkuliuojančių antikūnų, t. y. AGA – gliadino, ARA – retikulino ir EmA – endomiziumo, TGA – audinių transgliutaminazės, aptikimas kraujo serume tuo metu, kai taikoma dieta su glitimu, ir jų išnykimas dietos be glitimo metu [20]. Efektyviausiai liga aptinkama naudojant EmA ir TGA kartu, kadangi tada tyrimo jautrumas yra 98 – 100 % [21]. Pradėjus plačiau taikyti gliadino, endomiziumo ar audinių transgliutaminazės antikūnų tyrimus sergantiesiems autoimuninėmis ligomis, galima tikėtis, kad pasaulyje vis dažniau bus diagnozuojamos mažasimptomės ir latentinės ligos formos [21].

1.2.2. Glitimo baltymų toksiškumas

Žalingu poveikiu plonosios žarnos gleivinei pasižymi kviečių baltymo glitimo gliadinų frakcija ir panašių grūdinių kultūrų baltymai – miežių hordeinas, rugių sekalinas ir avižų avidinas [24,25]. Dėl didelio glutamino kiekio ir specifinių sekų modelių prolaminai yra atsparūs virškinimo trakto proteolitiniams fermentams ir veikia žarnyno pralaidumą [26]. Gliadinai virškinamajame trakte pasiekia prieigą prie bazinio epitelio paviršiaus ir tiesiogiai veikia imuninę sistemą [26]. Dauguma imunoreaktyvių ω -5 gliadinų frakcijų yra pagrindiniai alergenai, sukeltantys anafilaksiją, t. y. alergiją kviečiams [27]. Gliadinai ω -1,2 yra beveik tokie pat toksiški kaip ir ω -5. Tarp skirtingų nustatytų glitimo epitopų α -gliadinų epitopai yra laikomi labiausiai imunogeniški [27]. Pagal Rocher ir kt. tyrimų duomenis [26], skirtingi α - ir γ - tipo gliadinai, išekstrahuoti metanoliu iš kviečių endospermos, identifikuoti kaip celiakiją sukeltantys baltymai. Šie komponentai identifikuoti NDS – PAGE kaip markerį naudojant celiakinį serumą (TGA IgA). Jų molekuliniai svoriai pagal jų N-galinę aminorūgščių seką: α -gliadinai (31, 35, 38, 45 kDa) ir γ -gliadinai (31, 40, 50 kDa). α -gliadinas, kurio seka yra sudaryta iš 33 aminorūgščių, yra vienas iš virškinimui atsparių glitimo peptidų [27]. Jame yra persidengiančių T ląstelių epitopų, o šio glitimo baltymo deamininta forma yra stiprus T ląstelių stimulatorius, generuojantis glutamo rūgšties liekanas, būtinas prisijungti prie ŽLA – DQ2 žymens. Būtent dėl šio baltymo atsiranda histologiniai pokyčiai plonosios žarnos gleivinėje, kurie yra dar kitaip vadinami malabsorbcijos sindromu [28]. Kitas α -gliadino baltymas, susidedantis iš 19 aminorūgščių, sukelia žarnų gaurelių atrofija [9]. Kiti toksiški glitimo gliadinų baltymai ir jų aminorūgščių sekos pateiktos 1.2 lentelėje, o aminorūgščių šifravimas – prieduose [29].

1.2 lentelė. Sveikatos sutrikimus sukeliantys gliadinų baltymai ir jų aminorūgščių sekos

Aminorūgščių seka	Gliadinų tipas
QLQPFQPQLPY	α -gliadinai
QLQPFQPQLPYQPQPF	α -gliadinai
LQLQPFQPQLPY	α -gliadinai
LQLQPFQPQLPYQPQPF	α -gliadinai
LQLQPFQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	α -gliadinai
VRFPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL	α -gliadinai
LPFPQQPQQPFPQPQ	γ -gliadinai
VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL	α -gliadinai
PSSQVQWPQQPVPQ	γ -gliadinai
NMQVDPGQVQWPQQQPF	γ -gliadinai
QNPSQQQPQEQVPLVQQQ	α -gliadinai

1.2.3. Dieta be glitimo

Šiuo metu vienintelis moksliskai įrodytas celiakijos gydymas yra griežta dieta be glitimo. Visų maisto produktų ir vaistų, kurių sudėtyje yra glitimo, turi būti atsisakyta, nes netgi maži glitimo kiekiai gali būti žalingi. Mokslininkai nustatė, kad 70 % pacientų sveikata pagerėjo jau po dviejų savaičių dietos be glitimo [23]. Daugiausia glitimo yra grūduose ir jų produktuose, tačiau jis yra randamas ir prieskoniuose, padažuose, marinatuose, sriubų kubeliuose, įvairiuose maisto pakaitaluose. Laikantis beglitimės dietos reikia atsisakyti šių produktų ir daugiau vartoti pieno, sviesto, sūrio, šviežių arba konservuotų vaisių ir daržovių, šviežios mėsos, žuvies, kiaušinių, sėklų, riešutų, kukurūzų ir ryžių. Pasaulyje vyksta diskusijos dėl frazės „be glitimo“ žymėjimo ant maisto etikečių. Tyrimais nustatyta, kad produktuose be glitimo neįmanoma išvengti visiško glitimo nebuvimo, todėl dauguma Europos šalių priimta, kad glitimo kiekis beglitiminiuose produktuose neturėtų viršyti 20 mg/kg, o tuose maisto produktuose, kurie yra su sumažintu glitimo kiekiu, glitimo kiekis neturi viršyti 200 mg/kg [21,23].

Kadangi kviečių grūdai yra svarbus angliavandenių, B grupės vitaminų, mineralų ir mikroelementų šaltinis, todėl jų visai atsisakyti nederėtų. Be to, kviečių grūduose yra gausu nepakeičiamųjų aminorūgščių, tokių kaip lizinas, treoninas, fenilalaninas, izoleucinas, leucinas, valinas, histidinas ir metioninas [30]. Dėl maistinių ir antioksidacinių savybių kviečių grūdų vartojimas siejamas su sumažėjusia lėtinių širdies ir kraujagyslių ligų atsiradimo rizika. Kviečių antioksidantai yra karotinoidai, tokoferoliai, flavonoidai ir fenolinės rūgštys. Daugelis suaugusiųjų pacientų, sergančių celiakija, atidžiai yra gydomi beglitime dieta kelerius metus ir po to pasireiškia vitaminų, tokių kaip folio rūgštis, B6 ir B12, ir mineralų (geležies, kalcio) trūkumas [31,32,33]. Dėl šios priežasties mokslininkai deda pastangas, kad būtų įmanoma pašalinti glitimą iš kviečių ir juos toliau būtų galima naudoti maisto produktuose.

1.3. Biotechnologiniai glitimo baltymų detoksikacijos būdai

Fermentinė hidrolizė dažniausiai yra taikoma glitimo detoksikacijai. Daugelis organizmų, t. y. bakterijos, grybai, augalai, turi proteolitinius fermentus [14]. Keletas peptidazių, gebančių skaidyti gliadinų baltymus, buvo išskirtos iš sudyusių grūdų (*Hordeum vulgare L.*, *Triticum aestivum L.*), bakterijų (*Flavobacterium meningosepticum*, *Sphingomonas capsulate*, *Myxococcus xanthus*) bei grybų (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*) [14]. Glitimą taip pat labai efektyviai hidrolizuoja proteazės, randamos *Lactobacilli* rūšies pieno rūgšties bakterijose [14].

1.3.1. Proteolitinių fermentų vartojimas su maistu

Glitimo baltymai, patekę į žmogaus virškinamąjį traktą, yra labai silpnai virškinami fermentų dėl juose esančio neįprastai didelio prolino ir glutamino kiekio, todėl pasiūlytas geriamasis endopeptidazių mišinys kaip alternatyva dietai be glitimo [34]. Šių fermentų mišinį sudaro prolil-oligopeptidazės, išskiriamos iš *Flavobacterium meningosepticum*, *Sphingomonas capsulate* ir *Myxococcus xanthus*. Šie fermentai hidrolizuoja glitimo baltymus ir yra atsparūs virškinamojo trakto fermentams [34]. Tačiau patekęs fermentų mišinys į skrandį gali būti inaktyvuojamas netinkamo skrandžio sulčių pH, todėl dažniausiai yra naudojamas kapsulėse. Šio glitimo detoksikacijos metodo trūkumai yra mažas efektyvumas, kadangi, norint pasiekti aukštą glitimo suskaidymo laipsnį, reikia naudoti dideles dozes preparato.

Efektyvesnis būdas glitimo detoksikacijai yra endoproteazių, išskirtų iš grybelio *Aspergillus niger*, panaudojimas. Nustatyta, jog šių fermentų optimalus pH atitinka skrandyje esantį ir jis yra atsparus pepsino hidrolizei [35,36]. Be to, šios endoproteazės glitimo baltymus pradeda skaidyti jau skrandyje, todėl dvylikapirštę žarną pasiekia žymiai smulkesnės molekulės. Šios proteazės yra prieinamos ir pramoniniu mastu.

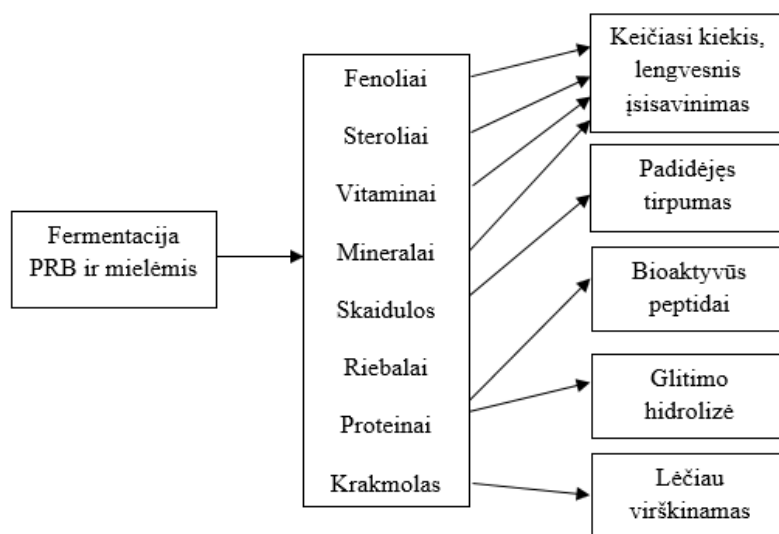
Efektyviausias būdas glitimo suskaidymui dar skrandyje yra vartojimas dviejų skrandyje aktyviai veikiančių fermentų, kurie yra sudaryti iš glutamino specifinės proteazės (cistino endoproteazės), gautos iš daigintų miežių sėklų, ir specifinės prolil-endopeptidazės, gautos iš labai retos bakterijos *Sphingomonas capsulata* [34]. Veikiant šiam fermentų kompleksui, visų pirma hidrolizuojamas glitimo tinklas į smulkesnius oligopeptidus, tačiau dar toksiškus, o po pirminės proteolizės vyksta antrinė, kurios metu *Sphingomonas capsulata* fermentai atskelia prolino likučius taip sudarydami netoksiškus junginius. Praktinis šios detoksikacijos pranašumas yra fermentų stabilumas ir didelis aktyvumas skrandyje. Šie fermentų preparatai gali būti vartojami kaip liofilizuoti milteliai arba tablečių pavidalu.

1.3.2. Mikroorganizmų panaudojimas glitimo suskaidymui maisto gamybos grandinėje

Kita alternatyva glitimo detoksikavimui yra mikroorganizmų fermentų panaudojimas kvietinių duonos raugų gamybos metu [34]. Nustatyta, kad raugų fermentacijos metu vykstanti baltymų proteolizė yra žymiai efektyvesnė nei neapdorotoje tešloje [37]. Mikrobiologiniai tyrimai parodė, kad daugiau kaip 50 PRB rūšių ir daugiau kaip 25 mielių rūšių, ypač priklausančių *Saccharomyces* ir *Candida* gentims, aptinkama ilgai brandintuose rauguose. Iš PRB aptinkamos *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ir *Weissella*. Svarbiausios fakultatyvinės gram-teigiamos heterofermentinės PRB, išskiriamos iš raugų, yra *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus sanfranciscensis* [37].

Proteolizė ir endogeninių fermentų aktyvinimas, kurią atlieka PRB ir mielės, teigiamai veikia bendrą kepinių kokybę [4]. Terpės rūgštingumo didėjimas skatina kviečių proteolitinių fermentų aktyvumą, ko pasekoje yra pagerinamos ir kepinių funkcinės savybės. Daugiausia kviečiai turi endogeninių fermentų, tokių kaip aminopeptidazė, karboksipeptidazė ir endopeptidazė [38]. Ilga fermentacija PRB teigiamai veikia visus kepinių kokybės aspektus – tekstūrą, aromatą, maistines savybės ir galiojimo laiką [4]. Didesnis terpės rūgštingumas padidina tešlos struktūrą sudarančių komponentų, tokių kaip glitimo, krakmolo, arabinoksilanų ir kt., tirpumą [4]. Fermentacijos PRB metu susidaro didesnis biologinių junginių (fenolių, aminorūgščių) kiekis, lyginant su procesu, kuriame naudojamos tik mielės, o tai įtakoja specifinį kepinių skonį ir aromatą. Taip pat PRB sukelia fitatų degradaciją, dėl ko padidėja mineralinių medžiagų biologinis prieinamumas [4]. Be to, PRB padidina ir magnio bei fosforo kiekį, kurie yra duonos β -gliukano, kuris žmogaus organizme veikia kaip stiprus imuninės sistemos stimulatorius ir užkerta kelią dažnoms infekcijoms, apsauginiai faktoriai [39]. Organinės rūgštys, kurios susidaro fermentacijos metu, mažina duonos glikemijos indeksą [4]. Raugų naudojimas slopina ir *Bacillus sp.* augimą ir sporų formavimąsi. PRB išskiria ir bakteriocinus, kurie slopina kitų mikroorganizmų dauginimąsi bei mažos molekulinės masės antibiotikus, tokius kaip reutericiklinas. PRB sintetina ir antigrybinius metabolitus, t. y. acto rūgštį, skruzdžių rūgštį, kaprilo rūgštį, ciklinius peptidus, kurie apsaugo maisto produktus nuo gedimo (duoną galima išlaikyti 21–28 dienas) [4].

Fermentacijos PRB ir mielėmis reikšmė duonos maistinei kokybei pateikta 1.5 paveiksle [40].



1.5 pav. Fermentacijos įtaka duonos maistinės kokybės gerinimui

Moksliniai tyrimai parodė, jog raugai, pagaminti kvietinius miltus fermentuojant PRB, gali būti naudojami pramonėje duonos be glitimo gamyboje [4]. Tokie fermentuoti skysti kviečių produktai (raugai), pašalinus drėgmę liofilizuojant ar išpurškiant, gali būti panaudoti duonos su sumažintu glitimo kiekiu gamybai kombinacijoje kartu su kitais glitimo neturinčiais augaliniais produktais, naudojant kepimo mieles ir struktūrizavimo agentus, tokius kaip ksantano guma [4]. Struktūrizavimo agentai yra būtini, kadangi glitimo tinklas būna visiškai suardytas.

Pagal Nionelli ir Rizzello [4] atliktus tyrimus, naudojant grybinės kilmės proteazes iš *Aspergillus niger* ir *A. oryzae* ir PRB, pasižyminčias dideliu proteolitinio aktyvumu, ilgos fermentacijos metu pilnai hidrolizuojami albuminai, globulinai ir gliadinai, ko pasekoje glitimo kiekis sumažėjo iki <20

mg/kg, kaip ir reglamentuojama produktams be glitimo. Pagrindiniai tokių produktų privalumai yra aukštas laisvųjų aminorūgščių kiekis, geresnis baltymų virškinamumas, mažas krakmolo hidrolizės laipsnis ir geresnės technologinės duonos savybės, lyginant su šiuo metu parduodamais komerciniais produktais be glitimo. Taip pat reikia paminėti, kad tokių kepinų vitaminų, mineralų ir maistinių skaidulų kiekiai yra panašūs į glitimo turinčios kvietinės duonos [4].

Daugelis cheminių tyrimų ir *ex vivo* bandymai su žmogaus ląstelių kultūromis patvirtino visišką glitimo detoksikaciją tokios fermentacijos metu [41]. Di Cagno [42] eksperimentas įrodė, jog *Lactobacilli* genties PRB per 24 h fermentacijos laikotarpį rauguose, pagamintuose iš kvietinių, grikių, avižų ir sorų miltų, geba hidrolizuoti mažos molekulinės masės alkoholyje tirpius peptidus ir kviečių gliadinus, susidedančius iš 33 aminorūgščių, kurie yra pripažinti labiausiai imunoreaktyvūs. Analogišku poveikiu pasižymi PRB ir bifidobakterijų mišinys [4]. Yra žinoma, kad probiotikai turi ir teigiamą poveikį žmogaus sveikatai – gerina žarnyno mikrobiotą, padidina epitelio barjerą ir atsparumą, skatindami mucino sekreciją epitelio ląstelėse. Di Cagno ir kt [43] duonos be glitimo gamybai taip pat naudojo *Lactobacillus sanfranciscensis* LS40 ir LS41 bei *Lactobacillus plantarum* CFI padermes. Eksperimento metu kvietinių miltų fermentacija vyko dviem etapais: ilga fermentacija (16 h) ir greita fermentacija (1,5 h), naudojant ankstesnę fermentuotą raugą kaip inokuliatą su mieles *Saccharomyces cerevisiae*. Šis būdas leido pradinį glitimo kiekį (400 mg/kg) sumažinti iki <20 mg/kg raugintoje tešloje. Prieš kepat duoną nustatytas fitazinis aktyvumas be glitimo tešloje 6 kartus viršijo fitazinį aktyvumą, nustatytą kontrolinėje tešloje tik su mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*. Šio proceso privalumas yra ir tai, kad, esant didesniai fitaziniai aktyvumui, susidaro daugiau laisvų Ca^{2+} , Zn^{2+} ir Mg^{2+} jonų. Taip pat šios fermentacijos metu padidėjo laisvų aminorūgščių koncentracija. Tokia kvietinė duona be glitimo maistine verte (1.3 lentelė) lenkia rinkoje esančius produktus be glitimo, kadangi kepinuose nustatyti didesni baltymų, skaidulinių medžiagų ir maži angliavandenių kiekiai [43].

1.3 lentelė. Beglitimės duonos maistinė vertė 100 g produkto

Maistingumo deklaracija	100 g
Energetinė vertė	1022 kJ/ 242 kcal
Riebalai	6,8 g
Iš kurių sočiųjų riebalų rūgščių	0,67 g
Angliavandeniai	40,5 g
Iš kurių cukrų	2,3 g
Skaidulinės medžiagos	7 g
Baltymai	4,8 g

Kaip minėta anksčiau, nesuvirškinti glitimo baltymai praeina pro žarnų sienelės ir yra skaidomi audinių transglutaminazės iki glutamo rūgščių. Pastarosios turi savybę jungtis su specifiniais ŽLA–DQ2/DQ8 molekuliniais žymenimis, tokiu būdu sustiprinamos T ląstelių aktyvacija. Remiantis šia prielaida, mokslininkas Gianfrani [44] pasiūlė imunogeninių peptidų epitopų inaktyvacija miltuose deaminavimo būdu, apdorojant kvietinius miltus su mikrobine transglutaminaze ir lizino metilesteriu. Mokslininkai teigia, jog lizinu modifikuoti gliadino peptidai beveik visiškai prarado gebėjimą prisijungti prie ŽLA–DQ2 žymens.

1.3.3. Kiti detoksikacijos būdai

Hoffmann ir kt. [45] atrado blokuojančius sintetinius peptidus, giminingsus glitimui, mažinančius gliadinų apdorojimą transglutaminaze. Vidutinis transglutaminazės aktyvumas, lyginant su kontrole be blokuojančių peptidų, buvo sumažintas 36 %. Tyrimai *in vitro* parodė, kad šie peptidai turi glitimo detoksikacijos potencialą ir gali būti vertinami kaip alternatyva kuriant naujus maisto produktus glitimo netoleruojantiems pacientams.

Pasauliniu mastu atliekami tyrimai, kuriais siekiama sukurti kviečių veisles su sumažintu glitimo kiekiu. Tuo tikslu pasiūlyta kviečių mutagenezė, kurios metu įvykdyta heksaploidinių kviečių *Triticum aestivum* transformacija į kviečius, kuriuos mokslininkai pavadino „Butte 86“ [46]. Nustatyta, kad ši transformacija neturi jokios įtakos kepinių kokybei. Jos metu visiškai nuslopinama ω -gliadinų genų ir visų kitų likusių gliadinų sudedamųjų dalių raiška [47]. Dėl šios priežasties buvo pradėtos gaminti transgeninės kviečių linijos, turinčios labai mažą toksiškumo lygį celiakija sergantiems pacientams.

Kviečių genomus modifikuojamas ir siekiant pagerinti tešlos kokybę. Tačiau skirtingos modifikacijos gali įvesti žinomus arba kliniškai susikryžminusius alergenų į genomą. Todėl pasiūlyta naudoti bioinformatikos įrankius, kad būtų užkirstas kelias tokiam alergenų įvedimui į genomą ir įvertintas modifikuotų pasėlių saugumas ir alergiškumas, naudojant išsamią duomenų bazę [48].

1.4. Ultragarso kavitacijos taikymas biotechnologinių procesų valdymui

Šiais laikais ultragarso pritaikymas yra labai platus: medicinoje naudojamas diagnostikai ir gydymui, biologijoje – ląstelių membranų suardymui, inžinerijoje – matavimui, filtravimui, valymui, porėtųjų mažiagų ir nanostruktūrų formavimui. Vis dažniau ultragaras yra taikomas ir cheminėje sintezėje, medžiagotyroje bei maisto biotechnologijoje.

Ultragarsu yra vadinamos bangos, kurių dažnis yra didesnis nei 20 kHz [49]. Ultragaras yra skirstomas į žemo dažnio (20 – 100 kHz) ir aukšto dažnio (didesnis nei 100 MHz). Ultragarso poveikis yra pagrįstas kavitacijos reiškiniu, t. y. garų ar dujų burbulų susidarymu skystyje. Sklisdamos bangos sukuria suslėgimą ir išretinimą, galintį nutraukti tokias jungtis kaip Van der Waalso, kurios palaiko vandens sukibimą, t. y. koheziją. Kada slėgio kaita yra didelė, tada skysčio slėgis tampa mažesnis nei jo garų slėgis ir atsiranda vakuuminių burbuliukų, kurie didėja tol, kol yra viršijama jų vidinė pusiausvyra [49]. Kai slėgio pusiausvyra yra viršijama, vanduo staiga suspaudžia šiuos burbuliukus ir jie kolapsuoja, sukurdami daugybę mažų burbuliukų, kurie yra vadinami „karštu tašku“. Šio proceso metu yra išlaisvinama labai didelė energija, sukaupta burbuliukuose [49]. Proceso metu absorbuota energija paverčiama į karštį, todėl bandinys turi būti aušinamas.

Molekuliniu lygmeniu ultragaras gali slopinti arba skatinti mikroorganizmų veiklą, keisdamas fermentų, substratų ir reakcijų savybes [50]. Mikroorganizmų gyvybingumo aktyvacija arba pasyvinimas priklauso nuo [51]:

- ultragarsinių bangu amplitudės;
- poveikio arba kontakto trukmės;
- apdorotos terpės kiekio;
- terpės sudėties;
- temperatūros;

- mikroorganizmų tipo, formos, ląstelės skersmens.

Tyrimais įrodyta, jog didesnės ląstelės yra jautresnės nei mažos dėl jų didesnio paviršiaus ploto. Gram-teigiamos bakterijos yra atsparesnės nei gram-neigiamos dėl jų storesnės ląstelės sienelės, kuri suteikia geresnę apsaugą ultragarso bangoms [51,52]. Taip pat tai gali būti susiję su tvirtesniu peptidoglikano sluoksniu išorinėje gram-teigiamų bakterijų plazminės membranos pusėje. Mikroorganizmai, kuriems yra būdinga kokių forma, yra labiau atsparūs nei lazdelės formos mikroorganizmai dėl ląstelės paviršiaus ir tūrio santykio. Be to, ultragarsą naudojant kaip sterilizavimo įrankį, sporos yra labai sunkiai sunaikinamos, lyginant su vegetatyvinėmis ląstelėmis, kurios yra augimo fazėje [51]. Tačiau tyrimais įrodyta, jog *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes* ir *E. coli* veiksmingai inaktyvuojamos, veikiant ultragarsu vandeniniuose ir fosfatinuose buferiuose ir maisto produktuose, pavyzdžiui, piene. Ultragaras, norint atlikti efektyvią sterilizaciją ar pasterizaciją, dažniausiai yra taikomas su karšto oro srautu ar dideliu slėgiu.

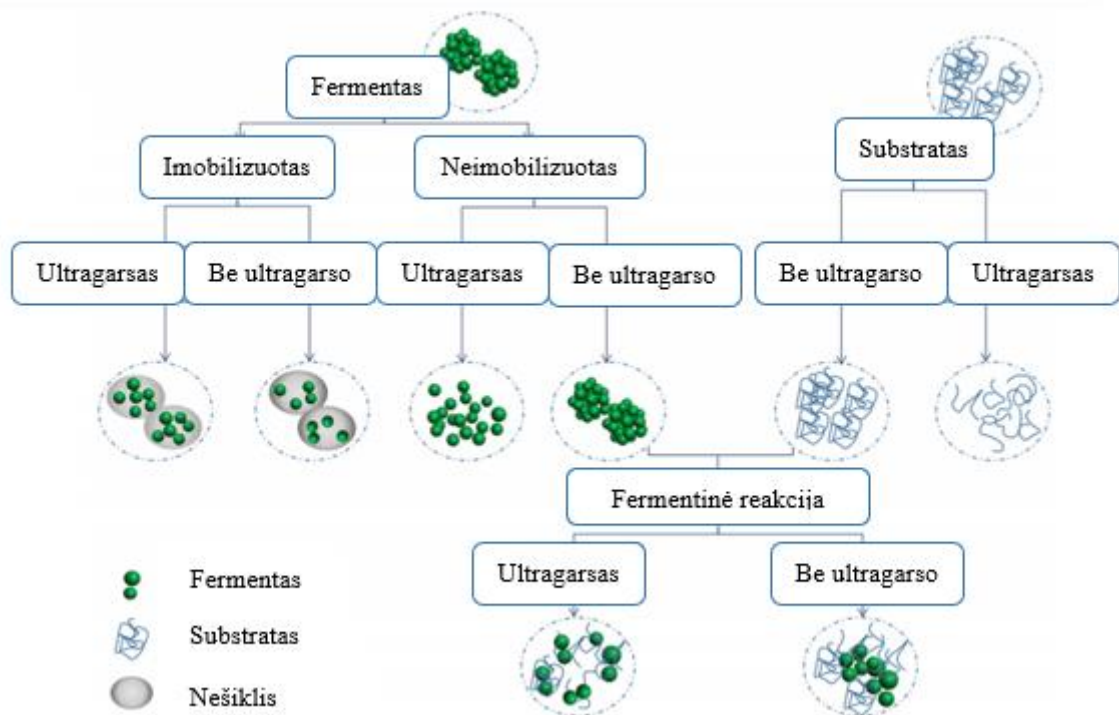
Be to, ultragaras šiuo metu pradėtas vis dažniau naudoti, siekiant suaktyvinti mikroorganizmų veiklą ir pagreitinti fermentaciją. Maisto produktų mikrobinės fermentacijos trukmės sumažinimas yra viena iš perspektyviausių sričių ultragarso taikyme [53]. Fermentacijos laiko sumažinimas padeda sumažinti gamybos laiką ir kainą. Guoping ir kt. [53] teigia, jog ultragarso sąlygomis, 20 kHz 100 W 15 min 37 °C temperatūroje, apdorojus nugriebtą pieną su *Bifidobacterium sp.* fermentacijos laikas sumažėja 11 – 26 %. Nustatyta, jog ultragaras pagerina ir bakterijų membranų pralaidumą. Sonoporacija įtakoja laipsnišką membranos prasivėrimą dėl susidariusios mikroburbuliukų kavitacijos. Mikroburbuliukai sukuria stiprią šlyties jėgą, kuri nutraukia chemines jungtis ląstelių membranose ir taip yra sukuriamos membranos poros. Tokiu būdu yra lengviau išskirti viduląstelinius fermentus, tokius kaip cisteino proteazės, į terpę [53]. Bakterinės ląstelės, apdorotos padidėjusia ultragarso amplitude, tačiau trumpesne ultragarso trukme, parodė gerokai paspartėjusią endofermentų veiklą, o didesnė amplitudė ir ilgesnė trukmė palankesnė egzofermentų aktyvumui [53]. Taip pat šio toks temperatūros kilimas dėl šilumos, gaunamos iš ultragarso absorbcijos, taip pat gali aktyvinti PRB ir taip sutrumpinti fermentacijos laiką [54]. Tyrimais įrodyta, jog veikiant PRB ultragarsu, paspartėja pieno rūgšties ir kitų metabolizmo produktų gamyba, greičiau pradedamas vartoti substratas, suaktyvėja fermentų veikla, padidėja specifinis augimo greitis ir pailgėja „log“ fazės trukmė [53]. Tai įrodo ir Dahroud ir kt. [55] atliktas eksperimentas, kurio metu išsiaiškinta, jog mažo intensyvumo ultragaras pagreitina *Lactobacillus casei* augimą ir prailgina „log“ fazės trukmę MRS terpėje. Siekiant sukelti stresinį PRB atsaką, didinantį β-gliukozidazės aktyvumą, kuris gali būti naudojamas gliukozidų biotransformacijai į izoflavonus sojų piene, *Lactobacillus acidophilus* paveikta ultragarsu (20 kHz ir 20 % amplitudė sąlygomis) stacionarioje augimo fazėje 2 min ir po 24 h pakartotinai. Tai leido padidinti fermentų aktyvumą 1,82 karto, lyginant su nustatytu prieš ultragarsą. Taip pat ultragarsu paveiktą *L. acidophilus*, naudojant sojų pieno fermentacijai, iš viso izoflavonų kiekis padidintas nuo 21,8 % iki 97,9 % per 24 val [56]. β-galaktozidazės fermento aktyvumas, kuris katalizuoja β-D-galaktozido hidrolizę į galaktozę, taip pat sėkmingai buvo padidintas, taikant ultragarso kavitaciją [53]. Atlikti tyrimai parodė, kad ultragarso poveikis PRB augimui ir bioaktyvumui priklauso ir nuo PRB padermės [53].

Didelio intensyvumo ultragaras yra taikomas siekiant modifikuoti baltymų fizikochemines savybes, tokias kaip tirpumas, drumstumas, emulgavimas, dalelių dydis, hidrolizės laipsnis ir kitas panašias savybes. Baltymų struktūra ir funkcijos pasikeičia dėl jų pokyčių baltymų molekulėse ir ultragarso

gebėjimo nutraukti kovalentinius ryšius [57]. Be to, ultragarsas sukelia baltymų molekulių dalinį išsisklaidymą ir mažina baltymų tarpusavio sąveiką, o tai rodo laisvos sulfhidrilo grupės kiekio padidėjimas ir paviršiaus hidrofobiškumas, dėl kurio žymiai pagerėja baltymų tirpumas. Ultragarso apdorojimas taip pat žymiai sumažina dalelių dydį [57]. Taip pat sumažėja ir terminis stabilumas, ko pasekoje baltymai denatūruoja. Nustatyta, kad ultragarso poveikis priklauso nuo ultragarso prietaiso tipo ir galios [57].

Tyrimais įrodyta, jog žaliavos apdorojimas prieš fermentaciją ultragarsu palengvina fermentinę hidrolizę [58]. Jin ir kt. [59] atlikti tyrimai parodė, kad dėl ultragarso poveikio padidėja kviečių glitimo laisvosios sulfhidrilo grupės kiekis. Taip pat nustatyta, kad kviečių glitimo struktūra, apdorojus ultragarsu, buvo suskaidyta ir lengviau pasiekiami fermentams. Be to, ultragarsas sąlygoja didelių peptidų frakcijų kiekio sumažėjimą ir santykinį mažų peptidų frakcijų padidėjimą hidrolizatuose, lyginant su kontrole. Mokslininkai teigia, jog kviečių glitimo netirpių baltymų struktūros pokyčiai yra pagrindinė fermentinės hidrolizės savybių pagerėjimo priežastis [59]. Pagal Li ir kt. [60], kurie tyrė ryžių baltymų apdorojimą prieš fermentaciją, ultragarsas yra nebrangi ir aplinkai visiškai nekenksminga technologija, kuri gali būti panaudota ir visų kitų baltymų apdorojimui prieš fermentaciją. Ultragarsas yra taikomas ir bioaktyvių peptidų, kurie yra naudojami vaistų pramonėje, gamybai iš baltymų, pavyzdžiui, išrūgų [61].

Be paminėtų ultragarso taikymo privalumų, ultragarsas skatina sąveiką tarp fermento ir substrato, susidarant jų kompleksui. Ultragarso kavitacija sukelia baltymų konformacijos pokyčius, todėl veikia fermentinį aktyvumą, atskleidžiant aktyvųjį centrą ir išskleidžiant polipeptidinę grandinę [62]. Be to, ultragarso bangos gali įtakoti reakcijos stabilumą. Atliktas tyrimas parodė, jog poligalakturonazės, apdorotos ultragarsu, aktyvumas pradėjo mažėti po 50 min, kai tuo tarpu neapdorotos ultragarsu aktyvumas pradėjo mažėti po 30 min [63]. Nustatyta, jog ultragarsu apdorotų fermentų antrinės ir tretinės struktūros yra pakeičiamos skirtingais laipsniais. Be to, fermento pokyčiai yra negrįžtami. Daugelis eksperimentinių rezultatų parodė, kad skirtingi fermentai turi skirtingą tolerancijos ultragarsui laipsnį [62]. Ultragarso įtaka fermentinės hidrolizės procesui pavaizduota 1.6 paveiksle [62].



1.6 pav. Ultragarso įtaka fermentinės hidrolizės reakcijoms

Fermentai taip pat gali atlaikyti didesnio intensyvumo ultragarsą, jei yra naudojami priedai. Fermentų inaktyvavimuisi sustabdyti į terpę galima pridėti ir tokių stabilizatorių kaip Tween 80 (apsaugo tripsiną nuo didelių ultragarso pažeidimų), poliolių (padidina natūralių baltymų stabilumą), polietilenglikolio (lipazės iš *Chromobacterium viscosum* stabilizavimui) ir kt. [63].

Apibendrinant, ultragarsas yra plačiai naudojamas įvairiuose fermentinės hidrolizės reakcijos etapuose, siekiant padidinti reakcijos greitį ir produkto išeigą. Ultragarsu galime apdoroti substratą, mikroorganizmus ar jau išskirtus iš jų fermentus bei visą mišinį kartu, tačiau labai svarbu yra parinkti tinkamas ultragarso sąlygas [64].

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Medžiagos ir mikroorganizmai

Substratas. Eksperimentui atlikti naudoti viso grūdo kvietiniai miltai (drėgnis 12,8 %, baltymai 10,3 %, riebalai 1,8 %, pelenai 0,6 %, skaidulos 11,16 %), pagaminti UAB „Malsena“. Taip pat grynas glitimas (drėgmė 6,6 %, baltymai 77,40 %), pagamintas AB „Roquette Amilina“ (Panevėžys, Lietuva).

Mikroorganizmai. Viso grūdo kvietinių miltų ir glitimo žaliavos fermentacijai naudotos pieno rūgšties bakterijos: *Lactobacillus paracasei* LUHS244, *Lactobacillus uvarum* LUHS245, *Pediococcus pentosaceus* LUHS22 ir LUHS100, *Lactobacillus plantarum* LUHS18 ir LUHS135, *Pediococcus acidilactici* LUHS236 ir LUHS29, *Lactobacillus brevis* LUHS140 ir LUHS173, gautos iš LSMU Maisto saugos ir kokybės katedros kolekcijos. Prieš eksperimentą, bakterijos padaugintos sterilioje MRS terpėje su Tween 80 (Biolife, Italija), inkubuojant jas 48 h 35 °C temperatūroje anaerobinėmis sąlygomis [42].

2.2. Aparatūra

- ❖ Spektrofotometras „Genesys 10UV“
- ❖ pH matuoklis „Hanna instruments“
- ❖ Termostatas „Mettler“
- ❖ Termostatuojama vandens vonelė „Biosam“
- ❖ Centrifuga „Universal 320 R“ ir „Orto alresta“
- ❖ Autoklavas „Certoclav“
- ❖ Termostatuojama purtyklė „Biosan ES-20“
- ❖ Laminaras „Telstar BV-100“
- ❖ Ultargarso vonelė „Ultrasonic proclean 3.ODSP“
- ❖ Chromatografas „THERMO Ultimate 3000-2“
- ❖ Kapiliarinės elektroforezės sistema „Agilent 2100 Bioanalyzer“
- ❖ Tekstūros analizatorius „TA.XT“ (Stable Micro Systems, Godalmingas, JK)
- ❖ Vertikalios elektroforezės įranga „Clever scientific CVS10“

2.3. Tyrimo metodai

2.3.1. Fermentacija pieno rūgšties bakterijomis

Fermentacijos tyrimui kvietinių miltų mėginys (100 g) sterilizuotas autoklave 121 °C 20 min. Atvėsinus iki 30 °C temperatūros, mėginys sumaišytas su steriliu distiliuotu vandeniu (150 ml) ir 2 % (g/100g) grynos bakterijų suspensijos. Fermentacija vykdyta 96 h laikant mėginius termostate 35 °C temperatūroje anaerobinėmis sąlygomis. Mėginiai tirti kas 24 h pH, BTR, tirpių baltymų kiekiui bei bakterijų proteolitiniam aktyvumui įvertinti. Kiekvienas mėginys analizuotas du kartus. Atrinkus proteolitiniu aktyvumu kvietinių miltų terpėje pasižyminčias PRB, pastarosios naudotos gryno glitimo baltymų hidrolizei.

2.3.2. pH ir bendro titruojamojo rūgštingumo nustatymas

Mėginių pH nustatytas pagal LST EN ISO 10523:2012 standartą [65]. Tyrimui pasverta 5 g žaliavos ir užpilta 50 ml vandens, gautas mišinys homogenizuotas 20 min ant magnetinės maišyklės. Gauta masė nufiltruota per kaproninį filtrą ir matuotas tirpalo pH tiesiogiai pH-metru.

Mėginių bendras titruojamasis rūgštingumas (BTR) nustatytas pagal LST 1553:1998 standartą [66]. Rūgštingumas išreikštas Neimano laipsniais ($^{\circ}\text{N}$), t. y. 1 N šarmų tirpalo ml skaičiumi, reikalingu nutitruoti rūgštis, esančias 100 g produkto. Rūgštingumui nustatyti mėginys analogiškai ruošiamas kaip ir pH nustatymui. Du lygiagretūs mėginiai po 50 ml titruoti 0,1 N NaOH tirpalu, naudojant indikatorių 1 % fenolftaleiną, iki avietinės spalvos, neišnykstančios 1 min. Terpės bendras titruojamasis rūgštingumas (BTR) apskaičiuotas pagal formulę:

$$BTR = 2 \cdot a \cdot k \quad (2.1)$$

čia: a – NaOH tirpalo kiekis sunaudotas mėginio titravimui (ml); k – NaOH tirpalo titro pataisos koeficientas ($k = 1$).

2.3.3. Baltymų kiekio nustatymas spektrofotometriniu metodu

Tirpiųjų baltymų kiekis pilno grūdo kvietinių miltų fermentacijos terpėje įvertintas spektrofotometriniu metodu [67]. Šio metodo principas remiasi baltyminių tirpalų gebėjimu absorbuoti UV spindulius, esant bangų ilgiams 280 ir 260 nm. Aminorūgštys, kurios turi aromatinių žiedą, absorbuoja UV spindulius, esant bangos ilgiui 280 nm. Absorbacija, esant 260 nm, įvyksta dėl peptidinių jungčių [67].

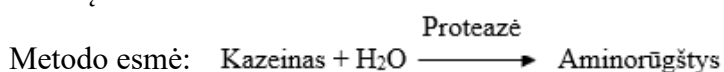
Tyrimui pasverta 5 g mėginio ir užpilta 10 ml dist. vandens. Mišinys maišytas magnetine maišykle 15 min ir centrifuguotas (10 min 4500 aps./min). Po centrifugavimo paimta 300 μl mėginio ir praskiesta su 2700 μl vandens. Vėliau matuotas tirpalų optinis tankis spektrofotometru, esant 280 nm ir 260 nm bangos ilgiui. Baltymų koncentracija tirpale X (mg/ml) apskaičiuota pagal formulę:

$$X \text{ (mg/ml)} = (1.55 \cdot A_{280}) - (0.76 \cdot A_{260}) \quad (2.2)$$

čia: A_{280} – baltymų tirpalo sugertis, esant bangos ilgiui 280 nm; A_{260} – baltymų tirpalo sugertis, esant bangos ilgiui 260 nm.

2.3.4. Proteolitinio aktyvumo nustatymas

Proteolitinių fermentų aktyvumas pilno grūdo kvietinių miltų terpėje ir gryname glitime nustatytas pagal Sigma – Aldrich proteazės aktyvumo įvertinimo metodiką, naudojant kazeiną kaip substratą [68]. Kaip standartas naudotas tirozino tirpalas. Vienas proteazės aktyvumo vienetas išreiškiamas μmol tirozino ekvivalento, atskelto nuo kazeino substrato reakcijos sąlygomis (37 $^{\circ}\text{C}$ pH 7,5) per minutę.



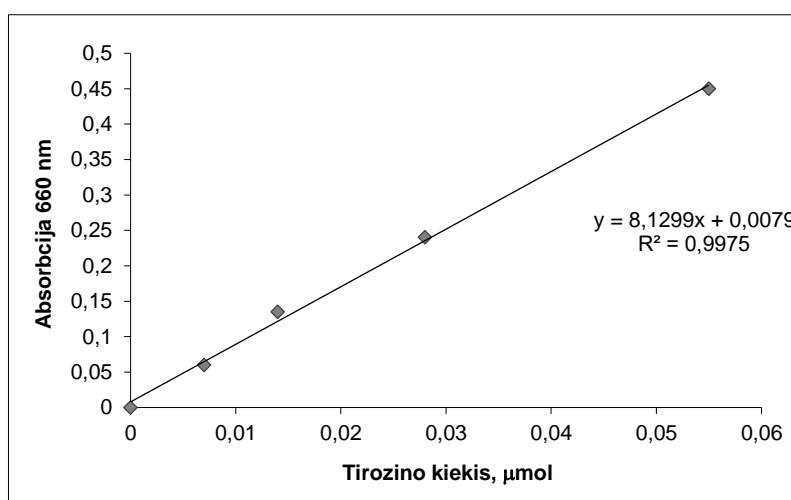
Tyrimui atsverta 5 g fermentuoto mėginio ir sumaišyta su 10 ml dist. vandens. Mišinys maišytas magnetine maišykle 15 min ir centrifuguotas 10 min 4500 aps./min. Supernatantas naudotas kaip fermentų tirpalas proteolitiniam aktyvumui įvertinti. Tyrimui atlikti papildomai paruošiamas 0,65 %

kazeino tirpalas (0,05 M Na₂HPO₄ buferyje, kurio pH 7,5), 110 mM TCA rūgštis, 0,5 M natrio karbonato tirpalas. Paimama Folino – Kiokalto reagento 10 ml ir praskiedžiama iki 100 ml. Reakcijai atlikti, substratas (2,5 ml) sumaišomas su fermentų ekstraktu (0,5 ml) ir inkubuojamas 30 min 37 °C vandens vonioje. Lygiagrečiai ruošiamas kontrolinis mėginys, į kurį pradžioje nededamas fermentas. Eksperimentas atliekamas seka, aprašyta 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Bakterijų proteolinio aktyvumo įvertinimas

	Testas	Tuščias
Kazeinas	2,5 ml	2,5 ml
Fermento ekstraktas	0,5 ml	-
Patalpiname mėgintuvėlius į 37 °C vandens vonelę 30 min. Tada pilame:		
TCA	2,5 ml	2,5 ml
Fermento ekstraktas	-	0,5 ml
Patalpiname mėgintuvėlius į 37 °C vandens vonelę 10 min. Nuosėdos filtruojamos per 0,45 μm filtrinį popierių ir toliau filtratą naudojame spalvinės reakcijos paieškoms:		
Testo filtratas	1 ml	-
Tuščio filtratas	-	1 ml
Natrio karbonatas	2,5 ml	2,5 ml
Folino-Kiokalto reagentas	0,5 ml	0,5 ml
Patalpiname mėgintuvėlius į 37 °C vandens vonelę 30 min. Paskui leidžiama atšalti iki kambario temperatūros ir matuojama tirpalų absorbcija, esant 660 nm bangos ilgiui.		

Kalibravimo kreivės sudarymas. Standartinio 1,1 mM tirozino tirpalo kiekiai (0,05; 0,10; 0,20; 0,40 ml) sumaišyti su dist. vandeniu, bendras tūris mėgintuvėliuose 2 ml. Į šį tirpalą įpilta 1 ml Folino–Kiokalto reagento ir 5 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišyta ir inkubuota kambario temperatūroje. Po poros minučių matuota šviesos sugertis, esant 660 nm bangos ilgiui. Kalibracinė kreivė pateikta 2.1 paveiksle.



2.1 pav. Tirozino kiekio priklausomybė nuo šviesos sugerties

Proteolitinis aktyvumas apskaičiuotas pagal formules:

$$\Delta A_{660nm} = A_{660nm \text{ testas}} - A_{660nm \text{ blankas}} \quad (2.3)$$

$$U(AV / ml) = \frac{a \cdot V}{V_f \cdot t \cdot v} \quad (2.4)$$

Čia: a – tirozino tirpalo koncentracija iš kalibracinės kreivės, μmol ; V – visas tirpalo tūris; V_f – pradinis fermento tūris, ml; t – bandymo laikas, min; v – filtrato tūris, ml, naudotas kalorimetrinėje analizėje.

2.3.5. Fermentacijos terpės apdorojimas ultragarsu

PRB fermentinės sistemos aktyvinimui taikytas apdorojimas 37 kHz dažnio (intensyvumas 100%, galingumas 70 W) ultragarsu. Eksperimentui atlikti glitimo (10 g) ar kvietinių miltų (20 g) mėginys sumaišytas su dist. vandeniu, atitinkamai santykiu 1:6 ir 1:2. Į gautą terpę įmaišius 2 % grynos bakterijų suspensijos, mėginiai homogenizuoti ir supilstyti į sandarius polietileningus maišelius. Maišeliai su mėginiais patalpinti į ultragarso vonelę ir apdoroti ultragarsu, keičiant trukmę (10, 20 ir 30 min) ir palaikant pastovią temperatūrą (35 °C). Po apdorojimo ultragarsu, mėginiai inkubuoti termostate 48 h, o paskui ir 96 h 35 °C temperatūroje. Kas 24 h įvertintas terpės pH, BTR, PRB proteolitinis aktyvumas ir paimti mėginiai gliadino baltymų išskyrimui ir jų kiekio įvertinimui. Kaip kontrolė naudoti neapdoroti ultragarsu mėginiai.

2.3.6. Glitimo baltymų ekstrakcija

Glitimo baltymų ekstrakcija atlikta pagal Dhaka [69] pateiktą metodiką.

Gliadinų frakcijos išskyrimas. 1 g fermentuojamosios terpės ekstrahuojama 5 ml 70 % vandeninio etanolio tirpalo, maišant ant magnetinės maišyklės. Gautas tirpalas centrifuguojamas (4500 aps./min 30 min), supernatantas nupilamas ir išsaugomas (I gliadinų frakcija). Procedūra kartojama du kartus ir nuosėdos išsaugomos [69]. Gautuose tirpaluose nustatyta baltymų koncentracija Bradfordo metodu.

Gliuteninų frakcijos išskyrimas. Ant pirmajame etape gautų nuosėdų užpilama 5 ml 50 % 1-propanolio + 1 % DTT ir maišoma 30 min, kas 10 min vartant. Mėginiai laikomi vandens vonioje 60 °C 90 min, kas 15 min vartant. Vėliau mėginiai centrifuguojami, supernatantas nupilamas ir nusodinti gliuteninai ištirpinami 5 ml 50 % 2-propanolio + 0,08 M Tris-HCl (pH 7,5) + 1 % DTT + 2 M karbamido tirpale [69].

2.3.7. Baltymų kiekio nustatymas Bradfordo metodu

Bradfordo metodas pagrįstas baltymų sąveika su specifiniu reagentu – Coomasee brilantinio mėlio dažikliu, su kuriuo baltymai sudaro mėlynos spalvos junginį (spalvos intensyvumas tiesiogiai priklauso nuo baltymų koncentracijos) [70]. Bradfordo reagentas ruošiamas iš 100 mg Coomasee brilantinio mėlio G-250, 50 ml 95 % etanolio ir 100 ml 85 % fosforo rūgšties. Kai dažai ištirpsta, tirpalas skiedžiamas su dist. vandeniu iki 1 litro. Tyrimui atlikti 100 μl gliadinų baltymų tirpalo sumaišoma su 3 ml Bradfordo reagento. Tirpalai inkubuojami 40 min kambario temperatūroje. Matuojamas tirpalų optinis tankis spektrofotometru, esant bangos ilgiui 595 nm [70]. Bendras baltymų kiekis X (mg/g) apskaičiuotas pagal formulę:

$$X = \frac{a \cdot V}{n \cdot V_1} \quad (2.5)$$

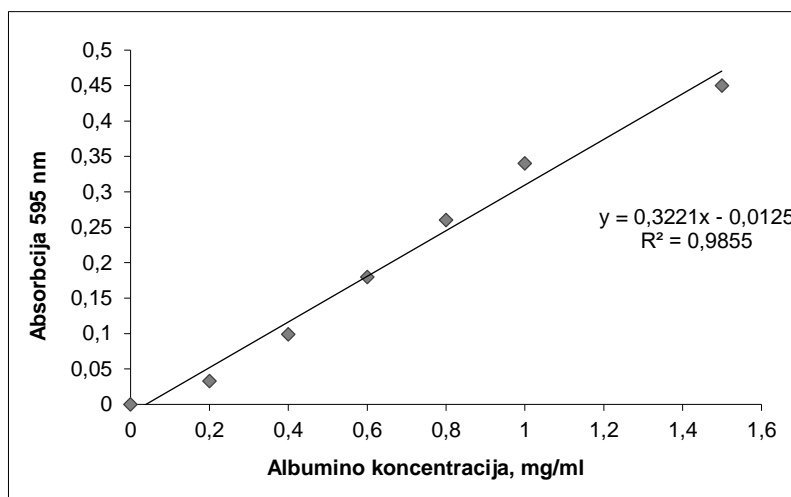
a – baltymo koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg/ml; V – baltymų ekstrakto tūris, ml; V_1 – pradinis ekstrakto tūris, paimtas praskiedimui, ml; n – pradinė žaliavos masė, g.

Tirozino kalibravimo kreivės sudarymas. Kalibracinei kreivei sudaryti reagentai supilstyti pagal 2.2 lentelę. Kalibracinei kreivei sudaryti naudotas 2 mg/ml koncentracijos jaučio serumo albumino tirpalas. Į visus mėgintuvėlius įpilama 3 ml Bradfordo reagento, inkubuojama 40 min kambario temperatūroje ir matuojama šviesos sugertis, esant 595 nm bangos ilgiui.

2.2 lentelė. Kalibracinės kreivės sudarymas Bradfordo metodui

Eil.Nr	Galutinė koncentracija (mg/ml)	Pradinio albumino tirpalo tūris (μl)	Vandens kiekis praskiedimui (μl)
1	0	0	100
2	0,2	10	90
3	0,4	20	80
4	0,6	30	70
5	0,8	40	60
6	1,0	50	50
7	1,5	75	25

Gliadinų koncentracija (mg/ml) apskaičiuojama iš kalibracinės tiesės lygties, pavaizduotos 2.2 paveiksle.



2.2 pav. Absorbcijos priklausomybė nuo baltymų koncentracijos tirpale

2.3.8. Baltymų elektroforezė natrio dodecilsulfato–poliakrilamido gelyje

Baltymų molekulių pokyčiams įvertinti taikyta baltymų NDS – PAGE, naudojant vertikaliosios elektroforezės įrangą. Šis metodas yra taikomas biomolekulėms atskirti ir identifikuoti. Elektroforezės metu įkrautos baltymų molekulės juda elektriniame lauke. Įkrautos molekulės judrumas elektriniame lauke priklauso nuo jos dydžio ir formos, krūvio ir cheminės prigimties,

elektrinio lauko stiprumo ir gelio porų dydžio [71]. Elektroforezei atlikti naudoti tirpalai, pateikti 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. Elektrofrezės tirpalai ir jų ruošimas

Tirpalo pavadinimas	Ruošimas
30 % akrilamido / 0,8 % N,N–metilenbisakrilamidas	Ištirpinama 30 g akrilamido ir 0,8 g N,N–metilenbisakrilamido ir pilama H ₂ O iki 100 ml
4x TRIS·HCl / NDS buferis pH 8,8 (1,5 M TRIS·HCl, 0,4 % NDS)	36,4 g TRIS ištirpinama 110 ml H ₂ O. Į gautą tirpalą pilama 8 ml 10 % NDS. Lašinama 1 N HCl, kol tirpalo pH bus 8,8. Praskiedžiama iki 200 ml
4x TRIS·HCl / NDS buferis pH 6,8 (0,5 M TRIS·HCl, 0,4 % NDS)	12,12 g TRIS ištirpinama 110 ml H ₂ O. Į gautą tirpalą įpilama 8 ml 10 % NDS. Lašinama 1 N HCl, kol tirpalo pH bus 6,8. Praskiedžiama iki 200 ml
4x TRIS–glicino buferis–NDS	57,6 g glicino ir 12 g TRIS ištirpinama 1 l H ₂ O
1x TRIS–glicino buferis–NDS (elektrofrezės buferis)	Sumaišoma 750 ml 4xTRIS–glicino buferio–NDS su 30 ml 10 % NDS ir pilama H ₂ O iki 3 l
10 % amonio peroksoulfatas	0,1 g ištirpinamas 1 ml
TEMED	-
4x mėginis denatūruojantis buferis	4 ml glicerolio, 2 ml 2–merkaptioetanolio, 1,2 g NDS, 5 ml 4xTRIS·HCl / NDS pH 6,8 buferio, 0,03 g bromfenolio mėlio sumaišoma, išpilstoma į Ependorfo mėgintuvėlius ir laikyta šaldytuve -20 °C
Baltymų tvirtinimo tirpalas	25 ml izopropilo alkoholio, 10ml acto rūgšties ir 65 ml vandens
Dažas Coomassie mėlis	10 ml acto rūgšties, 0,006 g Coomassie mėlio G-250, 90 % vandens
Dažo išplovimo tirpalas 10 % acto rūgštis	10 ml acto rūgšties skiedžiama iki 100 ml

Baltymų išskirstymui ruoštas 12 % akrilamido gelis. Skirstomojo ir kencentruojamojo gelių receptūros pateiktos 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Skirstomojo ir koncentruojamojo gelio ruošimas

Skirstomasis gelis		Koncentruojamasis gelis	
Tirpalas	Kiekis (ml)	Tirpalas	Kiekis (ml)
30 % akrilamido / 0,8 % N,N–metilenbisakrilamidas	4	30 % akrilamido / 0,8 % N,N–metilenbisakrilamidas	1,7
4xTRIS·HCl / NDS buferis pH 8,8	2,5	4 × TRIS·HCl / NDS buferis pH 6,8	2,5
H ₂ O	3,4	H ₂ O	5,7
10 % amonio peroksoulfatas	0,1	10 % amonio peroksoulfatas	0,1
TEMED	0,004	TEMED	0,01

Elektroforezės eiga. Paruoštu skiriamuoju tirpalu pripildoma elektroforezės aparato gardelė ir 40 min laukiama, kol įvyks polimerizacija. Koncentruojamasis tirpalas supilamas tarp stiklų ant skiriamojo gelio ir įdedamos šukos. Laukiama, kol įvyks polimerizacijos reakcija 35 min. Tiriamojo baltymo tirpalo praskiedžiama santykiu 1:1 su baltymus denatūruojančiu buferiu ir 5 min mišinys kaitinamas verdančio vandens vonioje. Iš elektroforezės aparato išimamos šukos. Po to į šulinėlius po 20 µl įpilami paruošti baltymo pavyzdžiai. Į kontrolinį šulinėlį įpilama 10 µl etaloninio baltymo mišinio. Molekulinei masei įvertinti naudoti elektroforezės baltymų standartai (Sigma – Aldrich), sudaryti iš žinomos molekulės masės baltymų, t. y. 200 kDa, 116 kDa, 97 kDa, 66kDa, 55 kDa, 45 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 24 kDa, 20 kDa, 14,2 kDa ir 6,5 kDa. Į elektroforezės aparatą pripilama elektroforezės buferio. Elektroforezės aparatas prijungiamas prie pastoviosios elektros srovės (220 V, 40 A) šaltinio ir baltymų išskirstymo procesas vykdomas 60 min.

Gelio dažymas. Po elektroforezės gelis įdedamas į plastikinę vonelę ir fiksuojamas baltymo tvirtinimo tirpalu apie 1 h. Vėliau užpilama Coomassie mėlio dažo tirpalas. Vonelė lėtai siūbuojama apie 6 h kambario temperatūroje, kol baltymo juostelės nusidažo norimo ryškumo mėlyna spalva. Dažo tirpalas išpilamas ir užpilama 10 % acto rūgšties tirpalo, kad iš gelio išsiplautų dažas, nesusirišęs su baltymu.

2.3.9. Baltymų kapiliarinė elektroforezė

Glitimo gliadinų frakcijos baltymų pokyčiai prieš ir po apdorojimo ultragarsu ir mikroorganizmais analizuoti kapiliarinės elektroforezės metodu. Šis metodas yra efektyvesnis nei NDS – PAGE, kadangi šimtai komponentų išskiriami tuo pačiu metu ir yra automatizuotas. Analizei atlikti naudotas „Agilent 2100 bioanalyzer“ aparatas (Agilent Technologies, JAV) ir „Agilent Protein“ rinkinys (Agilent Technologies, JAV). Šis rinkinys yra skirtas analizuoti baltymus, kurių molekulinė masė yra 5 – 80 kDa ir gali būti naudojamas analizuoti ląstelių lizatus, kolonėlių frakcijas ir išgrynintus baltymus. Kiekvienas čipas turi viduje sujungtus mikrokanalėlius, kurie „sijoja“ baltymus pagal dydį, kol šie juda kanaluose elektroforezės principu.

Kapiliarinės elektroforezės tirpalai ir eiga. Visų pirma ruošiamas mėginio buferis pagal 2.5 lentelėje pateiktą receptūrą.

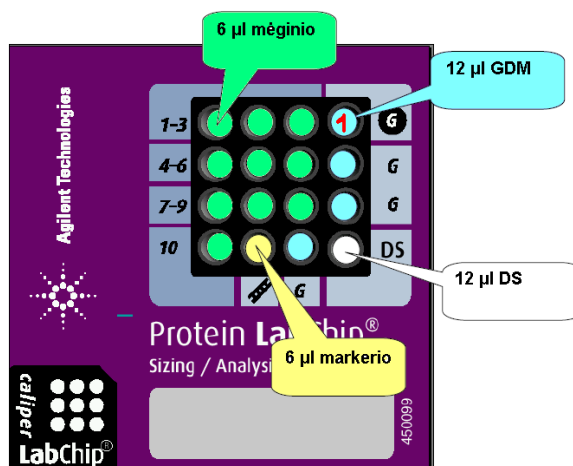
2.5 lentelė. Mėginio buferio paruošimas

Mėginio buferis (pH=8,8)	2x mėginio buferis (100 ml)
2 M karbamidas	24 g karbamido
15 % glicerino	30 ml glicerino
0,1 M DTT	3,1 g DTT
0,1 M Tris/HCl	3,1 g Tris/HCl

Tyrimui atlikti 100 µl gliadinų tirpalo užpilama 75 µl 2x mėginio buferio ir 75 µl dejonizuoto vandens. Mėgintuvėliai įdedami į 25 °C ultragarsinę vonelę 15 min. Po to centrifuguojami 5 min 12200 aps./min mikrocentrifugoje. Supernatantas surenkamas ir naudojamas elektroforezei atlikti kaip mėginys. Mėginys (4 µl) sumaišomas su 2 µl denatūruojančio tirpalo 0,5 ml mėgintuvėlyje. Denatūruojantis buferis ruošiamas pridėnant merkptoetanolio į mėginio buferį (7 µl merkptoetanolio į 200 µl mėginio buferio mėgintuvėlį). Mėginių mėgintuvėliai ir mėgintuvėliai su

6 μl komerciniu baltymų markeriu patalpinami į verdančio vandens vonelę 5 min. Po virimo mėginiai atvėsunami ir centrifuguojami 5 s, kad mėginys susirinktų mėgintuvėlio dugne. Pridedama 84 μl dejonizuoto vandens į mėginio ir markerio mėgintuvėlius ir supurtoma.

Baltymų analizės čipas (2.3 pav) užpildomas 12 μl dažais (šulinėlis G), 12 μl dažų išplovimo tirpalu (šulinėlis DS), 6 μl mėginiu į kiekvieną šulinėlį (1-10), 6 μl markeriu į šulinėlį, pažymėtą kopetėlėmis. Kiekvienas šulinėlis turi būti užpildytas (mėginiu arba markeriu). Čipas įstatomas į „Agilent 2100 bioanalyzer“ aparatą ir analizė pradedama iš karto.



2.3 pav. „Agilent 2100 bioanalyzer“ aparato čipas

2.3.10. Molekulinių sietų chromatografija

Molekulinių sietų chromatografija yra skysčių chromatografijos procesas, kai nėra sąveikos tarp skiriamųjų junginių ir sorbento, jonų mainų ar kitų giminingumo reiškinių. Molekulinių sietų chromatografijoje dvi fazės sudaro tas pats tirpiklis. Stacionariąją fazę sudarantis tirpiklis yra kietųjų poringų dalelių, kurios yra netirpios eliuente ir inertiškos jo bei skiriamųjų medžiagų atžvilgiui viduje, o judriąją fazę sudaro tas pats tirpiklis, esantis šių dalelių išorėje [72]. Pasiskirstymas vyksta dėl junginio difuzijos, kurią lemia skirtinga koncentracija junginio judrioje ir stacionarioje fazėje. Molekulių atskyrimas pagal jų dydį ir formą grindžiamas molekulinio sieto principu: molekulės atskiriamos tam tikro dydžio poras turinčiais nešikliais. Kolonėlė pripildoma gelio grūdelių, suspenduotų judriosios fazės buferyje. Didelės molekulės iš kolonėlės eliuojamos pirmiausia, nes jos nepatenka į nešiklio poras ir iš kolonėlės yra išstumiamos. Mažesnės molekulės pasiskirsto atitinkamo dydžio gelio porose ir iš kolonėlės eliuojamos pagal dydį viena paskui kitą [71].

Glitimo gliuteninų frakcijos baltymų struktūros pokyčiai prieš ir po ultragarso ir mikroorganizmų apdorojimo analizuoti „THERMO Ultimate 300022“ chromatografu (Thermo Fisher Scientific, JAV). Chromatografinės analizės sąlygos pateiktos 2.6 lentelėje. Tyrimui atlikti baltymų tirpalas filtruotas pro 0,45 μm membraninį filtrą ir naudotas analizei.

2.6. lentelė. Chromatografinės analizės atlikimo parametrai

Paskirtis	Srautas, ml/min	Slėgis, bar	Temperatūra, °C	Eliuentas	Trukmė, min	Injekcijos tūris, µl
Darbinis	0.3	490 – 570	30	30% acetoni-trilas / 0,1% TFA	30	5
Naktinis	0.01	5	30	70% vanduo / 0,1% TFA	∞	5

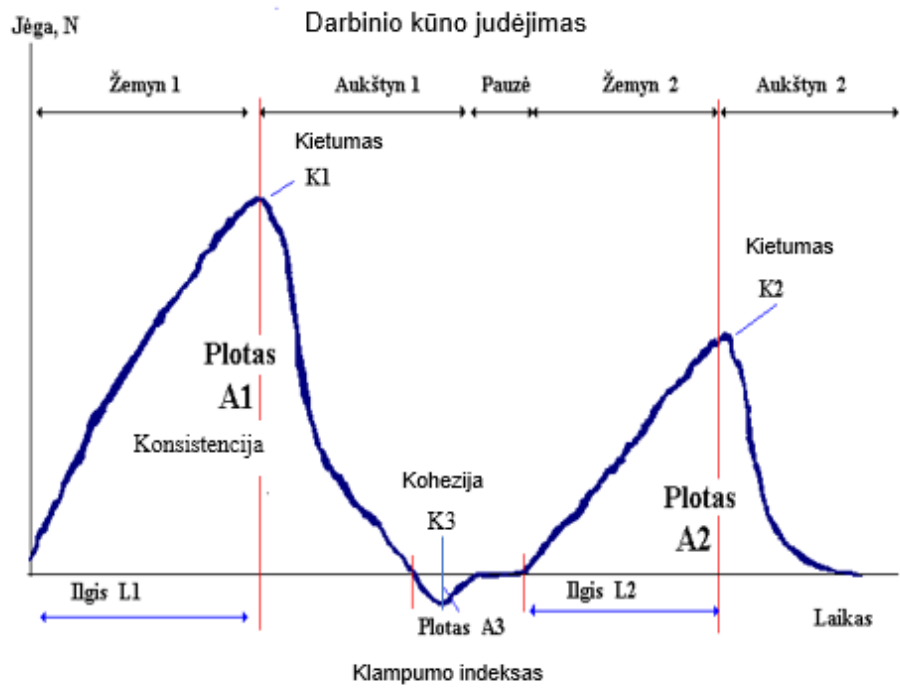
Analizei atlikti naudotos chromatografinės kolonėlės:

- kolonėle „Waters BEH200 SEC 125A“ 4,6 x 150 mm. Užpildo dalelių dydis 1,7 µm;
- kolonėle „Waters Protein BEH SEC 125A“ 4,6 x 300 mm. Užpildo dalelių dydis 1,7 µm.

2.3.11. Tešlos tekstūros parametrų nustatymas

Mėginių paruošimas. Tešlos tekstūros parametrai vertinti prieš ir po fermentacijos PRB bei apdoravimo ultragarsu, naudojant tekstūros analizatorių TA.XT (Stable Micro Systems, Godalmingas, JK). Viso grūdo kvietiniai miltai (50 g) sumaišomi su distiliuotu vandeniu santykiu 1:1. Dalis mėginių apdoroti ultragarsu, kita dalis – apdoroti ultragarsu ir fermentuoti atrinktomis PRB. Fermentacija vykdyta optimaliomis sąlygomis (24 h 35 °C). Po fermentacijos, į dalį mėginių įdėta 2 g/100g mielių ir papildomai fermentuota papildomai 1 h 35 °C. Kaip kontrolinis mėginys tirtas kvietinių miltų pusgaminis, ruoštas iš pilno grūdo kvietinių miltų ir distiliuoto vandens santykiu 1:1.

Analizė. Tekstūros analizatoriumi įvertintas mėginių kietumas, konsistencija, kohezija ir klampumo indeksas. Tekstūros įvertinimui naudotas 20 mm skersmens cilindrinis plunžeris, penetracijos greitis 1 mm/s, penetracijos gylis 10 mm. Parametrai nustatyti iš jėgos – laiko kreivės (2.4 pav.). Kietumas įvertintas pagal didžiausią teigiamą jėgą, konsistencija įvertinta kaip didžiausias teigiamas plotas, kohezija įvertinta kaip didžiausia neigiama jėga, o klampumo indeksas įvertintas kaip didžiausias neigiamas plotas.



2.4 pav. Tešlos tekstūros kreivė

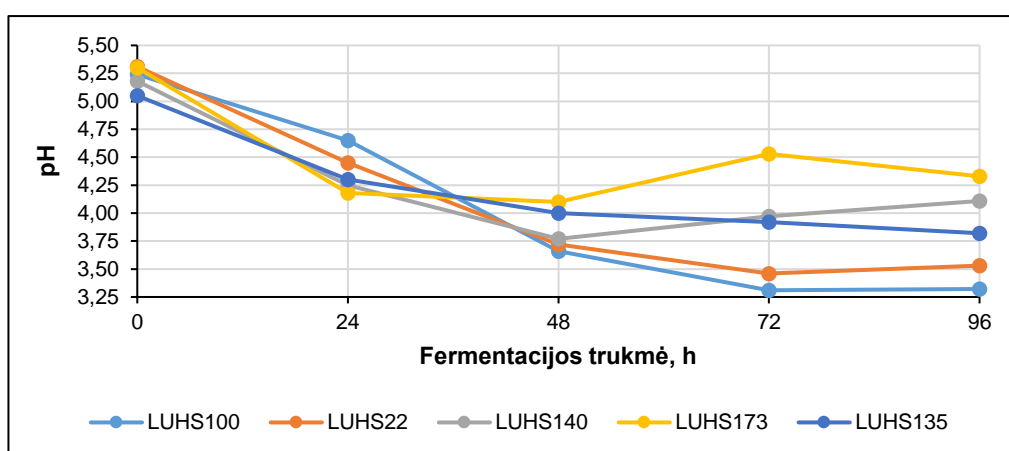
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Pieno rūgšties bakterijų gyvybingumo kvietinių miltų terpėje įvertinimas

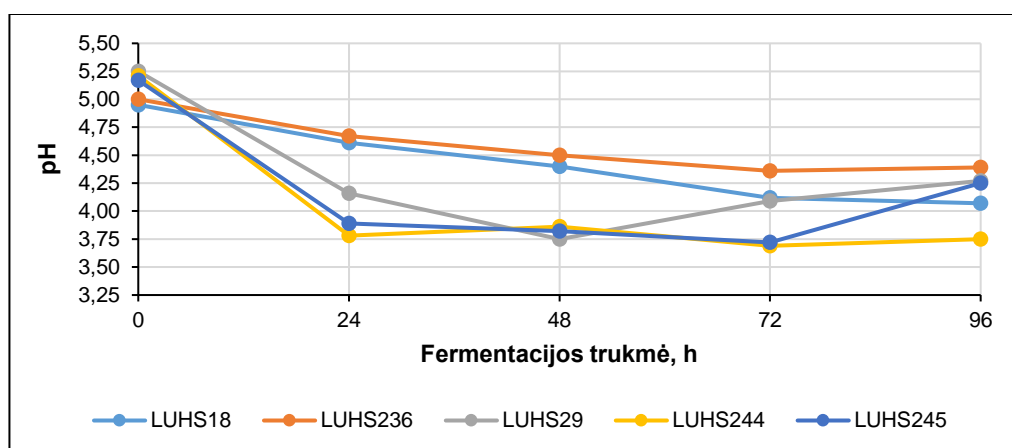
Šio etapo tikslas – atrinkti PRB, pasižyminčias proteolitinio aktyvumu kvietinių miltų terpėje, siekiant jas panaudoti kviečių prolaminų suskaidymui, taip sumažinant jų toksiškumą. Eksperimente pilno grūdo kvietinių miltų apdorojimui taikyta fermentacija skirtingomis PRB 35 °C temperatūroje 96 h. Fermentacijos kokybę vertinta pagal terpės rūgštingumo pokyčius, o bakterijų aktyvumas vertintas pagal jų proteolitinį aktyvumą ir tirpių baltymų susidarymą fermentacijos terpėje.

3.1.1. Terpės rūgštingumo kitimas fermentacijos metu

Tyrimo rezultatai rodo, kad fermentuojamosios terpės pH mažėjo beveik visą fermentacijos laikotarpį, priklausomai nuo naudotos PRB. Intensyviausiai organinės rūgštys kaupėsi per pirmąsias 48 h, o sekančias 24 h rūgštingumas didėjo lėčiau (3.1 pav.).



A



B

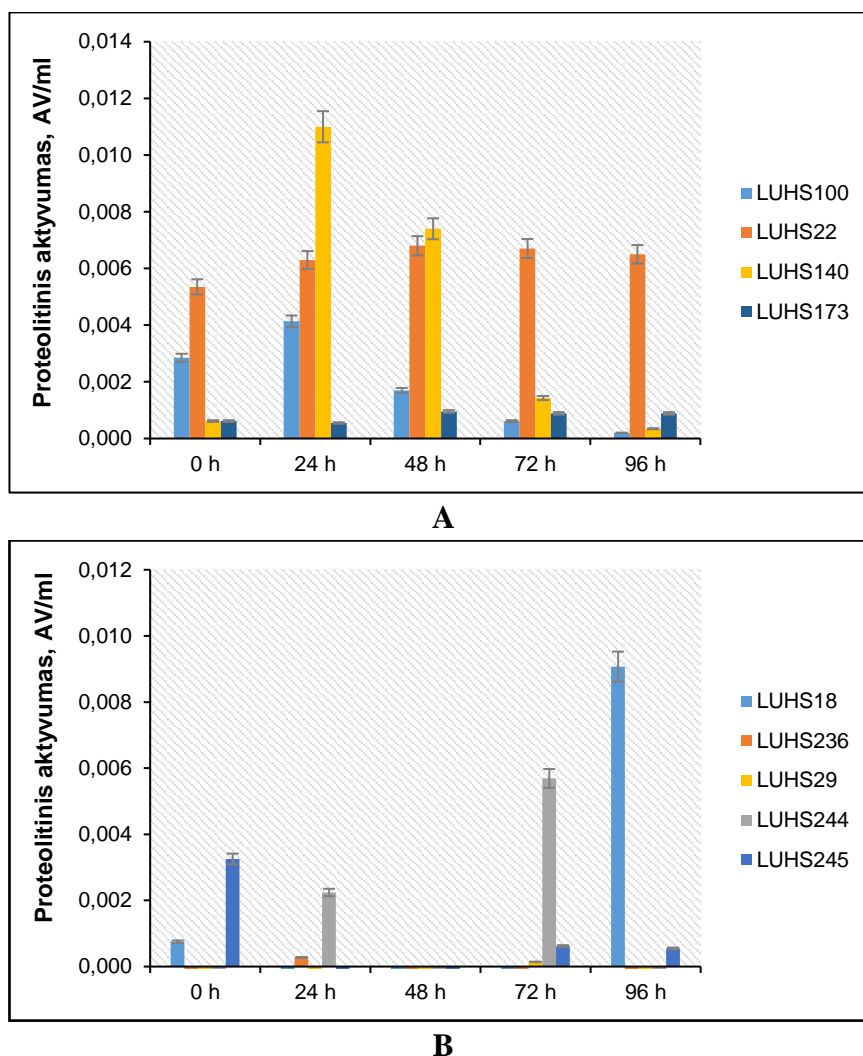
3.1 pav. pH kitimo priklausomybė nuo fermentacijos trukmės. PRB: *L. paracasei* LUHS244, *L. uvarum* LUHS245, *P. pentosaceus* LUHS22 ir LUHS100, *L. plantarum* LUHS18 ir LUHS135, *P. acidilactici* LUHS236 ir LUHS29, *L. brevis* LUHS140 ir LUHS173

Iš gautų rezultatų matyti, kad *P. pentosaceus* LUHS22 ir LUHS100 per 96 h fermentacijos periodo organinių rūgščių gamino daugiausiai. *P. pentosaceus* LUHS100 pH kito nuo 5,24 iki 3,32, o tuo

metu *P. pentosaceus* LUHS22 pH kito nuo 5,31 iki 3,53. Po 48 h fermentacijos šių abiejų padermių terpės pH buvo mažiausias iš visų, atitinkamai 3,66 ir 3,72. Mažiausios pH vertės po 24 h fermentacijos nustatytas *L. paracasei* LUHS244 ir *L. uvarum* LUHS245 fermentuotoje terpėje. *L. paracasei* LUHS244 pH kito nuo 5,21 iki 3,78, o *L. uvarum* LUHS245 nuo 5,17 iki 3,89 ir, toliau fermentuojant, išliko pastovus. Efektyvus rūgščių susidarymas stebimas ir *L. brevis* LUHS140 bei *P. acidilactici* LUHS29 fermentuotoje terpėje. *L. brevis* LUHS140 fermentuotoje terpėje per 48 h pH pakito nuo 5,18 iki 3,77, o *P. acidilactici* LUHS29 – nuo 5,25 iki 3,75, tačiau tolimesniu fermentacijos periodu terpės pH vertės didėjo. Silpniausiai rūgštys kaupėsi *L. plantarum* LUHS18 ir *P. acidilactici* LUHS236 fermentacijos terpėse (pH sumažėjimas nustatytas tik 19,2 % ir 14,6 %, lyginant su pradinėmis pH reikšmėmis).

3.1.2. Pieno rūgšties bakterijų proteolitinio aktyvumo įvertinimas fermentacijos terpėje

PRB proteolitinio aktyvumo (PA) pilno grūdo kvietinių miltų terpėje tyrimo rezultatai pateikti 3.2 paveiksle.



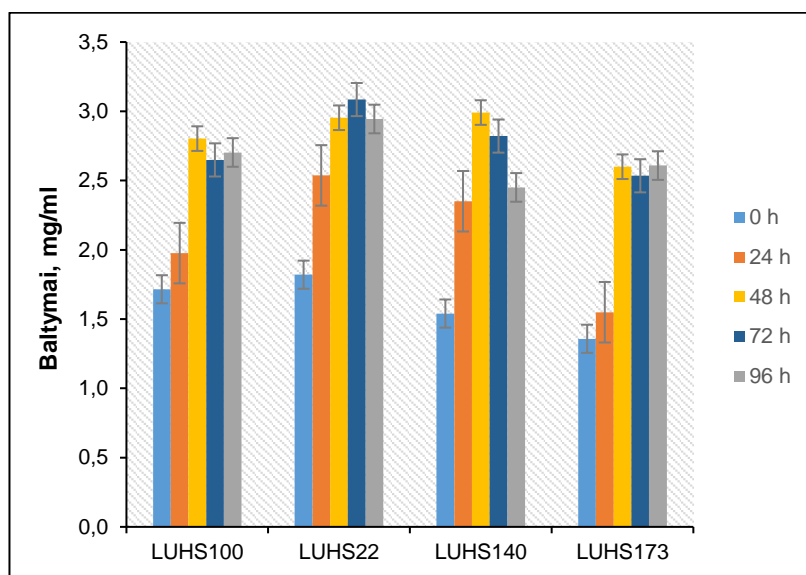
3.2 pav. PRB proteolitinio aktyvumo kitimas viso grūdo kvietinių miltų terpėje, fermentuojant 96 h skirtingomis padermėmis: *P. pentosaceus* LUHS22 ir LUHS100, *L. brevis* LUHS140 ir LUHS173 (A); *L. paracasei* LUHS244, *L. uvarum* LUHS245, *L. plantarum* LUHS18, *P. acidilactici* LUHS236 ir LUHS29 (B)

Iš gautų rezultatų matyti, kad *P. pentosaceus* LUHS22 ir LUHS100 bei *L. brevis* LUHS140 ir LUHS173 padermės pasižymėjo proteolitinium aktyvumu visu 96 h fermentacijos periodu (3.2 pav). Didžiausias PA nustatytas po 24 ir 48 h, priklausomai nuo fermentacijai naudotos PRB padermės. Didžiausias PA po 24 h fermentacijos nustatytas *L. brevis* LUHS140 (0,011 AV/ml) fermentuotoje terpėje, taip pat *P. pentosaceus* LUHS22 (0,006 AV/ml) mėginiuose, kurių PA po 48 h padidėjo iki 0,007 AV/ml. Mažesnis aktyvumas nustatytas *P. pentosaceus* LUHS100 fermentuotoje terpėje – praėjus 24 h aktyvumas siekė 0,004 AV/ml (3.2 A pav.). Mažiausias iš pastarųjų PA nustatytas *L. brevis* LUHS173 – praėjus 48 h siekė 0,001 AV/ml ir toliau beveik nebekito.

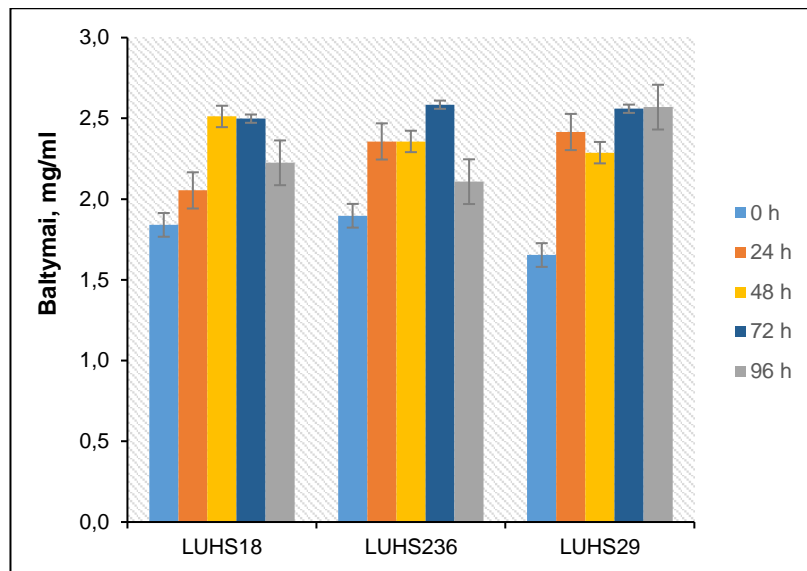
Kai kurios padermės pasižymėjo proteolitinium aktyvumu tam tikru fermentacijos momentu. Pavyzdžiui, *L. plantarum* LUHS18 didžiausias proteolitinis aktyvumas nustatytas po 96 h ir siekė 0,009 AV/ml (3.2 B pav.). *L. uvarum* LUHS245 didžiausias PA vertės nustatytos pradinium momentu (0,003 AV/ml). *L. paracasei* LUHS244 aktyvumas po 24 h siekė 0,002 AV/ml, o po 72 h padidėjo iki 0,006 AV/ml. Šios padermės proteolitinis aktyvumas po 48 h fermentacijos nenustatytas. Priežastis gali būti tokia, kad šios bakterijos pasižymėjo lėta adaptacija tiriamojoje terpėje ir silpnu jos komponentų skaidymu, taip pat galėjo įsivelti eksperimento paklaida. Tyrimas taip pat parodė, kad šios PRB padermės – *P. acidilactici* LUHS236 (0,0003 AV/ml po 24 h) ir LUHS29 (0,0001 AV/ml po 72 h) – pasižymėjo labai mažu proteolitinium aktyvumu, o *L. plantarum* LUHS135 jis visai nenustatytas.

3.1.3. Tirpiųjų baltymų pokyčių įvertinimas fermentacijos terpėje

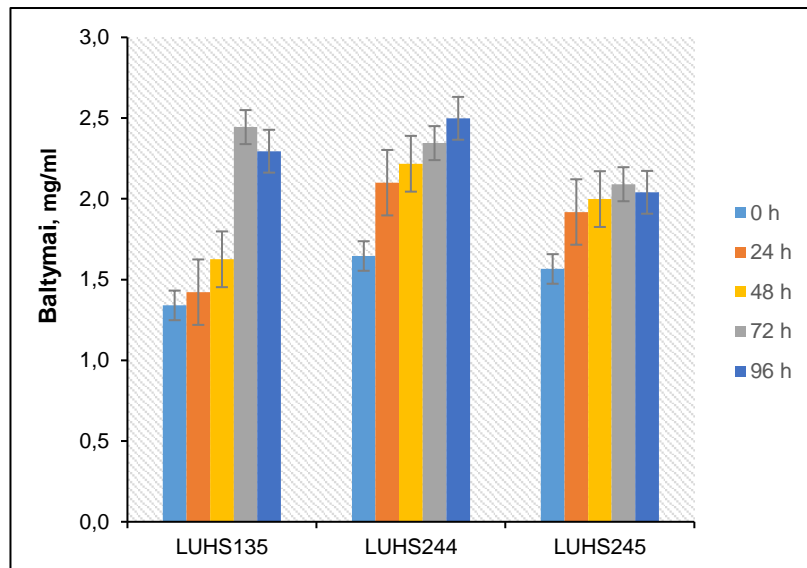
Tirpiųjų baltymų pokyčiai gali būti tiesiogiai susiję su PRB adaptavimusi terpėje ir jų gebėjimu skaidyti baltymines medžiagas, ko pasekoje susidaro didesni tirpiųjų baltymų kiekiai [37]. Tirpiųjų baltymų pokyčiai pilno grūdo kvietinių miltų terpėje, vykdant fermentaciją 96 h skirtingomis PRB padermėmis, pateikti 3.3 paveiksle.



A



B



C

3.3 pav. Tirpiųjų baltymų kitimas fermentacijos terpėje, fermentuojant 96 h. PRB: *P. pentosaceus* LUHS22 ir LUHS100, *L. brevis* LUHS140 ir LUHS173 (A); *L. plantarum* LUHS18, *P. acidilactici* LUHS236 ir LUHS29 (B); *L. paracasei* LUHS244, *L. uvarum* LUHS245, *L. plantarum* LUHS135 (C)

Iš gautų rezultatų matyti, kad pilno grūdo kvietinių miltų terpėje geriausiai adaptavosi *L. brevis* LUHS140 ir *P. pentosaceus* LUHS173, tirpių baltymų kiekis po 48 h fermentacijos padidėjo, atitinkamai 48,7 % ir 47,7 %, lyginant su pradine koncentracija (1,54 ir 1,36 mg/ml) (3.3 A pav.). Taip pat gerai šioje terpėje adaptavosi *P. pentosaceus* LUHS22, tirpiųjų baltymų kiekis po 24 ir 72 h fermentacijos padidėjo 28,3 % ir 41,1 %, lyginant su pradine baltymų koncentracija (1,82 mg/ml) (3.3 A pav.). Be to, gerai šioje terpėje adaptavosi ir *P. pentosaceus* LUHS100 ir LUHS173 padermės: tirpiųjų baltymų kiekiai po 48 h fermentacijos LUHS100 padidėjo nuo 38,8 % (pradinė koncentracija 1,72 mg/ml), o LUHS173 – iki 47,8 % (pradinė koncentracija 1,36 mg/ml) (3.3 A pav.).

Eksperimento metu nustatyta, kad silpniau viso grūdo kvietinių miltų terpėje adaptavosi *L. plantarum* LUHS135 ir LUHS18, *L. paracasei* LUHS244 bei *L. uvarum* LUHS245 padermės. Mažiausias

susidariusių tirpiųjų baltymų kiekis nustatytas po 24 h ir 48 h fermentacijos *L. plantarum* LUHS135 (1,42 mg/ml), kuris nuo pradinės vertės padidėjo atitinkamai tik 5,9 % ir 17,6 % (3.3 C pav.).

Iš gautų rūgštingumo ir tirpiųjų baltymų susidarymo tendencijų matyti, kad PRB proteolitinis aktyvumas išties priklauso nuo jų gebėjimo adaptuotis tiriamojoje fermentacijos terpėje. 48 h fermentacijos laikotarpiu, didėjant *P. pentosaceus* LUHS22 proteolitiniam aktyvumui nuo 0,0054 AV/ml iki 0,0070 AV/ml (3.2 A pav.), tirpių baltymų kiekis terpėje taip pat didėja nuo 1,82 iki 2,95 mg/ml (3.3 A pav.), o pH vertės mažėja nuo 5,31 iki 3,72 (3.1 A pav.). Tendencijos atsikartoja ir fermentuojant *L. brevis* LUHS140 ir LUHS173 bei *P. pentosaceus* LUHS100.

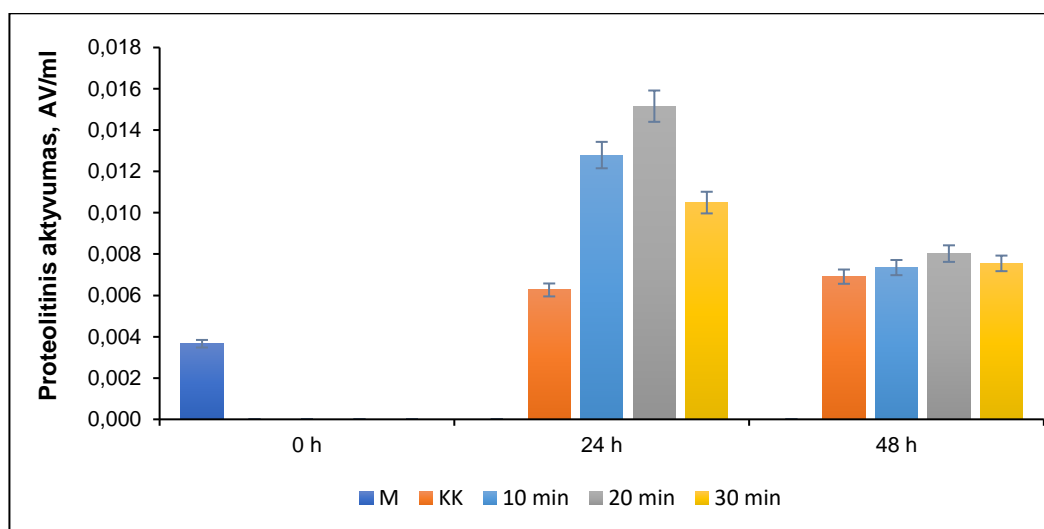
Šiame etape gauti rezultatai yra svarbūs proteolitinio aktyvumo pilno grūdo kvietinių miltų terpėje pasižyminčių PRB atrinkimui, kurios gebėtų hidrolizuoti kviečių glitimo gliadinų frakciją. Atrinkti du didžiausiu proteolitinio aktyvumu pasižymintys ir gebantys adaptuotis pilno grūdo kvietinių miltų terpėje mikroorganizmai, t.y. *P. pentosaceus* LUHS22 ir *L. brevis* LUHS140, kurie naudoti eksperimente, analizuojant ultragarso kavitacijos įtaką PRB bioaktyvumui.

3.2. Ultragarso kavitacijos įtaka mikroorganizmų bioaktyvumui

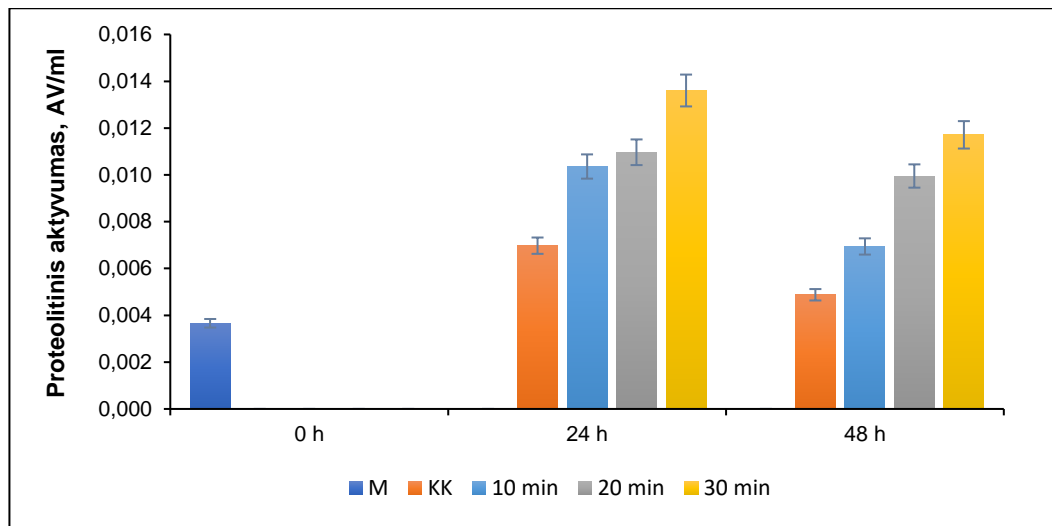
Sekantis darbo etapas skirtas ultragarso (UG) kavitacijos panaudojimui PRB bioaktyvumui padidinti, siekiant optimizuoti PRB fermentacijos sąlygas efektyviai kviečių baltymų degradacijai.

3.2.1. Kviečių terpės apdorojimo ultragarsu įtaka mikroorganizmų bioaktyvumui

Kviečių terpės apdorojimo ultragarsu (dažnis 37 kHz, temperatūra 35 °C) trukmės įtakos PRB proteolitiniam aktyvumui tyrimo rezultatai pateikti 3.4 paveiksle.



A



B

3.4 pav. *P. pentosaceus* LUHS22 (A) ir *L. brevis* LUHS140 (B) proteolitinio aktyvumo priklausomybė nuo fermentacijos trukmės, apdorojus kviečių terpę ir PRB 10, 20 ir 30 min ultragarsu. KK – kviečių terpė be apdoravimo ultragarsu, tik fermentacija PRB; M – neapdoroti pilno grūdo kvietiniai miltai

Tyrimas parodė, kad apdoravimo ultragarsu trukmė turėjo reikšmingos įtakos PRB proteolitiniam aktyvumui, kuris priklausė ir nuo fermentacijos trukmės. *P. pentosaceus* LUHS22 proteolitinio aktyvumas po 24 h fermentacijos, prieš tai mėginį paveikus 20 min ultragarsu, padidėjo 2,4 karto, lyginant su kontroliniu mėginiu (be apdoravimo ultragarsu) po 24 h fermentacijos, tačiau ilgesnis ultragarsu apdorojimas (30 min) šios PRB proteolitinio aktyvumo vertes mažino (padidėjimas, lyginant su ultragarsu neapdorotu mėginiu, 1,7 karto). Po 48 h fermentacijos *P. pentosaceus* LUHS22 aktyvumas ultragarsu apdorotuose 10, 20 ir 30 min mėginiuose padidėjo nežymiai, atitinkamai 5,7 %, 5,9 % ir 8,6 %, lyginant su ultragarsu neapdorotu mėginiu (3.4 A pav).

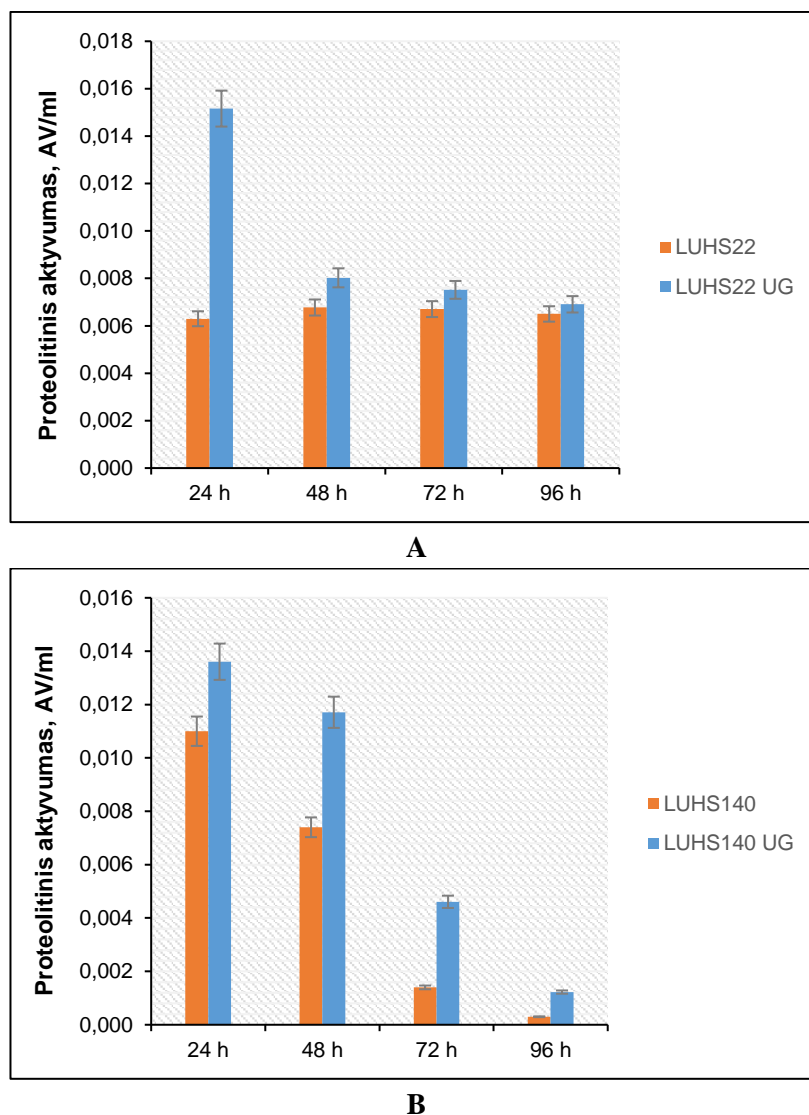
Iš gautų rezultatų matyti, kad *L. brevis* LUHS140 proteolitinio aktyvumas po 24 h fermentacijos, prieš tai mėginį paveikus 30 min ultragarsu, padidėjo 2 kartus, lyginant su kontroliniu mėginiu po 24 h fermentacijos (3.4 B pav). Nepaveiktuose ultragarsu mėginiuose po 48 h fermentacijos analizuojamų PRB proteolitinio aktyvumo vertės sumažėjo 31 %, lyginant su vertėmis po 24 h fermentacijos, kaip ir visuose kituose mėginiuose po 48 h, tačiau ultragarsu paveiktuose mėginiuose PRB proteolitinio aktyvumo nustatytos vertės ir po 48 h išlieka didesnės nei kontroliniuose mėginiuose – tai parodo, kad proteolitinio aktyvumas priklauso ir nuo PRB padermės (3.4 B pav).

Mokslinėje literatūroje rašoma, jog gram-teigiamų bakterijų, tokių kaip *Pediococcus pentosaceus* LUHS22 ir *Lactobacillus brevis* LUHS140, ląstelių sienelės yra atsparesnės ultragarso bangoms ir jų fermentų veiklą galima suaktyvinti, tačiau gram-neigiamų bakterijų ląstelės yra jautrios ir vyksta jų destrukcija [52]. Be to, Pitt ir Ross nustatė, kad mažo intensyvumo (<2 W/cm²) ir žemo dažnio ultragarsas (70 kHz) didina bakterinių ląstelių augimo greitį, lyginant su augimu be ultragarso [5].

Apibendrinant rezultatus galima daryti išvadą, kad ultragarso kompleksinis panaudojimas fermentacijos terpės ir mikroorganizmų apdorojimui reikšmingai padidina šių PRB proteolitinį aktyvumą, kuris ryškiausiai pasireiškė 24 h fermentacijos periodu. Parinkus mikroorganizmus ir apdoravimo ultragarsu sąlygas, galima sėkmingai padidinti visos mikrobinės fermentacijos efektyvumą.

3.2.2. Optimalių apdorojimo ultragarsu sąlygų įtaka mikroorganizmų bioaktyvumui

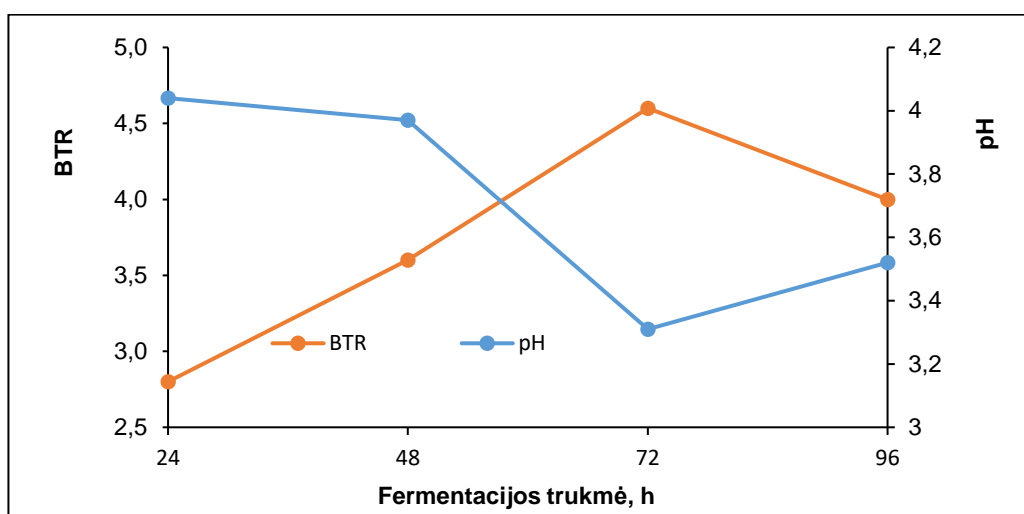
Atrinktų PRB proteolitinis aktyvumas, kultivuojant 96 h *P. pentosaceus* LUHS22 ir *L. brevis* LUHS140 po apdorojimo ultragarsu optimaliomis sąlygomis (atitinkamai 20 ir 30 min, 37 kHz, 35 °C), pateiktas 3.5 paveiksle.



3.5 pav. Apdorojimo ultragarsu įtaka *P. pentosaceus* LUHS22 (A) ir *L. brevis* LUHS140 (B) proteolitinio aktyvumo kitimui viso grūdo kvietinų miltų terpėje, fermentuojant 96 h

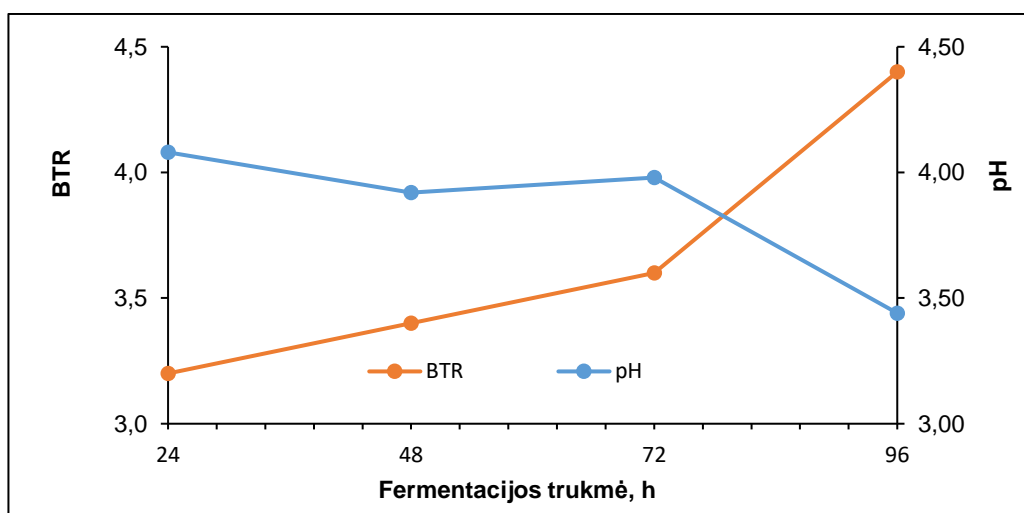
Iš gautų rezultatų matyti, kad mėginiuose su *P. pentosaceus* LUHS22, apdorotuose ultragarsu, nustatytas proteolitinis aktyvumas didesnis 6 – 59 % už nustatytą neapdorotuose ultragarsu mėginiuose visą 96 h fermentacijos laikotarpį. Po *P. pentosaceus* LUHS22 20 minučių apdorojimo ultragarsu ir 24 h fermentacijos, proteolitinis aktyvumas nustatytas didžiausias – 0,015 AV/ml (3.5 A pav). *L. brevis* LUHS140 mėginiuose, apdorotuose ultragarsu, nustatytas proteolitinis aktyvumas taip pat didesnis 19 – 75 % už nustatytą neapdorotuose ultragarsu mėginiuose visą 96 h fermentacijos laikotarpį. Po *L. brevis* LUHS140 30 min apdorojimo ultragarsu ir 24 h fermentacijos, proteolitinis aktyvumas nustatytas didžiausias – 0,014 AV/ml.

Rūgštingumo pokyčių, fermentuojant kviečių terpę *P. pentosaceus* LUHS22 ir *L. brevis* LUHS140 35 °C temperatūroje 5 paras po apdorojimo ultragarsu, rezultatai pateikti 3.6 ir 3.7 paveiksluose.



3.6 pav. Terpės pH ir BTR kitimo priklausomybė nuo fermentacijos trukmės. PRB: ultragarsu apdorota *P. pentosaceus* LUHS22

Analizuojant apdorojimo ultragarsu įtaką rūgščių susidarymui fermentacijos terpėje, nustatyta, kad rūgštys intensyviau kaupėse terpėje, apdorotoje ultragarsu. Gauti rezultatai parodė, kad paveiktos ultragarsu *P. pentosaceus* LUHS22 fermentuotos terpės pH vertė po 24 h nustatyta 10 % mažesnė nei ultragarsu neapdoroto mėginio (3.1 A pav), o terpės BTR nustatytas 2,8 °N, kurio vertė po 72 h padidėjo 39 % (iki 4,6 °N). Pastebėta, kad terpės rūgštingumas didėjo 72 h fermentacijos laikotarpiu, o ilgiau fermentuojant, rūgštingumas kito paklaidų ribose.



3.7 pav. Terpės pH ir BTR kitimo priklausomybė nuo fermentacijos trukmės. PRB: ultragarsu apdorota *L. brevis* LUHS140

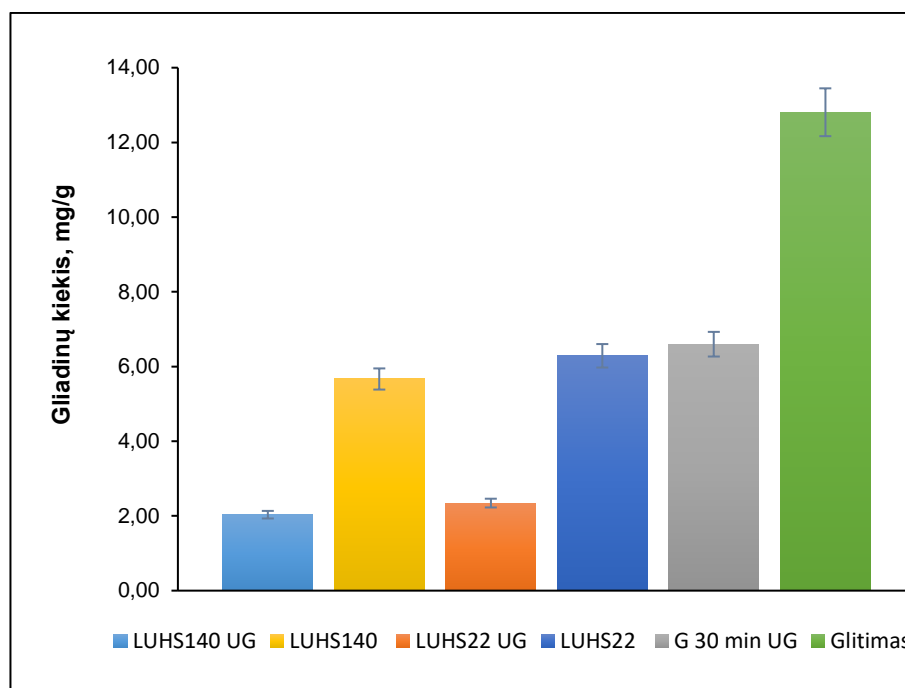
Analizuojant *L. brevis* LUHS140 fermentacijos terpę, nustatyta, kad terpės rūgštingumas didėjo visu fermentacijos laikotarpiu – pH sumažėjo 15,7 %, BTR padidėjo 38 %, lyginant su pradine verte, o po 72 h didėjo intensyviau – pH sumažėjo 14 %, o BTR vertės padidėjo 22,2 %. Po 24 h *L. brevis* LUHS140 fermentuotos terpės, apdorotos ultragarsu, pH vertė siekė 4,08, o BTR – 3,2 °N, kai tuo tarpu terpės be apdorojimo ultragarsu nustatyta pH vertė 5 % didesnė (3.1 A pav).

Pagal Komen ir kt. [73] tyrimų duomenis, patys kviečiai taip pat turi endogeninių proteolitinių fermentų, kurie suaktyvėja, esant pH 3,5 – 4. Tiriamajame darbe nustatytas kviečių proteolitinis aktyvumas siekė 0,0037 AV/ml (3.4 pav.). Todėl galime teigti, kad kompleksiškas biopriemonių panaudojimas, t. y. fermentacija bioaktyviomis PRB, jų fermentinio aktyvumo intensyvinimas ir terpės komponentų skaidymas, taikant ultragarso kavitaciją, gali įtakoti efektyvų kviečių glitimo gliadinų frakcijos suskaidymą

3.3. Apdorojimo ultragarsu ir fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis įtaka glitimo baltymų frakcijų suskaidymui

Šio etapo tikslas – įvertinti fermentacijos ir ultragarso įtaką glitimo baltymų frakcijų pokyčiams molekuliniam lygmenyje, taikant molekulinį sietų chromatografiją, NDS–PAGE ir kapiliarinę elektroforezę.

Glitimo gliadinų pokyčiai. Gliadinų kiekio, išekstrahuoto iš neapdoroto glitimo ir glitimo po apdorojimo ultragarsu ir/ar fermentacijos *P. pentosaceus* LUHS22 ir *L. brevis* LUHS140 padermėmis, tyrimo rezultatai pateikti 3.8 paveiksle.

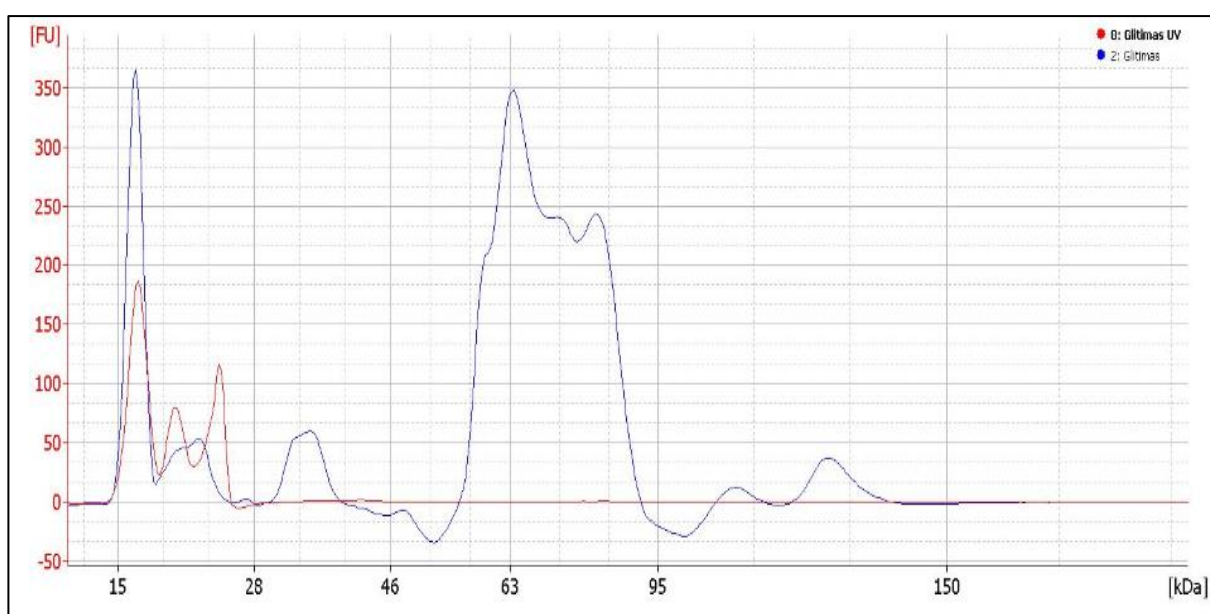


3.8 pav. PRB fermentacijos ir apdorojimo UG įtaka gliadinų kiekiui. LUHS140 – *L. Brevis*; LUHS22 – *P. Pentosaceus*; UG – ultragarsu apdorotas glitimo mėginys; G – glitimo mėginys

Tyrimai rodo, kad gliadinų kiekis, gautas iš gryno glitimo mėginių, paveiktų 30 min ultragarsu, sumažėjo 48 %, lyginant su neapdorotu glitimo mėginiu (12,81 mg/g) (3.8 pav). Pagal literatūros duomenis, glitimo baltymams ultragarsas esminių pokyčių nesukelia ir jis yra gana atsparus, tačiau ultragarsu galima pagerinti baltymų dispersiją ir jų sukibimą į agregatus [74,75]. Skirtumus gali įtakoti tai, kad mokslininkų tyrimuose buvo naudotas 24 kHz ultragarsas, o šiame tiriamajame darbe glitimas apdorotas didesnio dažnio (37 kHz) ir intensyvumo ultragarsu – tai ir galėjo turėti įtakos gliadinų hidrolizės laipsniui.

Gauti rezultatai rodo, kad mėginiai, kurie nebuvo apdoroti ultragarsu, bet fermentuoti, turėjo didesnę gliadinų kiekį (3.8 pav), kai tuo tarpu gliadinų kiekis, apdorojus glitimą ultragarsu ir 24h fermentacija *L. brevis* LUHS140, nustatytas dvigubai mažesnis nei ultragarsu neapdorotame mėginyje. Šio eksperimento metu nustatytas gliadinų kiekis po fermentacijos ir apdoravimo ultragarsu tiek *L. brevis*, tiek *P. pentosaceus* reikšmingai nesiskyrė, tačiau efektyviau gliadinus suskaidė *L. Brevis* LUHS140, nes nustatytas gliadinų kiekis 6,3 karto mažesnis nei kontroliniame mėginyje (glitimas be apdoravimo).

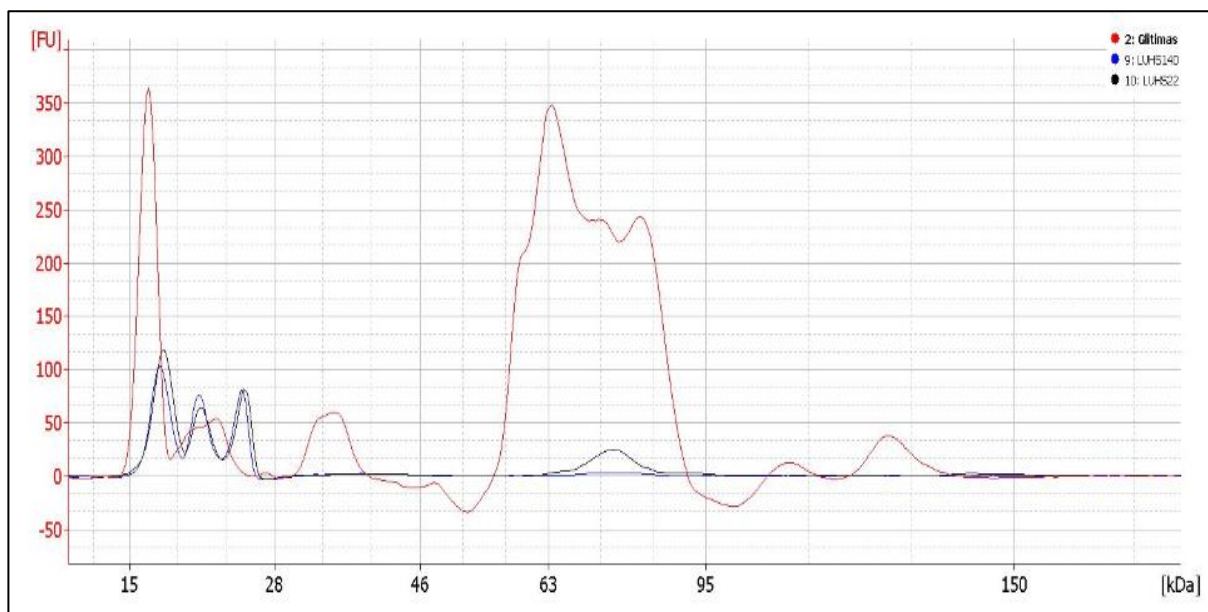
Toliau analizuotas gliadinų baltymų pasiskirstymas pagal molekulinę masę PRB fermentacijos ir ultragarso įtakoje. Apdoroto ultragarsu ir neapdoroto glitimo gliadinų elektroferograma pateikta 3.9 paveiksle. Iš gautos elektroferogramos matome, jog tiriant gryną gliadinų frakciją užregistruoti baltymų pikai, turintys 19, 24, 27, 32, 39, 50, 70, 83, 96, 101, 132 kDa molekulinės masės. Literatūroje teigiama, jog komponentai, kurie pasižymi celiakiniu aktyvumu, yra 31, 33, 35, 38, 40, 45, 50 kDa molekulinės masės gliadinų baltymai [28].



3.9 pav. Glitimo apdoravimo UG įtaka gliadinų molekulinėi sudėčiai. Raudona linija – glitimas, apdorotas ultragarsu; mėlyna linija – glitimas be apdoravimo ultragarso

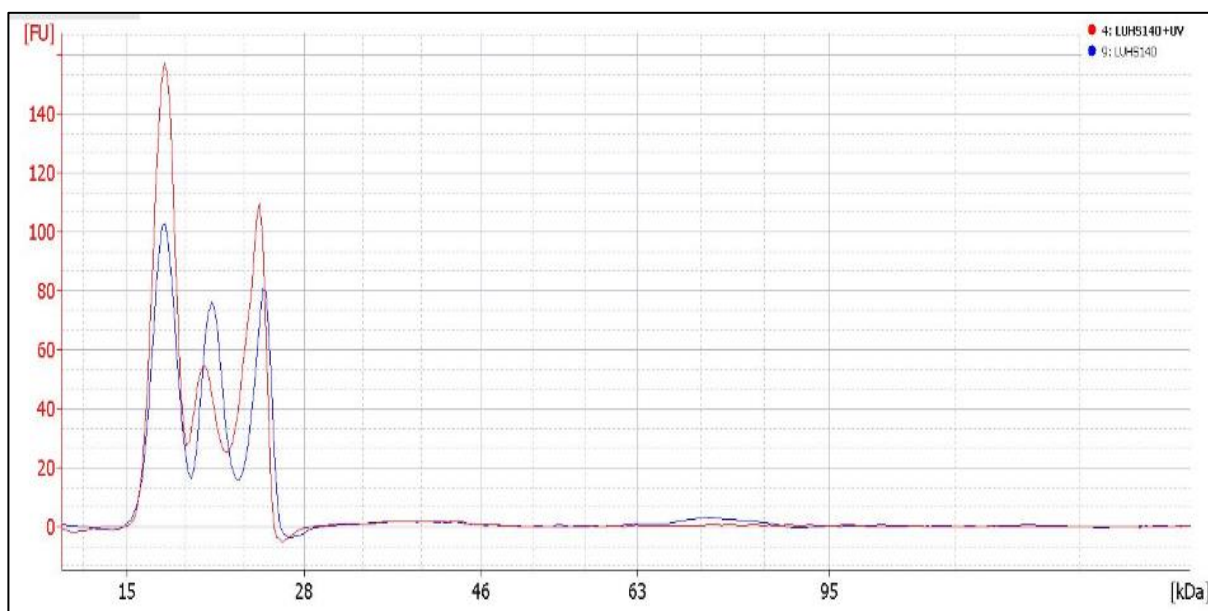
Analizuojant iš glitimo, apdoroto ultragarsu, išskirtų gliadinų elektroferogramą matome, jog apdorotoje frakcijoje nebėra didesnės molekulinės masės, t.y. 50, 70, 83, 96, 101, 132 kDa, gliadino molekulių. Yra likusios tik pavienės mažos – 17, 20, 25 kDa. Galima teigti, kad gryno glitimo apdoravimas 37 kHz dažnio ultragarsu efektyviai suskaido gliadinų frakciją.

Vertinant mikrobinės fermentacijos proteolitinį aktyvumą pasižyminčiomis PRB įtaką gliadinų suskaidymui (3.10 pav.), nustatyta, kad fermentuojant glitimą *L. brevis* LUHS140, glitimo gliadinų frakcija taip pat yra beveik hidrolizuojama.



3.10 pav. Glitimo apdorojimo PRB įtaka gliadinų molekulinei sudėčiai. Raudona linija – glitimas, be apdorojimo ultragarsu; mėlyna linija – glitimas, fermentuojant *L. brevis* LUHS140; juoda linija- glitimas, fermentuojant *P. pentosaceus* LUHS22

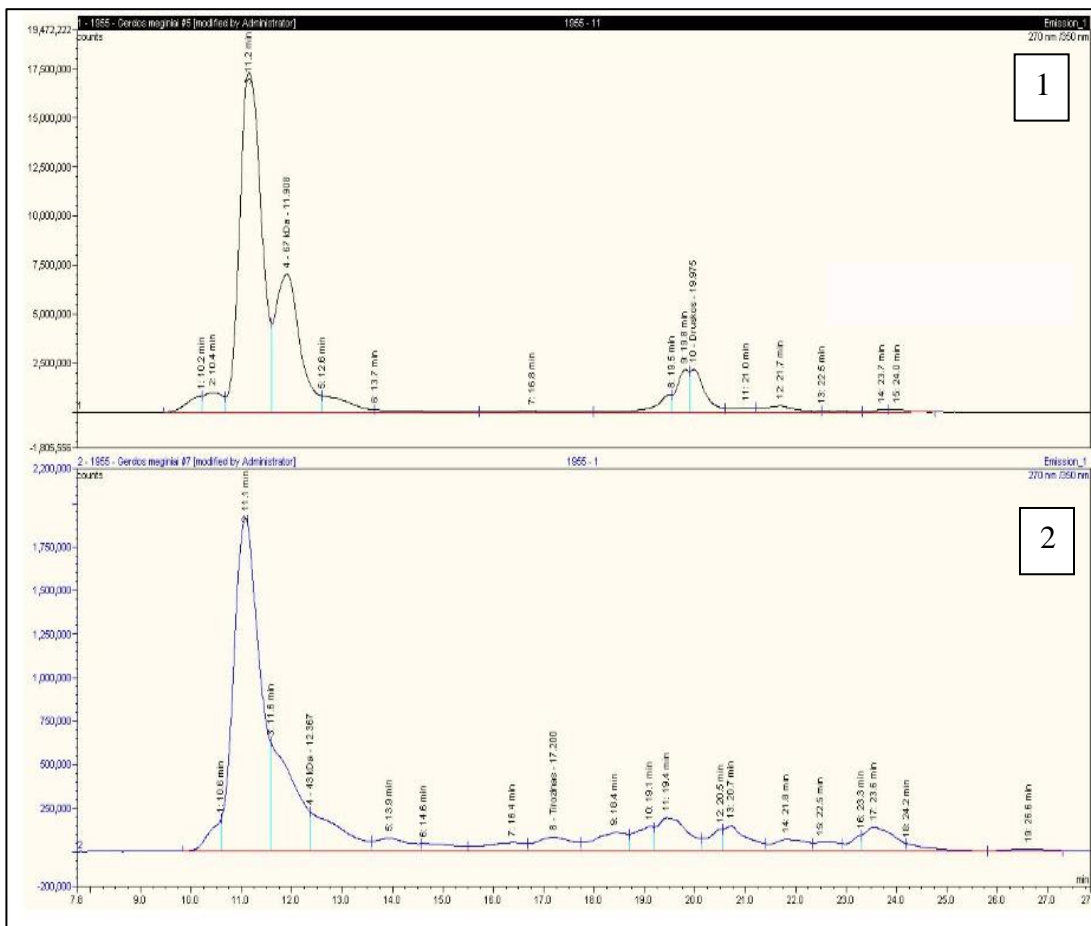
Iš gautos elektroferogramos matome, jog fermentuojant *L. brevis* LUHS140, glitimo gliadinų frakcija beveik visiškai suskyla – lieka tik 17, 21, 25 kDa molekulės ir nežymus pikas stebimas ties 76 kDa (3.11 pav.). Panašios molekulinės masės baltymai, t.y. 20 – 27 kDa, identifikuoti po 24 h fermentacijos *Lactobacillus* PRB Zotta ir kt. [76] tyrimuose.



3.11 pav. Glitimo apdorojimo PRB ir UG įtaka gliadinų molekulinei sudėčiai. Raudona linija – glitimas, paveiktas ultragarsu ir *L. brevis* LUHS140; mėlyna linija- glitimas, fermentuojant *L. brevis* LUHS140

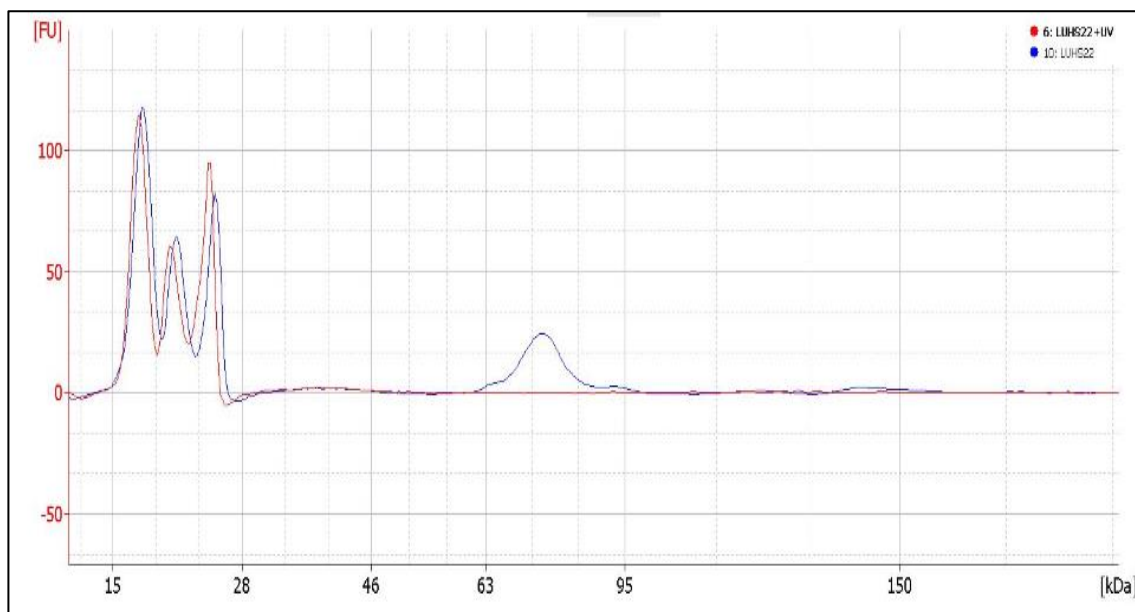
Elektroferograma parodė, jog glitimą apdorojus ne tik *L. brevis* LUHS140, bet ir ultragarsu, yra visiškai suskaidomos didesnės molekulinės masės baltymai – šiuo atveju 76 kDa. Taip pat po ultragarso apdorojimo daugiau molekulių lieka smulkesnių, t. y. po 18 kDa ir 24 kDa ir šiek tiek mažiau po 20 kDa, tačiau jos nėra sukeliančios celiakiją. Šiuos rezultatus patvirtina ir

chromatografinė analizė, kurioje aiškiai matosi, kad kontrolės baltymai (gliadinai) yra sulaikomi kietosios fazės porose žymiai trumpesni laiką ir molekulės yra didelės, o tuo tarpu apdorojus *L. brevis* LUHS140 ir ultragarsu – mažesnės ir užlaikymo trukmė kolonėlėje didesnė. Be to, ir molekulių išėjimas iš kolonėlės dažnesnis dėl didesnio molekulių pasiskirstymo pagal molekulinę masę (3.12 pav.).



3.12 pav. Glitimo, apdoroto ultragarsu ir PRB fermentacija, gliadinų frakcijos chromatograma. 1 – neapdoroto glitimo gliadinai; 2 – apdoroto ultragarsu ir *L. brevis* LUHS140 glitimo gliadinai

Panašios tendencijos stebimos *P. pentosaceus* LUHS22. Iš gautos elektroferogramos matome (3.10 pav), kad fermentuojant glitimą su *P. pentosaceus* LUHS22, glitimo gliadinų frakcija beveik visiškai suskyla, t.y. lieka tik 18 – 26 kDa molekulės ir vienas pikas stebimas ties 75 kDa (3.13 pav.).



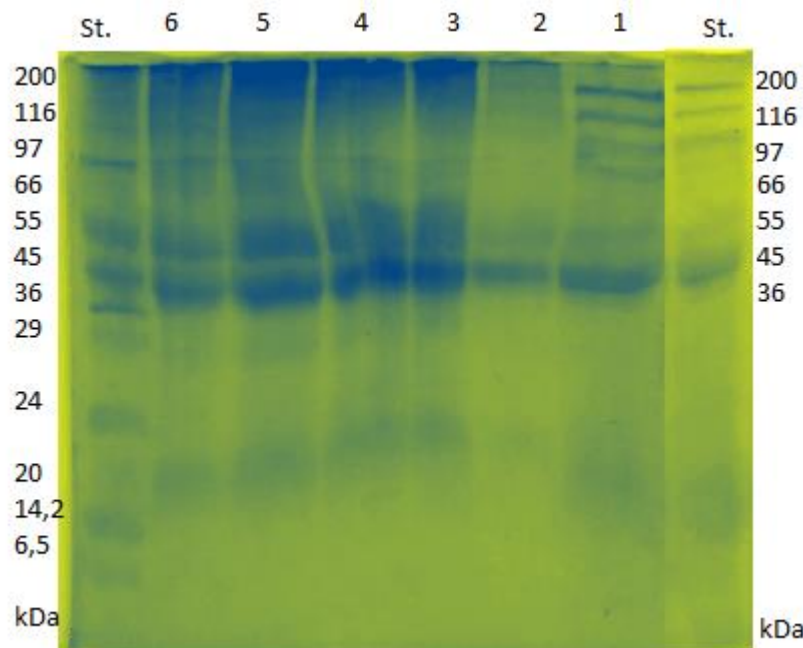
3.13 pav. Glitimo apdoravimo PRB ir UG įtaka gliadinų molekulinėi sudėčiai. Raudona linija – glitimas, paveiktas ultragarsu ir *P. pentosaceus* LUHS22. mėlyna linija – glitimas, fermentuojant *P. pentosaceus* LUHS22

Iš gautų rezultatų matyti, kad po ultragarso ir *P. pentosaceus* LUHS22 apdoravimo yra visiškai hidrolizuojami glitimo gliadinų baltymai. Mažesnės molekulinės masės baltymai išliko panašūs kaip ir prieš apdorojimą ultragarsu.

Apibendrinant tyrimų rezultatus, galime teigti, jog ultragarso ir proteolitinio aktyvumu pasižyminčių mikroorganizmų, tokių kaip *L. brevis* LUHS140 ir *P. pentosaceus* LUHS22, įtakoje yra suhidrolizuojami gliadinų baltymai į mažesnius peptidus, kurių masė svyruoja tarp 17 – 26 kDa. Tačiau šios masės baltymai nėra priskiriami gliadinų baltymams (1.1 lentelė).

Glitimo gliuteninų pokyčiai. Literatūroje rašoma, kad po 24 h fermentacijos *Lactobacillus* PRB, didelės molekulinės masės gliuteninai, kurie sudaro gliutenino makropolimero pagrindą, suskyla į mažesnius subvienetus suardydami glitimo tinklą ir taip padidindami visų glitimo baltymų tirpumą [27]. Dvořáček ir kt. [77] eksperimentų metu nustatė, kad gliuteninams būdingos tipiškos elektroferogramos smailės priskirtos tokiems molekulinės masės baltymams: 44, 45, 57, 100, 106 ir 112 kDa.

Glitimo gliuteninų pokyčiai po ultragarso ir fermentacijos PRB vertinti, taikant NDS – PAGE (3.14 pav.).



3.14 pav. Gliuteninų elektroforetiniai geliai (NDS – PAGE 12 % gelyje). Mėginiai: 1 – *L. brevis* LUHS140, UG 30 min; 2 – *P. pentosaceus* LUHS22, UG 20 min; 3 – glitimas UG 30 min; 4 – *L. brevis* LUHS140 be UG; 5 – *P. pentosaceus* LUHS22 be UG; 6 – kontrolė, t. y. neapdorotas glitimas

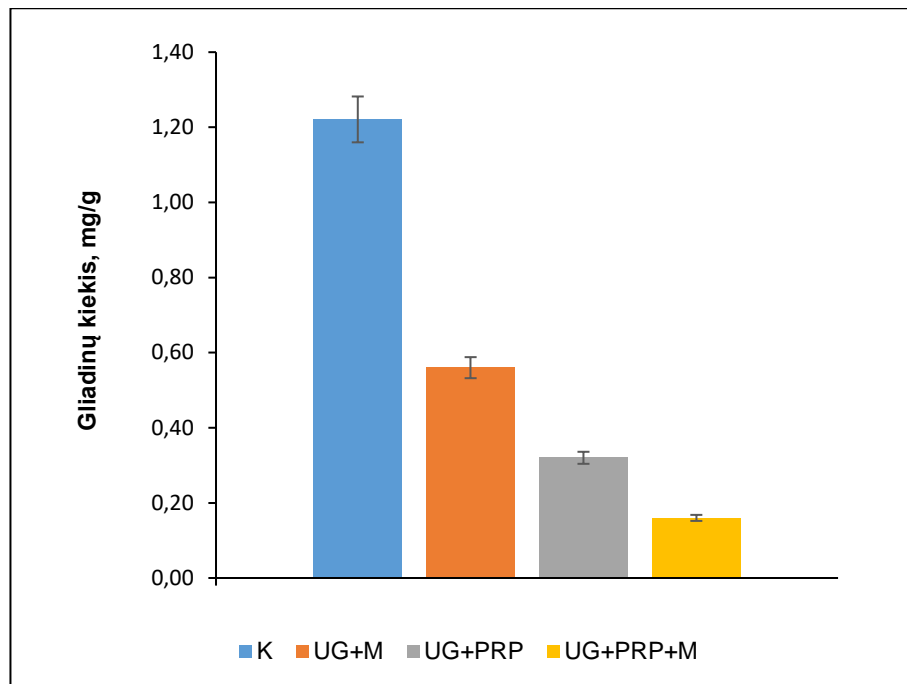
Iš elektroforetinio gelio matyti, kad mėginyje po fermentacijos *P. pentosaceus* LUHS22 baltymų pokyčių nepastebėta, kai tuo tarpu papildomai apdorojus ultragarsu, didesnės molekulinės masės gliuteninai buvo suskaidyti, liko tik 45 kDa komponentas. Mėginyje su *L. brevis* LUHS140, apdorotame ultragarsu, nustatyti didesnės molekulinės masės (106, 56 kDa) gliuteninai, lyginant su *P. pentosaceus* LUHS22 analogišku mėginiu.

Elektroforezės rezultatai rodo, kad, priešingai nei gliadinai, gliuteninai nebuvo taip stipriai paveikti taikomų priemonių, lyginant visus mėginius su kontrole. Literatūroje rašoma, kad fermentuojant pienarūgštėmis bakterijomis, gliuteninų frakcija nėra visiškai suhidrolizuojama ir gliuteninų lieka ne mažiau 20 %, kas yra labai svarbu duonos kokybės kontrolėje, kadangi gliuteninai yra atsakingi už tešlos elastingumą [41]. Jei visi glitimo baltymai būtų pašalinami iš miltų, tai tešlos struktūros pagrindo (karkaso) nebeliktų, todėl labai svarbu yra išlaikyti tinkamą santykį tarp glitimo baltymų. Dėl šios priežasties tolimesniuose tyrimuose pasirinkta *L. brevis* LUHS140 padermė.

3.4. Apdoravimo ultragarsu ir fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis įtaka viso grūdo kvietinių miltų glitimo baltymų frakcijų suskaidymui

Šiame etape vertintos ultragarso ir fermentacijos *L. brevis* LUHS140 panaudojimo galimybės glitimo baltymų degradacijai rauguose iš viso grūdo kvietinių miltų, perspektyvoje panaudoti šiuos pusgaminius kepinių be glitimo ar su sumažintu glitimo kiekiu gamybai.

Viso grūdo kvietinių miltų glitimo gliadinų pokyčiai. Viso grūdo kvietiniai (VGK) miltai apdoroti ultragarsu ir fermentuoti atrinktomis PRB, taikant optimalias sąlygas, ir panaudojant mieles *Saccharomyces cerevisiae*. Kaip kontrolinis mėginys tirti neapdoroti viso grūdo kvietiniai miltai. Įvairių apdoravimo būdų įtakos kvietinių miltų gliadinų kiekiui tyrimo rezultatai pateikti 3.15 paveiksle.

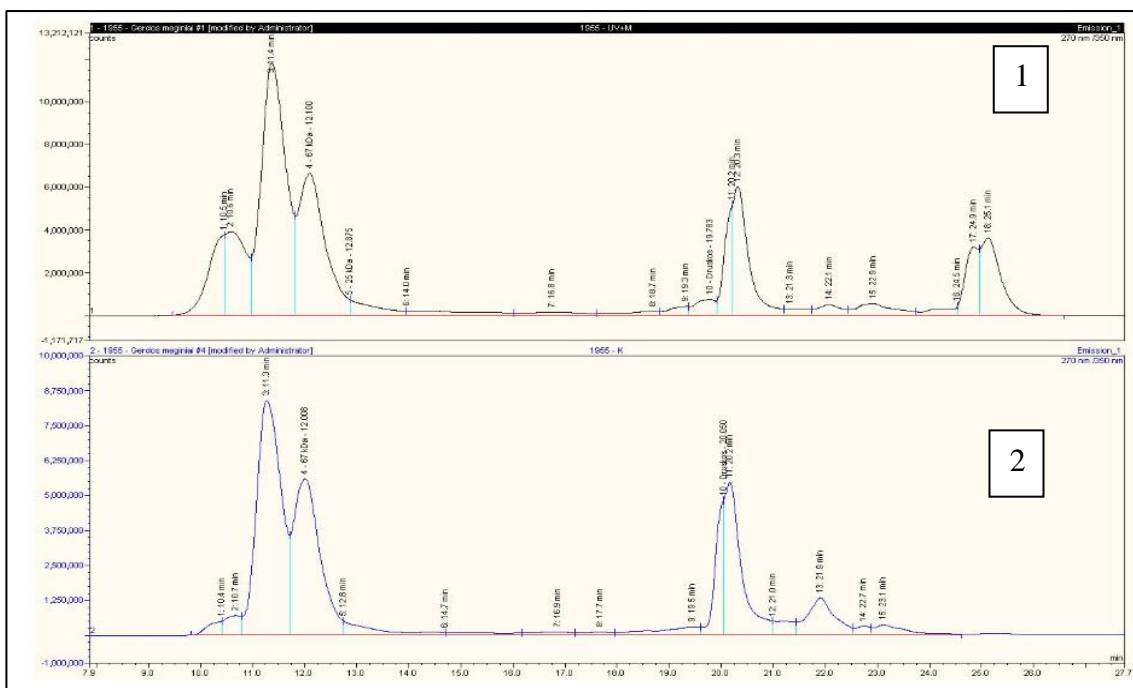


3.15 pav. VGK miltų apdorojimo UG ir PRB fermentacijos įtaka gliadinų kiekiui. K – kontrolė (neapdoroti pilno grūdo kvietiniai miltai); UG+M – apdoroti UG ir mielėmis; UG+PRP – apdoroti UG ir *L. brevis* LUHS140; UG+PRP+M – apdoroti UG, *L. brevis* LUHS140 ir mielėmis

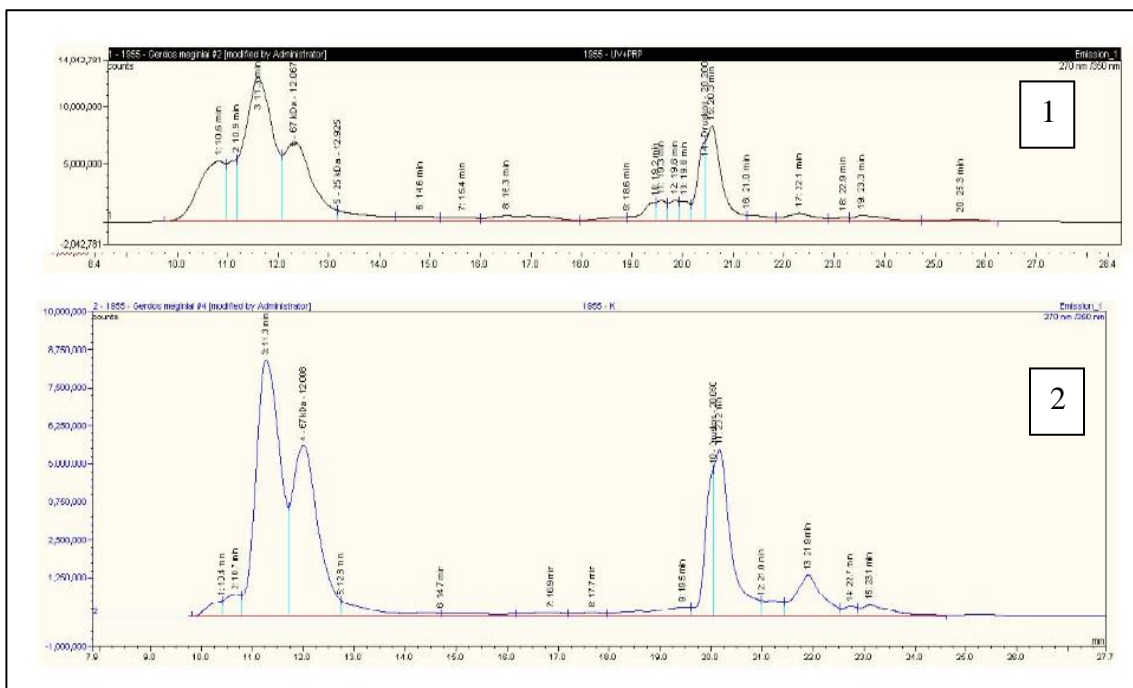
Tyrimo metu nustatyta, kad visos taikytos priemonės reikšmingai mažino gliadinų išeią. Kompleksinis ultragarso ir PRB fermentacijos taikymas sumažino gliadinų kiekį 3,8 karto, lyginant su kontroliniu mėginiu (1,22 mg/g) (3.15 pav.). Kompleksinis ultragarso, PRB ir *S. cerevisiae* mielių taikymas papildomai gliadinų kiekį sumažino dar 50 % (iki 0,16 mg/g).

Rizzello ir kt. [41] atliktas tyrimas parodė, kad *Lactobacilli* bakterijų komplekso (*L. alimentarius* 15 M, *L. brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A, and *L. hilgardii* 51B, *L. Sanfranciscensis* LS3, LS10, LS19, LS23, LS38 ir LS47) ir kepimo mielių panaudojimas gali sumažinti glitimo kiekį miltuose net iki 12 mg/kg, fermentuojant 48 h. Mikroorganizmai darbe atrinkti pagal peptidazių sistemas, gebančias hidrolizuoti peptidus, turinčius daug prolino. Šiame tiriamajame darbe gautos gliadinų išeiagos yra didesnės, tačiau tai galėjo lemti ir eksperimentų paklaidos.

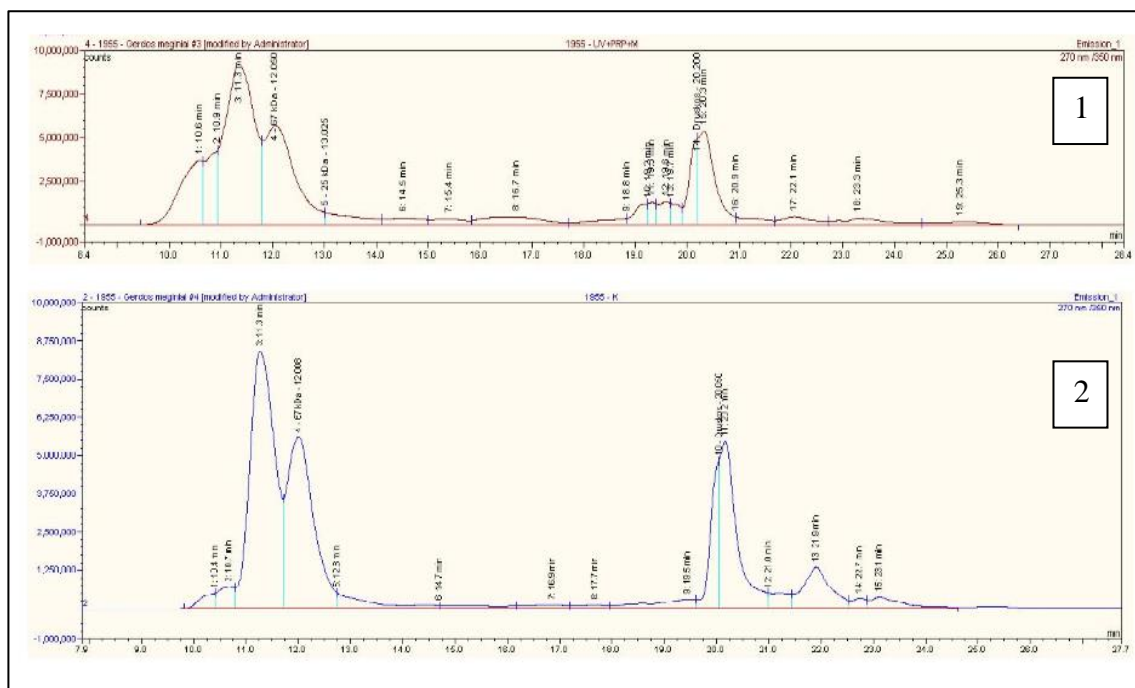
Iš ultragarso ir PRB apdorotų pilno grūdo kvietinių miltų mėginių išekstrahuoti gliadinų frakcijos baltymai analizuoti molekulinį sietų chromatografu, siekiant identifikuoti frakciją sudarančių komponentų pokyčius. Rezultatai pateikti 3.16–3.18 paveiksluose.



3.16 pav. Neapdorotų ir apdorotų pilno grūdo kvietinių miltų glitimo gliadinų chromatograma. 1 – pilno grūdo kvietiniai miltai, apdoroti ultragarsu ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*; 2 – gliadinų frakcija, išskirta iš neapdorotų pilno grūdo kvietinių miltų



3.17 pav. Neapdorotų ir apdorotų pilno grūdo kvietinių miltų glitimo gliadinų chromatograma. 1 – pilno grūdo kvietiniai miltai, apdoroti *L. brevis* LUHS140 ir ultragarsu; 2 – gliadinų frakcija, išskirta iš neapdorotų pilno grūdo kvietinių miltų

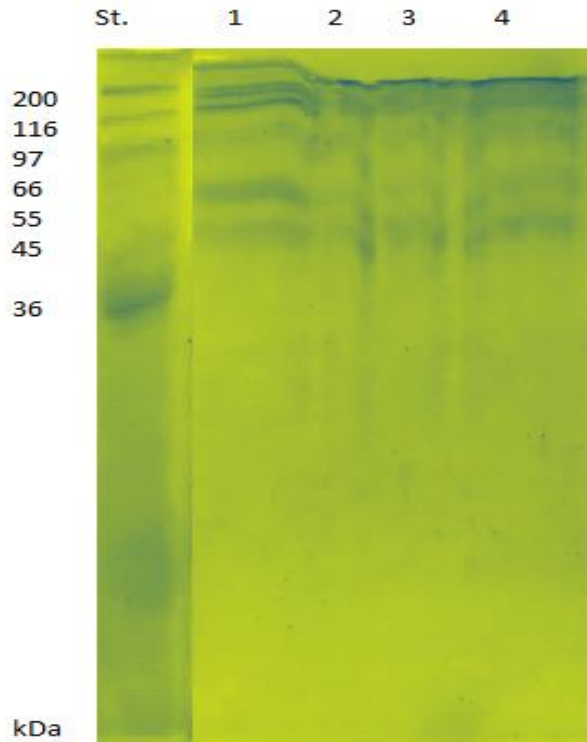


3.18 pav. Neapdorotų ir apdorotų pilno grūdo kvietinių miltų glitimo gliadinų chromatograma. 1 – pilno grūdo kvietiniai miltai, apdoroti *L. brevis* LUHS140, ultragarsu ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*; 2 – gliadinų frakcija, išskirta iš neapdorotų pilno grūdo kvietinių miltų

Kadangi molekulinė chromatografija yra skirta kokybinei, o ne kiekybinei analizei, todėl negalime identifikuoti molekulinė masių, tačiau, remiantis tyrimų rezultatais, matome, kad baltymų užlaikymo trukmė ilgiausia ir baltymų pasiskirstymas pagal molekulinę masę didžiausias yra mėginyje su *L. brevis* LUHS140, ultragarsu ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae* (3.18 pav.) bei *L. brevis* LUHS140 ir ultragarsu (3.17 pav.). Be to, šiuose mėginiuose nustatytas gliadinų kiekis ir buvo mažiausias (3.15 pav.).

Rezultatai rodo, kad, taikant biotechnologines priemones ir ultragarsą, nepavyko visiškai suskaidyti didelės molekulinės masės baltymų (ties 11 min nustatyti visuose mėginiuose), tačiau detektorius galėjo identifikuoti didelės molekulinės masės baltymus kaip ląstelių nuolaužas ar priemaišas, kurios išsiekstrahavo kartu su gliadinų frakcija, kadangi ekstrahuojant iš gryno glitimo, paveikto *L. brevis* LUHS140 ir ultragarsu, nebuvo aptikta didelės molekulinės masės baltymų liekanų ir visa glitimo frakcija buvo hidrolizuota (3.11 pav.). Įtakos rezultatų netikslumams galėjo turėti mažos išekstrahuotų gliadinų koncentracijos, todėl frakcijos baltymų akivaizdžių pokyčių ir nepavyko užfiksuoti.

Viso grūdo kvietinių miltų glitimo gliuteninų pokyčiai. Iš viso grūdo kvietinių miltų mėginių išekstrahuoti gliuteninų frakcijos baltymai analizuoti NDS – PAGE, o tyrimo rezultatai pateikti 3.19 paveiksle.



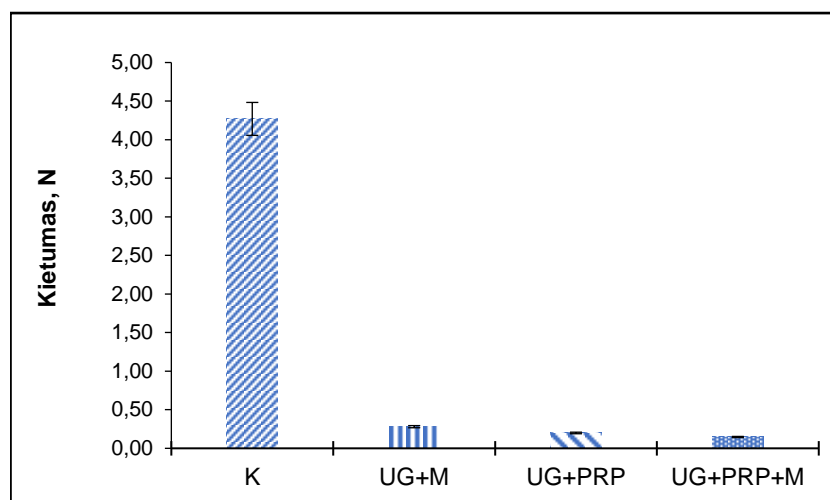
3.19 pav. Gliuteninų elektroforetiniai geliai (NDS – PAGE 12 % gelyje). Mėginiai: 1 – gliuteninų frakcija, išskirta iš neapdorotų pilno grūdo kvietinių miltų; 2 – apdorojimas UG ir mielės *S. cerevisiae*; 3 – apdorojimas *L. brevis* LUHS140 ir UG; 4 – apdorojimas *L. brevis* LUHS140, UG ir mielės *S. cerevisiae*

Tyrimo metu gauti analogiški rezultatai, kaip ir analizuojant gryno glitimo gliuteninų baltymus (3.14 pav.). Pilno grūdo kvietinių miltų gliuteninų frakcijos hidrolizė taip stipriai nevyksta, lyginant su gliadinų frakcija. Iš gauto elektroforetinio gelio matyti, kad po kvietinių miltų hidrolizės visuose mėginiuose lieka didesnės molekulinės masės baltymai, tačiau gautos linijos neryškios dėl galimai mažos gliuteninų koncentracijos mėginiuose.

3.5. Biotechnologinių priemonių ir ultragarso įtaka tešlos tekstūros savybėms

Šiame etape analizuoti tešlos tekstūros pokyčiai, apdorojant pilno grūdo kvietinius miltus: 1) ultragarsu ir fermentacija mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*; 2) ultragarsu ir fermentacija *L. brevis* LUHS140; 3) ultragarsu, *L. brevis* LUHS140 ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*. Kaip kontrolinis mėginys tirta neapdorotų pilno grūdo kvietinių miltų tešla.

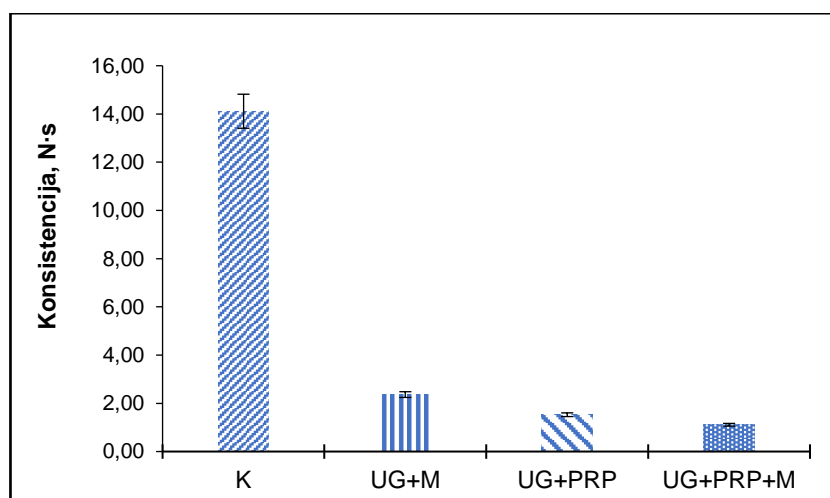
Fermentacijos PRB ir mielėmis metu susidaro įvairios aminorūgštys, tokios kaip fenilalaninas, leucinas ar cisteinas, kurios kepiniams suteikia ypatingas savybes – skonį ir aromatą [78]. Taip pat labai svarbios yra ir tešlos reologinės savybės, nuo kurių priklauso tešlos kokybė. Biotechnologinių priemonių ir apdorojimo ultragarsu įtakos tešlos tekstūrai tyrimo rezultatai pateikti 3.20 – 3.24 pav.



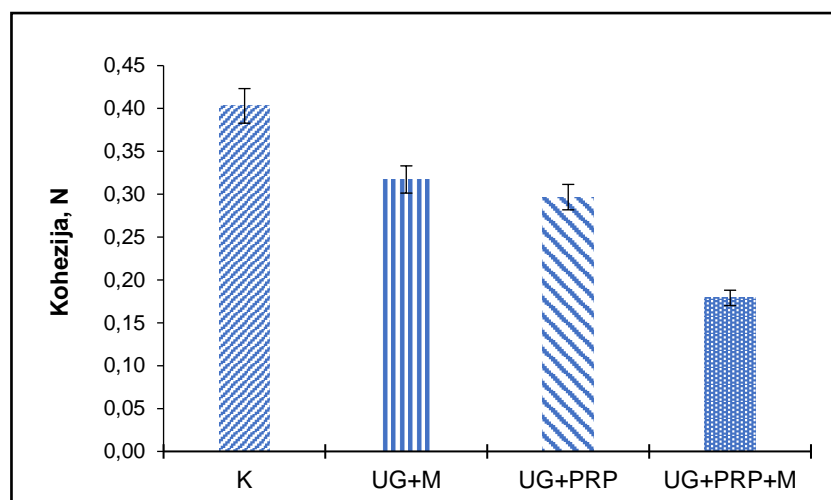
3.20 pav. Biopriemonių ir UG įtaka tešlos kietumui. K – kontrolė (neapdoroti pilno grūdo kvietiniai miltai); UG+M – apdorojimas ultragarsu ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*; UG+PRP – apdorojimas ultragarsu ir *L. brevis* LUHS140; UG+PRP+M – apdorojimas ultragarsu, *L. brevis* LUHS140 ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*

Iš gautų rezultatų matyti, kad didžiausiu kietumu, t. y. 4,27 N, pasižymėjo kontrolinė tešla iš pilno grūdo kvietinių miltų. Apdoroti įvairiomis sąlygomis mėginiai po 24 h fermentacijos buvo kur kas minkštesni, atitinkamai sumažėjo 15 ir daugiau kartų, lyginant su kontrole. Mažiausias kietumas (0,15 N) nustatytas mėginyje, apdorotame ultragarsu, *L. brevis* LUHS140 ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*, o tai ir parodo aukštą hidrolizės laipsnį, kadangi suyra peptidinės jungtys ir tešla labai suskystėja.

Apdorojus mėginius ultragarsu, PRB ir mielėmis, konsistencijos vertė nustatyta 13 kartų mažesnė nei kontrolyje, o apdorojus ultragarsu ir PRB vertė sumažėjo 9 kartais. Didžiausia konsistencijos vertė nustatyta kontroliniame mėginyje (14,11 N·S), o mažiausia konsistencijos vertė (1,11 N·S) pasižymėjo tešlos mėginys, apdorotas ultragarsu, *L. brevis* LUHS140 ir mielėmis.

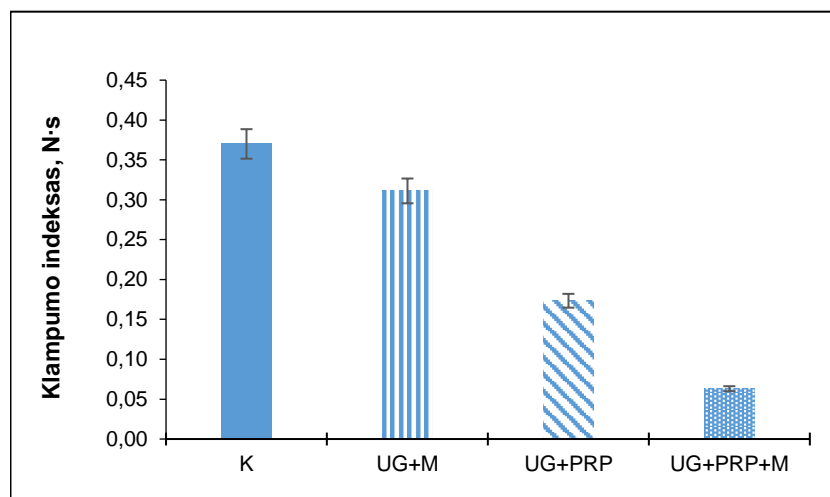


3.21 pav. Biopriemonių ir UG įtaka tešlos konsistencijai. K – kontrolė (neapdoroti pilno grūdo kvietiniai miltai); UG+M – apdorojimas ultragarsu ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*; UG+PRP – apdorojimas ultragarsu ir *L. brevis* LUHS140; UG+PRP+M – apdorojimas ultragarsu, *L. brevis* LUHS140 ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*



3.22 pav. Biopriemonių ir UG įtaka teslos kohezijai. K – kontrolė (neapdoroti pilno grūdo kvietiniai miltai); UG+M – apdorojimas ultragarsu ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*; UG+PRP – apdorojimas ultragarsu ir *L. brevis* LUHS140; UG+PRP+M – apdorojimas ultragarsu, *L. brevis* LUHS140 ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*

Analizuojant mėginių kohezijos ir klampos indekso vertes, nustatyta, kad mažiausiai šiuos rodiklius įtakojo apdorojimas UG ir mielėmis, lyginant su kontroliniu mėginiu. Kompleksinių priemonių taikymas reikšmingai sumažino teslos koheziją (iki 2,2 karto) (3.23 pav.) ir klampumą (iki 6 kartų) (3.24 pav.). Mažiausios šių parametų vertės 0,18 N ir 0,063 N-s nustatytos tesloje, apdorotoje ultragarsu, *L. brevis* LUHS140 ir mielėmis.



3.23 pav. Biopriemonių ir UG įtaka teslos klampumui. K – kontrolė (neapdoroti pilno grūdo kvietiniai miltai); UG+M – apdorojimas ultragarsu ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*; UG+PRP – apdorojimas ultragarsu ir *L. brevis* LUHS140; UG+PRP+M – apdorojimas ultragarsu, *L. brevis* LUHS140 ir mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*

Įvertinus gautus rezultatus, galima daryti išvadą, kad taikant kompleksines priemones glitimo baltymų detoksikacijai pilno grūdo kvietinių miltų produktuose, t.y. apdorojimą ultragarsu ir 24 h fermentaciją proteolitinėmis *L. brevis* LUHS140 pienarūgštėmis bakterijomis ir *S. cerevisiae* mielėmis, gaunamas silpnos konsistencijos mažai klampus fermentuotas produktas. Kita vertus,

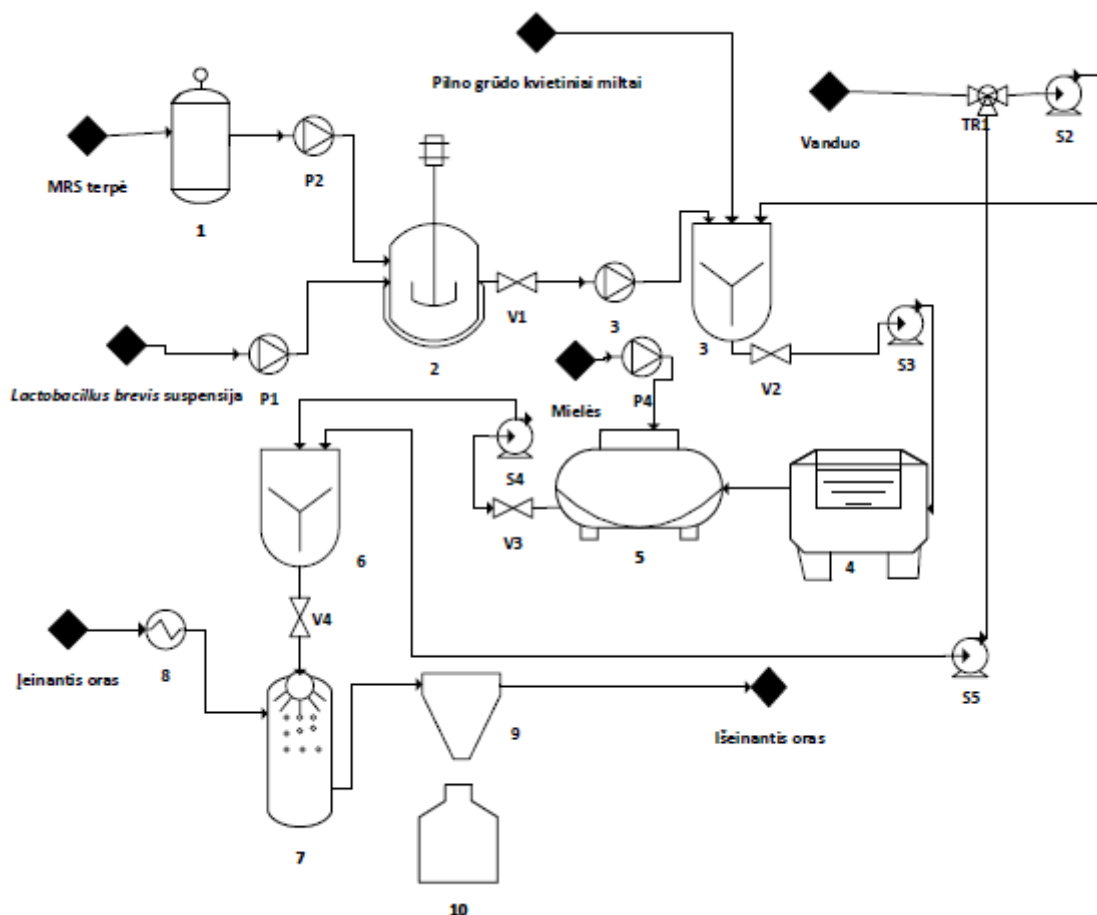
taikant šias biopriemones ir apdorojimą ultragarsu, glitimo kiekį tokiaame kviečių produkte galima sumažinti iki 0,16 mg/g, kaip ir reglamentuojama produktams su sumažintu glitimo kiekiu. Šio produkto, turtingo įvairiais bioaktyviais komponentais, iki 30 % priedas gali būti panaudotas be glitimo ar su sumažintu glitimo kiekiu kepinių iš sorų, kukurūzų, ryžių, grikių ar avižų miltų gamybai [79]. Be to, po apdorojimo ultragarsu ir PRB fermentacijos, gautas pilno grūdo kvietinių miltų raugas (skystas) taip pat gali būti panaudotas duonos gamyboje, ruošiant tešlą su mielėmis *Saccharomyces cerevisiae* ir miltų be glitimo, naudojant struktūrizavimo agentą, pavyzdžiui, ksantano gumą (maisto priedas E415), kuri yra natūralus polisacharidas, susidarantis fermentacijos metu iš cukrų ir melasos, naudojant *Xanthomonas campestris* bakterijas. Tyrimais nustatyta, jog 3 % ksantano ir guaro (maisto priedas E412) gumų mišinys (santykis 1:1) pagerina ne tik tokių produktų konsistenciją, bet ir ilgiau išlaiko produktą šviežią (iki 72 h) [80].

Rekomendacijų dalis

Viso grūdo kviečių miltų produkto, pagaminto taikant apdorojimą ultragarsu ir fermentaciją proteolitinėmis PRB, stabilizavimui ir galiojimo laiko prailginimui gali būti naudojamas džiovinamas purkštuvinėje džiovykloje, taip gaunant sausą miltelių pavidalo produktą, kuris gali būti naudojamas kaip raugas kepinių be glitimo ar su sumažintu glitimo kiekiu gamybai. Naujausioje mokslinėje literatūroje teigiama, kad toks raugas ir po 6 mėnesių laikymo sandarioje plastikinėje pakuotėje išlieka stabilus (drėgmės kiekis < 7,5 %) bei nepraradęs ląstelių aktyvumo, lyginant su raugais, kurie buvo liofilizuoti vakuumė $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje [81]. Be to, literatūroje pateiktos raugų rekomenduojamos išpurškimo sąlygos yra: įeinančio oro temperatūra – $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, išeinančio oro temperatūra – $54\text{ }^{\circ}\text{C}$, suspensijos srauto tėkmės greitis – 8 ml/min [81].

Tokiu būdu gauto sauso raugo mikroorganizmų ląstelės prieš naudojimą yra tik atgaivintos fiziologiniame tirpale (NaCl) su priedais, tokiais kaip viso grūdo kvietiniai miltai ir pienas, tirpinant maišyklėje 1 h $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, kol gaunama suspensija.

Sauso raugo su sumažintu glitimo kiekiu gamybos principinė aparatinė schema pateikta 1 paveiksle.



4.1 pav. Raugo su sumažintu glitimo kiekiu principinė aparatinė gamybos schema

Aparatūra:

1 – autoklavas; 2 – fermentatorius; 3 ir 6 – maišyklės; 4 – ultragarso vonia; 5 – raugo talpykla; 8 – šildytuvas; S2–S5 – išcentriniai siurbliai; P1–P4 – peristaltiniai siurbliai; V1–V4 – dviejų kelių vožtuvai; TR1 – trijų kelių vožtuvas; purkštuvinė džiovykla; 7 – išpurškimo kamera; 9 – ciklonas; 10 – miltelių surinkimo talpykla.

Mitybinė terpė (MRS) yra sterilizuojama autoklave (1) 121 °C 20 min. Iš autoklavo peristaltiniu siurbliu (P2) terpė patenka į fermentatorių (2), į kurį taip pat atiteka *Lactobacillus brevis* bakterijų suspensija (LBB). Fermentatoriuje bakterijos auginamos 35 °C temperatūroje 48 h. Iš fermentatoriaus išleidžiama 2 g/100g bakterijų suspensijos į maišyklę (3), į kurią taip pat yra tiekiamas švarus vandentiekio vanduo ir viso grūdo kvietiniai miltai (santykiu 2:1). Maišyklėje masė sumaišoma, palaikant 35 °C temperatūrą. Iš maišyklės išleistas LBB–miltų mišinys išcentrinio siurbliu tiekiamas į ultragarso vonią (4), kurioje masė apdorojama 37 kHz dažnio ultragarsu 30 min, palaikant 35 °C temperatūrą. Po apdorojimo ultragarsu masė perkeliama į raugo tanką (5), į kurį taip pat peristaltiniu siurbliu atiteka 2 g/100g *Saccharomyces cerevisiae* mielių suspensija, ir mišinys fermentuojamas 24 h 35 °C temperatūroje. Po fermentacijos, gautas raugas tiekiamas į maišyklę (6), kurioje su švariu vandentiekio vandeniu yra sumaišomas santykiu 1:5. Gauta suspensija tiekama į purkštuvinės džiovyklos išpurškimo kamerą (7), kurioje iš šono yra paduodamas karštas oras (pakaitintas šildytuvo (8) iki 130 °C), kurio pagalba skystis yra išgarinamas. Garai tos pačios oro srovės yra išnešami iš kameros kartu su kietosiomis dalelėmis. Kameros išėjimo angoje įtaisytas vamzdis, kuriuo dalelės patenka į cikloną (9). Ciklone yra atskiriamos kietosios dalelės ir gauti milteliai surenkami į talpyklą. Vėliau raugo milteliai fasuojami į polietileningus sandarius maišelius ir laikomi 4 ° temperatūroje.

Išvados

1. Nustatyta, kad iš visų dešimties tirtų pieno rūgšties bakterijų didžiausiu pilno grūdo kvietinių miltų terpėje proteolitininiu aktyvumu pasižymėjo *Pediococcus pentosaceus* LUHS22 (0,007 AV/ml) po 48 h fermentacijos ir *Lactobacillus brevis* LUHS140 (0,011 AV/ml) po 24 h fermentacijos.
2. Apdorojimo ultragarsu trukmė turėjo reikšmingos įtakos pieno rūgšties bakterijų proteolitiniam aktyvumui ir fermentacijos trukmei, priklausomai nuo pieno rūgšties bakterijų padermės. *Pediococcus pentosaceus* LUHS22, paveikus 20 min 37 kHz dažnio bei 70 W galios ultragarsu ir po 24 h fermentacijos, proteolitininis aktyvumas padidėjo 2,4 karto, o *Lactobacillus brevis* LUHS140, paveikus 30 min 37 kHz dažnio bei 70 W galios ultragarsu ir po 24 h fermentacijos, proteolitininis aktyvumas padidėjo 2 kartus, lyginant su mėginiais be apdorojimo ultragarsu. Apdorojimas ultragarsu nustatytomis sąlygomis leido sutrumpinti *Pediococcus pentosaceus* LUHS22 fermentacijos trukmę nuo 48 h iki 24 h.
3. Nustatyta, kad efektyviau glitimo baltymus hidrolizavo *Lactobacillus brevis* LUHS140 padermė. Fermentuojant 24 h gryną glitimą *Lactobacillus brevis* LUHS140, gliadinų frakcijos baltymų kiekis sumažėjo 2,3 karto, lyginant su neapdorotu glitimo mėginiu, o papildomas apdorojimas ultragarsu leido sumažinti gliadinų baltymų kiekį 6,3 karto. Ultragarso ir fermentacijos *Lactobacillus brevis* LUHS140 taikymas leido sumažinti gliadinų baltymų kiekį galutiniame produkte (tešloje) 3,8 karto. Kompleksinis ultragarso, *Lactobacillus brevis* LUHS140 ir *Saccharomyces cerevisiae* mielių taikymas papildomai gliadinų frakcijos baltymų kiekį sumažino dar 50 % (iki 0,16 mg/g). Fermentuojant 24 h gryną glitimą *Pediococcus pentosaceus* LUHS22, glitimo gliadinų kiekis sumažėjo 2 kartais, o papildomas apdorojimas nustatytomis ultragarso sąlygomis leido gliadinų kiekį sumažinti 5,5 karto.
4. Nustatyta, kad 30 min apdorojimas ultragarsu sumažino gliadinų frakcijos baltymų kiekį gryname glitime 48 %, lyginant su ultragarsu neapdorotu glitimo mėginiu.
5. Kokybinė gliadinų analizė patvirtino, kad ultragarso ir *Lactobacillus brevis* LUHS140 ir *Pediococcus pentosaceus* LUHS22 proteolitinių fermentų poveikyje gyno glitimo gliadinų frakcija pilnai suhidrolizuojama, nors viso grūdo kvietinių miltų atveju šie pokyčiai mažesni. Priešingai nei gliadinai, visais atvejais gliuteninai nebuvo taip efektyviai paveikti taikomų priemonių.
6. Nustatyta, kad taikytos biotechnologinės priemonės ir apdorojimas ultragarsu blogino tešlos tekstūros parametrus. Apdorojimas ultragarsu ir 24 h fermentacija pieno rūgšties bakterijomis *Lactobacillus brevis* LUHS140 optimaliomis sąlygomis sumažino tešlos kietumą, konsistencijos, kohezijos ir klamos indekso vertes, atitinkamai 21, 9, 1,3 ir 2 kartais. Kompleksinis apdorojimas, t. y. 30 min ultragarsu, 24 h fermentacija *Lactobacillus brevis* LUHS140 bei mielėmis *Saccharomyces cerevisiae*, sumažino šiuos parametrus, atitinkamai 28, 13, 2 ir 6 kartais, lyginant su kontroliniu mėginiu, tačiau tai tik patvirtina aukštą prolaminų hidrolizės laipsnį.
7. Šiame tiriamajame darbe sukurta technologija gali būti pritaikyta fermentuotų produktų be glitimo ar su sumažintu glitimo kiekiu gamybai.

Literatūros sarakšas

1. Naiyana GUJRAL, Hugh FREEMAN, Alan THOMSON. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol* [interaktyvus]. 2012 Nov 14; 18(42): 6036–6059 [žiūrėta 2019-04-02]. Prieiga per doi: 10.3748/wjg.v18.i42.6036.
2. Anastasia BALAKIREVA, Andrey ZAMYATNIN. Properties of Gluten Intolerance: Gluten structure, evolution, pathogenicity and detoxification capabilities. *Nutrients* [interaktyvus]. 2016, 8, 644 [žiūrėta 2019-04-01]. Prieiga per doi: 10.3390/nu8100644.
3. CODEX alimentarius. International Food Standards. STANDARD FOR FOODS FOR SPECIAL DIETARY USE FOR PERSONS INTOLERANT TO GLUTEN CODEX STAN 118-1979, 2008.
4. NIONELLI L ir RIZZELLO CG. Sourdough-Based Biotechnologies for the Production of Gluten-Free Foods. *Foods* (Basel, Switzerland). 2016, 5(3). ISSN: 23048158.
5. PITT ir S, Aaron ROSS, William G.. Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnology Progress* [interaktyvus]. 2003; 19(3): 1038–1044 [žiūrėta 2015-05-10]. Prieiga per doi: 10.1021/bp0340685.
6. HAFEEZ Malik Ali. Nutrient uptake, transport and translocation in cereals: Influences of environment and farming conditions. Introductory Paper at the Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science 2009:1. Swedish University of Agricultural Sciences Alnarp, September 2009. ISSN 1654–3580.
7. Z. ŠRAMKOVÁ, E. GREGOVÁ, E. ŠTURDÍKA. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*. 2009, 2(1), p. 115 – 138.
8. M. ANSON, N. HEMERY ir kt. Optimizing the bioactive potential of wheat bran by processing. *Food & function*. 2012, Vol.3(4), pp.362–75. ISSN: 2042–650X.
9. LOPONEN Jussi. Prolamin degradation in sourdoughs. University of Helsinki, 2006. ISSN: 0355–1180.
10. D'OVIDIO Renato, Stefania MASCI. The low–molecular–weight glutenin subunits of wheat gluten. *Journal of Cereal Science* [interaktyvus]. 2004, 39 (30), p.321–339 [žiūrėta 2019–03–24]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jcs.2003.12.002.
11. WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol*. 2007, 24, 115–119. ISSN: 0740-0020.
12. ANDERSON, O. D. and GREENE, F. C. The α -gliadin gene family. II. DNA and protein sequence variation, subfamily structure, and origins of pseudogenes. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997, 95, 59-65. ISSN: 0040-5752.
13. WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* [interaktyvus]. 2007, 24, 120-122 [žiūrėta 2019-03-25]. Prieiga per doi: 10.1016/j.fm.2006.07.004.
14. BALAKIREVA Anastasia V., Andrey A. ZAMYATNIN Jr. Properties of Gluten Intolerance: Gluten structure, evolution, pathogenicity and detoxification capabilities. *Nutrients* [interaktyvus]. 2016, 8, 644 [žiūrėta 2019-04-01]. Prieiga per doi: 10.3390/nu8100644.
15. GOESAERT, H., BRIJS, K., VERAVERBEK ir kt. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*. 2005, 16, 12-30. ISSN: 0924-2244.

16. BHUPENDAR Singh Khatkar. Structure and functionality of wheat gluten proteins. Proceedings of the 2014 International Conference of Food Properties. 2014, Kuala Lumpur, Malaysia, January 24-26.
17. W. S. VERAVERBEKE, DELCOUR, J. A. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to bread-making functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [interaktyvus]. 2002, 42, 179-208 [žiūrėta 2019-03-28]. Prieiga per doi: 10.1080/10408690290825510.
18. KOEHLER P., WIESER H., KONITZER K. Celiac Disease and Gluten: Multidisciplinary Challenges and Opportunities. Academic Press, 2014. ISBN: 9780124202207.
19. BROTTVEIT M, VANDVIK P. ir kt. Absence of somatization in non-coeliac gluten sensitivity. *Scand J Gastroenterol* [interaktyvus]. 2012;47:770–7 [žiūrėta 2019-04-03]. Prieiga per doi: 10.3109/00365521.2012.679685.
20. KAZĖNAITĖ E., E.STURKIENĖ, J. VALANTINA ir kt. Celiakijos diagnostika vyresnio amžiaus pacientams: klinikiniai atvejai. *Medicinos teorija ir praktika*. 2007, 13 (2). ISSN: 1392-1312.
21. NIEWINSKI, Mary M. Advances in Celiac Disease and Gluten-Free Diet. *Journal of the American Dietetic Association*. 2008, Vol.108(4), pp.661-672. ISSN: 0002-8223.
22. FASANO A, BERTI I, GERARDUZZI T, ir kt. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: A large multicenter study. *Archives of Internal Medicine*, 2003. 163:286-292.
23. GREEN P, STAVROPOULOS S, PANAGI S, GOLDSTEIN SL ir kt. Characteristics of adult celiac disease in the USA: Results of a national survey. *Am J Gastroenterol* [interaktyvus]. 2001;96: 126-131 [žiūrėta 2019-04-02]. Prieiga per doi: 10.1111/j.1572-0241.2001.03462.x.
24. KAZĖNAITĖ E., KALIBATIENĖ D., KALPOKAITĖ Z., GLEMŽIENĖ I. Sergančiųjų reumatoidiniu artritu IgA klasės antigliadino antikūnai kraujo serume. *Laboratorinė medicina*. 2001; 9: 26-30.
25. KAZĖNAITĖ E., GLEMŽIENĖ I., KALIBATIENĖ D. Clinical signs of adult coeliac disease. *Acta Medica Lituanica*. 2002; 9: 2000-2002
26. GUJRAL Naiyana, Hugh J FREEMAN, Alan BR THOMSON. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol* [interaktyvus]. 2012 Nov 14; 18(42): 6036–6059 [žiūrėta 2019-04-02]. Prieiga per doi: 10.3748/wjg.v18.i42.6036.
27. ŽILIĆ, Slađana. *Wheat Gluten: Composition and Health Effects*. Nova Science Publisher, Inc. 2013, pp.71-86. ISBN: 9781626183438.
28. ASUNCIÓN Rocher, FernandoSORIANO, EnriqueMOLINA ir kt. Characterization of distinct α - and γ -type gliadins and low molecular weight components from wheat endosperm as coeliac immunoreactive proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* [interaktyvus]. 1995, 1247, 1, p. 143-148 [žiūrėta 2019-02-25]. Prieiga per doi: 10.1016/0167-4838(94)00206-V.
29. PRANDI, Barbara. Celiac Disease: Gluten Peptides Characterization after In Vitro Digestion. *Wheat Improvement, Management and Utilization* [interaktyvus]. 2017, May 24th [žiūrėta 2019-04-02]. Prieiga per doi: 10.5772/63694.
30. JIANG Xiao ir kt. Protein Content and Amino Acid Composition in Grains of Wheat-Related Species. *Agricultural Sciences in China*. 2008, Vo 7 (3), p. 272-279. ISSN: 1671-2927.

31. SHEPHERD SJ, GIBSON PR. Nutritional inadequacies of the gluten-free diet in both recently-diagnosed and long-term patients with coeliac disease. *J Hum Nutr Diet [interaktyvus]*. 2013;26:349–58 [žiūrėta 2019-04-03]. Prieiga per doi: 10.1111/jhn.12018
32. HALLERT C. ir kt. Evidence of poor vitamin status in coeliac patients on a gluten-free diet for 10 years. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16:1333–9.
33. THOMPSON T, DENNIS M, HIGGINS LA ir kt. Gluten-free diet survey: are Americans with coeliac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods?. *J Hum Nutr Diet [interaktyvus]*. 2005;18:163–9 [žiūrėta 2019-04-04]. Prieiga per doi: 10.1111/j.1365-277X.2005.00607.x.
34. Ivana CAPUTO, Marilena LEPRETTI, Stefania MARTUCCIELLO, Carla ESPOSITO. Enzymatic Strategies to Detoxify Gluten: Implications for Celiac Disease. *SAGE-Hindawi Access to Research Enzyme Research [interaktyvus]*. 2010, Article ID 174354, 9 p. [žiūrėta 2019-04-03]. Prieiga per doi: 10.4061/2010/174354.
35. L. SHAN, T. MARTI, L. M. SOLLID ir kt. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochemical Journal*, 2004. 383, no. 2, pp. 311–318.
36. C. MITEA, R. HAVENAAR ir kt. Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut*. 2008, vol. 57, no. 1, pp. 25–32.
37. GOBBETTI, M.; CORSETTI, A. *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: A review. *Food Microbiol.* 1997, 14, 175–187.
38. Raffaella DI CAGNO, Maria De ANGELIS ir kt. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 2002, Vol. 68, No. 2, p. 623–633. ISSN:0099-2240.
39. KATINA, K., ARENDT, E.K.; Liukkone ir kt. Potential of sourdough for cereal products. *Trends Food Sci. Technol.* 2005, 16, 104–112.
40. POUTANEN, Kaisa ; FLANDER, Laura ; KATINA, Kati. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*. 2009, Vol.26(7), pp.693-699. ISSN: 0740-0020.
41. CARLO G. RIZZELLO, Maria De ANGELIS, Raffaella DI CAGNO ir kt. Highly Efficient Gluten Degradation by Lactobacilli and Fungal Proteases during Food Processing: New Perspectives for Celiac Disease. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 2007, p. 4499–4507 Vol. 73, No. 14. ISSN: 0099-2240.
42. R. DI CAGNO, M. DE ANGELIS, S. AURICCHIO ir kt., “Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in Celiac Sprue patients,”. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, vol. 70, no. 2, pp. 1088–1096.
43. RAFFAELLA DI Cagno, Carlo G. RIZZELLO ir kt. Use of Selected Sourdough Strains of *Lactobacillus* for Removing Gluten and Enhancing the Nutritional Properties of Gluten-Free Bread. *Journal of Food Protection*. 2008, Vol. 71, No. 7, p. 1491–1495.
44. C. GIANFRANI, R. A. SICILIANO, A. M. FACCHIANO ir kt. Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Gastroenterology*. 2007, vol. 133, no. 3, pp. 780–789.
45. K.HOFFMANN ir kt.. Blocking peptides decrease tissue transglutaminase processing of gliadin in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, vol. 57, no. 21, pp. 10150–10155.

46. ALTENBACH, S.B.; ALLEN, P.V. Transformation of the US bread wheat 'Butte 86' and silencing of omega-5 gliadin genes. *GM Crops [interaktyvus]*. 2011, 2, 66–73 [žiūrėta 2019-04-05]. Prieiga per doi: 10.4161/gmcr.2.1.15884.
47. GIL-HUMANES, J.; PISTON, F.; TOLLEFSEN, S.; SOLLID, L.M.; BARRO, F. Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010, 107, 17023–17028.
48. HILEMAN, R.E.; SILVANOVICH, A.; GOODMAN ir kt.. Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2002, 128, 280–291.
49. A. ŠAČKUS, J. ROUSSEAU, C. ROUSSEAU. Žalioji chemija. Vitae Litera, 2007. ISBN: 9789955686491.
50. Huang, GUOPING, Chen, SUWAN ir kt. Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrasonics – Sonochemistry*. 2017, Vol.37, pp.144-149. ISSN: 1350-4177.
51. CHEMAT F., HUMA Z., KAMRAN Khan M. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2011;18(4): 813–835. ISSN: 1350-4177.
52. Tor MONSEN, Elisabeth LOVGREN ir kt. 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, p. 2496–2501. ISSN 0095-1137.
53. HUANG ir kt. Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrasonics – Sonochemistry*. 2017, Vol.37, pp.160-165. ISSN: 1350-4177.
54. SHIMADA, T., OHDAIRA, E. ir MASUZAWA, N. Effect of ultrasonic frequency on lactic acid fermentation promotion by ultrasonic irradiation. *Japanese Journal of Applied Physics*. 2004, 43. Article 2831.
55. DAHROUD, B. D., MOKARRAM, R. ir kt. Low intensity ultrasound increases the fermentation efficiency of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATTC 39392. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, 86, 462–467.
56. LIU, Wen-Sin ; Yang, CHUN-YAO. Strategic ultrasound-induced stress response of lactic acid bacteria on enhancement of β -glucosidase activity for bioconversion of isoflavones in soymilk. *Journal of Microbiological Methods*. 2018, Vol.148, pp.145-150. ISSN: 0167-7012.
57. MALIK, Mudasir Ahmad. High intensity ultrasound treatment of protein isolate extracted from dephenolized sunflower meal: Effect on physicochemical and functional properties. *Ultrasonics – Sonochemistry*. 2017, Vol.39, pp.511-519. ISSN: 1350-4177.
58. JIA, Junqiang ir kt. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*. 2010, Vol.119(1), pp.336-342. ISSN: 0308-8146.
59. H. L. JIN ir kt. Characteristics of Enzymatic Hydrolysis of the Wheat Gluten Proteins Treated by Ultrasound Wave. *Advanced Materials Research [interaktyvus]*. 2012, 343-344, pp. 1015-1022 [žiūrėta 2019-04-08]. Prieiga per doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.343-344.1015.
60. Li, SUYUN, Ma, HAILE ir kt. A new kinetic model of ultrasound-assisted pretreatment on rice protein. *Ultrasonics – Sonochemistry*. 2018, Vol.40, pp.644-650. ISSN: 1350-4177.
61. Wu, QIONGYING ; Zhang, XUEFEN ir kt. Effect of ultrasonic pretreatment on whey protein hydrolysis by alcalase: Thermodynamic parameters, physicochemical properties and bioactivities. *Process Biochemistry*. 2018, Vol.67, pp.46-54. ISSN: 1359-5113.

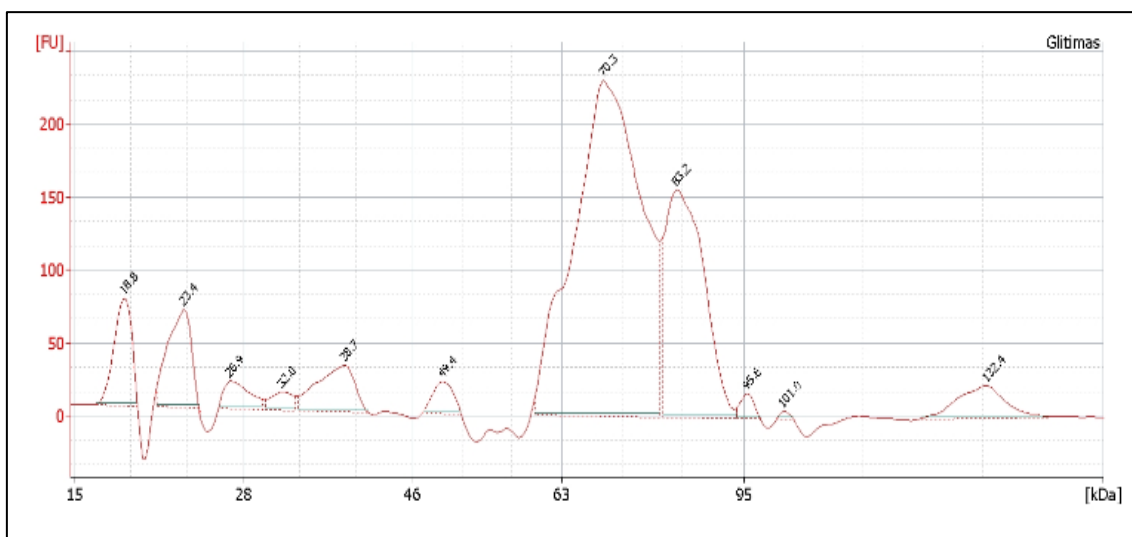
62. WANG, Danli ; Yan, LUFENG ; Ma, XIAOBIN ir kt. Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, Vol.119, pp.453-461. ISSN: 0141-8130.
63. B. OZBEK, K.O. ULGEN. The stability of enzymes after sonication. *Process Biochem*. 2000, 35, 1037–1043. ISSN: 1359-5113.
64. X. MA, W. WANG, M. ZOU, T. DING, X. Ye, D. LIU. Properties and structures of commercial polygalacturonase with ultrasound treatment: role of ultrasound in enzyme activation, *RSC Adv*. 5 (130) (2015) 107591–107600.
65. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST EN ISO 10523:2012]. Vandens kokybė. pH nustatymas (ISO 10523:2008) = Water quality. Determination of pH: Europos Standartas EN ISO LST EN ISO 10523:2012 turi Lietuvos standarto statusą. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2012.
66. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. Miltiniai kepiniai ir konditerijos gaminiai. Rūgštingumo ir šarmingumo nustatymo metodai LST 1553:1998. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 1998.
67. LAYNE, E. Spectrochemical and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology*. 1957, 3, 447-455.
68. CUPP-ENYARD, C. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *J. Vis. Exp*. 2008, (19), e899, doi:10.3791/899.
69. Vandana DHAKA ir Bhupendar KHATKAR. Effects of Gliadin/Glutenin and HMW-GS/LMW-GS Ratio on Dough Rheological Properties and Bread-Making Potential of Wheat Varieties: Gluten Proteins, Dough Rheology and Bread Quality. *Journal of Food Quality [interaktyvus]*. 2015, 38(2), 71-82 [žiūrėta 2019-04-10]. Prieiga per doi: 10.1111/jfq.12122.
70. N. J. KRUGER. The Bradford Method for Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook. Part I*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2002. ISBN 9780896039407.
71. Lida BAGDONIENĖ, Vida BENDIKIENĖ ir kt. BIOCHEMIJOS laboratoriniai darbai. VILNIAUS UNIVERSITETAS BIOCHEMIJOS IR BIOFIZIKOS KATEDRA.
72. LIESIENĖ, J. ir BUIKA G. Skysčių ir dujų chromatografijos pagrindai. Kaunas. Vitae Litera, 2007. ISBN: 9789955686385.
73. Gokcen KOMEN, Ayse HANDAN BAYSAL, Sebnem HARSA. Structural changes of gliadins during sourdough fermentation. Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey, 2010.
74. MARCUZZO, Eva ; PERESSINI, Donatella ; DEBEAUFORT, Frédéric ; Sensidoni, Alessandro. Effect of ultrasound treatment on properties of gluten-based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2010, Vol.11(3), pp.451-457. ISSN: 1466-8564.
75. HAIHUA Zhang, IRAKOZE V.. The Effect of Ultrasound on the Functional Properties of Wheat Gluten. *Molecules [interaktyvus]*. 2011, 16, p, 4231-4240 [žiūrėta 2019-02-26]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules16054231.
76. Teresa ZOTTA, Paolo PIRAINO, Annamaria RICCIARDI ir kt. Proteolysis in Model Sourdough Fermentations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 05 April 2006, Vol.54(7), pp.2567-74. ISSN: 0021-8561.
77. V. DVOŘÁČEK, V. ČURN. Evaluation of protein fractions as biochemical markers for identification of spelt wheat cultivars (*Triticum spelta* L.). *Plant Soil and Environment [interaktyvus]*. 2003, 49(3):99-105 [žiūrėta 2019-03-02]. Prieiga per doi: 10.17221/4097-PSE.

78. C. THIELE M., G. GÄNZLE, R. F. VOGEL. Contribution of Sourdough Lactobacilli, Yeast, and Cereal Enzymes to the Generation of Amino Acids in Dough Relevant for Bread Flavor. *Cereal chemistry* [interaktyvus]. 2002, Volume79, 1, p. 45-51 [žiūrėta 2019-03-05]. Prieiga per doi: 10.1094/CCHEM.2002.79.1.45.
79. R. Di CAGNO, M. De ANGELIS, S. AURICCHIO ir kt. Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in Celiac Sprue patients. *Applied and Environmental Microbiology* [interaktyvus]. 2004, vol. 70, no. 2, pp. 1088–1096 [žiūrėta 2019-05-03]. Prieiga per doi: 10.1128/aem.70.2.1088-1096.2004.
80. GADALLAH M., MAHMOUD R., YOUSIF E.. Effect of Adding Xanthan and Guar Gums on Quality Characteristics of Rice Gluten-Free Pan Bread. *Journal of Agricultural and Veterinary Sciences* [interaktyvus]. 2016, Vol. 9, No. 2, pp. 235-246 [žiūrėta 2019-05-15]. Prieiga per doi: 10.12816/0030731.
81. A. REALE, T. DI RENZO, M. PREZIUSO, G. PANFILI. Stabilization of sourdough starter by spray drying technique: New breadmaking perspective. *Food Science and Technology*. 2019, 99, Pages 468-475. ISSN: 0023-6438.

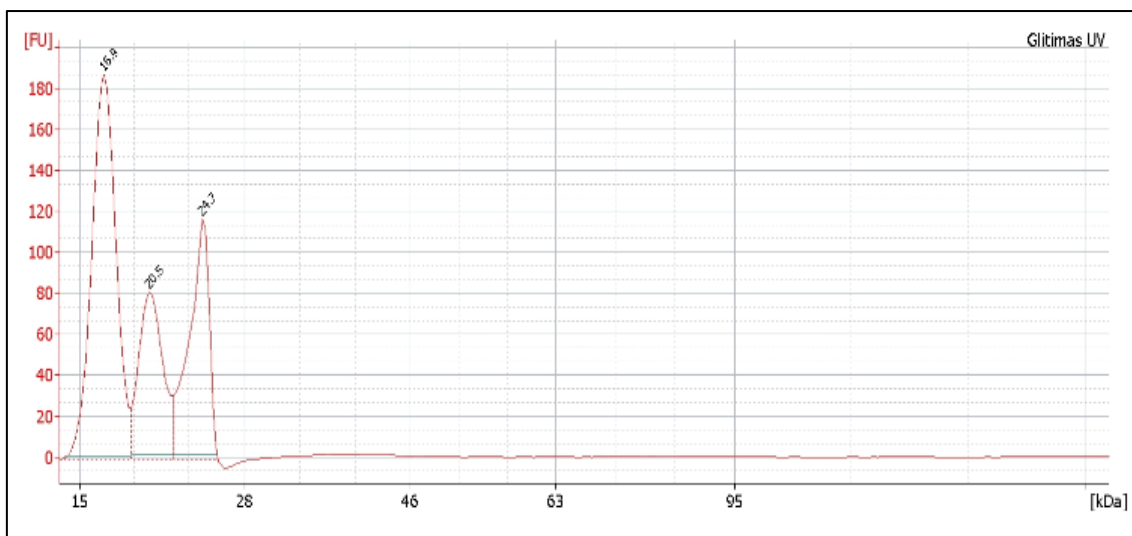
Priedai

A Alaninas	R Argininas
N Asparaginas	D Asparto rūgštis
C Cisteinas	Q Glutaminas
E Glutamo rūgštis	G Glicinas
H Histidinas	I Isoleucinas
L Leucinas	K Lizinas
M Metioninas	F Fenilalaninas
P Prolinas	S Serinas
T Treoninas	W Triptofanas
Y Tirozinas	V Valinas

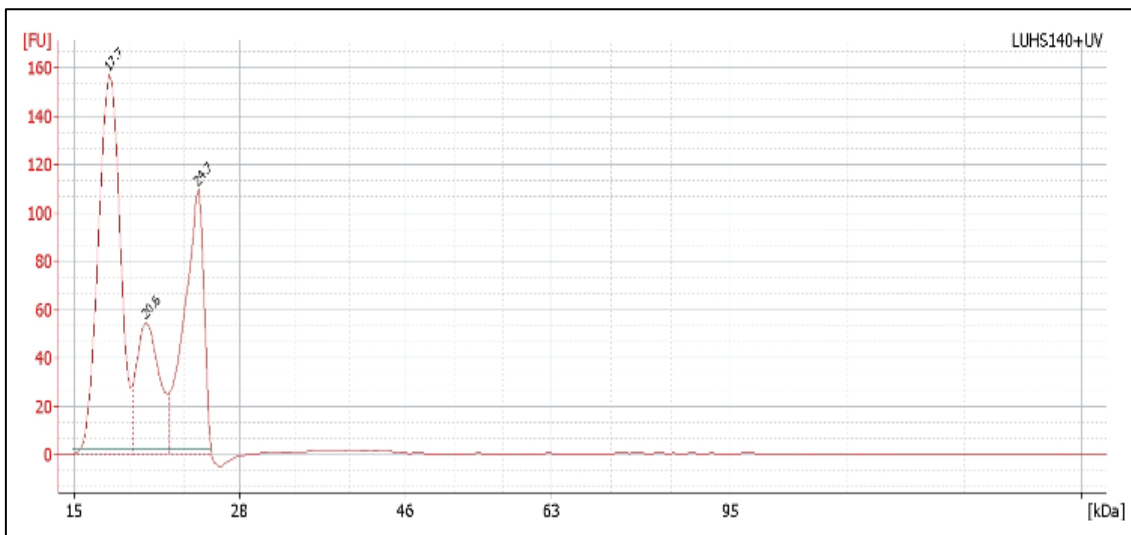
1 pav. Aminorūgščių šifravimas



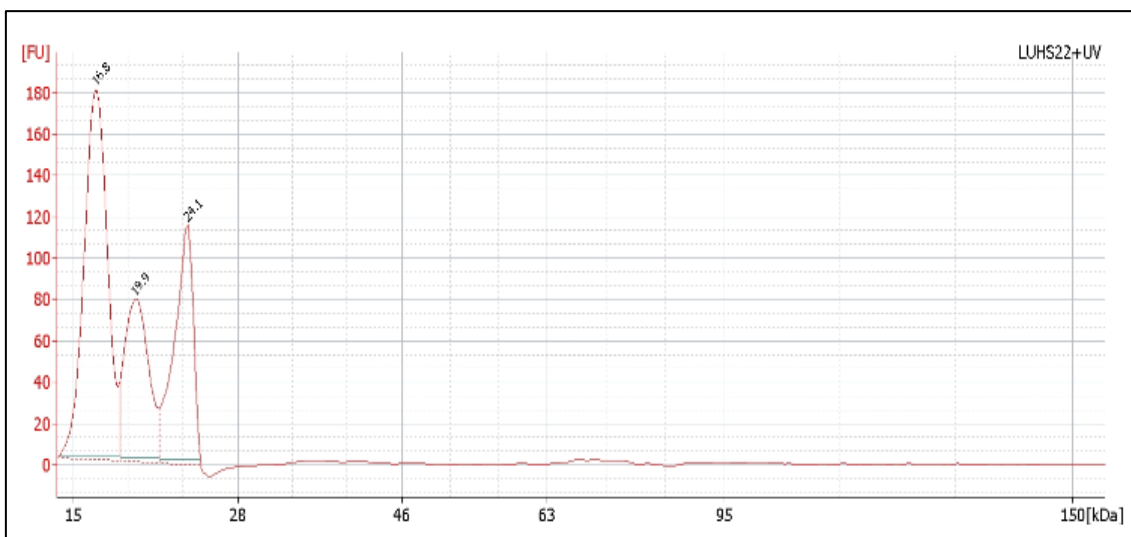
2 pav. Gliadinų, išekstrahuotų iš gryno glitimo, elektroferograma



3 pav. Gliadinų, išekstrahuotų iš 30 min apdoroto glitimo, elektroferograma



4 pav. Gliadinų, išekstrahuotų iš apdoroto ultragarsu ir *L. brevis* LUHS140 glitimo, elektroferograma



5 pav. Gliadinų, išekstrahuotų iš apdoroto ultragarsu ir *P. pentosaceus* LUHS22 glitimo, elektroferograma