



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Pieno rūgštis bakterijų parinkimas manitolio gamybai iš  
duonos atliekų biotechnologiniu būdu**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Julija Riaukaitė**

Projekto autorė

**Doc., dr. Loreta Bašinskienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**  
Cheminės technologijos fakultetas

# **Pieno rūgštis bakterijų parinkimas manitolio gamybai iš duonos atliekų biotechnologiniu būdu**

Baigiamasis magistro projektas  
Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

---

**Julija Riaukaitė**

Projekto autorė

**Doc., dr. Loreta Bašinskiėnė**

Vadovė

**V. m. d., dr. Daiva Žadeikė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Julija Riaukaitė

## **Pieno rūgšties bakterijų parinkimas manitolio gamybai iš duonos atliekų biotechnologiniu būdu**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Julijos Riaukaitės, baigiamasis projektas tema „Pieno rūgšties bakterijų parinkimas manitolio gamybai iš duonos atliekų biotechnologiniu būdu“ 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)

Riaukaitė, Julija. Pieno rūgšties bakterijų parinkimas manitolio gamybai iš duonos atliekų biotechnologiniu būdu. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Loreta Bašinskienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Technologijų mokslai, Maisto technologijos.

Reikšminiai žodžiai: pieno rūgšties bakterijos, manitolis, duonos atliekos, gliukozės-fruktozės sirupas, fermentacija.

Kaunas, 2019. 78 p.

## Santrauka

Šiuolaikinės maisto pramonės tikslai yra ne tik pagaminti saugius ir kokybiškus maisto produktus, bet ir užtikrinti tvarią gamybą. Mikrobinė manitolio gamyba, panaudojant pieno rūgšties bakterijas ir duonos atliekas, galėtų būti alternatyva cheminiam gamybos būdui, kuris yra brangus ir aplinkai kenksmingas procesas. Šio darbo tikslas buvo parinkti pieno rūgšties bakterijas ir pritaikyti duonos atliekas kaip terpę manitolio gamybai biotechnologiniu būdu bei įvertinti jo, kaip saldiklio, panaudojimo galimybes miltinės konditerijos kepinų energinei vertei sumažinti.

Darbo metu įvertinta 17 pieno rūgšties bakterijų, priklausančių *Lactococcus*, *Leuconostoc* ir *Lactobacillus* gentims, tinkamumas manitolio gamybai. Nustačius manitolio 2-dehidrogenazės aktyvumą, atrinktos 6 padermės, pasižymėjusios didžiausiu (0,07–0,24 AV/ml) fermento aktyvumu. Fermentuojant modelinę fruktozės-gliukozės sistemą kiekvienos bakterijos augimui optimalioje temperatūroje, palaikant pH 5,0, didžiausias manitolio kiekis (43,47 g/l) po 72 h susidarė naudojant *Lactobacillus rossiae* GL14 padermę.

Tiriant duonos atliekų panaudojimo fermentacijos terpei galimybes, atliktas duonos atliekose esančio krakmolo konversijos į gliukozę parametrų optimizavimas. Nustatyti optimalūs duonos ir fermentų ( $\alpha$ -amilazės ir gliukoamilazės) kiekiai didžiausiai gliukozės išėigai (84,35 % duonos sausųjų medžiagų arba 97,92 % krakmolo) gauti. Optimizavus gliukozės izomerizacijos į fruktozę parametrus (pH ir fermento kiekį), gautas gliukozės-fruktozės sirupas, kuriame šių sacharidų santykis 1,4:1. Panaudojus iš duonos atliekų pagamintą gliukozės-fruktozės sirupą biotechnologinei manitolio gamybai, gauta manitolio koncentracija siekė 20,4 g/l, išėiga – 36 %. Pakoreguotas fruktozės-gliukozės santykis (2:1) sirupe ir kukurūzų išdžiovintų dalelių, mangano sulfato bei sojų peptono priedai turėjo teigiamą įtaką *Lb. rossiae* GL14 dauginimuisi ir padidino manitolio koncentraciją iki 72,98 g/l, išėigą – iki 51 %.

Keksiukų receptūroje pakeitus 25 % cukraus manitolium, su cukrumi gaunamų kalorijų kiekis buvo sumažintas 10 %, pagerėjo kepinų skonis, kvapas, tokie keksiukai labiau patiko vartotojams. Tinkamumo vartoti tyrimų metu nustatyta, kad po 12 dienų laikymo polietileninėje pakuotėje šių keksiukų drėgnis ir tekstūros parametrų vertės išliko didesnės, todėl tinkamumo vartoti terminas galėtų būti ilgesnis už kontrolinių keksiukų be manitolio.

Riaukaitė, Julija. Selection of Lactic Acid Bacteria for Biotechnological Production of Mannitol from Bread Waste. Master's Final Degree Project / supervisor doc. dr. Loreta Bašinskienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Technological Sciences, Food Technology.

Keywords: lactic acid bacteria, mannitol, bread waste, glucose-fructose syrup, fermentation.

Kaunas, 2019. 78 p.

### Summary

The goal of today's food industry is not only to ensure food safety and quality but also food production sustainability. Microbial production of mannitol by lactic acid bacteria from bread waste could be an alternative to the chemical production methods, which are expensive and environmentally unfriendly. The aim of this study was to select lactic acid bacteria and to use bread waste as a fermentation medium for biotechnological production of mannitol as well as to evaluate its potential as a sweetener to reduce calorie intake of sweet bakery products.

17 lactic acid bacteria of the genera *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* were analyzed to investigate their suitability for mannitol production. 6 strains with the highest mannitol 2-dehydrogenase activity (0,07–0,24 U/ml) were selected for fermentation experiments. Fermentation of the model fructose-glucose system was performed at the optimum growth temperature for each strain, maintaining pH at 5,0. The highest mannitol concentration (43,47 g/l) was achieved after 72 h with *Lactobacillus rossiae* GL14 strain.

Waste bread potential of being a resource for the production of fermentation medium was investigated by optimization of the conversion parameters of starch from waste bread to glucose. The optimal loading of bread and enzymes ( $\alpha$ -amylase and glucoamylase) were determined to obtain the highest glucose yield of 84,35 % bread dry matter or 97,92 % starch. After parameters (pH and enzyme loading) for glucose isomerization to fructose were optimized, the glucose-fructose syrup with a 1,4:1 ratio was obtained. When produced glucose-fructose syrup was used for biotechnological production of mannitol, mannitol concentration of 20,4 g/l and 36 % yield were obtained. Adjusted fructose-glucose ratio (2:1) in syrup, the addition of corn steep solids, manganese sulfate and soy peptone had a positive effect on growth of *Lb. rossiae* GL14 and increased mannitol concentration up to 72,98 g/l, yield – up to 51 %.

25 % sugar replacement with mannitol in cupcakes reduced sugar calorie intake by 10 %, the taste and aroma of these cupcakes as well as the overall acceptance to customers were improved. The shelf-life studies showed that after 12 days of storage in polyethylene packaging, moisture and texture parameters of these cupcakes remained higher, therefore the shelf-life could be longer than control ones without mannitol.

## Turinys

<b>Lentelių sąrašas .....</b>	<b>7</b>
<b>Paveikslų sąrašas .....</b>	<b>8</b>
<b>Santrumpos .....</b>	<b>9</b>
<b>Įvadas.....</b>	<b>10</b>
<b>1. Literatūros apžvalga .....</b>	<b>12</b>
1.1. Manitolio savybės ir panaudojimas pramonėje .....	12
1.1.1. Manitolio fizikinės ir cheminės savybės .....	12
1.1.2. Manitolio paplitimas.....	12
1.1.3. Manitolio funkcinės savybės .....	13
1.1.4. Manitolio rinka .....	15
1.2. Manitolio gamyba.....	15
1.2.1. Cheminis hidrinimas.....	15
1.2.2. Fermentinė gamyba .....	16
1.2.3. Mikrobinė gamyba.....	16
1.2.4. Manitolio gryninimas .....	22
1.3. Duonos atliekų perdirbimas į aukštesnės vertės produktus .....	23
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....</b>	<b>27</b>
2.1. Tyrimų kryptys .....	27
2.2. Tyrimo objektai .....	27
2.2.1. Mikroorganizmai .....	27
2.2.2. PRB kultūrų paruošimas MDH aktyvumo nustatymui.....	28
2.2.3. Modelinės fruktozės-gliukozės sistemos fermentacija .....	28
2.2.4. Duonos atliekos .....	29
2.2.5. Fermentiniai preparatai.....	29
2.2.6. Duonos atliekų hidrolizė ir jos planavimas .....	30
2.2.7. Gliukozės konversija į fruktozę ir jos planavimas.....	31
2.2.8. Duonos atliekų fermentacija.....	31
2.2.9. Keksiukų gamyba su manoliu .....	32
2.3. Tyrimo metodai .....	33
2.3.1. Ląstelių augimo kreivės nustatymas.....	33
2.3.2. Manitolio 2-dehidrogenazės aktyvumo nustatymas .....	33
2.3.3. Manitolio kiekio nustatymas .....	34
2.3.4. Duonos atliekų cheminės sudėties analizė.....	35
2.3.5. Gliukozės ir fruktozės kiekio nustatymas.....	37
2.3.6. Pieno rūgšties kiekio nustatymas.....	38
2.3.7. Kepinių kokybės ir juslinio vertinimo metodai .....	38
2.3.8. Rezultatų matematinė – statistinė analizė.....	41
<b>3. Rezultatai ir jų aptarimas .....</b>	<b>42</b>
3.1. Pieno rūgšties bakterijų parinkimas manitolio gamybai.....	42
3.1.1. Manitolio 2-dehidrogenazės aktyvumo įvertinimas .....	42
3.1.2. Manitolio susidarymas fermentuojant pieno rūgšties bakterijomis.....	44
3.2. Duonos atliekų panaudojimas manitolio gamybai.....	46
3.2.1. Fermentinės duonos atliekų hidrolizės optimizavimas.....	46
3.2.2. Gliukozės konversijos į fruktozę optimizavimas.....	52

3.2.3. Duonos atliekų fermentacija.....	56
3.3. Manitolio įtaka kepinų kokybei ir juslinėms savybėms.....	60
3.3.1. Manitolio įtaka keksiukų kokybei .....	61
3.3.2. Manitolio įtaka keksiukų juslinėms savybėms .....	64
3.3.3. Manitolio įtaka keksiukų pokyčiams laikymo metu .....	66
<b>Išvados .....</b>	<b>69</b>
<b>Literatūros sąrašas .....</b>	<b>70</b>
<b>Padėka .....</b>	<b>78</b>

## Lentelių sąrašas

1 lentelė. PRB panaudojimas manitolio gamybai.....	21
2 lentelė. Duonos atliekų panaudojimas pridėtinės vertės produktų gamybai .....	25
3 lentelė. PRB charakteristikos.....	28
4 lentelė. Keksiukų receptūros.....	33
5 lentelė. Vertinamų jauslinių savybių apibūdinimai .....	40
6 lentelė. Friedmano testo kritinės vertės [95] .....	41
7 lentelė. Centriško kompozicinio plano parametrų vertės duonos atliekų hidrolizės optimizavimui ir gautos atsako – gliukozės kiekio – vertės.....	47
8 lentelė. Duonos atliekų hidrolizės optimizacijos regresijos parametrų dispersinė analizė.....	49
9 lentelė. Centriško kompozicinio plano parametrų vertės gliukozės izomerizacijos proceso optimizavimui ir gautos atsako vertės .....	53
10 lentelė. Gliukozės konversijos optimizacijos regresijos parametrų dispersinė analizė .....	54
11 lentelė. Manitolio įtaka keksiukų minkštimo spalvai .....	63
12 lentelė. Keksiukų tešlos su skirtingu manitolio kiekiu tekstūros parametrai .....	63
13 lentelė. Keksiukų minkštimo tekstūros parametrai.....	64
14 lentelė. Keksiukų su skirtingu manitolio kiekiu rikiavimo testo rezultatų suvestinė .....	65



## Paveikslų sąrašas

1 pav. D-manitolio struktūra [9].....	12
2 pav. Maninio uosis ( <i>Fraxinus ornus</i> ) [14] .....	13
3 pav. Numatomas manitolio rinkos augimas pagal sritis JAV [27].....	15
4 pav. Fruktozės vertimas manitoliu katalizuojant manitolio 2-dehidrogenazei [31] .....	16
5 pav. Homofermentinių PRB metabolizmas [11] .....	18
6 pav. Heterofermentinių PRB metabolizmas [11] .....	19
7 pav. Maisto atliekų pasiskirstymas pagal frakcijas prekybos centre [63] .....	24
8 pav. „LAMBDA Minifor“ laboratorinis fermenteris.....	29
9 pav. Manitolio gamybos iš duonos atliekų schema .....	32
10 pav. Tešlos tekstūros profilio analizės „laiko-jėgos“ kreivės pavyzdys.....	39
11 pav. Tekstūros profilio analizės „laiko-jėgos“ kreivės pavyzdys [93].....	40
12 pav. <i>Lactococcus lactis</i> bakterijų augimo kreivės .....	42
13 pav. <i>Lactobacillus</i> ir <i>Leuconostoc</i> bakterijų augimo kreivės .....	43
14 pav. Skirtingų PRB padermių manitolio 2-dehidrogenazės aktyvumas (skirtingos raidės, rodo, kad yra statistiškai reikšmingi skirtumai, esant 95 % tikimybės lygiui).....	43
15 pav. Manitolio kiekio kitimas fermentuojant PRB fruktozės-gliukozės (2:1) substratą .....	45
16 pav. Gliukozės kiekio priklausomybė nuo hidrolizės trukmės.....	48
17 pav. Prognozuojamų ir eksperimentinių gliukozės kiekių palyginimas .....	50
18 pav. Atsako paviršiaus 3D ir 2D plotai vaizduojantys parametų (duonos, $\alpha$ -amilazės ir gliukoamilazės kiekio) įtaką gliukozės išėigai .....	51
19 pav. Gliukozės kiekio kitimas izomerizacijos metu .....	53
20 pav. Fruktozės kiekio kitimas izomerizacijos metu.....	54
21 pav. Prognozuojamų ir eksperimentinių fruktozės kiekių palyginimas .....	55
22 pav. Atsako paviršiaus 3D ir 2D plotai, vaizduojantys parametų (gliukozės izomerazės kiekio ir pH) įtaką fruktozės išėigai.....	55
23 pav. Manitolio kiekio kitimas fermentacijos metu .....	57
24 pav. Gliukozės ir fruktozės kiekiai fermentacijos pradžioje ir pabaigoje (skirtingos raidės, rodo, kad yra statistiškai reikšmingi skirtumai, esant 95 % tikimybės lygiui) .....	57
25 pav. Pieno rūgšties kiekio kitimas fermentacijos metu .....	59
26 pav. Manitolio įtaka keksiukų aukščiui (skirtingos raidės, rodo, kad yra statistiškai reikšmingi skirtumai, esant 95 % tikimybės lygiui) .....	61
27 pav. Manitolio įtaka keksiukų drėgmeniui (skirtingos raidės, rodo, kad yra statistiškai reikšmingi skirtumai, esant 95 % tikimybės lygiui) .....	62
28 pav. A – keksiukas be manitolio (kontrolė), B – keksiukas su 25 % manitolio, C – keksiukas su 50 % manitolio, D – keksiukas su 75 % manitolio.....	62
29 pav. Keksiukų su skirtingu manitolio kiekiu juslinis profilis.....	64
30 pav. Manitolio kiekio (▲ – 0 % (kontrolė); ● – 25 %; ◆ – 50 %; ■ – 75 %) įtaka keksiukų tekstūros pokyčiams laikymo metu: kietumo (A), elastingumo (B), sukibimo (C), lipnumo (D), kramtomumo (E) ir gebėjimo atsistatyti (F).....	66
31 pav. Manitolio kiekio (▲ – 0 % (kontrolė); ● – 25 %; ◆ – 50 %; ■ – 75 %) įtaka keksiukų drėgmės kiekio pokyčiams laikymo metu.....	67

## Santrumpos

ADP – adenozino difosfatas;

AGU – gliukoamilazės kiekis, kuris per 1 min hidrolizuoja 1  $\mu\text{mol}$  maltozės;

ATP – adenozino trifosfatas;

AV – aktyvumo vienetai;

CKP – centriškas kompozicinis planas;

CSL – kukurūzų ekstraktas (angl. *corn steep liquor*);

CSS – kukurūzų išdžiovintos dalelės (angl. *corn steep solids*);

DT – iš duonos atliekų pagamintas gliukozės-fruktozės sirupas;

DF – iš duonos atliekų pagamintas gliukozės-fruktozės sirupas su fruktozės priedu;

DP – iš duonos atliekų pagamintas gliukozės-fruktozės sirupas su fruktozės, kukurūzų išdžiovintų dalelių, mangano sulfato ir sojų peptono priedais;

IGIU – fermento kiekis, kuris normaliomis sąlygomis paverčia gliukozę į fruktozę 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  greičiu;

KNU – (Kilo Novo Units)  $\alpha$ -amilazės kiekis, kuris per 1 h suskaldo 5,26 g krakmolo;

KTU MI – Kauno technologijos universiteto Maisto institutas;

KTU MMTK – Kauno technologijos universiteto Maisto mokslo ir technologijos katedra;

LDH – D-laktato dehidrogenazė;

MDH – manitolio 2-dehidrogenazė;

MRS – De Man, Rogosa ir Sharpe mitybinė terpė;

NAD – nikotinamido adenino dinukleotidas;

NADH – redukuotas nikotinamido adenino dinukleotidas;

NADPH – redukuotas nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas;

PAM – paviršiaus atsako modelis;

PRB – pieno rūgšties bakterijos;

s. m. – sausosios medžiagos;

ST – modelinė fermentacijos sistema (fruktozės-gliukozės mišinys 2:1, kukurūzų išdžiovintos dalelės, sojų peptonas ir mangano sulfatas).

## Įvadas

Visuomenės susidomėjimas sveikesniais, mažiau kalorijų turinčiais maisto produktais sparčiai auga. Cukrus yra vienas dažniausių ingredientų maisto produktų gamyboje. Ypač dideli cukraus kiekiai naudojami gėrimuose, batonėliuose, miltinės konditerijos gaminiuose. Didelis cukraus suvartojamas siejamas su sveikatos problemomis: nutukimu, dantų karieso atsiradimu, padidėjusia rizika susirgti II tipo cukriniu diabetu. Siekiant pagaminti mažiau kalorijų ir cukraus turinčius produktus, neprarandant vartotojų pageidaujamo saldaus skonio, nuolat ieškoma naujų saldiklių [1]. Pakeisti cukrų nėra taip paprasta, nes cukrus produktams suteikia ne tik saldų skonį, bet ir padidina produktų tūrį, suteikia pageidaujamą išvaizdą, tekstūrą. Viena iš natūralių saldiklių grupių yra cukraus alkoholiai – polioliai. Polioliai nesukelia karieso, nes jų nemetabolizuoja burnoje esantys mikroorganizmai, taip pat nesukelia padidėjusio cukraus kiekio kraujyje (hiperglikemijos), jie mažiau virškinami ir absorbuojami žarnyne, dėl to turi mažesnę kalorinę vertę [2].

Daugiausia tirti ir naudojami polioliai yra sorbitolis, ksilitolis, maltitolis, eritritolis ir izomaltas. Mažiau populiarius manitolis, tačiau jo paklausa medicinos ir maisto pramonėje nuolat auga. Kasmet suvartojama apytiksliai 150000 t manitolio, kuris sudaro 11 % visų suvartojamų poliolių. Norint patenkinti vis didėjančią paklausą, reikalingi metodai, leidžiantys pagaminti didelį manitolio kiekį [3]. Manitolio gamyba cheminiu būdu yra sudėtinga ir brangi, todėl bandoma pritaikyti biotechnologinį manitolio gamybos procesą, kuriame naudojama fermentacija pieno rūgšties bakterijomis (PRB). PRB naudojamos nuo pat civilizacijos pradžios ruošiant fermentuotus maisto produktus iš pieno, mėsos ir daržovių. Nepaisant jų įprastinių savybių suteikti rūgštumą, aromatą ir tekstūrą, jos taip pat vertinamos kaip greitai augantys natūralūs bioreaktoriai, skirti funkcinių biomolekulių ir maisto priedų gamybai. Panaudojus PRB, gali būti gaminami biotirštiniai, bakteriocinai, vitaminai, bioaktyvūs peptidai ir aminorūgštys. Nors šių bakterijų metabolizmas gana paprastas, riboti biosintezės pajėgumai ir nedidelė genų įvairovė, tokiuose bioreaktoriuose galima nesunkiai gauti didesnius kiekius pageidaujamų produktų lyginant su kitais mikroorganizmais – mielėmis ar mikroskopiniais grybais. Prie didelio PRB metabolitų sąrašo neseniai pridėti mažo kaloringumo saldikliai (manitolis, sorbitolis, eritritolis, ksilitolis), kurie sulaukė didelio mokslininkų, gamintojų ir vartotojų susidomėjimo [4, 5].

PRB fermentacijos metu manitolį gamina iš fruktozės, todėl gamybai sunaudojami dideli fruktozės kiekiai. Siekiant užtikrinti ekonomišką gamybą, ieškoma pigesnių fruktozės šaltinių. Žemės ūkiu bei maisto atliekos dažnai yra vertinga žaliava, kuri gali būti panaudota pridėtinės vertės produktų gamyboje. Duona yra vienas pagrindinių angliavandenių šaltinių daugelio žmonių mityboje. Dėl šiuolaikinių gamybos technologijų ir siekio patenkinti vartotojų poreikius, kiekvieną dieną pagaminami dideli duonos kiekiai. Dėl pakankamai trumpo galiojimo laiko apie trečdalis gaminių išmetama gamybos, transportavimo ar prekybos metu. Tai sudaro vieną didžiausių maisto atliekų dalį daugelyje pasaulio šalių. Nustatyta, kad pasaulyje kasmet išmetama apie 1,2 milijonai tonų duonos. Didžioji dalis atliekų susidaro kepyklose, mažmeninės prekybos metu ir vartotojų namų ūkiuose [6]. Duonos atliekose yra disacharidų (pvz., sacharozės) ir polisacharidų (pvz., krakmolo ir skaidulinių medžiagų polisacharidų), todėl, siekiant išgauti jose esančius cukrus (daugiausia gliukozę ir fruktozę), gali būti panaudojamas fermentinis sucukrinimo procesas. Lyginant su tradiciniais atliekų apdorojimo metodais (kompostavimas, deginimas ir kaupimas sąvartynuose), biokonversija į cukrus yra aplinkai draugiška technologija. Gauti cukrūs gali būti panaudoti kaip atsinaujinanti žaliava biokuro, etanolio, organinių rūgščių, gliukozės-fruktozės sirupų gamybai [7, 8]. Iš duonos atliekų

pagaminto gliukozės-fruktozės sirupo pritaikymas biotechnologinei manitolio gamybai leistų ne tik panaudoti susidariusias duonos atliekas, bet ir pagaminti aukštesnės pridėtinės vertės produktus.

Darbo tikslas – parinkti pieno rūgšties bakterijas ir pritaikyti duonos atliekas kaip terpę manitolio gamybai biotechnologiniu būdu bei įvertinti jo, kaip saldiklio, panaudojimo galimybes miltinės konditerijos kepinų energinei vertei sumažinti.

Darbo tikslui pasiekti sprendžiami šie uždaviniai:

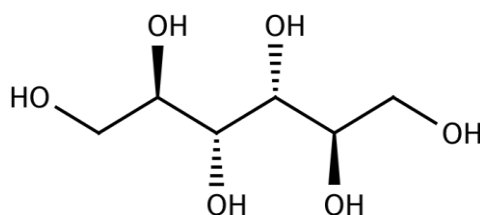
- 1) atrinkti pieno rūgšties bakterijas, pasižyminčias didžiausiu manitolio 2-dehidrogenazės aktyvumu;
- 2) pritaikyti atrinktas pieno rūgšties bakterijas manitolio gamybai fruktozės-gliukozės modelinėje sistemoje ir parinkti gaminančias didžiausią šio poliolio kiekį;
- 3) taikant matematinį eksperimento planavimą, optimizuoti rugių ir kviečių krakmolo hidrolizės bei gliukozės izomerizacijos parametrus gliukozės-fruktozės sirupo gamybai iš duonos atliekų;
- 4) įvertinti iš pusruginės duonos atliekų pagaminto gliukozės-fruktozės sirupo tinkamumą biotechnologinei manitolio gamybai, naudojant parinktas pieno rūgšties bakterijas;
- 5) nustatyti manitolio įtaką plačiai vartojamų miltinės konditerijos kepinų – keksiukų – kokybei ir juslinėms savybėms bei jų pokyčiams laikymo metu.

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Manitolio savybės ir panaudojimas pramonėje

#### 1.1.1. Manitolio fizikinės ir cheminės savybės

D-manitolis (žr. 1 pav.) yra aciklinis 6 anglies atomų cukraus alkoholis. Cheminis pavadinimas pagal IUPAC nomenklatūrą (2R,3R,4R,5R)-heksanas-1,2,3,4,5,6-heksolis. Jo empirinė formulė yra  $C_6H_{14}O_6$  ir molekulinė masė – 182,17 g/mol. Grynas manitolis yra bekvapis, sudaro bespalvius arba baltus adatos ar rombo formos kristalus. Kristalinis manitolis pasižymi mažu higroskopiškumu ir yra chemiškai inertiškas. Saldumas lyginant su sacharoze siekia 50–70 %. Manitolis taip pat pasižymi mažesniu kaloringumu nei daugelis cukrų. Pavyzdžiui, priimta manitolio kalorinė vertė JAV yra 1,6 kcal/g, o Europoje Sąjungoje – 2,4 kcal/g, kai sacharozės – 4 kcal/g. Manitolis, kaip ir kiti polioliai, chemiškai inertiškas ir nedalyvauja Majaro reakcijose [9, 10, 11].



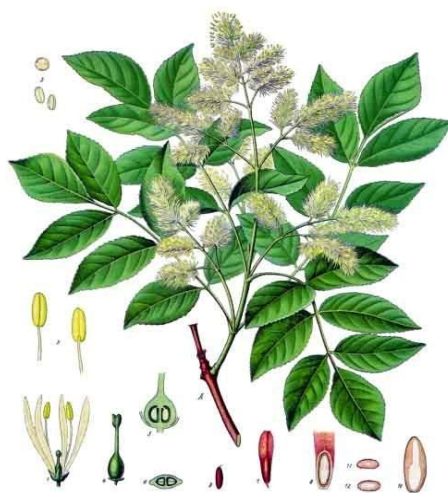
1 pav. D-manitolio struktūra [9]

Šio poliolio tirpumas vandenyje yra gerokai mažesnis nei sorbitolio ir daugumos kitų cukraus alkoholių. Esant 14 °C temperatūrai manitolio tirpumas vandenyje yra tik apie 13 %, o 25 °C temperatūroje – 18 %. Jis mažai tirpus organiniuose tirpikliuose, tokiuose kaip etanolis ir glicerolis, ir praktiškai netirpsta eteriye, ketonuose ir angliavandeniliuose. Lydymosi temperatūra yra 165–168 °C [10, 12].

#### 1.1.2. Manitolio paplitimas

D-manitolis natūraliai randamas gamtoje. Jo mažais kiekiais yra daugumoje vaisių ir daržovių. Paprastai randama tokiuose augaluose kaip moliūgai, salierai, svogūnai, alyvuogės. Optinis izomeras L-manitolis natūraliai gamtoje nėra randamas [13].

Pirmą kartą manitolis buvo išskirtas iš išdžiovinto maninio uosio (lot. *Fraxinus ornus*), nuo kurio ir kilo pavadinimas. Maninis uosis pavaizduotas 2 pav. Mana gaunama kaitinant medžio žievę, jos sudėtyje gali būti iki 50 % manitolio. Mana buvo pramoninis manitolio šaltinis Sicilijoje (Italijoje). Jūrų dumbliai, ypač rudieji dumbliai, taip pat turi daug manitolio (10–20 %). Manitolis dažnai randamas ir įvairių mikroskopinių grybų grybienoje bei šviežiuose grybuose (apie 1 %). Maži kiekiai manitolio yra vyne. Be to, manitolį gamina kai kurios mikroskopinių grybų ir bakterijų rūšys [3, 13].



2 pav. Maninio uosis (*Fraxinus ornus*) [14]

### 1.1.3. Manitolio funkcinės savybės

Mažo kaloringumo saldikliai gali būti suskirstyti į dvi grupes. Pirmoji grupė susideda iš labai intensyvaus saldaus skonio medžiagų, kurios naudojamos nedideliais kiekiais, siekiant pakeisti didelį kiekį cukraus. Tai acesulfamas K, aspartamas, neotamas, sacharinas, sukralozė ir kiti. Šie saldikliai gaminami panaudojant cheminius metodus. Antroji grupė susideda iš cukraus alkoholių – poliolių. Tai sorbitolis, manitolis, ksilitolis, eritritolis, laktitolis, maltitolis. Polioliai turi keletą pranašumų lyginant su cukrumi:

- 1) neskatina dantų ėduonies;
- 2) po vartojimo sukelia mažesnę glikeminę atsaką negu krakmolai ir dauguma cukrų;
- 3) turi mažą kalorinę vertę dėl jų menko virškinimo ir absorbcijos [4].

Manitolis – JAV maisto ir vaistų valdybos (angl. *Food and Drug Administration*) traktuojamas kaip saugus naudoti maisto produktuose, o Europos Sąjungoje turi maisto priedo statusą ir žymimas E421 [3, 4]. Pagal komisijos reglamentą (ES) Nr. 432/2012 [15] dėl tam tikrų leidžiamų vartoti teiginių apie maisto produktų sveikumą, produktus su manitoliumi galima ženklinti tokiais teiginiais: maisto produktų (gėrimų), kuriuose cukrus yra pakeistas manitoliumi, vartojimas sukelia mažesnę gliukozės koncentracijos kraujyje padidėjimą ir padeda palaikyti dantų mineralizaciją. Maisto ir žemės ūkio organizacijos ir Pasaulio sveikatos organizacijos (FAO / PSO) Jungtinis maisto papildų ekspertų komitetas (JECFA) nustatė, kad 50 mg manitolio/kg kūno svorio per dieną yra saugi dozė sveikiems suaugusiems žmonėms [16]. Didelis manitolio kiekis gali sukelti pilvo skausmą, per didelį dujų kiekį (pilvo pūtimą), skystesnes išmatas ar viduriavimą [17].

Manitolis yra vertingas saldiklis, nes yra netoksiškas, nehigroskopiškas ir nesukelia dantų ėduonies. Burnoje tirpstant manitolio kristalams atsiranda vėsinimo pojūtis. Toks efektas naudojamas be cukrų kramtomųjų gumų gamyboje. Duonos ir konditerijos pramonėje manitolis naudojamas tekstūrai ir kokybei gerinti. Manitolis suteikia stabilizuojantį efektą maisto produktams iš dalies imituodamas riebalus [18]. Jis gali pratęsti produkto galiojimo laiką sumažindamas cukrų kristalizaciją, stabdydamas žiedėjimo procesus ir išlaikydamas drėgmę. S. Bhise ir A. Kaur [19] tyrė duonos, pagamintos keičiant 4 % cukraus nuo miltų masės manitoliumi, tinkamumo vartoti terminą. Lyginant su kontroliniu kepiniumi, po 10 dienų duonoje su manitoliumi vandens aktyvumas buvo mažesnis, drėgmės

kiekis ir bendras priimtinumas – didesnis. Tyrimo metu nustatyta, kad į duonos receptūrą įtraukus manitolį, jos tinkamumo vartoti terminas gali būti pailgintas nuo 4 iki 10 dienų. A. W. Sahin et al. [20] tyrė 3, 5 ir 10 % ksilitolio, maltitolio ir manitolio panaudojimo galimybes bandelių gamyboje. Bandelės su manitoliumi pasižymėjo geriausiomis tekstūros ir juslinėmis savybėmis, lyginant su kitais tirtais cukraus pakaitalais.

Atlikti tyrimai rodo, kad kepiniai su nedideliu manitolio kiekiu pasižymi gera kokybe ir vartotojui priimtinomis juslinėmis savybėmis, tačiau viso cukraus pakeitimas manitoliumi daro neigiamą įtaką. V. Psimouli'is ir V. Oreopoulou [21] tyrė pyrago tešlą su įvairiais saldikliais reologines savybes. Nustatyta, kad pyrago tešla, kurioje visas cukrus pakeistas manitoliumi, pasižymėjo tirščiausia konsistencija. Manitolis taip pat pažemino krakmolo kleisterizacijos temperatūrą, kuri lėmė ankstyvą kepinio struktūros susiformavimą. Tokia struktūra slopino oro burbuliukų susidarymą ir sumažino pyrago iškilimo laipsnį. F. Ronda et al. [22] nustatė, kad pakeitus visą cukrų manitoliumi gaunami šviesesnės spalvos, mažesnio tūrio, kietesni, prastesnės išvaizdos, mažiau saldūs ir mažiau priimtini vartotojams biskvitiniai pyragai.

Šis poliolis tik dalinai metabolizuojamas žmogaus organizme ir nesukelia hiperglikemijos (glikeminis indeksas 0), todėl naudinga diabetu sergantiems žmonėms. Apie 75 % suvartoto manitolio sufermentuojamas žarnyno mikroorganizmų, o likusi dalis absorbuojama ir išsiskiria su šlapimu [23]. Manitolis gali būti maišomas su kitais ingredientais ir saldikliais, kas gali suteikti sinergistinę poveikį skonio ir saldumo intensyvumui. Maisto pramonėje dažnai naudojamas šokolado skonio glaistų, skirtų ledams ir saldainiams, gamyboje. Dėl neturėjimo higroskopinių savybių jis taip pat naudojamas gaminių paviršiams apibarstyti siekiant išvengti jų prilipimo prie įrangos ir pakuočių [17].

Polioliai ląstelėse atlieka apsauginę funkciją. Jų veikimas dar nėra iki galo išaiškintas. Buvo pasiūlytos trys apsaugos mechanizmo hipotezės:

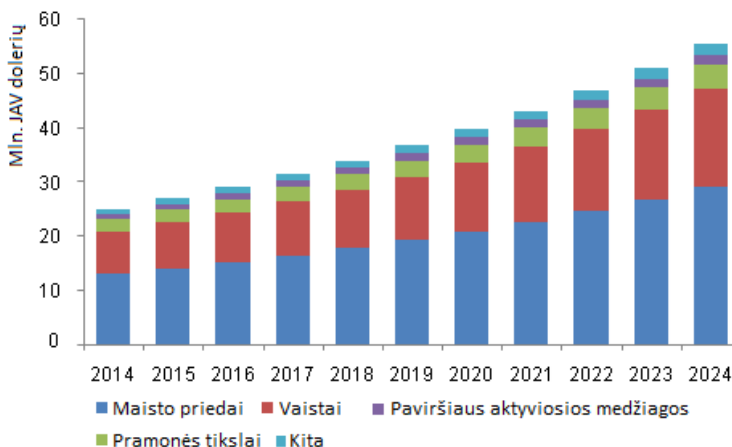
- 1) turgoro palaikymas (esant mažam vandens aktyvumui ląstelės sienelės turgoras atkuriamas dėl susikaupusio manitolio);
- 2) membranos lipidų ir baltymų stabilizavimas esant mažam vandens aktyvumui;
- 3) apsauga nuo oksidacinio streso, pašalinant laisvuosius reaktyvius deguonies radikalus. Manitolis turi antioksidacinių savybių, gali veiksmingai sujungti hidroksilo radikalus ir apsaugoti nuo gaubtinės žarnos vėžio vystymosi [11].

Manitolis plačiai naudojamas ne tik maisto, bet ir farmacijos, medicinos, chemijos pramonėse. Jis priskiriamas osmosiniams diuretikams. Medicinoje naudojamas siekiant paskatinti šlapimo susidarymą, kad būtų išvengta ūminio inkstų nepakankamumo ir pašalintos toksinės medžiagos iš organizmo. Manitolis taip pat naudojamas galvos smegenų edemai (padidėjusiam smegenų vandens kiekiui) ir akispūdžiui sumažinti. Jis vartojamas glomerulų filtravimo osmosiniam slėgiui keisti gydant inkstų sutrikimus. Farmacijos pramonėje pritaikomas kramtomųjų tablečių ir granuliuotų miltelių gamyboje. Jo saldus vėsinantis skonis panaudojamas karčiam vitaminų, mineralų, vaistų skoniui maskuoti [18]. Vienas didžiausių manitolio privalumų tablečių gamyboje yra jo cheminis inertiškumas. Šis poliolis yra stabilus ir nereaguoja su kitais ingredientais. Kiti tablečių ingredientai, pavyzdžiui, laktozė ir dekstrozė, sumaišyti su laisvąją amino grupę turinčiomis medžiagomis, dalyvauja Majaro reakcijose. Šios reakcijos produktai suteikia nepageidaujamą spalvą. Aukšta manitolio lydymosi temperatūra (165–168 °C) užtikrina, kad spalva išliks nepakitusi [24].

### 1.1.4. Manitolio rinka

Dėl didėjančio mažo kaloringumo saldiklių naudojimo prognozuojamas manitolio rinkos augimas 2015–2024 m. Pagrindiniai manitolio rinkos augimo veiksniai yra didėjanti paklausa kepyklose ir konditerijos pramonėje. Manitolio paklausa taip pat didėja dėl jo vartojimo vietoj cukraus diabetu sergantiems žmonėms skirtuose maisto produktuose.

2008 m. „Aldrich“ kataloge manitolio kaina už kilogramą buvo apie 79 JAV dolerius [25], 2011 m. „Sigma“ kataloge manitolis (M4125, D-manitolis 98 % grynumo) kainavo apie 42 [26], o šiuo metu – 58 JAV dolerius. 2015 m. pasaulinė manitolio rinka buvo įvertinta 209,4 mln. JAV dolerių. Dėl kintančių mitybos tendencijų ir vartojimo įpročių didėja becukrės kramtomosios gumos gamybos mastai. Žmonių populiacijos didėjimas, gyvenimo būdo pokyčiai ir kai kurių ligų dažnėjimas turi teigiamą įtaką manitolio rinkai. JAV manitolio, kaip maisto priedo, naudojimas sudaro virš 35 % visų sričių ir prognozuojamas vis didėjantis augimas (žr. 3 pav.). 2015 m. Azijos regione manitolio rinka sudarė daugiau nei pusę pasaulinės rinkos ir vis dar yra rinkos lyderė. Kinijoje, Japonijoje ir Indijoje ypač pastebimas didėjantis žmonių sergančių diabetu skaičius, todėl manoma, kad manitolio paklausa vis augs ir iki 2024 m. pasieks 418,3 mln. JAV dolerių [27].



3 pav. Numatomas manitolio rinkos augimas pagal sritis JAV [27]

## 1.2. Manitolio gamyba

### 1.2.1. Cheminis hidrinimas

Manitolis pramoniniu būdu gaminamas hidrinant fruktozės-gliukozės vandeninio tirpalo mišinį aukštame slėgyje (100–150 bar), 120–160 °C temperatūroje, su Renėjaus nikelio katalizatoriumi ir vandenilio dujomis. Vykstant šiai reakcijai galimos dvi hidroksilo grupės, esančios prie antrojo fruktozės molekulės anglies atomo, orientacijos.  $\alpha$ -Fruktozė paverčiama manitoliu,  $\beta$ -fruktozė – sorbitoliu ir gaunami vienodi abiejų junginių kiekiai. pH pakeitimas į šarminę pusę šiek tiek padidina manitolio išeią. Reakcijos metu gliukozė verčiama tik sorbitoliu. Dėl mažo nikelio katalizatoriaus selektyvumo, iš 50:50 fruktozės ir gliukozės mišinio gaunama apytiksliai 25:75 manitolio ir sorbitolio mišinio. Atskirti manitolį nuo sorbitolio gana sunku. Perskyrimas dar labiau padidina gamybos kaštus ir sumažina išeią. Jei sacharozė naudojama kaip pradinė medžiaga ir hidrinimas atliekamas esant šarminiam pH, manitolio gali būti gaunama iki 31 %. Grynos fruktozės hidrinimo metu gaunama manitolio išeią – 48–50 % [28].

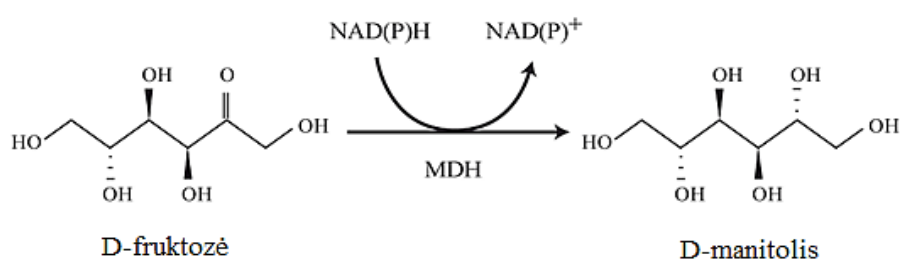


Kraskmolai yra pigesnė žaliava nei cukrus, tačiau šiuo atveju manitolio gamybos procesas yra sudėtingesnis. Pirmajame etape hidrolizuojant kraskmolą gaunamas 94–96 % dekstrozės sirupas, kuris izomerizuojamas naudojant imobilizuotą gliukozės izomerazės fermentą. Tokiu būdu gaunamas sirupas, kuriame yra apie 42 % fruktozės. Hidrinant šį sirupą didžiausia galima manitolio išeiga siekia tik 21–22 %, todėl prieš tai naudojamas chromatografinis gryninimo etapas ir fruktozės kiekis sukonzentruojamas iki 90–95 % [29].

F. Devos'as [30] pasiūlė fruktozės sirupą, turintį mažiau nei 15 % gliukozės, izomerizuoti su manozės izomeraze iki fruktozės-manozės-gliukozės sirupo. Po chromatografinio atskyrimo manozės frakciją, turinčią didelius fruktozės kiekius, panaudojo hidrinimui. Iš manozės buvo gautas manitolis, o iš fruktozės – manitolio ir sorbitolio mišinys. Fruktozės frakcija buvo sukaupta izomerizacijos kolonėlės viršuje ir iš naujo panaudota procese. Jei naudojama gryna fruktozė, manitolio išeiga gali siekti iki 70 %, tačiau procesas yra sudėtingas, fruktozės frakciją reikia perdirbti kelis kartus, o manitolį išgryninti. Be to, manozės izomerazė nėra komerciškai gaunama.

### 1.2.2. Fermentinė gamyba

Manitolis gali būti gaminamas panaudojant fermentus. D-fruktozės redukcijai į manitolį reikalingas nuo redukuoto nikotinamido adenino dinukleotido (fosfato) (NAD(P)H) priklausomas fermentas manitolio 2-dehidrogenazė (MDH) [31]. MDH pagal tarptautinę biochemijos ir molekulinės biologijos sąjungos (IUBMB) nomenklatūrą žymima EC 1.1.1.67. Fermentu katalizuojamos reakcijos lygtis pavaizduota 4 pav.



4 pav. Fruktozės vertimas manitoliumi katalizuojant manitolio 2-dehidrogenazei [31]

MDH fermentas buvo išskirtas iš *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Torulaspora delbrückii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Caloglossa leprieurii*, *Aspergillus parasitius*, *Zymomonas mobilis*, *Gluconobacter suboxydans* [32]. Manitolio gamyba fermentais pramonėje nėra taikoma dėl reakciją ribojančio MDH kofaktoriaus. NADH ir ypač NADPH yra labai brangūs, todėl tokio proceso panaudojimas nėra praktiškas [11]. Kofaktorių gali būti regeneruoti panaudojant metano rūgšties dehidrogenazę arba gliukozės dehidrogenazę, tačiau praktikoje vis dar išlieka keletas problemų: fermentų atskyrimas nuo produktų, naudojant specialias membranas, susidariusių produktų atskyrimas ir stipri MDH inhibicija susidariusiais produktais [32].

### 1.2.3. Mikrobinė gamyba

Cheminiai ir fermentiniai procesai reikalauja specialių sąlygų ir brangiai kainuojančių chromatografinių gryninimo etapų, be to, gaunamos mažos galutinio produkto išeigos. Dėl šių trūkumų siekiama pritaikyti biotechnologinę manitolio gamybą. Biotechnologinė gamyba, pagrįsta

mikrobine fermentacija, yra saugesnis ir aplinkai draugiškesnis procesas. Nustatyta, kad kai kurios mielės, mikroskopiniai grybai ir bakterijos gamina manitolį.

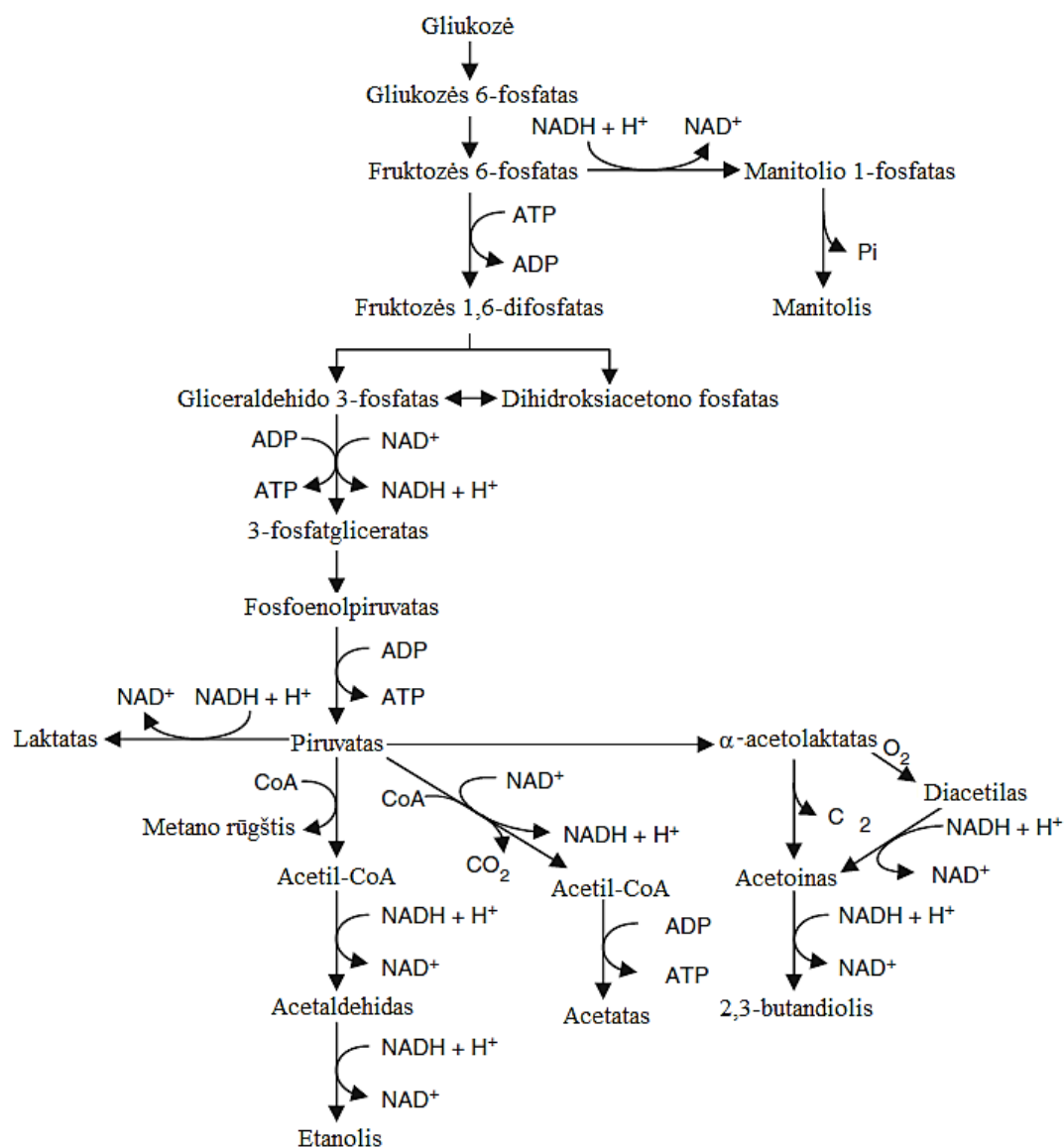
Mielės gali gaminti įvairius cukraus alkoholius. *Torulopsis versatilis* ir *T. anomala* gali gaminti manitolį iš įvairių anglių šaltinių: gliukozės, fruktozės, manozės, galaktozės, maltozės, glicerolio ir ksilitolio. *Torulopsis mannifaciens* gamina manitolį iš gliukozės ir glicerolio. *Zygosaccharomyces rouxii* iš gliukozės gamina etanolį, glicerolį, arabitolį ir manitolį. *Candida magnoliae* buvo atrinkta kaip manitolį gaminanti mielių rūšis tiriant daugiau kaip 1000 mikroorganizmų. *C. lipolytica* produkuoja manitolį kaip pagrindinį cukraus alkoholį. Nustatyta, kad *C. petrovorus*, *C. aliphatica* ir *C. zeylanoides* taip pat išskiria manitolį [32, 33, 34].

Kai kurios mikroskopinių grybų rūšys terpėje esant angliavandeniams taip pat išskiria manitolį kaip savo veiklos produktą. *Aspergillus candidus* gamina manitolį iš gliukozės. Gliukozė pirmiausiai paverčiama fruktozės 6-fosfatu ir redukuojama iki manitolio 1-fosfato esant NADH, po to specifinės fosfatazės hidrolizuojamas iki manitolio. *Penicillium* genties mikroskopiniai grybai produkuoja manitolį ir glicerolį terpėje esant sacharozės [34]. I. El-Kady et al. [35] *Aspergillus*, *Eurotium* ir *Fennellia* priskyrė didžiausią manitolio kiekį gaminančioms mikroskopinių grybų gentims.

Nors mielės ir mikroskopiniai grybai gali gaminti manitolį, tačiau jų produktyvumas yra per mažas, kad būtų pritaikytas pramoninei gamybai. Dauguma šių mikroorganizmų pagamintą manitolį greitai sunaudoja, todėl gamybos procesą sunku kontroliuoti. Produktų gryninimą, ypač fermentuojant mielėmis, gali apsunkinti terpėje esančios didelės glicerolio koncentracijos. Be to, šių mikroorganizmų tinkamumas maisto pramonei yra abejotinas [32].

Pieno rūgšties bakterijos (PRB) yra plačiausia žinoma bakterijų grupė gaminanti manitolį. Jos taip pat turi ilgą ir saugią vartojimo istoriją fermentuotų maisto produktų ir gėrimų gamyboje. Nustatyta, kad keletas homofermentinių PRB gamina nedidelius kiekius intraląstelinio manitolio. Daugiau žadanti strategija – heterofermentinių PRB panaudojimas. Šios bakterijos turi fermentą MDH, kuris katalizuoja fruktozės konversiją į manitolį [4].

Homofermentinės ir heterofermentinės PRB turi skirtingus heksozės metabolizmo būdus [13, 36]. Kai kurios homofermentinės PRB (*Streptococcus mutants* ir *Lactobacillus leichmanii*) gamina nedidelius manitolio kiekius iš gliukozės. Gliukozės metabolizmas ir manitolio gamyba pavaizduota 5 pav. Homofermentinėms PRB priklauso *Lactobacillus* I ir II grupės bakterijos, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* ir *Vagococcus* rūšių bakterijos. Šios bakterijos fermentuoja heksozes vykstant glikolizei pagal Embden-Meyerhof-Parnas schemą. Iš gliukozės susidaro fruktozės 1,6-difosfatas, kurį aldolazė suskaldo į gliceraldehido 3-fosfatą ir dihidroksiacetono fosfatą. Toliau susidaro piruvatas, o iš jo – pieno rūgštis. Esant tam tikroms sąlygoms, glikolizės metu gali susidaryti tokie galutiniai produktai kaip acetatas, etanolis, diacetilas, acetoinas, 2,3-butandiolis ir kai kuriais atvejais – manitolis. Manitolio biosintezė prasideda susidarant tarpiniam junginiui – fruktozės 6-fosfatui. Šis redukuojamas ir, katalizuojant manitolio fosfatazei, verčiamas į manitolį [11, 37].

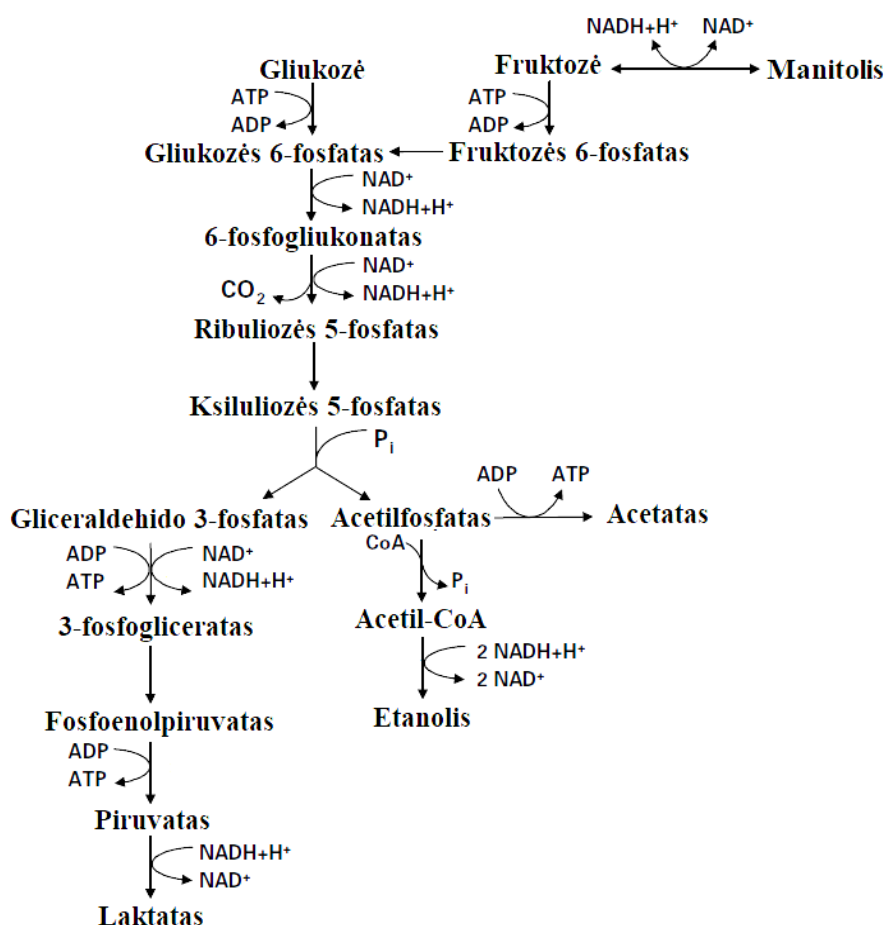


5 pav. Homofermentinių PRB metabolizmas [11]

A. R. Neves et al. [38] nustatė, kad homofermentinėse PRB trūkstant L- ir D-laktato dehidrogenazės (LDH), jos gamina manitolį kaip galutinį gliukozės katabolizmo produktą. Didelės manitolio išeigos, panaudojant šių rūšių PRB, buvo pasiektos taikant įvairias genų inžinerijos strategijas. Sustiprinta dviejų genų, koduojančių manitolio 1-fosfato dehidrogenazę ir manitolio 1-fosfatazę, ekspresija leido pasiekti žymiai didesnes manitolio išeigas (0,27 g manitolio/g gliukozės) lyginant su nemodifikuota paderme (<0,003 g manitolio/g gliukozės) [13]. Kadangi homofermentinės PRB pasibaigus gliukozei gali pagamintą manitolį panaudoti kaip anglies šaltinį, ieškoma būdų kaip to išvengti [18]. P. Gaspar et al. [39] pašalino genus, atsakingus už manitolio transportavimą, tai padidino manitolio išeigą iki 0,33 g manitolio/g gliukozės. LDH geno panaikinimas dar labiau padidino manitolio išeigą – iki 0,42 g manitolio/g gliukozės.

Heterofermentinėms PRB priklauso *Leuconostoc*, *Oenococcus* ir *Lactobacillus* III grupė (obligatinės heterofermentinės). Jos fermentuoja heksozes kombinuotu 6-fosfogliukonato ir fosfoketolazės būdu. Tam tikros heterofermentinės PRB gamina manitolį tiesiogiai iš D-fruktozės. Be manitolio šios bakterijos gali gaminti pieno rūgštį, acto rūgštį, anglies dioksidą ir etanolį. Heterofermentinių bakterijų metabolizmas ir manitolio gamyba pavaizduota 6 pav. Procesas paremtas PRB savybe

panaudoti fruktozę kaip elektronų akceptorių ir redukuoti ją į manitolį. Šią reakciją katalizuoja MDH fermentas [28].



6 pav. Heterofermentinių PRB metabolizmas [11]

B. C. Saha ir L. K. Nakamura [40] nustatė, kad 9 heterofermentinių PRB padermės (*L. brevis* B-1836, *L. buchneri* B-1860, *L. cellobiosus* B-1840, *L. fermentum* B-1915, *L. intermedius* B-3693, *Leu. amelilibiosum* B-742, *Leu. Citrovorum* B-1147, *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* B-1120 ir *Leu. paramesenteroides* B-3471) gamina manitolį iš fruktozės. Iš jų *L. intermedius* B-3693 buvo atrinkta kaip perspektyviausia PRB manitolio gamybai. Fermentuojant 37 °C temperatūroje ir palaikant pH 5,0, per 136 h iš 300 g/l fruktozės gauta 198 g/l manitolio. Fermentacijos laikas gali būti sutrumpintas nuo 136 iki 92 h, panaudojant periodinį su pamaitinimu (angl. *fed-batch*) procesą. W. Soetaert'as et al. [41] tyrė periodinį su pamaitinimu procesą manitolio ir pieno rūgšties gamybai su *Leu. pseudomesenteroides*. Po 24 h fermentacijos manitolio koncentracija siekė 90 g/l, o fruktozės konversijos efektyvumas buvo 94 %.

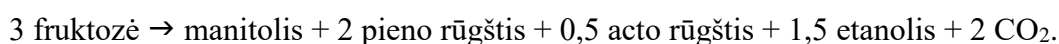
Nustatyta, kad trečdalis fruktozės gali būti pakeista kitais substratais: gliukoze, maltoze, manoze, galaktoze, krakmolu su gliukoamilaze. Du trečdaliai fruktozės taip pat gali būti pakeisti sacharoze. Terpėje esant fruktozės-gliukožės santykiui 2:1, lyginant su fermentacija esant tik fruktozei, PRB pagamina labai panašius manitolio, pieno ir acto rūgšties kiekius. Šiuo atveju gliukožė paverčiama pieno ir acto rūgštimis, o fruktozė – manitoliumi [40]. G. J. Grobber'as et al. [42] nustatė, kad *Leu. pseudomesenteroides* gamina manitolį terpėje esant fruktozės. Manitolį gaminanti padermė nuo negaminančios skyrėsi dviem fiziologiniais aspektais: MDH aktyvumu ir gebėjimu tuo pačiu metu naudoti fruktozę ir gliukožę. B. C. Saha [43] tyrė inulino kaip substrato panaudojimą manitolio

gamybai su *L. intermedius* B-3693. Inulinas yra homopolisacharidas, sudarytas iš D-fruktopiranozės liekanų, sujungtų β-2,1-glikozidiniu ryšiu, redukuojančiame gale turintis gliukozės liekaną. Po 72 h fermentacijos iš 300 g/l inulino, sucukrinto inulinaze, buvo gauta 207 g/l manitolio. Fermentacijos laikas gali būti sutrumpintas nuo 72 iki 62 h, panaudojant fruktozės ir inulino mišinį santykiu 1:1. B. C. Saha [44] taip pat nustatė, kad panaudojus melasos ir fruktozės sirupą santykiu 1:1 *L. intermedius* B-3693 pagamina 104,4 g/l manitolio. Tokiame sirupe fruktozės kiekis yra apie 120 g/l, gliukozės – 30 g/l (fruktozės-gliukozės santykis 4:1). J. W. Yun'as ir D. H. Kim'as [45] išskyrė *Lactobacillus* sp. Y-107 ir *Leuconostoc* sp. Y-002 iš *kimchi* (korėjiečių fermentuoto maisto produkto). Šios padermės manitolio gamybai kaip substratą naudojo fruktozę ir sacharozę. Didžiausias manitolio kiekis, gautas fermentuojant *Lactobacillus* sp. Y-107 ir *Leuconostoc* sp. Y-002, buvo atitinkamai 73 ir 26 g/l iš 100 g/l fruktozės, o išeiga 86 ir 65 % nuo sunaudotos fruktozės. N. von Weymarn'as et al. [46] tyrė manitolio gamybą 8 heterofermentinėmis PRB (*L. brevis* ATCC-8287, *L. buchneri* TKK-1051, *L. fermentum* B-1932, *L. sanfranciscensis* E-93491, *Lactobacillus* sp. (B001) BP-3158, *Leu. mesenteroides* ATCC-9135, *Leu. pseudomesenteroides* ATCC-12291 ir *O. oeni* E-9762). Nustatyta, kad tinkamiausia manitolio gamybai *L. fermentum*. Iš fruktozės (20 g/l) ir gliukozės (10 g/l) mišinio gautos manitolio išeigos buvo 86, 89 ir 94 mol % atitinkamai fermentuojant esant 25, 30 ir 35 °C temperatūrai. Vėlesniuose N. von Weymarn'o et al. [47] tyrimuose su *Leu. mesenteroides* ATCC-9135 buvo nustatyta, kad didinant fruktozės koncentraciją terpėje nuo 100 iki 120 ir 140 g/l, manitolio išeiga mažėja dėl didelių substrato ir galutinio produkto koncentracijų. C. Fontes et al. [48] tyrė manitolio gamybą iš anakardžių vaisių sulčių, kurių sudėtyje buvo 50 g/l redukuojančių cukrų, tarp jų 28 g/l fruktozės. Fermentuojant su *Leu. mesenteroides* B-512F susidarė 18 g/l manitolio, o fruktozės konversija siekė 67 %. F. Carvalheiro et al. [49] tyrė 8 manitolį gaminančias PRB (*Leu. citreum* ATCC 49370, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* ATCC19254, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* ATCC 19255, *L. ficulneum* NRRL B-23447, *L. fructosum* NRRL B-2041, *L. lactis* ATCC 19256, *Lactobacillus intermedius* NRRL 3692 ir *L. Reuteri* DSM 20016) saldžiųjų ceratonijų sirupo terpėje. Sirupo cukrų, kuriuos sudarė fruktozė, gliukozė, sacharozė ir pinitolis, koncentracija buvo apie 200 g/l. *L. fructosum* NRRL B-2041 išsiskyrė didžiausiu pagamintu manitolio kiekiu (43,7 g/l), o konversijos iš fruktozės į manitolį efektyvumas siekė 100 %. M. E. Ortiz et al. [50] kaip pigų anglies šaltinį manitolio gamybai su *L. reuteri* CRL 1101 panaudojo cukranendrių melasą. Didžiausia manitolio koncentracija (38,4 g/l) po 24 h buvo gauta panaudojus 7,5 % melasos sirupo. Manitolio gamybai naudojamų PRB suvestinė pateikta 1 lentelėje.

Jei kaip anglies šaltinis naudojama tik fruktozė, ji reakcijoje dalyvauja tiek kaip substratas, tiek kaip elektronų akceptorius. Proceso metu trečdalis fruktozės oksiduojama į pieno ir acto rūgštis. Tada teorinė konversijos lygtis yra [11]:

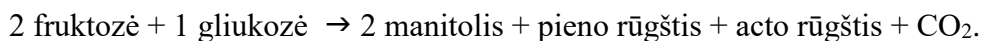


H. Erten'as [51] nustatė mažesnę manitolio išeigą fermentuojant su *Leu. mesenteroides*. Šiuo atveju lygtis yra:



Fruktozė yra daug brangesnė už gliukozę, todėl gliukozės kaip anglies šaltinio panaudojimas manitolio gamybai yra ekonomiškė variantas. Šiuo atveju fruktozė verčiama tik į manitolį. Buvo nustatyta, kad manitolio gamybai panaudojant fruktozės-gliukozės mišinį, kurio santykis 2:1,

apytiksliai 1 mol gliukozės verčiamas į CO<sub>2</sub>, pieno ir acto rūgštį, o 2 mol fruktozės – į manitolį. Konversijos lygtis [11]:



**1 lentelė.** PRB panaudojimas manitolio gamybai

Mikroorganizmas	Substratas (g/l)	Manitolis (g/l)	Šaltinis
<i>Lactobacillus</i> sp. Y-107	F (100)	73	J. W. Yun ir D. H. Kim [45]
<i>Lactobacillus reuteri</i> CRL 1101	S (65) + F (6) + G (4)	38	M. E. Ortiz et al. [50]
<i>Lactobacillus intermedius</i> B-3693	F (300)	198	B. C. Saha ir L. K. Nakamura [40]
	I (300)	207	B. C. Saha [43]
	F (120) + G (30)	104	B. C. Saha [44]
	F (250)	161	B. C. Saha ir F. M. Racine [52]
<i>Lactobacillus fermentum</i> B-1932	F (100) + G (50)	90	N. von Weymarn et al. [46]
<i>Leuconostoc</i> sp. Y-002	F (100)	26	J. W. Yun ir D. H. Kim [45]
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	F (100) + G (50)	90	W. Soetaert et al. [41]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC-9135	F (100) + G (50)	91	N. von Weymarn et al. [47]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F	F (28) + G (21)	18	C. Fontes et al. [48]
<i>Leuconostoc fructosum</i> B-2041	F (45) + G (48) + S (6) + pinitolis (8)	44	F. Carvalheiro et al. [49]

F – fruktozė, G – gliukozė, I – inulinas, S – sacharozė

Fermentacijos metu susidariusios organinės rūgštys mažina terpės pH ir stabdo manitolio susidarymą, todėl jos turi būti neutralizuotos. Paprastai pH palaikymui naudojamas NaOH [53]. Manitolio gamyboje iš fruktozės-gliukozės mišinio kaip maistinių medžiagų šaltinis PRB dauginimuisi dažniausiai naudojamas MRS terpės priedas. Brangiausi komponentai šioje terpėje yra bakteriologinis peptonas ir mielių ekstraktas. Siekiant sumažinti manitolio gamybos kainą, ieškoma ekonomiškesnių azoto ir kitų maistinių medžiagų šaltinių. B. C. Saha [54] atlikti tyrimai įrodė, kad kukurūzų ekstraktas (CSL) kartu su sojų peptonu yra geras azoto, vitaminų ir mineralų šaltinis, kuriuo gali būti pakeisti šie MRS terpės komponentai. Kai kurie metalų jonai yra būtini norint užtikrinti efektyvią manitolio gamybą. Manganas yra laktato dehidrogenazės ir kai kurių fermentų, dalyvaujančių gliceraldehido 3-fosfato konversijoje į piruvatą, kofaktorius. Magnis yra fruktokinazės, fosfoketolazės ir acetatkinazės kofaktorius, užtikrinantis didžiausią manitolio išeią. Šie metalų jonai svarbūs fruktozės transportavimui ir redukcijai [3]. B. C. Saha [55] tyrė druskų (amonio citrato, natrio fosfato, magnio sulfato ir mangano sulfato) įtaką manitolio fermentacijai su *L. intermedius*. Nustatyta, kad tik mangano sulfatas yra svarbus komponentas, padidinantis manitolio išeią.

Siekiant gauti dar didesnes manitolio išeiąs pasitelkiami genų inžinerijos metodai. Bandoma kurti naujas padermes, kurios gamintų didelį manitolio kiekį arba negamintų šalutinių produktų [56]. N. von Weymarn'as [32] panaudojo LDH inaktyvaciją *Lactobacillus fermentum* bakterijose. Po inaktyvacijos manitolio išeią padidėjo nuo 60 iki 68 %. M. Papagianni ir M. Legisa [56] nustatė,

kad manitolio išeiga padidėja nuo 10 iki 56 g/l į *Lactobacillus reuteri* įterpiant sutrumpintą 6-fosfofrukto-1-kinazę koduojančio geno versiją iš *Aspergillus niger*. M. Helanto et al. [57] cheminės mutagenezės būdu sukūrė *Leu. pseudomesenteroides* padermes, neturinčias fruktokinazės aktyvumo. Daugiausiai žadanti buvo BPT143 padermė, turinti tik 10 % pradinio fruktokinazės aktyvumo. Ši padermė greičiau augo ir gamino mažiau šalutinių produktų (rūgščių, CO<sub>2</sub>, etanolio) ir didesnis kiekis fruktozės buvo verčiamas manitolium. Manitolio išeiga padidėjo nuo 74 iki 86 mol %.

Biotechnologinė manitolio gamyba turi keletą privalumų lyginant su cheminiu būdu. Visų pirma, D-fruktozė visiškai paverčiama į D-manitolį ir proceso metu nesusidaro sorbitolis. Taip pat yra gana paprastos gamybos sąlygos (nenaudojamas didelis slėgis, aukšta temperatūra) ir nereikia labai gerai išgrynintų substratų. Manitolio gamyba heterofermentinėmis bakterijomis pagrįsta jų gebėjimu naudoti D-fruktozę kaip alternatyvų elektronų akceptorių ir paversti jį D-manitolium vienos pakopos fermentinės reakcijos metu, katalizuojant MDH. Pasitelkiant biotechnologinius metodus, siekiama padidinti manitolio išeigą sumažinant šalutinių produktų, pieno ir acto rūgšties, susidarymą ir palengvinant NADH, kuris reikalingas fruktozės-6-fosfato vertimui į manitolį, regeneraciją. Pagamintas manitolis gali būti sunaudojamas kaip anglies šaltinis, todėl manitolio asimiliacijos prevencija padidintų susidariusio manitolio kiekį [13].

#### 1.2.4. Manitolio gryninimas

Pasibaigus fermentacijai terpėje lieka PRB ląstelės, nesunaudotos maistinės medžiagos, įvairūs fermentacijos produktai: manitolis, pieno ir acto rūgštis, CO<sub>2</sub>, etanolis. Manitolis gali būti išgrynintas iš fermentacijos terpės kristalizacijos būdu. W. Soetaert'as et al. [53] manitolio gryninimui pasiūlė tokią schemą:

- 1) PRB ląstelės pašalinamos centrifuguojant (500 rpm, 30 min), taip gaunamas skaidrus, gelsvas arba šviesiai rudas supernatantas;
- 2) supernatantas išgarinamas rotaciniu garintuvu ir manitolis sukonzentruojamas iki 250 g/l;
- 3) sukonzentruotas tirpalas maišant atvėsina iki 20 °C;
- 4) į atvėsusį tirpalą įberiamas kristalinis manitolis siekiant sužadinti kristalizaciją;
- 5) tirpalas nuolat maišant vėsina iki 0–5 °C ir išlaikomas apie 15 h. Vėstant tirpalui iškrenta smulkūs, balti, adatos formos manitolio kristalai;
- 6) maždaug po 24 h nuo kristalizacijos pradžios kristalai gali būti atskirti nuo tirpalo vakuumine filtracija. Siekiant pašalinti priemaišas, manitolio kristalai perplaunami šaltu etanolium ir išdžiovinami vakuume kambario temperatūroje.

Vietoj filtravimo manitolio kristalų atskyrimui gali būti taikomas centrifugavimas. Manitolio kristalų išeiga gali siekti maždaug 40 %, priklausomai nuo manitolio kiekio tirpale. Tinkamai parinkus sąlygas, tokiu metodu gautas manitolio grynumas yra apie 99 %. Didesnės manitolio išeigos gali būti gautos pirmiausia iš fermentacijos terpės pašalinant organines rūgštis elektrodializės būdu, vėliau sukonzentruojant garinant ir aušinant.

N. von Weymarn'as et al. [58], tirdami manitolio atskyrimo nuo fermentacijos terpės ir gryninimo procesą, nustatė koreliacinį ryšį tarp aušinimo greičio ir kristalų grynumo. Aušinant 10 ir 2 °C/h greičiu, išskirto manitolio grynumas buvo atitinkamai 81,8 ir 98,6 %. Didesniam grynumui, kuris buvo pasiektas aušinant lėtesniu greičiu, galėjo turėti įtakos susidarę didesni manitolio kristalai, kurie palengvino kristalų atskyrimo nuo tirpalo procesą. Aušinimo greitis neturėjo įtakos manitolio išeigai.

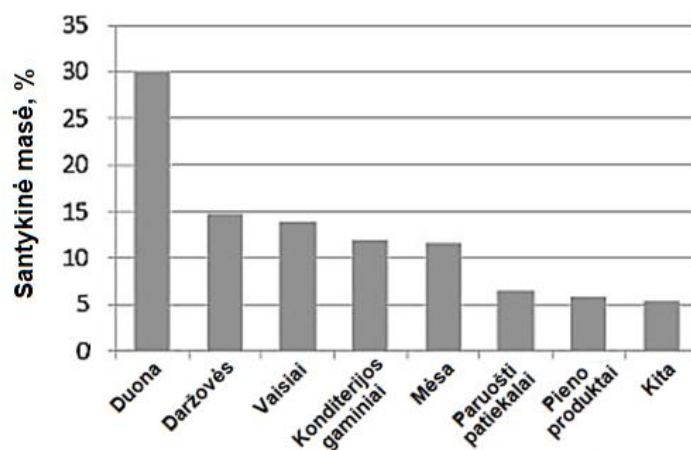
Manitolio koncentracijos didinimas tirpale nuo 200 iki 300 g/l padidino tiek išeią (nuo 47,6 iki 64,4 %), tiek grynumą (nuo 63,5 iki 97,9 %). M. Slatner'is et al. [59] nustatė, kad fermentiniu būdu pagamintas manitolis iš fermentacijos terpės gali būti išgrynintas pirmiausiai ultrafiltracija pašalinant fermentus. Gautas permeatas garinant buvo sukonzentruotas maždaug iki pusės pradinio tūrio ir manitolis iškristalizuotas 4 °C temperatūroje pridėjus izopropanolio. Po centrifugavimo likęs alkoholis iš manitolio kristalų išgarintas kambario temperatūroje. Tokiu būdu gautas manitolis, kurio grynumas ne mažesnis kaip 97 %.

### **1.3. Duonos atliekų perdirbimas į aukštesnės vertės produktus**

Maisto atliekų susidarymas yra viena iš dabartinių pasaulinių aplinkosaugos problemų (klimato kaita ir gamtinių išteklių išsekimas). Maždaug trečdalis visų žmonių maistui skirtų produktų yra prarandama dėl įvairių priežasčių. Maisto atliekos susidaro visuose etapuose – nuo gamybos iki perdirbimo, paskirstymo ir galutinio vartojimo [60]. Duona yra kasdieninio vartojimo produktas daugelyje pasaulio šalių. Dėl didelių produkcijos mastų ir trumpo tinkamumo vartoti termino susidaro dideli kiekiai duonos atliekų. Atlikti tyrimai rodo, kad Europos Sąjungoje duonos atliekos sudaro daugiau nei 7 % visos pagaminamos produkcijos, maždaug 1,3 mln. tonų per metus [61]. Remiantis tyrimų duomenimis, Jungtinėje Karalystėje išmetama 407000 tonų duonos atliekų kiekvienais metais, kas sudaro apie 15 % visos duonos produkcijos [62]. P. Brancoli'io et. al. [63] atlikti tyrimai apie Švedijos prekybos centro maisto atliekų susidarymą patvirtina, kad duonos atliekos sudaro didesnę maisto atliekų dalį nei kitų kategorijų produktai (žr. 7 pav.). Naujojoje Zelandijoje duonos atliekos sudaro apie 10 % visų maisto atliekų (20575 tonų per metus) [6]. Turkijoje kas dieną pagaminama apie 120 mln. duonos kepalų, iš kurių apie 10 % nėra suvartojami. Per metus tai sudaro nuostolių maždaug už 700 mln. JAV dolerių [64]. Panašios tendencijos pastebimos visose pasaulio šalyse.

Duona, kaip ir kiti grūdų produktai, genda daug greičiau nei neperdirbti grūdai. Duonos kepimo metu krakmolai absorbuoja vandenį ir kleisterizuojasi. Tačiau kleisterizuotas krakmolai nėra stabilūs, vyksta krakmolo kristalizacija ir retrogradacija. Iškeptos duonos kepalą sudaro du skirtingi sluoksniai. Išorinis sluoksnis – kieta pluta, vidinis – minkštas ir purus minkštumas. Pluta suteikia apsauginį sluoksnį, kuris neleidžia iš minkštumo išgaruoti drėgmei. Nepaisant to, duonos galiojimo laikas gana trumpas. Duonos laikymo metu vyksta įvairūs fizikiniai ir cheminiai pokyčiai: minkštumo kietėjimas, skonio, aromato, vandens absorbcijos ir tirpaus krakmolo kiekio kitimas. Šie pokyčiai sukelia duonos gedimą, vadinamą žiedėjimu [65]. Sužiedėjusi duona praranda geras juslines savybes ir tampa nepriimtina vartotojui, nors dar yra saugi ir maistinga. Pagrindiniai žiedėjimo metu vykstantys pokyčiai yra drėgmės kiekio praradimas ir krakmolo retrogradacija. Drėgmė prarandama dėl jos migracijos iš minkštumo į plutą. Minkštumas tampa sausesnis, o pluta – minkštesnė ir elastingesnė. Krakmolo retrogradacija – procesas, kurio metu krakmolai iš amorfinės būsenos pereina į iš dalies kristalinę [66]. Retrogradacija priklauso nuo laiko ir temperatūros. Greičiausiai vyksta esant žemai temperatūrai, todėl duonos laikymas šaldytuve, lyginant su laikymu kambario temperatūroje, pagreitina žiedėjimo procesą [67].





7 pav. Maisto atliekų pasiskirstymas pagal frakcijas prekybos centre [63]

Šviežia duona turi didelį drėgmės kiekį ir vandens aktyvumą (0,94–0,97). Tokia terpė labai palanki mikroorganizmams daugintis, todėl paprastai duonos tinkamumo vartoti terminas yra 3–7 dienos. Mikrobiologinis gedimas yra pagrindinė problema dėl kurios prarandama apie 1–5 % produkto, priklausomai nuo produkto tipo, naudojamų žaliavų ir gamybos būdo. Konservantų (propiono, sorbo, benzoinės rūgšties) panaudojimas pailgintų duonos galiojimo laiką, tačiau vartotojams priimtinesni duonos gaminiai be šių priedų [68]. Duonos mikrobiologinis gedimas dažnai susijęs su kietos fazės fermentacija mikroskopiniais grybais, pavyzdžiui, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucorales*, *Neurospora* genčių. [64]. Šis natūralus fermentacijos procesas gali būti panaudojamas vertingiems produktams gaminti, o ne tam, kad duonos atliekos būtų išmestos į sąvartynus, paverstos anglies dioksidu ir metanu. Remiantis duomenimis, pateiktais N. Espinoza-Orias et al. [69], iš kiekvieno išmesto 800 g duonos kepalų susidaro 977–1244 g klimato kaitos dujų CO<sub>2</sub> ekvivalentu. Vienas iš būdų panaudoti duonos atliekas yra fermentacija pagrįsta pridėtinės vertės produktų gamyba.

Fermentacijos procesai atliekoms apdoroti vertinami dėl ekonomiško ir aplinkai draugiškos technologijos. Duona yra tinkama žaliava fermentacijos terpei, nes susideda iš subalansuoto anglies, azoto šaltinių ir kitų maistinių medžiagų [64, 70]. A. S. Demirci'is et al. [71] optimizavo duonos atliekų fermentinės hidrolizės į gliukozės sirupą procesą, kuris yra daugumos pridėtinės vertės produktų gamybos žaliava. C. C. J. Leung et al. [72] panaudojo duonos atliekas gintaro rūgšties gamybai fermentuojant *Actinobacillus succinogenes* mikroorganizmais. Gauta išėiga, lyginant su prieš tai atliktais tyrimais fermentuojant maisto atliekas, buvo didžiausia – 0,55 g gintaro rūgšties/g duonos. T. Doi'us et al. [73] tyrė duonos atliekų panaudojimo galimybes biovandenilio gamybai. Fermentacijos tyrimai atlikti su iš ryžių augalų rizosferos išskirta mikroflora. Nustatyta, kad tinkamiausi vandenilio gamybai *Clostridium* sp. mikroorganizmai. Parinkus optimalias sąlygas, pagamintas vandenilio kiekis siekė 1,30 mol H<sub>2</sub>/ mol heksozės. W. Han'as et al. [74] nustatė, kad iš 1 g duonos atliekų galima pagaminti 109,5 ml vandenilio. Y. Oda'as et al. [75] tyrė pieno rūgšties gamybą iš duonos atliekų. Fermentacijai buvo naudotos PRB *Lactobacillus amylovorus*, pasižyminčios amilolitinu aktyvumu. Tyrimas išsiskyrė iš kitų, nes krakmolo konversijai į pieno rūgštį nebuvo naudojami papildomi krakmolą skaldantys fermentai. Fermentuotos suspensijos filtratas buvo panaudotas duonos gamybos procese. J. V. Kumar'as et al. [76] kepinų atliekas, kurias sudarė duona, sausainiai, bandelės ir pyragai, panaudojo etanolio gamybai. Išdžiovintos atliekos buvo susmulkinamos, sumaišytos su vandeniu ir fermentais ( $\alpha$ -amilaze ir gliukoamilaze). Gautas hidrolizatas fermentuotas iki etanolio alkoholio gamybai naudojamomis sausomis mielėmis *Saccharomyces*

*cerevisiae*. Etanolio išeiga siekė 93 % nuo gliukozės kiekio hidrolizate. J. Kawa-Rygielska ir W. Pietrzak'as [77] taip pat tyrė duonos gaminių tinkamumą etanolio gamybai *Saccharomyces cerevisiae* mielėmis. Gauta didžiausia etanolio išeiga buvo 36,6 g/100 g s. m. arba 54,1 g/100 g krakmolo. P. Daigle et al. [78] tyrė duonos atliekų fermentaciją aromato junginių gamybai. Mišinys, kurį sudarė 35 % duonos minkštimo ir 65 % vandens, buvo fermentuotas mielėmis *Geotrichum candidum* ATCC 62217. Buvo gauti vaisių, ananasų kvapo aromatiniai junginiai. M. Asghar'as et al. [79] optimizavo duonos terpės fermentacijos *Arachniotus* sp. parametrus  $\alpha$ -amilazės gamybai. W. Lam'as et al. [80] tyrimų metu nustatė, kad kepyklų atliekos gali būti panaudotos gliukoamilazės gamybai kietos fazės fermentacijos būdu su *Aspergillus awamori*. Suvestinė apie duonos atliekų panaudojimo galimybių tyrimus pridėtinės vertės produktų gamybai pateikta 2 lentelėje.

**2 lentelė.** Duonos atliekų panaudojimas pridėtinės vertės produktų gamybai

Mikroorganizmas	Produktas	Šaltinis
<i>Bacillus licheniformis</i> ( $\alpha$ -amilazė), <i>Aspergillus</i> (amilogliukozidazė)	Gliukozės sirupas	A. S. Demirci at al. [71]
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Gintaro rūgštis	C. C. J. Leung et al. [72]
<i>Clostridium</i> sp.	Biovandenilis	T. Doi et al. [73]
<i>Aspergillus awamori</i> , <i>A. oryzae</i>	Biovandenilis	W. Han et al. [74]
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Pieno rūgštis	Y. Oda et al. [75]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanolis	J. V. Kumar et al. [76]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanolis	J. Kawa-Rygielska ir W. Pietrzak [77]
<i>Geotrichum candidum</i> ATCC 62217	Aromato junginiai	P. Daigle et al. [78]
<i>Arachniotus</i> sp.	$\alpha$ -amilazė	M. Asghar et al. [79]
<i>Aspergillus awamori</i>	Gliukoamilazė	W. Lam et al. [80]

Iš duonos atliekų siekiant pagaminti pridėtinės vertės produktus daugeliu atveju duonoje esantis krakmolas pirmiausiai turi būti suskaldytas iki gliukozės. Krakmolo fermentinė hidrolizė iki gliukozės taikoma nuo 1960-ųjų vidurio, kai buvo pradėtas naudoti amilogliukozidazės fermentas [81]. Krakmolo ir duonos hidrolizė skiriasi dėl struktūrinių pokyčių, vykstančių duonos gamybos proceso metu nuo tešlos paruošimo iki kepimo. Tešlos ruošimo metu susiformuoja glitimo tinklas, kuris gali apsaugoti kai kurias krakmolo grandines nuo fermentų poveikio. Majaro reakcijų metu dalis duonoje esančių cukrų gali būti sujungti su aminorūgštimis [82]. Duonos kepimo metu vyksta svarbūs krakmolo pokyčiai. Krakmolas kleisterizuojasi ir dalinai depolimerizuojasi. Tokie pokyčiai gali palengvinti tolimesnę hidrolizę [77]. Norint pasiekti dideles fermentuojamų sacharidų išeigas, būtina parinkti optimalias sąlygas. Visų pirma reikia parinkti tinkamus substrato, vandens ir fermentų kiekius. Duonos atliekose esančiam krakmolui suskaldyti į fermentuojamus cukrus (gliukozę) naudojamas fermentinės hidrolizės procesas, kuris susideda iš dviejų etapų. Pirmajame etape, siekiant suskystinti krakmolą ir gauti dekstrinus bei mažus gliukozės kiekius, naudojama  $\alpha$ -amilazė [83]. Ši reakcija turi būti vykdoma esant aukštai temperatūrai (85–95 °C), kad fermentai galėtų lengvai paveikti krakmolo granules, todėl naudojama termostabili  $\alpha$ -amilazė. Siekiant išvengti maltuliozės (4-O- $\alpha$ -D-gliukopiranozil-D-fruktozės) susidarymo, pH turėtų būti žemesnis nei 6,3. Maltuliozės fermentai negali paversti gliukoze ir jos susidarymas sumažina gliukozės išeigas [84]. Suskystintas krakmolas naudojamas antrame (sukukrinimo) etape. Sukukrinimo metu fermentas gliukoamilazė

skaldo susidariusius dekstrinus iki gliukozės. Buvo nustatyta, kad abu etapai yra susiję tarpusavyje, todėl siekiant gauti dideles gliukozės išeigas reikalingas optimalus suskystinimo laipsnis [83].

C. C. J. Leung et al. [72] ir W. Han'as et al. [74] gliukozės sirupo gamybai iš duonos atliekų panaudojo *Aspergillus awamori* ir *Aspergillus oryzae* mikroorganizmus, kurie išskyrė duonos krakmolo hidrolizei reikalingus amilolitinius ir proteolitinius fermentus. J. Kawa-Rygielska ir W. Pietrzak'as [77] panaudojo termostabilią  $\alpha$ -amilazę (Termamyl SC), gliukoamilazę (Spiryzyme Fuel) ir hemiceliuliazę (Optimash BG) bei fermentinius preparatus Ceremix 2XL ( $\alpha$ -amilazė,  $\beta$ -gliukanazė ir proteazė) ir Ceremix 6X MG ( $\alpha$ -amilazė,  $\beta$ -gliukanazė, proteazė, pentozanazė ir celiuliazė). Nustatyta, kad fermentiniai preparatai padidino proceso efektyvumą: buvo suardytas glitimo tinklas, kas padidino fermentams prieinamo krakmolo kiekį. J. V. Kumar'o et al. [76] atlikti duonos atliekų hidrolizės tyrimai su skirtingais fermentais parodė, kad didžiausios gliukozės išeigos gaunamos naudojant aukštos temperatūroje aktyvią  $\alpha$ -amilazę (High T) ir fermentų mišinį (Alcoholase II), kurį sudaro  $\alpha$ -amilazės, amilogliukozidazės, proteazės ir celiuliazės. A. S. Demirci'is et al. [71] gliukozės gamybai panaudojo tik du fermentus: termostabilią  $\alpha$ -amilazę (Termamyl 120 L) ir amilogliukozidazę (AMG 300 L). Parinkus optimalius duonos ir fermentų kiekius, gauta gliukozės išeiga siekė 86 % nuo duonos atliekų.

Šiuo metu jau yra duonos atliekų biotechnologinio perdirbimo pavyzdžių vandenilio, etanolio,  $\alpha$ -amilazės, gliukoamilazės, pieno ir gintaro rūgšties gamybai. Nauja perspektyva galėtų būti nepatogeninių mikroorganizmų panaudojimas pridėtinės vertės produktų gamybai: poliolių, aromatinių junginių, vitaminų, bioaktyvių peptidų, antimikrobinių medžiagų. Iš daugybės potencialių mikrobinių šaltinių, PRB yra svarbiausi pramonėje naudojami mikroorganizmai. Nustatyta, kad fermentacijos metu be organinių rūgščių PRB gali išskirti didelį kiekį įvairių antrinių metabolitų, tarp jų manitolį, sorbitolį, inuliną, laktonus, esterius, diacetilą, vaniliną, alaniną, argininą, liziną, peptidus, vitaminus E, D, K, B<sub>1</sub>–B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folio rūgštį ir kitus [7].

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1. Tyrimų kryptys

Manitolį gamina kai kurios mielės, mikroskopiniai grybai ir PRB. Tyrimų metu pasirinkta nagrinėti mikrobinę manitolio gamybą, kuri pagrįsta fermentacija PRB. Bakterijų veiklos produktai skiriasi priklausomai nuo jų padermių, todėl svarbu parinkti mikroorganizmus, gaminančius kuo didesnį tikslinio produkto (manitolio) kiekį. Manitolio išeią taip pat priklauso nuo fermentacijos sąlygų: bakterijų gyvybingumo, optimalios temperatūros ir pH, trukmės, tinkamai parinktų substratų, jų kiekio ir santykio.

Šis mokslinis tyrimas buvo vykdomas trimis etapais.

Pirmas etapas skirtas PRB atrinkimui manitolio gamybai. Buvo tirta 17 PRB padermių: nustatytos jų augimo kreivės, parinktos sąlygos, kurių metu ląstelės yra metaboliškai aktyvios, nustatytas ląstelėse esančio MDH fermento aktyvumas. Pagal fermento aktyvumą atrinktos perspektyviausios manitolio gamybai PRB, kurios toliau tirtos gliukozės-fruktozės substrato fermentacijos metu. Pagal susidariusio manitolio kiekį atrinkta daugiausiai manitolio gaminanti PRB.

Antrame etape tirti duonos atliekų hidrolizės ir izomerizacijos procesai, siekiant juos panaudoti gliukozės-fruktozės sirupo gamybai. Optimalių sąlygų parinkimui naudotas matematinis eksperimento planavimas. Pagamintas sirupas panaudotas kaip substratas fermentacijai atrinkta PRB, įvertinant terpės tinkamumą manitolio gamybai.

Trečiame etape analizuotos manitolio, kaip cukraus pakaitalo, panaudojimo galimybės keksiukų gamyboje. Įvertinta skirtingų manitolio kiekių įtaka tešlos tekstūros savybėms ir kepinio kokybei (spalvai, formai, tekstūros rodikliams, galiojimo trukmei, juslinių savybių priimtinumui).

### 2.2. Tyrimo objektai

#### 2.2.1. Mikroorganizmai

Tyrimui naudota 17 pieno rūgšties bakterijų kultūrų, gautų iš KTU Maisto instituto (MI) ir KTU Maisto mokslo ir technologijos katedros (MMTK) kolekcijų (3 lentelė).

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* bakterijų kultūros kultivuotos steriliame piene, o po to inokuliuotos į MRS mitybinę terpę. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *acetoinicus* ir *paracitrovorus* kultūros laikytos sušaldytos  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  ir atgaivintos MRS mitybinėje terpėje. Likusios bakterijos laikytos sušaldytos  $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje 50 % glicerolio tirpale ir atgaivintos MRS mitybinėje terpėje. MRS mitybinės terpės (Biolife, Italija) viename litre yra 10 g peptono, 10 g jautienos ekstrakto, 5 g mielių ekstrakto, 20 g gliukozės, 2 g dikalio hidrofosfato ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 5 g natrio acetato, 2 g amonio citrato, 0,2 g magnio sulfato ( $\text{MgSO}_4$ ), 0,05 g mangano sulfato ( $\text{MnSO}_4$ ) ir 1 ml Tween 80. PRB kultūros iki paruošimo analizei laikytos  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Prieš atliekant tyrimus bakterijos kultivuotos MRS mitybinėje terpėje, optimaliose augimo temperatūrose 24 h.

### 3 lentelė. PRB charakteristikos

Mikroorganizmo pavadinimas		Kolekcija	Optimali temperatūra, °C
Rūšis	Padermė		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	149/II	KTU MI	30
	768/5		
	130		
	57		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>acetoinicus</i>	88/25	KTU MI	30
	T/15		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>paracitrovorus</i>	A230	KTU MI	30
	A241		
	A212		
	A211		
<i>Lactobacillus rossiae</i>	GL14	KTU MMTK	37
	M2		
<i>Lactobacillus frumenti</i>	H10	KTU MMTK	30
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	242	KTU MMTK	30
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	MR29	KTU MMTK	30
	MW15		25
	W2		

#### 2.2.2. PRB kultūrų paruošimas MDH aktyvumo nustatymui

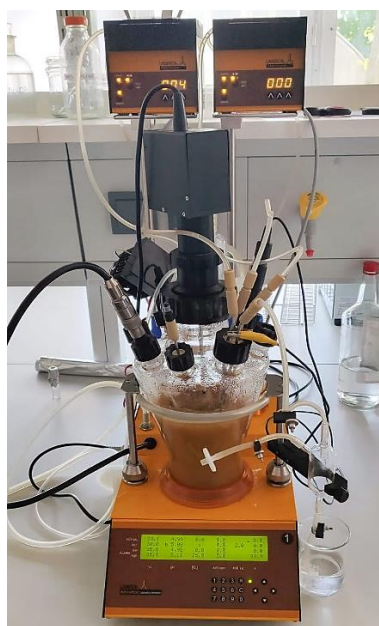
Terpė MDH aktyvumo nustatymui ruošta pagal modifikuotus S. Parmentier et al. [85] bei F. M. Racine et al. [86] metodus. 1 l vandens ištirpinta 55,2 g MRS mitybinės terpės (sudėtis pateikta 2.2.3 skyriuje) ir 15 g D-fruktozės (Reachem, Slovakija). Terpė sterilizuota 121 °C temperatūroje 15 min. Ląstelių optinio tankio matavimui ir MDH aktyvumo nustatymui į 100 ml sterilios terpės inokuliuota 0,5 ml bakterijų padermės.

#### 2.2.3. Modelinės fruktozės-gliukozės sistemos fermentacija

Fermentacija vykdyta 1 L fermenteryje „Minifor“ (LAMBDA Instruments GmbH, Switzerland) (žr. 8 pav.) pagal modifikuotą F. M. Racine et al. [86] metodiką. Taikytas periodinės fermentacijos procesas. Fermentacijos terpė paruošta ištirpinant 28 g kukurūzų išdžiovintų dalelių (CSS) (Sigma-Aldrich, Vokietija), 40 mg mangano sulfato (grynumas 99 %, Alfa Aesar, Vokietija) ir 2,2 g sojų peptono (azoto kiekis 9–11 %, Liofilchem, Italija) 550 ml distiliuoto vandens. 120 g fruktozės ir 60 g gliukozės (Reachem, Slovakija) ištirpinta 250 ml distiliuoto vandens, supilta į terpę ir sterilizuota fermenteryje 121 °C temperatūroje 15 min. Paruošti 4 N NaOH ir 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tirpalai sterilizuoti atskirai.

Fermentacija vykdyta esant optimaliai kiekvienai bakterijai augimo temperatūrai, palaikant terpės pH 5,0 ir pastoviai maišant 2,5 Hz greičiu. Oras į fermenterį nebuvo tiekiamas. Nusistovėjus terpės parametrams, į fermenterį inokuliuota 25 ml PRB padermės, prieš tai kultivuotos 24 h MRS terpėje

su fruktozės priedu. Fermentuota 72 h, tam tikrais laiko intervalais (po 6, 24, 32, 48, 56 ir 72 h) buvo imti mėginiai, kurie iki analizės laikyti -20 °C temperatūroje.



8 pav. „LAMBDA Minifor“ laboratorinis fermenteris

#### 2.2.4. Duonos atliekos

Tyrimams naudota UAB „Baltasis pyragas“ pusruginė duona, pagaminta iš ruginių ir kvietinių miltų, vandens, cukraus, joduotosios druskos, mielių ir kmynų, kurios tinkamumo vartoti trukmė buvo pasibaigusi. Duonos riekelės supjaustytos 1–2 cm kubeliais ir išdžiovintos, siekiant išvengti jos mikrobiologinio gedimo. Išdžiovinti duonos kubeliai sumalti laboratoriniu malūnu „Mlynek WZ-1“ (Zakład Badawczy Przemysłu Piekarskiego Sp. z o.o, Lenkija) ir iki naudojimo laikyti -20 °C temperatūroje. Duonos atliekų cheminė sudėtis (drėgnis, baltymų, riebalų, angliavandenių, krakmolo, mineralinių medžiagų kiekiai) nustatyta standartiniais metodais.

#### 2.2.5. Fermentiniai preparatai

Duonos atliekų biokonversijai naudoti Novozymes A/S (Danija) fermentiniai preparatai.

Termostabili  $\alpha$ -amilazė (EC 3.2.1.1, Liquoflow®), pagaminta iš genetiškai modifikuotos *Bacillus* atmainos. Fermento aktyvumas 240 KNU/g (KNU (Kilo Novo Units) =  $\alpha$ -amilazės kiekis, kuris per 1 h suskaldo 5,26 g krakmolo). Gamintojo specifikacijoje nurodytas rekomenduojamas fermento kiekis yra 100–200 g/tonai krakmolo, optimali fermento veikimo temperatūra – 85–95 °C, pH – 5,4–5,8.

Gliukoamilazė (EC 3.2.1.3, Saczyme® Plus 2X), gauta iš *Aspergillus niger* mikroorganizmų. Fermento aktyvumas 1500 AGU/g (AGU = gliukoamilazės kiekis, kuris per 1 min hidrolizuoja 1  $\mu$ mol maltozės). Gamintojo specifikacijoje nurodytas rekomenduojamas fermento kiekis yra 250–400 g/tonai krakmolo, optimali fermento veikimo temperatūra – 65 °C, pH – 3,8–4,3.

Gliukozės izomerazė (EC 5.3.1.5, Sweetzyme® IT) – imobilizuotas fermentas, gautas iš *Streptomyces murinus* padermės. Fermentas katalizuoja D-gliukozės izomerizaciją į D-fruktozę.

Fermento aktyvumas 400 IGIU/g (IGIU = fermento kiekis, kuris normaliomis sąlygomis paverčia gliukozę į fruktozę 1  $\mu$ mol/min greičiu). Rekomenduojamos fermento veikimo sąlygos, nurodytos gamintojo specifikacijoje, yra 55–60 °C ir pH 7,5–7,8.

## 2.2.6. Duonos atliekų hidrolizė ir jos planavimas

Siekiant gauti didžiausias gliukozės išeigas, sunaudojant optimalų duonos ir fermentų kiekį, atliktas duonos atliekų hidrolizės optimizavimo procesas. Hidrolizės parametrų optimizavimui parinktas paviršiaus atsako modelis (PAM) ir centriškas kompozicinis planas (CKP), panaudojant „Design-Expert 7.0.0“ statistinę kompiuterinę programą (Stat-Ease Inc., Minneapolis, JAV). Optimizuojama trijų veiksnių sistema, kurios nepriklausomi kintamieji – duonos atliekų kiekis (11,34–28,66 masės %),  $\alpha$ -amilazės kiekis (0,013–0,047 KNU/g duonos) ir gliukoamilazės kiekis (0,23–0,57 AGU/g duonos). Fermentų kiekiai parinkti remiantis gamintojo rekomendacijomis. Duonos atliekų kiekis parinktas remiantis A. S. Demirci'io et al. [71] gautais rezultatais. Eksperimento metu atliekamų bandymų skaičius apskaičiuojamas pagal (1) formulę:

$$N = 2^f + 2f + c; \quad (1)$$

čia:  $f$  – kintamųjų skaičius;

$c$  – centrinių taškų skaičius.

Eksperimentą sudarė 18 bandymų (2 lentelė), kurie kartoti du kartus. Eksperimentinis planas sumodeliuotas pagal centrinį kompozicinį modelį imant 4 centrinius taškus. Rezultatams įvertinti kaip atsakas naudotas susidaręs gliukozės kiekis (%).

Gauti rezultatai analizuoti dispersinės analizės (ANOVA) metodu ir pritaikytas geriausiai rezultatus atitinkantis matematinis modelis. Statistinis modelio tinkamumas nustatytas įvertinant individualių regresijos koeficientų reikšmingumą ( $p < 0,05$ ), Fišerio vertę ( $F$ ) ir determinacijos koeficientą ( $R^2$ ).

Duonos atliekų hidrolizė atlikta pagal modifikuotą A. S. Demirci'io et al. [71] metodiką. Pirmajame hidrolizės (suskystinimo) etape duonoje esantis krakmolas fermento  $\alpha$ -amilazės suskaldomas į oligosacharidus,  $\alpha$ -amilazei hidrolizuojant krakmolo (1,4)- $\alpha$ -D-glikozidinius ryšius. Fermentinė hidrolizė vykdyta 250 ml kūginėse kolbose. Jose susmulkintos duonos atliekos (11,34–28,66 g/100 g suspensijos) sumaišytos su atitinkamu distiliuoto vandens kiekiu, reikalingu apie 90 g suspensijos gauti. Gautos masės pH sureguliuotas iki 5,6 naudojant 1 N NaOH tirpalą. Kolbos uždengtos aliuminio folija ir išlaikytos 20 min 45 °C temperatūros vandens vonioje (GFL 1092, Vokietija) maišant 150 aps./min greičiu. Po to temperatūra pakelta iki 60 °C, pridėta termostabili  $\alpha$ -amilazė (0,013–0,047 KNU/g duonos) ir distiliuotu vandeniu bendras suspensijos svoris pakoreguotas iki 100 g. Kolbos toliau kaitintos 60 min 90 °C temperatūroje džiovinimo krosnelėje „Nahita 631 Plus“ (Auxilab, Ispanija). Išimtos iš krosnelės ir atvėsintos iki 50 °C.

Susidarę oligosacharidai antrame hidrolizės (sucukrinimo) etape toliau hidrolizuoti iki gliukozės panaudojant fermentą gliukoamilazę. Mėginių pH pakoreguotas iki 4,3 naudojant 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tirpalą ir pridėtas atitinkamas gliukoamilazės kiekis (0,23–0,57 AGU/g duonos). Kolbos laikytos 65 °C temperatūros vandens vonioje 24 h, maišant 150 aps./min greičiu.

Hidrolizės metu tam tikrais laiko intervalais (po 1, 5, 21 ir 25 h) imti mėginiai, kurie iki gliukozės analizės laikyti -20 °C temperatūroje.

### 2.2.7. Gliukozės konversija į fruktozę ir jos planavimas

Optimizavus duonos atliekų hidrolizės procesą ir parinkus optimalius duonos (18,64 masės %),  $\alpha$ -amilazės (0,03 KNU/g duonos) ir gliukoamilazės (0,43 AGU/g duonos) kiekius, atliktas gliukozės konversijos į fruktozę optimizavimas Design-Expert programa. Svarbiausi gliukozės inversijos parametrai yra fermento kiekis ir pH. Šie parametrai optimizuoti pritaikant PAM ir CKP. Pagal pateiktas gamintojo rekomendacijas parinktas fermento gliukozės izomerazės kiekis kito nuo 2,59 iki 5,41 IGIU/g sirupo, o pH – nuo 6,79 iki 8,21. Eksperimentą sudarė 12 bandymų (3 lentelė), kurie kartoti du kartus. Planas sudarytas pagal centrinį kompozicinį modelį imant 4 centrinius taškus. Rezultatai analizuoti pagal 2.3 skyriuje aprašytą metodiką. Jiems įvertinti kaip atsakas naudotas susidaręs fruktozės kiekis (%).

Gliukozės konversija į fruktozę vykdyta pagal modifikuotą M. H. Gaily et al. [87] metodą. Po hidrolizės etapo suspensija nufiltruota per sietelį ir supilstyta į 250 ml kūgines kolbas po 100 ml. Reikiamas pH (6,79–8,21) sureguliuotas 1 N NaOH ir pridėtas atitinkamas imobilizuoto fermento gliukozės izomerazės kiekis (2,59–5,41 IGIU/g gliukozės sirupo). Visos kolbos uždengtos aliuminio folija, įdėtos į 65 °C vandens vonią (GFL 1092, Vokietija) ir laikytos 30 h, maišant 125 aps./min greičiu. Tam tikrais laiko intervalais (po 6, 24 ir 30 h) imti mėginiai, kurie iki gliukozės ir fruktozės analizės laikyti -20 °C temperatūroje.

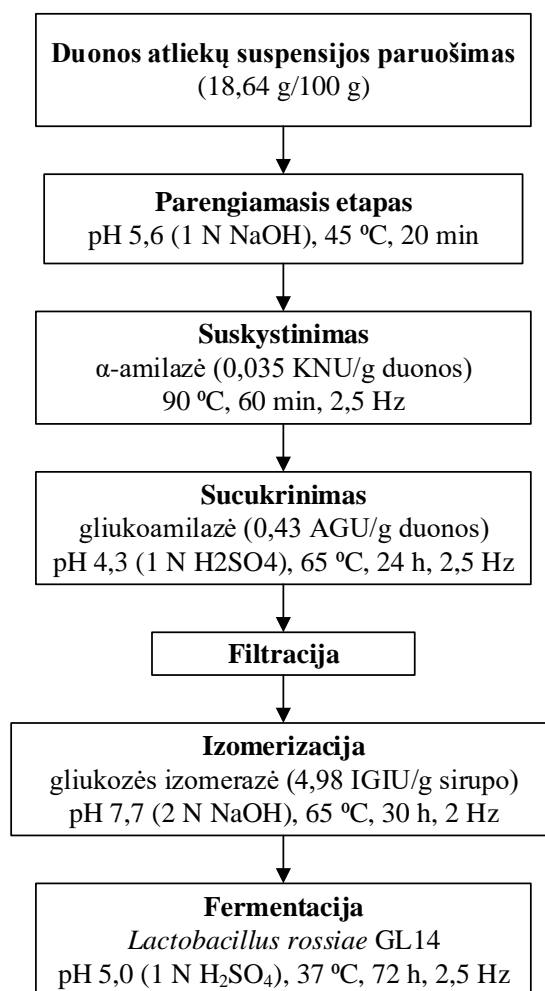
### 2.2.8. Duonos atliekų fermentacija

Fermentacija vykdyta kaip aprašyta 3.2.3. skyriuje. Fermentacijos terpė inokuliuota 25 ml PRB *Lactobacillus rossiae* GL14, kuri prieš tai kultivuota MRS terpėje su fruktozės priedu 37 °C temperatūroje 24 h. *Lactobacillus rossiae* GL14 atrinkta pagal modelinės fruktozės-gliukozės sistemos tyrimo rezultatus kaip tinkamiausia manitolio gamybai. Vertinant duonos atliekų tinkamumą perdirbimui į manitolį, analizuotos 3 skirtingos terpės.

1. Kaip fermentacijos terpė naudota 800 g iš duonos atliekų pagaminto gliukozės-fruktozės sirupo (DT), kuriame gliukozės-fruktozės santykis artimas 1:1.
2. Siekiant užtikrinti optimalų manitolio gamybai gliukozės-fruktozės santykį 1:2, į duonos atliekų sirupą papildomai pridėta 75 g fruktozės (DTF).
3. Siekiant padidinti maistinių medžiagų kiekį, į duonos atliekų sirupą su fruktozės priedu papildomai pridėta 22,4 g CSS, 32 mg mangano sulfato monohidrato ir 1,75 g sojų peptono (DTP).

Manitolio gamybos iš duonos atliekų schema pateikta 9 pav.





9 pav. Manitolio gamybos iš duonos atliekų schema

### 2.2.9. Keksiukų gamyba su manitolium

Kepimai atlikti siekiant įvertinti manitolio įtaką kepinų kokybei ir juslinėms savybėms. Keksiukų tešla ruošta pagal receptūras, pateiktas 4 lentelėje. 25, 50 arba 75 % cukraus receptūroje pakeista manitolium (grynumas 98 %, Sigma-Aldrich, Vokietija).

Keksiukų tešla ruošta sumaišant visus birius ingredientus: kvietinius miltus, kiaušinių miltelius, pieno miltelius, cukrų, manitolį, kepimo miltelius ir druską. Po to supiltas aliejus, vanduo ir tešla išmaišyta iki vienalytės konsistencijos. Tešla supilstyta į 5 cm skersmens formeles po 40 g, keksiukai kepti kepimo krosnyje „Condo“ (MIWE, Vokietija) 190 °C temperatūroje 18 min. Iškepę keksiukai atvėsinti iki kambario temperatūros. Atvėšę keksiukai iki analizės laikyti polietileniniuose maišeliuose kambario temperatūroje. Manitolio įtaka keksiukų gamybos technologiniam procesui vertinta pagal tešlos reologines savybes ir gatavo kepinio kokybės rodiklius: spalvą, kepinio aukštį, drėgmės kiekį, tekstūros ir juslines savybes. Papildomai vertinti keksiukų drėgmės kiekio ir tekstūros pokyčiai 12 dienų laikymo metu.

#### 4 lentelė. Keksiukų receptūros

Ingredientai (g)	Manitolio kiekis (%)			
	Kontrolė (0)	25	50	75
Kvietiniai miltai	200,0	200,0	200,0	200,0
Kiaušinių milteliai	20,0	20,0	20,0	20,0
Aliejus	100,0	100,0	100,0	100,0
Pieno milteliai	12,0	12,0	12,0	12,0
Cukrus	120,0	90,0	60,0	30,0
Manitolis	0,0	30,0	60,0	90,0
Kepimo milteliai	5,0	5,0	5,0	5,0
Druska	1,3	1,3	1,3	1,3
Vanduo	158,0	158,0	158,0	158,0

### 2.3. Tyrimo metodai

#### 2.3.1. Ląstelių augimo kreivės nustatymas

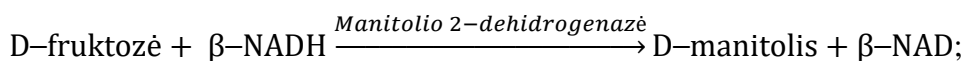
Ląstelių augimas išmatuotas remiantis P. Mall et al. [88] metodika pagal optinį tankį, esant 600 nm bangos ilgiui. MRS terpė be PRB naudota kaip kontrolinis mėginys. Ląstelių optinis tankis spektrofotometru „GENESYS 10 UV“ (Thermo Fisher Scientific, JAV) matuotas 13 h, kas 1 h užrašant rezultatus. Išmatavus nubrėžta kreivė – optinio tankio priklausomybė nuo laiko.

#### 2.3.2. Manitolio 2-dehidrogenazės aktyvumo nustatymas

Manitolio 2-dehidrogenazės (MDH) aktyvumas nustatytas pagal modifikuotą S. Parmentier et al. [85] metodiką. PRB augintos iki logaritminės fazės, nustatytos pagal ląstelių augimo kreivę. Pasiekus logaritminę fazę, jos centrifuguotos (6000 g, 15 min) ir du kartus praplautos 0,05 M acetatinio buferiu (pH 6,0). Ląstelės suspenduotos tame pačiame buferyje ir suardytos ultragarsu. Suardymui naudota ultragarsinė vonelė „Ulsonix“ (Ultrasonic cleaner Proclean 3.0DSP, Lenkija). Suardytos ląstelės atskirtos centrifuguojant (6000 g, 15 min) ir supernatantas naudotas MDH aktyvumui nustatyti.

MDH aktyvumas išmatuotas spektrofotometru „GENESYS 10 UV“ 25 °C temperatūroje, esant 340 nm bangos ilgiui pagal NADH sunaudojimo greitį, naudojant D-fruktozę kaip substratą. Reakcijos mišinį sudarė 240 µl 0,025 M acetatinio buferio (pH 5,35), 200 µl 1,5 M D-fruktozės, 100 µl 0,003 M NADH ir 100 µl supernatanto. Acetatiniai buferiai ruošti natrio acetatą ištirpinant ledinėje acto rūgštyje, praskiedžiant iki reikiamo tūrio ir pakoreguojant pH. NADH reagentas visada ruoštas šviežiai. Kontroliniame mėginyje vietoj fruktozės naudotas distiliuotas vanduo. Absorbancija matuota 5 min, rezultatus užrašant kas 30 sekundžių.

MDH aktyvumas nustatomas pagal reakciją:



čia:  $\beta\text{-NADH}$  –  $\beta$ -nikotinamido adenino dinukleotidas, reduktuota forma;

$\beta\text{-NAD}$  –  $\beta$ -nikotinamido adenino dinukleotidas, oksiduota forma.

MDH aktyvumas apskaičiuotas pagal (1) formulę [89]:

$$\frac{AV}{ml} fermento = \frac{(\Delta A_{340nm}/min - \Delta A_{340nm}/min \text{ tuščias}) \cdot V_t \cdot pr}{6,22 \cdot V_{ferm}}; \quad (1)$$

čia:  $AV$  – aktyvumo vienetai;

$V_t$  – bendras reakcijos mišinio tūris, ml;

$pr$  – praskiedimo koeficientas;

6,22 – milimoliarinis  $\beta$ -NADH nykimo koeficientas ties 340 nm bangos ilgiu;

$V_{ferm}$  – naudojamo fermento tirpalo tūris, ml

$\Delta A_{340nm}/min$  – didžiausias absorbcijos pokytis per 1 min.

### 2.3.3. Manitolio kiekio nustatymas

Manitolio kiekis mėginiuose nustatytas naudojant fermentinį D-manitolio/L-arabitolio testą (Megazyme International Ireland Limited, Airija). Metodo esmė – nustatymo metu vykstanti D-manitolio oksidacijos nikotinamido-adenino dinukleotidu (NAD<sup>+</sup>) reakcija į D-fruktozę, katalizuojama MDH, susiformuojant NADH. Susiformavusio NADH kiekis yra ekvivalentiškas mėginyje esančiam D-manitolio kiekiui.

Pagal gamintojo rekomendacijas paruoštas tiriamojo mėginio vandeninis tirpalas taip, kad manitolio kiekis mėginyje būtų tarp 0,05 ir 0,75 g/l. Gerai sumaišytas tirpalas nufiltruotas. Į 3 ml kiuvetę įpilta 0,1 ml paruošto tiriamojo tirpalo, 2 ml distiliuoto vandens, 0,1 ml Tris/HCl buferio su natrio azidu (pH 9,0) ir 0,1 ml NAD<sup>+</sup> tirpalo. Tirpalai sumaišyti ir po 2 min išmatuota absorbcija ( $A_1$ ) spektrofotometru „GENESYS 10 UV“, esant 340 nm bangos ilgiui. Po to pridėtas 0,02 ml MDH tirpalo, gerai sumaišyta ir reakcijos pabaigoje (maždaug po 4 min) išmatuota absorbcija ( $A_2$ ). Apskaičiuojamas absorbcijos skirtumas  $\Delta A_{tir.} = A_2 - A_1$ . Tuščio mėginio absorbcijos skirtumas  $\Delta A_{tušč.}$  išmatuotas taip pat, tik vietoje tiriamojo mėginio įpilta 0,1 ml distiliuoto vandens. D-manitolio koncentracija (g/l) apskaičiuota pagal (2) formulę:

$$c = \frac{V \cdot MW}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A; \quad (2)$$

čia:  $V$  – galutinis tirpalo kiekis, ml;

$MW$  – D-manitolio molekulinis svoris, g/mol;

$\varepsilon$  – NADH ekstinkcijos koeficientas esant 340 nm bangos ilgiui (6300 l/mol·cm);

$d$  – šviesos kelias, cm;

$v$  – mėginio kiekis, ml;

$\Delta A$  – absorbcijos skirtumas ( $\Delta A = \Delta A_{tir.} - \Delta A_{tušč.}$ ).

Gautą rezultatą padauginus iš praskiedimo faktoriaus, D-manitolio kiekis (g/100 g) apskaičiuotas pagal (3) formulę:

$$q = \frac{c}{m_{mėginio}} \cdot 100; \quad (3)$$

čia:  $m_{mėginio}$  – analizuojamo mėginio kiekis, g/l.

### 2.3.4. Duonos atliekų cheminės sudėties analizė

#### Drėgmės kiekio nustatymas

Drėgnis nustatytas pagal LST 1492:2013 [90], džiovinant mėginį 105 °C temperatūroje iki pastovios masės. Drėgmės kiekis (%) apskaičiuotas pagal (4) formulę:

$$x = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{(m_1 - m)}; \quad (4)$$

čia:  $m$  – biukso svoris, g;

$m_1$  – biukso svoris su mėginiu iki džiovinimo, g;

$m_2$  – biukso svoris su mėginiu po džiovinimo, g.

#### Riebalų kiekio nustatymas

Tyrimui pasverta  $3 \pm 0,001$  g tiriamojo mėginio ir suvyniota į filtrą. Riebalų ekstrakcija iš mėginio vykdyta Soksleto aparate, kaip tirpiklį naudojant chloroformą. Pasibaigus ekstrakcijai mėginys išdžiovintas iki pastovaus svorio. Mėginio riebalų kiekis (%) apskaičiuotas pagal (5) formulę:

$$x = \frac{(a - b) \cdot 100}{m}; \quad (5)$$

čia:  $a$  – suvynioto į filtrą mėginio svoris prieš ekstrakciją, g;

$b$  – suvynioto į filtrą mėginio svoris po ekstrakcijos, g;

$m$  – analizei paimto mėginio masė.

#### Baltymų kiekio nustatymas

Baltymų kiekis nustatytas Kjeldalio metodu pagal standartinį metodą AOAC 950.36 [91]. Proceso metu atliktas tiriamojo mėginio ( $1 \pm 0,001$  g) mineralizavimas koncentruotoje sieros rūgštyje, naudojant katalizatoriaus tabletes ( $K_2SO_4$ ;  $CuSO_4 \times 5H_2O$ ;  $TiO_2$ ). Pagal titravimui sunaudotas HCl kiekį apskaičiuotas  $NH_3$  kiekis ir atitinkantis jį azoto kiekis. Azoto kiekis (%) apskaičiuotas pagal (6) formulę:

$$x = \frac{0,0014 \cdot A}{m} \cdot 100; \quad (6)$$

čia:  $A$  – 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas titruojant mėginio distiliatą, ml;

$m$  – mėginio svoris, g;

0,0014 – azoto kiekis, ekvivalentiškas 1 ml 0,1 N HCl.

Azoto kiekis perskaičiuotas į baltymus, padauginant gautą reikšmę iš perskaičiavimo koeficiento 5,7 [92].

#### Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas

Į iki pastovaus svorio iškaitintą tiglią pasverta  $3 \pm 0,001$  g tiriamojo mėginio. Bendras mineralinių medžiagų (pelenų) kiekis nustatytas iš pelenų kiekio, gauto sudeginus mėginį 500 – 600 °C temperatūroje. Pelenų kiekis (%) apskaičiuotas pagal (7) formulę:

$$x = \frac{(m_2 - m) \cdot 100}{(m_1 - m)}; \quad (7)$$

čia:  $m$  – tiglio svoris, g;

$m_1$  – tiglio svoris su mėginiu, g;

$m_2$  – tiglio svoris su pelenais, g.

### Kraskmolo kiekio nustatymas

Kraskmolo kiekis mėginiuose nustatytas naudojant fermentinį bendro kraskmolo kiekio „K-TSHK“ testą (Megazyme International Ireland Limited, Airija). Metodo esmė – nustatymo metu vykstanti kraskmolo hidrolizės reakcija. Jos metu termostabili  $\alpha$ -amilazė suskaido kraskmolą į tirpius šakotus ir nešakotus maltodekstrinus. Vėliau amilogliukozidazė hidrolizuoja maltodekstrinus iki D-gliukozės. D-gliukozė, veikiant heksokinazei ir adenozino-5'-trifosfatui (ATP), fosforilinama ir susiformuoja gliukozės-6-fosfatas ir adenozino-5'-difosfatas (ADP). Veikiant fermentui gliukozės-6-fosfato dehidrogenazei, gliukozės-6-fosfatas oksidinamas nikotinamido-adenino dinukleotido fosfatu (NADP+) į gliukonato-6-fosfatą, susiformuojant redukuotam NADPH. Susidariusio NADPH kiekis yra ekvivalentiškas mėginyje esančiam D-gliukozės kiekiui.

Į mėgintuvėlį pasverta 100 mg tiriamojo mėginio, įpilta 0,2 ml 80 % vandeninio etanolio tirpalo ir sumaišyta. Po to įpilta 2 ml 2 M KOH, kuris stabdo gumulėlių susidarymą ir ištirpina atsparų kraskmolą. Mėginys 20 min išlaikytas ledo/vandens vonioje, maišant magnetine maišykle MSH 300 (BioSan, Latvija). Į mėgintuvėlį įpilta 8 ml 1,2 M natrio acetato buferio (pH 3,8), iškart pridėta 0,1 ml termostabilios  $\alpha$ -amilazės ir 0,1 ml amilogliukozidazės, gerai išmaišyta ir išlaikyta 30 min 50 °C temperatūros vandens vonioje, retkarčiais pamaišant. Suspensija iš mėgintuvėlio pernešta į 100 ml matavimo kolbą ir praskiesta distiliuotu vandeniu iki žymės. Suspensija centrifuguota 10 min 3000 rpm greičiu ir nufiltruota. Kraskmolo kiekio nustatymui naudotas skaidrus, nepraskiestas filtratas. Į mėgintuvėlį įpilta 0,1 ml filtrato, pridėta 3 ml GOPOD reagento ir laikyta 20 min 50 °C temperatūros vandens vonioje. GOPOD reagentas sudarytas iš p-hidroksibenzoinės rūgšties buferio su 0,095 % natrio azidu (pH 7,4), gliukozės oksidazės, peroksidazės ir 4-aminoantipirino. Lygiagrečiai tirtas tuščias mėginys, sudarytas iš 0,1 ml distiliuoto vandens ir 3 ml GOPOD reagento. Papildomai analizuotas D-gliukozės kontrolinis tirpalas, sudarytas iš 0,1 ml D-gliukozės standartinio tirpalo (1 mg/ml) ir 3 ml GOPOD reagento. Absorbcija išmatuota spektrofotometru „GENESYS 10 UV“ esant 510 nm bangos ilgiui. Kraskmolo kiekis (%) apskaičiuotas pagal (8) formulę:

$$K = \Delta A \cdot \frac{F}{W} \cdot FV \cdot 0,9; \quad (8)$$

čia:  $\Delta A$  – absorbcijos skirtumas;

$F$  – 100/ 100  $\mu$ g gliukozės absorbcija (konversija iš absorbcijos į  $\mu$ g);

$FV$  – galutinis tirpalo kiekis, ml;

$W$  – analizuojamo mėginio svoris, mg;

0,9 – korekcija iš laisvos D-gliukozės į anhidro D-gliukozę (kokia yra kraskmole).

Kraskmolo kiekis sausosiose medžiagose apskaičiuotas pagal (9) formulę:

$$K_{s.m.} = K \cdot \frac{100}{100 - drėgmės\ kiekis\ (\%)}. \quad (9)$$

### 2.3.5. Gliukozės ir fruktozės kiekio nustatymas

Gliukozės ir fruktozės kiekis mėginiuose nustatytas naudojant fermentinius D-gliukozės „K-GLUHK“ ir D-fruktozės/D-gliukozės „K-FRUGL“ testus (Megazyme International Ireland Limited, Airija). Metodo esmė – nustatymo metu vykstanti gliukozės ir fruktozės fosforilavimo reakcija, katalizuojama fermento heksokinazės ir ATP, į gliukozės-6-fosfatą ir fruktozės-6-fosfatą kartu susiformuojant ADP. Esant gliukozės-6-fosfato dehidrogenazei, susidaręs gliukozės-6-fosfatas oksiduojamas NADP+ į gliukonato-6-fosfatą susiformuojant NADPH. Susiformavusio NADPH kiekis yra ekvivalentiškas mėginyje esančiam D-gliukozės kiekiui. Fosfogliukozės izomerazė fruktozės-6-fosfatą paverčia gliukozės-6-fosfatu. Gliukozės-6-fosfatas reaguoja su NADP+ sudarydamas gliukonato-6-fosfatą ir NADPH, kas lemia absorbcijos padidėjimą. Šis absorbcijos padidėjimas yra lygus fruktozės kiekiui mėginyje. Nustatymo metu spektrofotometriškai išmatuotas NADPH absorbcijos padidėjimas esant 340 nm bangos ilgiui.

Pagal gamintojo rekomendacijas paruoštas tiriamojo mėginio vandeninis tirpalas taip, kad gliukozės ir fruktozės kiekis mėginyje būtų tarp 0,04 ir 0,8 g/l. Tirpalas nufiltruotas, į 3 ml kiuvetę įpilta 0,1 ml filtrato, 2 ml distiliuoto vandens, 0,1 ml imidazolo ir magnio chlorido buferio su natrio azidu (pH 7,6) ir 0,1 ml NADP+/ATP tirpalo. Tirpalai sumaišyti ir po 3 min išmatuota absorbcija ( $A_1$ ) spektrofotometru „GENESYS 10 UV“, esant 340 nm bangos ilgiui. Po to pridėta 0,02 ml heksokinazės ir gliukozės-6-fosfato dehidrogenazės suspensijos, gerai sumaišyta ir reakcijos pabaigoje (maždaug po 5 min) išmatuota absorbcija ( $A_2$ ). Gliukozės nustatymui apskaičiuotas absorbcijos skirtumas  $\Delta A_{G.tir.} = A_2 - A_1$ .

D-fruktozės nustatymui papildomai pridėta 0,02 ml fosfogliukozės izomerazės, sumaišyta ir reakcijos pabaigoje (maždaug po 8-10 min) išmatuota absorbcija ( $A_3$ ). Tuščio mėginio absorbcijos skirtumas  $\Delta A_{tušč.}$  išmatuotas taip pat, tik vietoje tiriamojo mėginio įpilta 0,1 ml distiliuoto vandens. Fruktosės nustatymui apskaičiuotas absorbcijos skirtumas  $\Delta A_{F.tir.} = A_3 - A_2$ .

D-gliukozės ir D-fruktozės koncentracija (g/l) apskaičiuota pagal (10) formulę:

$$c = \frac{V \cdot MW}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A; \quad (10)$$

čia:  $V$  – galutinis tirpalo kiekis, ml;

$MW$  – D-gliukozės arba D-fruktozės molekulinis svoris, g/mol;

$\varepsilon$  – NADPH ekstinkcijos koeficientas esant 340 nm bangos ilgiui (6300 l/mol·cm);

$d$  – šviesos kelias, cm;

$v$  – mėginio kiekis, ml;

$\Delta A$  – absorbcijos skirtumas ( $\Delta A = \Delta A_{G.tir.} - \Delta A_{tušč.}$  arba  $\Delta A_{F.tir.} - \Delta A_{tušč.}$ ).

Gautas rezultatas padaugintas iš skiedimo faktoriaus. D-gliukozės ir D-fruktozės kiekis (g/100 g) apskaičiuotas pagal (11) formulę:

$$q = \frac{c}{m_{mėginio}} \cdot 100; \quad (11)$$

čia:  $m_{mėginio}$  – analizuojamo mėginio kiekis, g/l.

### 2.3.6. Pieno rūgšties kiekio nustatymas

Pieno rūgšties kiekis mėginiuose nustatytas naudojant fermentinį D-/L-pieno rūgšties „K-DLATE“ testą (Megazyme International Ireland Limited, Airija). Metodo esmė – nustatymo metu vykstančios dvi fermentinės reakcijos. Pirmąją reakciją katalizuoja D-laktato dehidrogenazė ir D-pieno rūgštis oksiduojama į piruvatą, esant NAD<sup>+</sup>. Kita reakcija naudojama norint pašalinti susidariusį piruvatą ir užtikrinti, kad reakcija netaptų grįžtama. Katalizuojant D-glutamato piruvato transaminazei ir esant dideliame D-glutamato pertekliui, piruvatas paverčiamas D-alaninu ir 2-oksoglutaratu. Reakcijos metu susidaręs NADH kiekis yra ekvivalentiškas D-pieno rūgšties kiekiui. Tokios pat reakcijos vyksta kai L-pieno rūgštis oksiduojama iki piruvato, katalizuojant L-laktato dehidrogenazei. NADH absorbcijos padidėjimas išmatuojamas spektrofotometriškai, esant 340 nm bangos ilgiui.

Pagal gamintojo rekomendacijas paruoštas tiriamojo mėginio vandeninis tirpalas taip, kad pieno rūgšties kiekis mėginyje būtų tarp 0,005 ir 0,3 g/l. Tirpalas nufiltruotas, į kiuvetę įpilta 0,1 ml filtrato, 1,5 ml distiliuoto vandens, 0,5 ml glicilglicino buferio (pH 10) su D-glutamatu ir natrio azidu (0,02 %), 0,1 ml NAD<sup>+</sup> tirpalo ir 0,02 ml D-glutamato piruvato transaminazės suspensijos. Tirpalai sumaišyti ir po 3 min išmatuota absorbcija (A<sub>1</sub>) spektrofotometru „GENESYS 10 UV“, esant 340 nm bangos ilgiui. Po to pridėta 0,02 ml D-laktato dehidrogenazės suspensijos ir 0,02 ml L-laktato dehidrogenazės suspensijos, gerai sumaišyta ir reakcijos pabaigoje (maždaug po 10 min) išmatuota absorbcija (A<sub>2</sub>). Apskaičiuojamas absorbcijos skirtumas  $\Delta A_{\text{tir.}} = A_2 - A_1$ . Tuščio mėginio absorbcijos skirtumas  $\Delta A_{\text{tušč.}}$  išmatuotas taip pat, tik vietoje tiriamojo mėginio įpilta 0,1 ml distiliuoto vandens.

Pieno rūgšties koncentracija (g/l) apskaičiuota pagal (12) formulę:

$$c = \frac{V \cdot MW}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A; \quad (12)$$

čia:  $V$  – galutinis tirpalo kiekis, ml;

$MW$  – pieno rūgšties molekulinis svoris, g/mol;

$\varepsilon$  – NADPH ekstinkcijos koeficientas esant 340 nm bangos ilgiui (6300 l/mol·cm);

$d$  – šviesos kelias, cm;

$v$  – mėginio kiekis, ml;

$\Delta A$  – absorbcijos skirtumas ( $\Delta A = \Delta A_{\text{tir.}} - \Delta A_{\text{tušč.}}$ ).

### 2.3.7. Kepinių kokybės ir juslinio vertinimo metodai

#### Keksiukų aukščio nustatymas

Atvėsusių keksiukų aukštis išmatuotas nuo apačios iki aukščiausio taško. Iš kiekvienos partijos atsitiktinai išmatuoti 8 keksiukai ir apskaičiuota vidutinė jų aukščio vertė.

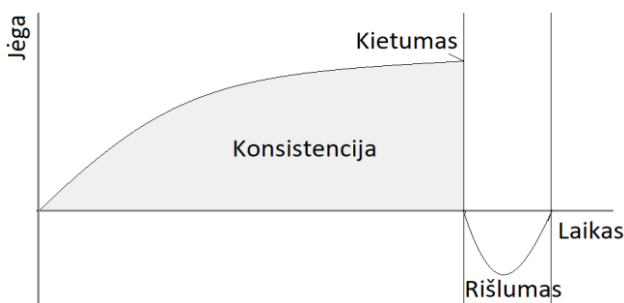
#### Spalvos matavimas

Keksiukų vidinės dalies spalva išmatuota spalvos sulyginimo matuokliu „Croma Meter CR-410“ (Konica Minolta, Japonija). Rezultatai išreikšti CIE  $L^*a^*b^*$  spalvų apibūdinimo sistemos koordinatėmis.  $L^*$  vertė rodo šviesumą, kur 100 yra balta ir 0 yra juoda.  $a^*$  teigiama vertė reprezentuoja raudoną spalvą, neigiama – žalią (skalėje nuo +60 raudonai iki –60 žaliai).  $b^*$  teigiama vertė reprezentuoja geltoną spalvą, neigiama – mėlyną (skalėje nuo +60 geltonai iki –60 mėlynai).

## Tekstūros matavimas

Tešlos ir kepinių tekstūros rodikliai nustatyti matuojant tekstūros analizatoriumi „TA.XT.plus“ (Stable Micro System, Jungtinė Karalystė) su „Texture Exponent“ programine įranga.

Tešlos reologinėms savybėms išmatuoti naudotas 20 mm skersmens cilindrinis kūnas (smigimo gylis 5 mm, greitis 1 mm/s). Tyrimams atsverta po 20 g tešlos. Iš „jėgos-laiko“ kreivių (žr. 10 pav.) nustatytos tešlos savybės: kietumas, konsistencija ir rišlumas. Kietumas nustatytas pagal teigiamos kreivės smailės viršūnę, konsistencija – pagal plotą po teigiama kreive, rišlumas – pagal neigiamos kreivės smailės viršūnę.



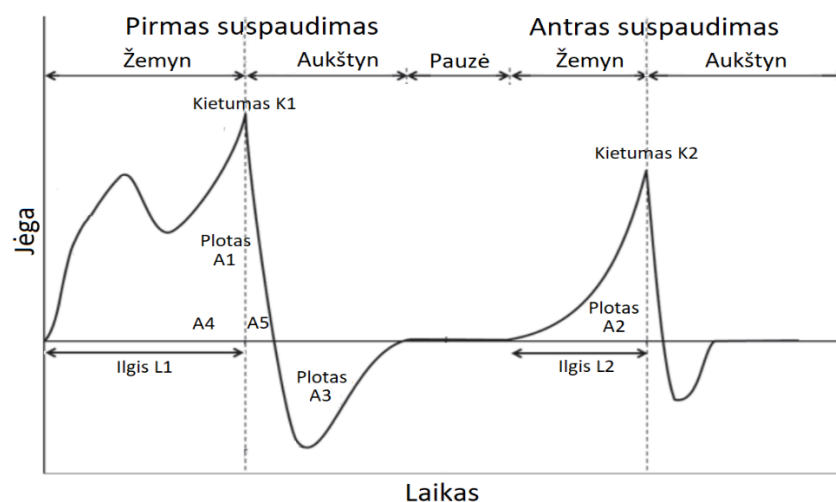
10 pav. Tešlos tekstūros profilio analizės „laiko-jėgos“ kreivės pavyzdys

Keksiukų tekstūros profilio analizė atlikta praėjus 24 h po kepimo. Keksiukų mėginiai analizei ruošti horizontaliai nupjaunant keksiukų viršūnes ir apačią. Nupjovus šonus gautas stačiakampis gretasienis, kurio aukštis – 22 mm, ilgis – 37 mm, plotis – 33 mm. Tekstūros profilio analizė atlikta taikant dvigubą spaudimo testą, kurio metu suspaudžiama 50 % mėginio aukščio naudojant 100 mm skersmens kompresinę plokštelę (P/100). Kūno judėjimo greitis 1 mm/s su 5 s pauze tarp dviejų ciklų. Iš gautų „jėgos-laiko“ kreivių (žr. 11 pav.) nustatyti tekstūros parametrai:

- 1) kietumas – jėga (N), kurios reikia pasiekti reikiamą (50 %) mėginio deformaciją, nustatoma pagal jėgos smailės viršūnę pirmo spaudimo ciklo metu ( $K1$ );
- 2) elastingumas – mėginio sugebėjimas grįžti į pirmykštę formą, nustojus veikti deformuojančiai jėgai, nustatomas pagal ilgių santykį ( $L2/L1$ );
- 3) sukibimas – mėginio atsparumas antrajai deformacijai, lyginant su pirmąja, nustatoma pagal plotų santykį ( $A2/A1$ );
- 4) lipnumas – deformacijos laipsnis, kurio reikia mėginį suardyti iki tinkamo nuryti, apskaičiuojamas kaip kietumo ir sukibimo sandauga ( $K1 \times (A2/A1)$ );
- 5) kramtomumas – deformacijos laipsnis, kurio reikia mėginį sukramtyti iki tinkamo nuryti, apskaičiuojamas kaip kietumo, sukibimo ir elastingumo sandauga ( $K1 \times (A2/A1) \times (L2/L1)$ );
- 6) gebėjimas atsistatyti – mėginio pasipriešinimas spaudimui, siekiant grįžti į pirmykštę formą, nustatomas pagal plotų santykį ( $A5/A4$ ).

Keksiukų tekstūros parametrai papildomai nustatyti po 5, 8 ir 12 dienų laikymo polietileniniuose maišeliuose kambario temperatūroje.





11 pav. Tekstūros profilio analizės „laiko-jėgos“ kreivės pavyzdys [93]

### Juslinė analizė

Kepinių kokybė buvo vertinama ir pagal jų juslines savybes. Analizė buvo atlikta praėjus 24 h po kepimo. Keksiukai su skirtingu manitolio kiekiu supjaustyti vienodo dydžio gabaliukais ir pažymėti atsitiktinių triženklių skaičių kombinacijomis. Juslinėje analizėje dalyvavo 15 vertintojų, kurie buvo supažindinti su juslinio vertinimo metodika. Tiriamosios savybės (spalva, akytumas, kvapo intensyvumas, saldumas, bendras skonis, liekamasis skonis, kietumas, trapumas ir drėgnumas) vertintos 7 kategorijų intensyvumo skalėje, remiantis LST ISO 4121:2004 [94]. Sudarytas vertintų juslinių savybių sąrašas ir jų apibūdinimas pateiktas 5 lentelėje.

5 lentelė. Vertinamų juslinių savybių apibūdinimai

Juslinė savybė	Skalė	Aprašymas
<b>Išvaizda</b>		
Spalva	Balta → Gelsva	Spalvos intensyvumas nuo baltos iki gelsvos
Akytumas	Mažas → Didelis	Mėginyje matomų akučių gausumo laipsnis
<b>Kvapas</b>		
Bendras kvapo intensyvumas	Silpnas → Stiprus	Mėginio kvapo intensyvumas
<b>Tekstūra</b>		
Kietumas	Mažas → Didelis	Apibūdina jėgą, reikalingą atkąsti mėginį ir jį suspausti tarp liežuvio ir gomurio
Trapumas	Mažas → Didelis	Apibūdina jėgą, reikalingą suardyti gaminį į trupinius
Drėgnumas	Mažas → Didelis	Apibūdina mėginio drėgnumo laipsnį, kurio reikia sudrėkinti seilėmis iki būklės, tinkamos nuryti
<b>Skonis</b>		
Saldumas	Silpnas → Stiprus	Saldaus skonio intensyvumas
Bendras skonio intensyvumas	Silpnas → Stiprus	Skonio, būdingo keksiukams, intensyvumas
Liekamasis skonis	Silpnas → Stiprus	Skonio, kuris lieka burnoje nurijus mėginį, intensyvumas

Keksiukų pirmumo seka buvo nustatyta pagal rikiavimo metodą LST ISO 8587:2007/A1:2015 [95]. Tyrime dalyvavo 10 vertintojų. Kiekvienam vertintojui buvo pateikta skirtinga mėginių kombinacija,

pažymėta atsitiktinių triženklių skaičių kombinacijomis. Rikiavimo metu mėginiai vertinti skalėje nuo 4 iki 1, kur labiausiai patikęs mėginys pažymėtas „4“, mažiausiai – „1“. Rezultatai apdoroti pagal Friedmano testą (žr. 6 lentelę). Siekiant nustatyti, ar tarp tiriamųjų mėginių yra reikšmingas skirtumas, apskaičiuotas Friedmano kriterijus pagal (13) formulę:

$$F_{test.} = \frac{12}{jp(p+1)} (R_1^2 + R_2^2 + \dots + R_M^2) - 3j(p+1); \quad (13)$$

čia:  $j$  – vertintojų skaičius;

$p$  – mėginių skaičius;

$R_1, R_2, \dots, R_M$  – rikiavimo numerių, priskirtų visų vertintojų kiekvienam mėginiui, sumos.

Gauta Friedmano kriterijaus vertė lyginta su 6 lentelėje pateikta kritine verte.

**6 lentelė.** Friedmano testo kritinės vertės [95]

Vertintojų skaičius (j)	Tiriamųjų mėginių skaičius (p) (reikšmingumo lygis 0,05)		
	3	4	5
7	7,14	7,80	9,11
8	6,25	7,65	9,19
9	6,22	7,66	9,22
10	6,20	7,67	9,25
11	6,55	7,68	9,27
12	6,17	7,70	9,29
13	6,00	7,70	9,30
14	6,14	7,71	9,32
15	6,40	7,72	9,33

Jei  $F_{test.} > F$ , daroma išvada, kad tarp mėginių yra reikšmingas skirtumas. Siekiant nustatyti, ar yra reikšmingas skirtumas tarp dviejų tiriamųjų mėginių porų, dviejų lyginamųjų mėginių rikiavimo numerių sumų modulis lygintas su kritine verte. Kritinė vertė apskaičiuota pagal (14) formulę:

$$KV = 1,960 \sqrt{\frac{jp(p+1)}{6}}. \quad (14)$$

Priimama, kad tarp dviejų lyginamųjų mėginių yra reikšmingas skirtumas, jei dviejų lyginamųjų mėginių rikiavimo numerių sumų modulio vertė yra didesnė arba lygi apskaičiuotai kritinei vertei.

Keksiukų mikrobiologinio gedimo įvertinimas atliktas laikymo polietilinėje pakuotėje metu vizualiai apžiūrint ir įvertinant atsiradusias mikroorganizmų kolonijas plutelės paviršiuje.

### 2.3.8. Rezultatų matematinė – statistinė analizė

Eksperimentiniai duomenys pateikti atlikus ne mažiau kaip du lygiagrečius tyrimus. Gauti rezultatai apdoroti Microsoft Excel programa. Pateikti tyrimų rezultatų aritmetiniai vidurkiai ir prie jų nurodyti standartiniai nuokrypiai. Skirtumų tarp mėginių reikšmingumas įvertintas pagal Dunkano kriterijų ( $p \leq 0,05$ ), naudojant IBM SPSS Statistics 23 kompiuterinę programinę įrangą. Optimizavimo uždavinių statistinė analizė atlikta naudojant vienfaktorinę dispersinę analizę (one-way ANOVA). Statistinis rezultatų patikimumas vertintas pagal Fišerio (F) kriterijų, pasirenkant reikšmingumo lygmenį 0,05 (sprendimo teisingumas bent 95 %).

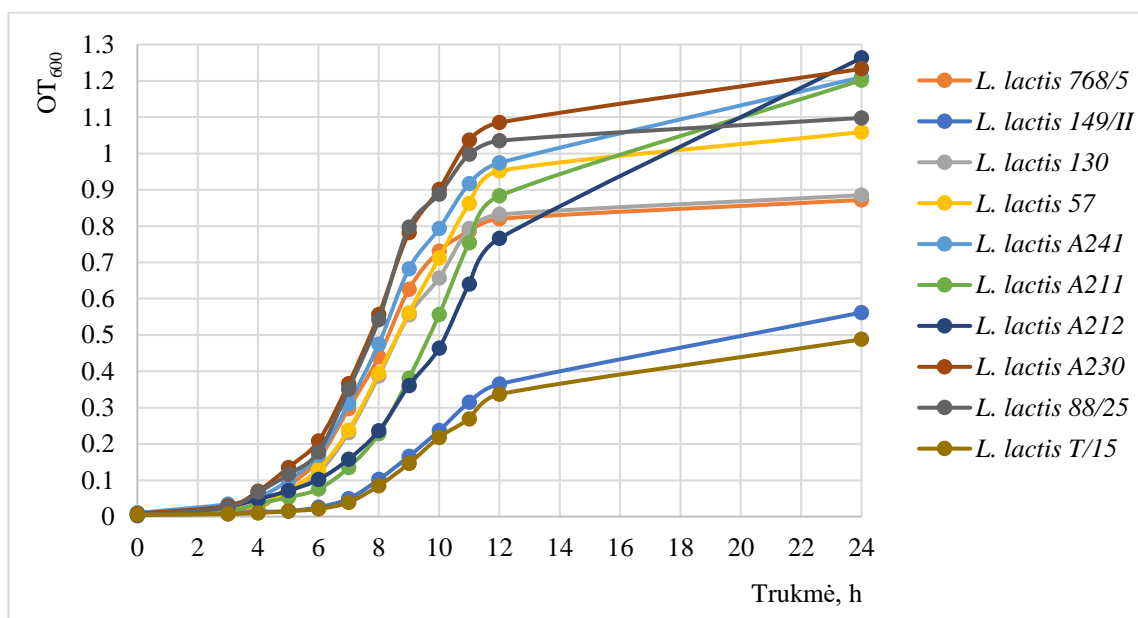
### 3. Rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Pieno rūgšties bakterijų parinkimas manitolio gamybai

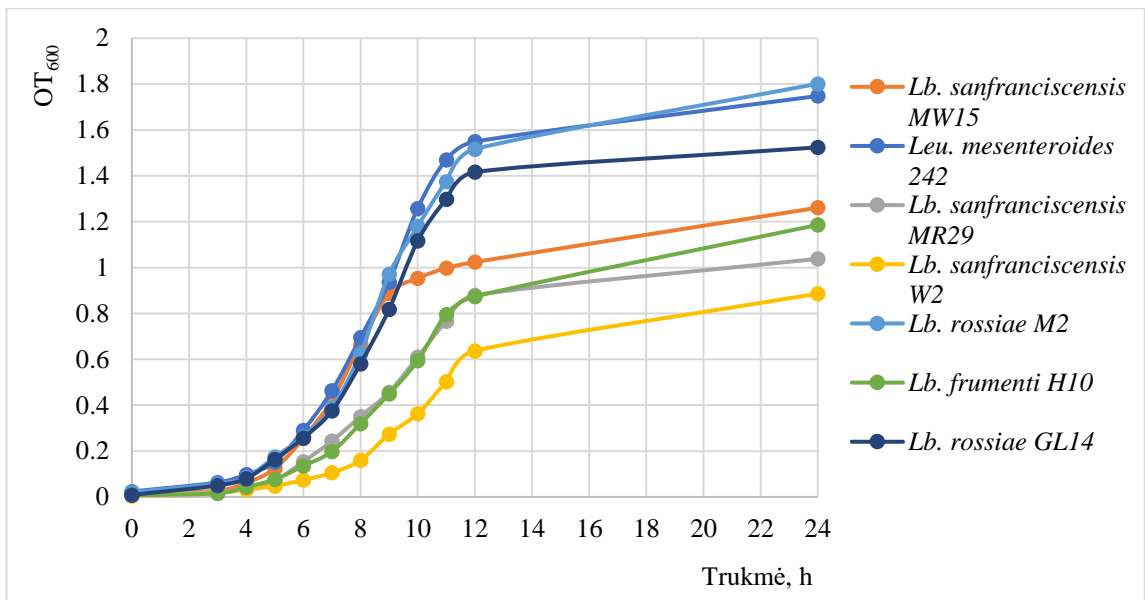
Fermentacijos metu PRB gamina įvairius junginius, kurie priklauso nuo bakterijų rūšies ir padermės. Skiriasi ne tik galutiniai produktai, bet ir jų kiekiai. Siekiant įvertinti kurios iš tiriamų PRB tinkamiausios manitolio gamybai, yra svarbu parinkti kiekvienai bakterijai optimalias augimo sąlygas ir nustatyti susidariusius tikslinio produkto kiekius. Tam buvo sudarytos bakterijų augimo kreivės, nustatytas MDH aktyvumas ir atlikti fermentacijos tyrimai.

##### 3.1.1. Manitolio 2-dehidrogenazės aktyvumo įvertinimas

PRB augimo MRS terpėje (optimalioje kiekvienai tirtai bakterijos padermei temperatūroje) kreivės, pavaizduotos pagal optinio tankio priklausomybę nuo laiko, pateiktos 12 ir 13 pav. Bakterijų optinis tankis po 24 h buvo labai skirtingas, svyravo nuo  $0,488 \pm 0,045$  iki  $1,801 \pm 0,031$ . *Lactobacillus* ir *Leuconostoc* genties bakterijos greičiau prisitaikė naujoje terpėje, jų latentine fazė buvo trumpesnė nei *Lactococcus* genties bakterijų, o augimo greitis ir ląstelių tankis po 24 h buvo didesnis. *Lactococcus* genties bakterijų logaritminė fazė prasidėjo maždaug po 6 h nuo eksperimento pradžios, o *Lactobacillus* ir *Leuconostoc* – po 5 h. Daugumos PRB augimo greitis sulėtėjo po 11–12 h nuo tyrimo pradžios. Vertinant gautus rezultatus, labiausiai išsiskyrė *L. lactis* A212 padermės augimo kreivė. Šios padermės logaritminė fazė truko žymiai ilgiau nei kitų *L. lactis* rūšių bakterijų. Praėjus 24 h nuo eksperimento pradžios *L. lactis* A212 padermės optinis tankis siekė  $1,263 \pm 0,062$  ir buvo didesnis nei tai pačiai rūšiai priklausančių bakterijų. *Leu. mesenteroides* 242 ir *Lb. rossiae* M2 padermės pasižymėjo greičiausia prisitaikymo faze ir didžiausiu optiniu tankiu, atitinkamai  $1,801 \pm 0,033$  ir  $1,748 \pm 0,027$ . Po 24 h tik dviejų *L. lactis* padermių (T/15 ir 149/II) optinis tankis nesiekė 0,6, jų reikšmės buvo  $0,488 \pm 0,024$  ir  $0,562 \pm 0,047$ .



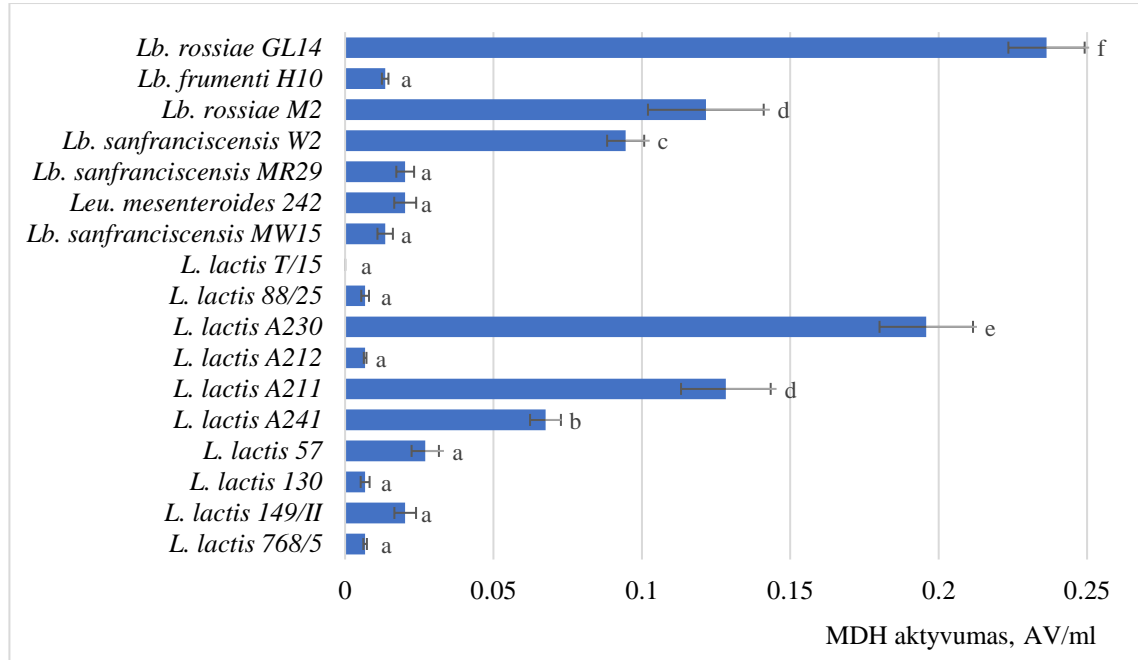
12 pav. *Lactococcus lactis* bakterijų augimo kreivės



13 pav. *Lactobacillus* ir *Leuconostoc* bakterijų augimo kreivės

Remiantis gautomis bakterijų augimo kreivėmis, pasirinkta nustatyti MDH aktyvumą logaritminėje fazėje, kai ląstelės sparčiai auga ir gamina fermentus. Kiekvienos padermės MDH aktyvumas nustatytas esant optiniam tankiui maždaug 0,6 (po 7–11 h nuo eksperimento pradžios, priklausomai nuo tiriamos PRB, išskyrus *L. lactis* T/15 ir 149/II padermes).

Pagal 1 formulę apskaičiuotos MDH vertės pateiktos 14 pav.



14 pav. Skirtingų PRB padermių manitolio 2-dehidrogenazės aktyvumas (skirtingos raidės, rodo, kad yra statistiškai reikšmingi skirtumai, esant 95 % tikimybės lygiui)

Tyrimo rezultatai parodė, kad iš visų PRB didžiausiu fermento aktyvumu pasižymėjo *Lb. rossiae* GL14 ir *L. lactis* A230, atitinkamai  $0,24 \pm 0,013$  ir  $0,19 \pm 0,016$  AV/ml. Mažesnę aktyvumą turėjo *L. lactis* A241, A211, *Lb. sanfranciscensis* MR29 ir W2. Kitos padermės MDH aktyvumo

neturėjo arba jis buvo nežymus. Nustatyta, kad iš *Lactococcus* genties tik *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *paracitrovorus* padermės, išskyrus A212, pasižymėjo didesniu MDH aktyvumu. Tokie rezultatai galėjo būti dėl *L. lactis* A212 padermės lėtesnio augimo tyrimo pradžioje ir ilgesnės logaritminės fazės. Iš *Lactobacillus* genties bakterijų didžiausią fermento aktyvumą turėjo *Lb. rossiae* GL14 ir dvi *Lb. sanfranciscensis* padermės (MR29 ir W2). Tirta *Leuconostoc* genties bakterija reikšmingesniu MDH aktyvumu nepasižymėjo.

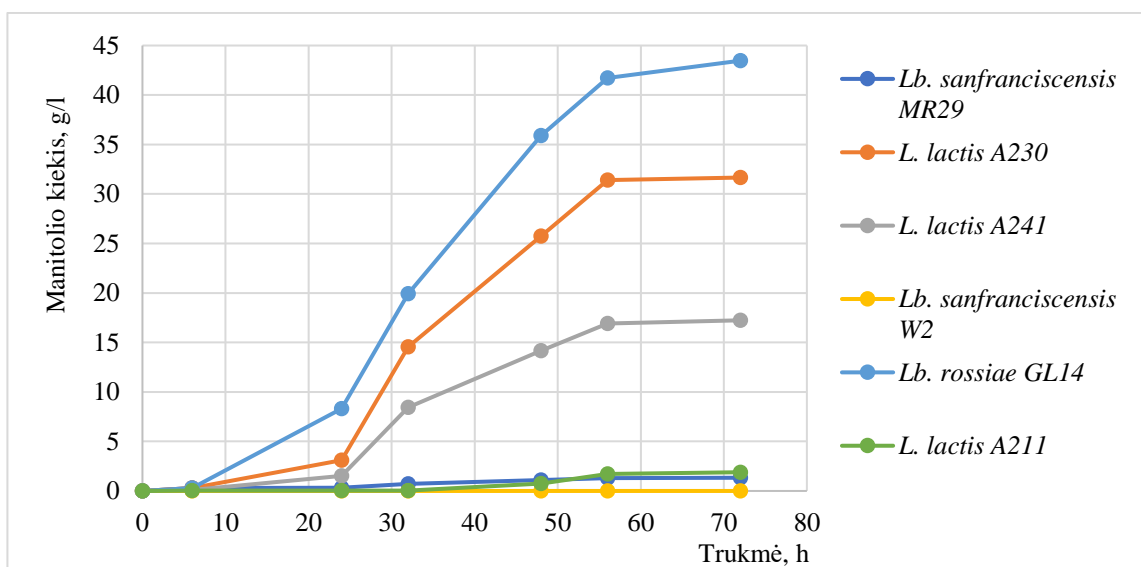
S. Parmentier et al. [85] tyrė *Leu. pseudomesenteroides* ATCC 12291 savybes ir panaudojimo galimybes fermentinei manitolio gamybai. Tyrimo duomenimis MDH aktyvumas kito nuo 0,1 iki 0,7 AV/ml, priklausomai nuo pH ir augimo laiko. Didžiausias fermento aktyvumas nustatytas po 6,5 h nuo fermentacijos pradžios, esant pH 6,5 ir ląstelių optiniam tankiui (OT 600 nm) šiek tiek virš 1. Po 6,5 h MDH aktyvumas pradėjo mažėti. Eksperimento metu tirtos padermės augo lėčiau, todėl, atsižvelgiant į tiriamo fermento aktyvumą, nustatytą ties optiniu tankiu 0,6 (OD 600 nm), straipsnyje pateiktos vertės 0,18–0,25 AV/ml sutampa su tyrimo metu gautomis didžiausiomis šio rodiklio vertėmis (0,19±0,016 ir 0,24±0,013 AV/ml). Kitos apskaičiuotos MDH aktyvumo vertės buvo mažesnės nei pateiktos straipsnyje. Tokius rezultatus galėjo lemti lėtesnis bakterijų augimas ir skirtingos padermių savybės. M. Zhang'as et al. [96] iškėlė hipotezę, kad didinant intraląstelinį NADH kiekį padidėtų manitolio išeiga. NADH kiekiui padidinti buvo pasirinkta nikotino rūgštis. Fermentuojant su *Leu. pseudomesenteroides* CTCC G123 nustatyta didžiausia MDH vertė (0,249 AV/ml), gauta pridėjus 50 mg/l nikotino rūgšties, buvo 3,5 karto didesnė nei kontrolinės grupės. 50 mg/l nikotino rūgšties priedas manitolio koncentraciją padidino nuo 64,6 iki 88,1 g/l. Šio darbo metu nustatyta didžiausia MDH vertė (0,24±0,013 AV/ml) sutampa su didžiausia verte, pateikta straipsnyje, o kitų bakterijų MDH aktyvumai buvo mažesni. Taip galėjo būti dėl nepakankamo intraląstelinio NADH kiekio, kuris nukreipia reakcijos lygtį manitolio susidarymo kryptimi.

Remiantis literatūros duomenimis ir gautais rezultatais, kai kurios iš tirtų padermių galėtų būti pritaikytos manitolio gamybai. Tolimesniems tyrimams atrinktos 6 didžiausiu MDH aktyvumu pasižymėjusios padermės: *Lb. rossiae* GL14, *L. lactis* A230, A241, A211, *Lb. sanfranciscensis* MR29 ir W2. Jos naudotos fermentacijos eksperimentuose, siekiant parinkti didžiausią manitolio kiekį gaminančią bakteriją.

### 3.1.2. Manitolio susidarymas fermentuojant pieno rūgšties bakterijomis

Mikroorganizmai manitolį gamina iš fruktozės, tačiau dėl nemažos fruktozės kainos ieškoma alternatyvių anglies šaltinių. Remiantis analizuotos literatūros duomenimis, trečdalis fruktozės gali būti pakeista kitais anglies šaltiniais, iš kurių populiariausias yra gliukozė. Taip pat dvi dalys gali būti pakeistos sacharoze. Abiem atvejais fruktozės ir gliukozės santykis yra 2:1. Nustatyta, kad naudojant fruktozės-gliukozės mišinį 2:1, gaunami labai panašūs manitolio, pieno ir acto rūgšties kiekiai, kaip ir fermentuojant tik su fruktoze. PRB augimui reikia ne tik anglies, bet ir azoto šaltinio, todėl dažniausiai PRB kultivavimui naudojama MRS terpė, kurios sudėtyje yra visos bakterijų augimui reikalingos maistinės medžiagos. CSL kartu su sojų peptonu panaudojimas nustatytas kaip ekonomiškė būdas pakeisti MRS terpę ir užtikrinti reikiamų maistinių medžiagų kiekį, o mangano sulfato priedas dar labiau padidina manitolio išeigas. Dėl šių priežasčių fermentacijos tyrimams kaip modelinė sistema (ST) pasirinktas fruktozės-gliukozės mišinys 2:1, CSS (alternatyva CSL), sojų peptonas ir mangano sulfatas.

Fermentacijos eksperimentų rezultatai pavaizduoti 15 pav. Atlikus eksperimentą nustatyta, kad didžiausias manitolio kiekis gautas fermentuojant su *Lb. rossiae* GL14 (43,47 g/l), mažiau manitolio susidarė fermentuojant su *L. lactis* A230 ir A211, atitinkamai 31,66 ir 17,24 g/l. Likusių 3 bakterijų (*Lb. sanfranciscensis* MR29, W2 ir *L. lactis* A211) fermentacijos produktuose reikšmingesnio manitolio kiekio nebuvo nustatyta. Manitolio susidarymo greitis per pirmąsias 6 h didėjo nežymiai, sparčiausiai kito tarp 24 ir 56 h, o po to vėl sulėtėjo. Tarp 24 ir 56 h manitolio susidarymo greitis buvo didžiausias *Lb. rossiae* GL14 fermentacijos terpėje ir siekė 1,04 g/l/h, *Lb. rossiae* A230 ir A211 terpėse mažesnis – 0,88 ir 0,48 g/l/h. Lyginant su MDH aktyvumo nustatymo rezultatais, *Lb. rossiae* GL14 padermė išsiskyrė tiek didžiausiu MDH aktyvumu, tiek didžiausia manitolio koncentracija fermentacijos terpėje. Mažesnis fermento aktyvumas bei pagaminto manitolio kiekis nustatytas tiriant *L. lactis* A230. *L. lactis* A241 bakterijos fermentacijos terpėje nustatytas nemažas manitolio kiekis (17,24 g/l), tačiau MDH aktyvumas buvo mažesnis nei *Lb. sanfranciscensis* MR29, W2 ir *L. lactis* A211 padermių. Šios padermės nors ir pasižymėjo nemažu fermentiniu aktyvumu, bet po 72 h fermentacijos nustatyti manitolio kiekiai buvo nežymūs (nesiekė 2 g/l).



15 pav. Manitolio kiekio kitimas fermentuojant PRB fruktozės-gliukozės (2:1) substratą

J. W. Yun'as ir D. H. Kim'as [45] lygino manitolio gamybą dvejomis skirtingomis PRB. Po fermentacijos *Lactobacillus* sp. Y-107 iš 180 g/l fruktozės susidarė 80 g/l manitolio, o *Leuconostoc* sp. Y-002 – apie 30 g/l. Atliktas eksperimentas parodė, kad manitolio susidarymo efektyvumas labai priklauso nuo jo gamybai parinktos PRB. N. von Weyarn'as [32], tirdamas skirtingas heterofermentines PRB, nustatė, kad iš 20 g/l fruktozės ir 10 g/l gliukozės susidaro nuo 15,8 iki 19,5 g/l manitolio. *Lb. sanfranciscensis* ATCC-27651 padermė beveik visą fruktozę pavertė manitolium, tačiau manitolio susidarymo greitis siekė tik 0,78 g/l/h. Tolesniems tyrimams buvo atrinktos *L. mesenteroides* ATCC-9135, *L. pseudomesenteroides* ATCC-12291, *Lb. brevis* ATCC-8287 ir *Lb. fermentum* NRRL-B-1932 padermės, kuriomis fermentuojant manitolio susidarymo greitis atitinkamai 1,53, 1,44, 1,47 ir 1,45 g/l/h. Manitolio susidarymo greitis priklauso nuo ląstelių augimo greičio, tačiau net padermių, pasižyminčių panašiu augimo greičiu, manitolio produktyvumas skyrėsi. Nustatyta, kad daugumoje tirtų padermių dalis fruktozės buvo nukreipta fosfoketolazės kryptimi susidarant acto, pieno rūgščiai, etanolui ir CO<sub>2</sub>. C. Rodriguez et al. [97] nustatė, kad tomis pačiomis sąlygomis fermentacijai naudojant skirtingas PRB, gaunamas skirtingas manitolio kiekis. Fermentuojant su *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 ir *Lactobacillus fermentum* CRL 573, iš 65 g/l

fruktozės ir 10 g/l gliukozės gautas didžiausias manitolio kiekis, atitinkamai 22 g/l ir 56 g/l (per 24 h 37 °C temperatūroje, esant pH 5,0.). Ištyrus šių bakterijų metabolizmą buvo nustatyta, kad *Lb. reuteri* CRL 1101 fruktozę naudojo kaip alternatyvų elektronų akceptorių arba kaip elektronų akceptorių ir kaip anglies šaltinį, priklausomai nuo pH. *Lb. fermentum* CRL 573 fruktozę naudojo kaip elektronų akceptorių ir kaip anglies šaltinį, nepriklausomai nuo terpės pH.

Atsižvelgus į gautus ir literatūroje pateiktus rezultatus, galima teigti, kad fermentuojant tirtomis padermėmis susidaręs manitolio kiekis priklauso ne tik nuo fermentacijos sąlygų, bet ir nuo naudojamos PRB metabolizmo skirtumų. Analizuotuose straipsniuose manitolio gamybai plačiausiai naudotos *Lb. intermedius*, *Lb. fermentum* ir *Leu. mesenteriodes* padermės. *Lb. rossiae* GL14, atrinkta tolimesniems tyrimams kaip daugiausiai iš tirtų PRB manitolio gaminanti padermė, prieš tai analizuota nebuvo. Deja, lyginant su literatūroje pateiktomis didžiausią manitolio kiekį gaminančiomis PRB, ji pasižymėjo mažesniu produktyvumu fruktozę verčiant manitolium.

### **3.2. Duonos atliekų panaudojimas manitolio gamybai**

Biotechnologinei manitolio gamybai be fruktozės-gliukozės terpės buvo tirti alternatyvūs substratai. Tinkamiausi nebrangūs substratai mikroorganizmų kultivavimui yra žemės ūkio ir maisto produktų atliekos. Nors atliekos fermentacijos procese naudojamos vis dažniau, tačiau didžioji dalis publikuotų straipsnių yra apie jų panaudojimą etanolio ir organinių rūgščių gamybai. Manitolio biotechnologinei gamybai su PRB jau buvo panaudotas inulinas, anakardžių vaisių sultys, saldžiųjų ceratonijų sirupas, cukranendrių melasa. Šiame darbe buvo tirtos duonos atliekų panaudojimo fermentacijos terpei galimybės. Duonos atliekos pasirinktos dėl didelio krakmolo kiekio, iš kurio gali būti pagamintas gliukozės-fruktozės sirupas, bei dėl kitų jose esančių maistinių medžiagų (baltymų, mineralinių medžiagų), reikalingų bakterijų dauginimuisi. Kaip modelinę duonos atliekų sistema pasirinktos pusruginės duonos atliekos, įvertinant esamą duonos rūšių įvairovę, kurios gamybai daugiausia naudojami kvietiniai ir ruginiai miltai.

#### **3.2.1. Fermentinės duonos atliekų hidrolizės optimizavimas**

Siekiant įvertinti pusruginės duonos atliekų hidrolizės iki gliukozės potencialą, atlikta jų cheminės sudėties analizė. Duonos atliekų drėgnis buvo  $8,77 \pm 0,12$  %. Baltymai sudarė  $7,65 \pm 0,10$  % s. m., riebalai –  $2,42 \pm 0,06$  % s. m., mineralinės medžiagos –  $1,19 \pm 0,12$  % s. m., angliavandeniai –  $88,72 \pm 0,06$  % s. m. Nustatytas krakmolo kiekis  $85,58 \pm 0,69$  % duonos s. m.

Duonos atliekų hidrolizės tikslas yra suskaldyti krakmolo molekules ir gauti gliukozę. Svarbiausi proceso parametrai, siekiant gauti didžiausią gliukozės išėigą, yra substrato (duonos) kiekis ir fermentų –  $\alpha$ -amilazės ir gliukoamilazės – kiekiai. Gamintojo pateiktose fermentų specifikacijose nurodomas optimalus fermentų kiekis, tačiau šis intervalas gana platus ir pritaikytas krakmolo, o ne duonos atliekų hidrolizei. Duonoje krakmolas yra pakitęs, nes kepat krakmolo granulės brinksta, kleisterizuojasi ir tampa dalinai tirpiomis vandenyje [28]. Duonos sausųjų medžiagų kiekis (substrato koncentracija) hidrolizės metu taip pat turėtų būti optimalus. Esant mažai substrato koncentracijai bus gaunama nedidelė gliukozės išėiga, o esant per didelei koncentracijai masė bus per tiršta, gerai nesimaišys ir fermentai negalės suskaldyti viso duonoje esančio krakmolo [34, 89].

Šio eksperimento metu hidrolizės parametrų optimizavimui sudarytas PAM ir CKP. Rezultatai pateikti kaip atsaką nurodant gautą gliukozės kiekį. Proceso parametrai, eksperimentiniai ir

prognozuojami gliukozės kiekiai pateikti 7 lentelėje. Atlikto eksperimento rezultatai parodė, kad hidrolizės metu gauta gliukozės išeiga kito nuo 56,40 iki 84,32 % duonos s. m. arba nuo 65,47 iki 97,89 % duonoje esančio krakmolo kiekio. Didelis gliukozės išeigų intervalas rodo, kad tinkamas parametų parinkimas duonos atliekų hidrolizei yra reikšmingas.

**7 lentelė.** Centriško kompozicinio plano parametų vertės duonos atliekų hidrolizės optimizavimui ir gautos atsako – gliukozės kiekio – vertės

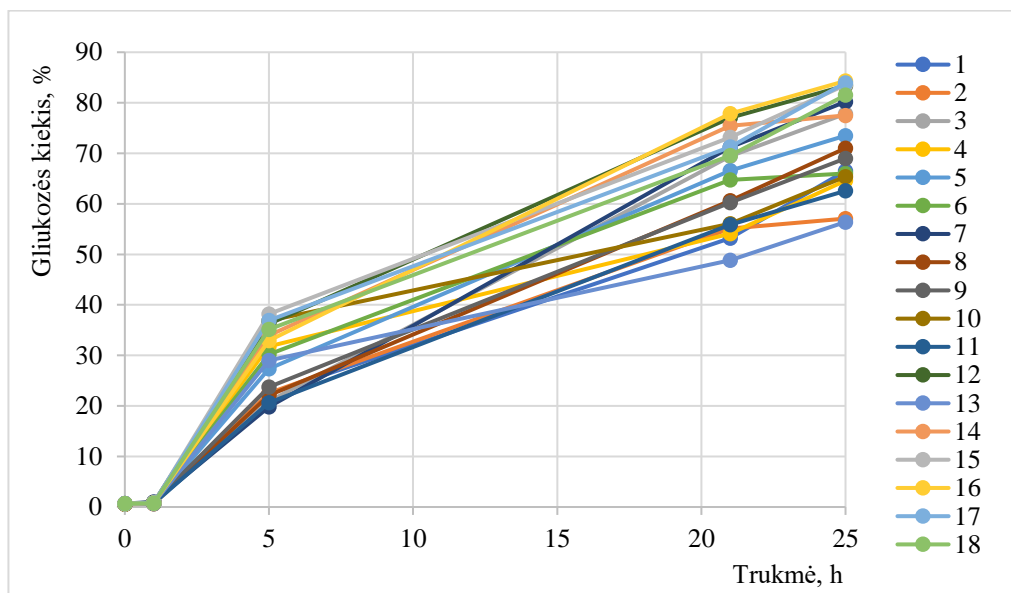
Eil. nr.	Optimizuojami parametrai			Gliukozės išeiga, % duonos s. m.		Gliukozės išeiga, % krakmolo	
	Duonos kiekis (masės %)	$\alpha$ -amilazės kiekis, KNU/g duonos	Gliukoamilazės kiekis, AGU/g duonos	Ekspirimentinis	Prognozuojamas	Ekspirimentinis	Prognozuojamas
1	15,00	0,02	0,30	66,52±1,22 <sup>bc</sup>	66,29	77,22±1,43 <sup>bc</sup>	76,96
2	25,00	0,02	0,30	57,08±1,03 <sup>a</sup>	56,84	66,26±1,20 <sup>a</sup>	65,99
3	15,00	0,04	0,30	77,82±1,77 <sup>g</sup>	77,58	90,34±2,07 <sup>g</sup>	90,06
4	25,00	0,04	0,30	64,60±1,92 <sup>bc</sup>	64,37	74,99±2,44 <sup>bc</sup>	74,73
5	15,00	0,02	0,50	73,49±0,44 <sup>ef</sup>	73,25	85,31±0,51 <sup>ef</sup>	85,04
6	25,00	0,02	0,50	66,00±2,40 <sup>bc</sup>	65,77	76,62±2,81 <sup>bc</sup>	76,35
7	15,00	0,04	0,50	80,19±0,61 <sup>gh</sup>	79,96	93,09±0,72 <sup>gh</sup>	92,83
8	25,00	0,04	0,50	71,01±1,92 <sup>de</sup>	70,77	82,44±2,24 <sup>de</sup>	82,16
9	11,34	0,03	0,40	68,99±1,52 <sup>cd</sup>	69,31	80,09±1,77 <sup>cd</sup>	80,46
10	28,66	0,03	0,40	65,39±1,09 <sup>bc</sup>	65,70	75,91±1,28 <sup>bc</sup>	76,27
11	20,00	0,013	0,40	62,57±0,86 <sup>b</sup>	62,89	72,64±1,00 <sup>b</sup>	73,01
12	20,00	0,047	0,40	83,38±0,14 <sup>h</sup>	83,70	96,80±0,17 <sup>h</sup>	97,17
13	20,00	0,03	0,23	56,40±1,58 <sup>a</sup>	56,72	65,47±1,84 <sup>a</sup>	65,85
14	20,00	0,03	0,57	77,50±0,86 <sup>fg</sup>	77,81	89,97±1,00 <sup>fg</sup>	90,33
15	20,00	0,03	0,40	83,53±0,58 <sup>h</sup>	83,45	96,97±0,68 <sup>h</sup>	96,88
16	20,00	0,03	0,40	84,32±1,37 <sup>h</sup>	83,45	97,89±1,60 <sup>h</sup>	96,88
17	20,00	0,03	0,40	83,96±0,43 <sup>h</sup>	83,45	97,47±0,50 <sup>h</sup>	96,88
18	20,00	0,03	0,40	81,52±0,29 <sup>gh</sup>	83,45	94,64±0,34 <sup>gh</sup>	96,88

Vidutinių verčių reikšmės, pažymėtos skirtingomis raidėmis, rodo, kad tame pačiame stulpelyje yra statistiškai reikšmingi skirtumai, įvertinti pagal Dunkano kriterijų ( $p \leq 0,05$ )

Duonos atliekų hidrolizės proceso kinetikos tyrimai parodė, kad gliukozės kiekis didėjo palaipsniui ir priklausė nuo duonos bei abiejų fermentų kiekių. Gliukozės kiekio priklausomybė nuo hidrolizės trukmės pavaizduota 16 pav. Gliukozės kiekis vandeninėje duonos suspensijoje prieš eksperimentą svyravo nuo 0,53 iki 0,60 %. Nuo eksperimento pradžios iki antrojo hidrolizės etapo (sucukrinimo) gliukozės kiekis (0,70–1,0 %) beveik nepadidėjo, nes  $\alpha$ -amilazė suskaldė krakmolo molekules iki dekstrinų. Po 300 min (4 h nuo antrojo etapo pradžios) nustatytas staigus gliukozės kiekio padidėjimas, jos kiekis išaugo iki 19,79–38,22 % (maždaug 30–40 kartų). Gliukozės susidarymo greitis siekė 4,69±1,56 %/h. Tęsiant hidrolizę toliau, gliukozės kiekis taip pat sparčiai didėjo ir, praėjus 20 h nuo gliukoamilazės pridėjimo, siekė 48,85–77,86 %, o gliukozės susidarymo greitis buvo 3,13±0,72 %/h. Per paskutines 4 hidrolizės valandas (20–24 h nuo antrojo etapo pradžios) nustatyta,



kad gliukozės susidarymas sulėtėjo arba jos kiekis beveik nebekito ir gliukozės susidarymo greitis sumažėjo iki  $1,47 \pm 1,15$  %/h. Didžiausia gliukozės išeiga išsiskyrė 12, 15–18 variantai. Juose duonos kiekis sudarė 20 masės %, gliukoamilazės – 0,40 AGU/g duonos, o  $\alpha$ -amilazės – atitinkamai 0,047 ir 0,03 KNU/g duonos. 15–18 variantuose gliukozės kiekis didėjo maždaug panašiai, o 12 variante – šiek tiek greičiau. 12 variantas išsiskyrė didesniu  $\alpha$ -amilazės kiekiu. Mažiausia gliukozės išeiga (56,40 %) ir lėčiausias gliukozės kiekio augimas gautas 13 variante, kuriame buvo mažiausias gliukoamilazės kiekis (0,23 AGU/g duonos).



**16 pav.** Gliukozės kiekio priklausomybė nuo hidrolizės trukmės

Išanalizavus visus rezultatus, nustatyta tendencija, kad, didėjant fermento kiekiui iki tam tikro lygio ( $\alpha$ -amilazei iki 0,047 KNU/g duonos ir gliukoamilazei iki 0,55 AGU/g duonos), didėjo gliukozės išeiga ir hidrolizės procesas vyko greičiau. Didesni fermentų  $\alpha$ -amilazės ir gliukoamilazės kiekiai (daugiau nei 0,047 KNU/g duonos ir 0,55 AGU/g duonos) didelės įtakos išeigai neturėjo. Nustatyta, kad didžiausios gliukozės išeigos pasiektos, kai duonos kiekis 15–20 masės %. Toliau didėjant duonos kiekiui suspensijoje hidrolizės procesas lėtėja ir ilgėja.

Parinkto modelio adekvatumui nustatyti naudota vienfaktorinė dispersinė analizė (ANOVA), įvertinta klaidos tikimybė, individualių regresijos koeficientų reikšmingumas ( $p < 0,05$ ), Fišerio kriterijus ( $F$ ) ir determinacijos koeficientas ( $R^2$ ) (žr. 8 lentelė). Remiantis eksperimento metu gautomis vertėmis buvo sudarytas matematinis modelis. Regresijos modelio analizė parodė, kad atsižvelgiant į Stjudento testą ( $p = 0,0005$ ,  $F = 67,33$ ) pats modelis reikšmingas, o klaidos tikimybė – nereikšminga ( $p > 0,05$ ), jos  $p$ -reikšmė lygi 0,5191. Remiantis gautais rezultatais nustatyta, kad gliukozės išeigai duonos atliekų hidrolizės metu reikšmingą įtaką turėjo 5 veiksniai ( $p < 0,05$ ):  $B$  ( $\alpha$ -amilazės kiekis),  $C$  (gliukoamilazės kiekis),  $A^2$  ( $A$  – duonos kiekis),  $B^2$ ,  $C^2$ . Gliukoamilazės kiekis (Fišerio kriterijus  $F = 128,86$ ) turėjo šiek tiek didesnę įtaką gliukozės išeigai nei  $\alpha$ -amilazės kiekis ( $F = 125,38$ ). Kiti kintamieji gali būti išdėstyti taip:  $C^2$  ( $F = 231,80$ )  $>$   $A^2$  ( $F = 224,98$ )  $>$   $B^2$  ( $F = 91,33$ ). Duonos sausųjų medžiagų kiekis yra nereikšmingas modelio veiksnys ( $p > 0,05$ ), o tai reiškia, kad duonos krakmolo hidrolizė daugiausia priklauso nuo fermentų kiekio ir jų sąveikos. Modelis, apibūdinantis ryšį tarp priklausomų ir nepriklausomų kintamųjų ( $A$ ,  $B$ ,  $C$ ), aprašomas lygtimi:



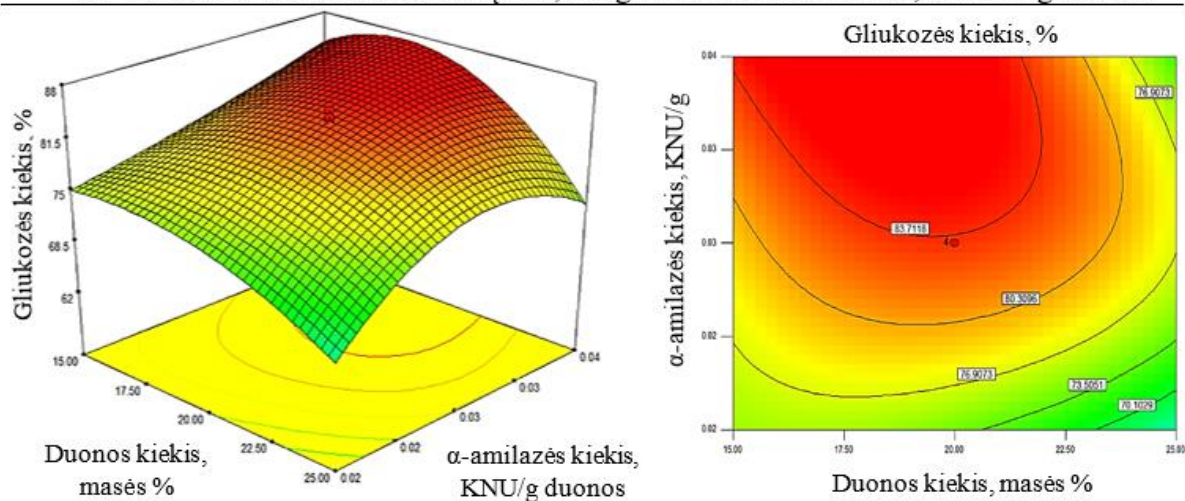
### 17 pav. Prognozuojamų ir eksperimentinių gliukozės kiekių palyginimas

Taškų išsidėstymas nedideliu atstumu nuo linijos reiškia, kad tiriamajame verčių intervale faktinės išėigos labai gerai koreliavo su prognozuojamomis. Modelio adekvatumą patvirtino ir determinacijos koeficientas ( $R^2 = 0,9955$ ), kuris rodo sudaryto matematinio modelio atitikimą eksperimento metu gautiems rezultatams. Ryšį tarp parametų ir išėigos apibūdina koreguotas ( $R^2 = 0,9807$ ) ir prognozuojamas ( $R^2 = 0,8480$ ) determinacijos koeficientai. Nelabai didelis koeficientų skirtumas patvirtino modelio tinkamumą numatyti optimalias eksperimento vertes (jų vertės neturi skirtis daugiau nei 0,2). Palyginamojo tikslumo santykinė vertė (23,28), kuri lygina prognozuojamų verčių diapazoną projektavimo taške su vidutine prognozavimo paklaida, buvo didesnė nei 4, o tai rodo, kad signalas tinkamas modeliuojant plano erdvę.

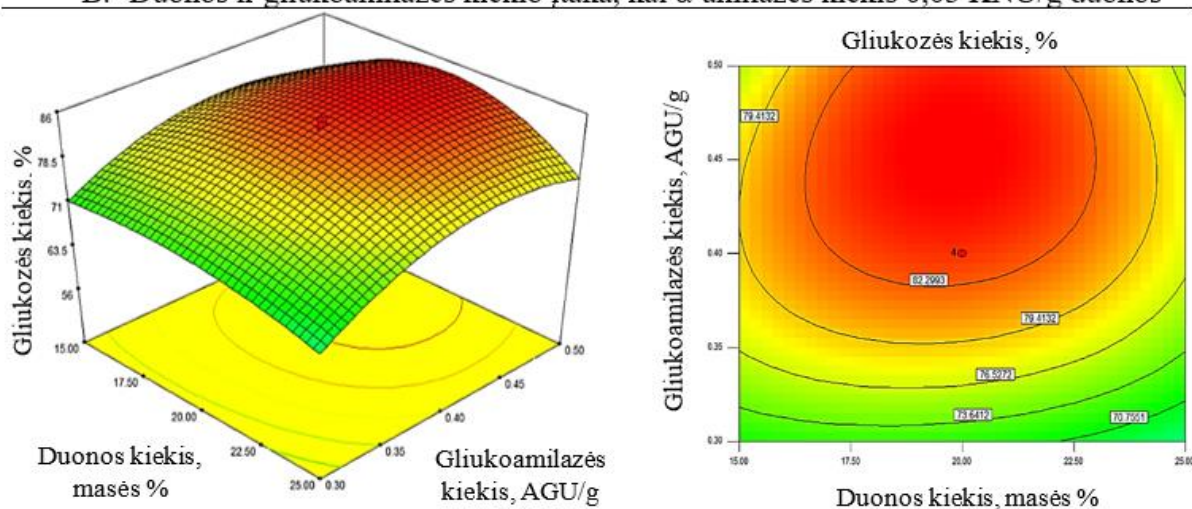
3D ir 2D grafikai vaizduoja skirtingų parametų (duonos,  $\alpha$ -amilazės ir gliukoamilazės kiekių) įtaką gliukozės išėigai (žr. 18 pav.). Grafikai sudaryti vieną parametą laikant konstanta, jo kiekis šiame grafike išlieka pastovus, o kiti du parametrai kinta ir prognozuoja atsaką. 18A pav. pavaizduota duonos ir  $\alpha$ -amilazės kiekio įtaka, esant pastoviam gliukoamilazės kiekiui (0,40 AGU/g duonos). Rezultatai parodė, kad tiek duonos, tiek ir  $\alpha$ -amilazės kiekis lemia galutinę gliukozės išėigą. Didžiausia gliukozės išėiga gauta, kai duonos kiekis kinta nuo 15 iki 22 masės %, o  $\alpha$ -amilazės kiekis yra didesnis nei 0,032 KNU/g duonos. Duonos kiekis, didesnis nei 22 masės %, gliukozės išėigai turėjo neigiamą įtaką. Siekiant gauti didžiausias gliukozės išėigas, mažiausias fermento  $\alpha$ -amilazės kiekis sunaudojamas, kai duonos kiekis yra tarp 18,5 ir 20,5 masės %. 18B pav. grafiškai pateikta duonos ir gliukoamilazės kiekio įtaka gliukozės išėigai, esant pastoviam  $\alpha$ -amilazės kiekiui (0,03 KNU/g duonos). Rezultatai parodė, kad šiuo atveju tiek gliukoamilazės, tiek duonos kiekis turėjo įtakos galutinei gliukozės išėigai. Didžiausia gliukozės išėiga gauta, kai gliukoamilazės kiekis buvo didesnis nei 0,38 AGU/g duonos, o duonos kiekis kito nuo 16,5 iki 23 masės %. Esant mažesniai nei 16,5 ir didesniai nei 23 masės % duonos kiekiui, gliukozės išėiga mažėjo. 18C pav. vaizduojama  $\alpha$ -amilazės ir gliukoamilazės kiekio įtaka gliukozės išėigai, kai duonos kiekis pastovus – 20 masės %. Pateiktuose grafikuose aiškiai matoma, kad abiejų fermentų kiekiai labai svarbūs galutinei gliukozės išėigai. Didėjant  $\alpha$ -amilazės ir gliukoamilazės kiekiams, didėja gliukozės išėiga. Abiejų fermentų įtaka gliukozės kiekiui labai panaši, nes panašios ir dispersinės analizės regresijos parametų vertės. M. Fujii'is et al. [98] tirdami krakmolo hidrolizės kinetiką nustatė, kad  $\alpha$ -amilazė ir gliukoamilazė krakmolo molekules veikia sinergistiškai, todėl fermentų panaudojimas optimaliomis koncentracijomis suteikia didžiausią efektyvumą. Tyrimo metu didžiausios gliukozės išėigos gautos, kai  $\alpha$ -amilazės kiekis buvo didesnis nei 0,027 KNU/g duonos ir gliukoamilazės kiekis – nei 0,36 AGU/g duonos. Taigi, didžiausią gliukozės kiekį galima pasiekti, naudojant hidrolizei didesnius abiejų fermentų kiekius ir optimalų duonos kiekį.

Remiantis gautu matematiniu modeliu, nustatytos optimalios hidrolizės sąlygos, kurias pritaikius galima gauti didžiausią gliukozės išėigą, naudojant mažiausius fermentų kiekius: duonos kiekis – 18,64 masės %,  $\alpha$ -amilazės – 0,035 KNU/g duonos ir gliukoamilazės – 0,43 AGU/g duonos. Pritaikius pakoreguotus kintamųjų kiekius, apskaičiuota prognozuojama gliukozės išėiga – 86,09 % duonos s. m. Atlikus eksperimentą šiomis sąlygomis, gauta gliukozės išėiga  $84,35 \pm 0,47$  % duonos s. m. ir  $97,92 \pm 0,92$  % krakmolo kiekio. Tai rodo, kad sudarytas modelis gana tiksliai prognozuoja atsaką ir gali būti pritaikytas šio proceso optimizavimui.

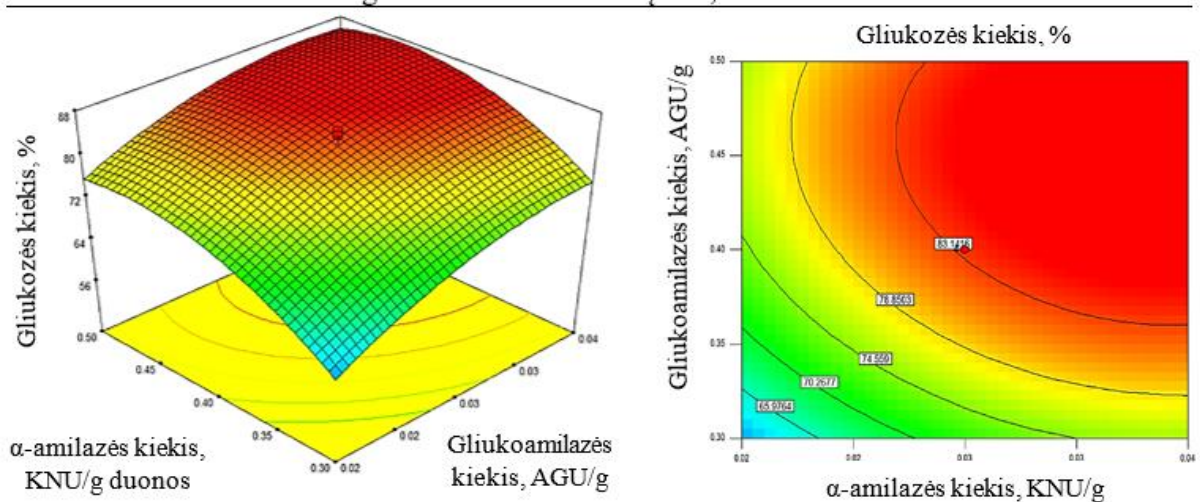
A. Duonos ir  $\alpha$ -amilazės kiekio įtaka, kai gliukoamilazės kiekis 0,40 AGU/g duonos



B. Duonos ir gliukoamilazės kiekio įtaka, kai  $\alpha$ -amilazės kiekis 0,03 KNU/g duonos



C.  $\alpha$ -amilazės ir gliukoamilazės kiekio įtaka, kai duonos kiekis 20 masės %



18 pav. Atsako paviršiaus 3D ir 2D plotai vaizduojantys parametų (duonos,  $\alpha$ -amilazės ir gliukoamilazės kiekio) įtaką gliukozės išeigai

Eksperimento metu buvo nustatyta, kad didesnis duonos kiekis nei 23 masės % mažina gliukozės išėigą. Panaši tendencija nustatyta F. Ebrahimi et al. [82], tiriant kvietinės duonos atliekų hidrolizę ir gauto hidrolizato panaudojimą etanolio gamybai. Nustatyta, kad duonos suspensija, kurioje yra daugiau nei 20 % s. m., pasižymi tiršta konsistencija ir dėl to negalima užtikrinti tolygaus maišymo suskystinimo metu. Didesnei duonos suspensijos koncentracijai gauti buvo panaudotas periodinis su pamaitinimu procesas, kurio metu suskystinimas buvo pradėtas esant mažesnei duonos suspensijos koncentracijai, o po to koncentracija palaipsniui buvo didinama iki 35 masės %. Suskystinimui naudota  $\alpha$ -amilazės 0,8 ml/kg duonos s. m., sucukrinimui – amilogliukozidazės 0,8 ml/kg duonos s. m. Gauta gliukozės išėiga siekė 80 % nuo duonos s. m. A. S. Demirci'is et al. [71], tirdami kvietinės duonos atliekų hidrolizę į gliukozės sirupą, optimizavo hidrolizės parametrus. Nustatyta didžiausia gliukozės išėiga (86 % duonos s. m.) buvo gauta hidrolizuojant 11 masės % duonos atliekų substratą  $\alpha$ -amilaze iš *Bacillus licheniformis* (0,08 KNU/g duonos) ir gliukoamilaze iš *Aspergillus* sp. (2,91 AGU/g duonos). Šiame darbe gauta panaši gliukozės išėiga (84,35 % duonos s. m. arba 97,92 % krakmolo), panaudojus mažesnius fermentų kiekius (0,035 KNU/g duonos ir 0,43 AGU/g duonos), bet didesnę duonos kiekį (18,64 masės %) galėjo būti dėl skirtingos duonos ir fermentų panaudojimo. Tokie rezultatai rodo, kad, parinkus optimalias sąlygas, pusruginės duonos atliekos yra gera žaliava gliukozės sirupui gaminti fermentiniu būdu, panaudojus termostabilią  $\alpha$ -amilazę iš *Bacillus* sp. ir gliukoamilazę iš *Aspergillus niger*.

### 3.2.2. Gliukozės konversijos į fruktozę optimizavimas

PRB manitolį gamina iš fruktozės, dėl to, norint pritaikyti duonos atliekas manitolio gamybai, po krakmolo hidrolizės etapo reikalinga gliukozę izomerizuoti į fruktozę. Ši reakcija yra grįžtamoji ir vyksta tik iki pusiausvyros taško, todėl pagaminamas gliukozės-fruktozės sirupas. Fermentinė izomerizacijos technologija gliukozės inversiją apriboja iki 42 % [99]. Didesnės fruktozės koncentracijos sirupuose gali būti gautos selektyviai pašalinant gliukozę arba pritaikius daugiapakopius chromatografinius atskyrimo metodus. Gliukozės izomerizacija į fruktozę yra plačiai naudojamas procesas maisto pramonėje: konditerijoje tokie sirupai naudojami kaip saldikliai ar užpildai, didinantys maisto produktų tūrį, o gėrimų gamyboje naudojami dėl jų stabilumo.

Gliukozės izomerizacijai pasirinktas fermentinis būdas, panaudojant imobilizuotą gliukozės izomerazę. Gliukozės konversijos į fruktozę efektyvumas labiausiai priklauso nuo fermento kiekio ir pH. Šie parametrai buvo optimizuoti pritaikant PAM ir CKP, atsaku pasirinktas susidaręs fruktozės kiekis. Optimizavimas atliktas analogiškai kaip ir duonos krakmolo hidrolizės etape. Šio proceso parametrai, eksperimentiniai ir prognozuojami fruktozės kiekiai pateikti 9 lentelėje.

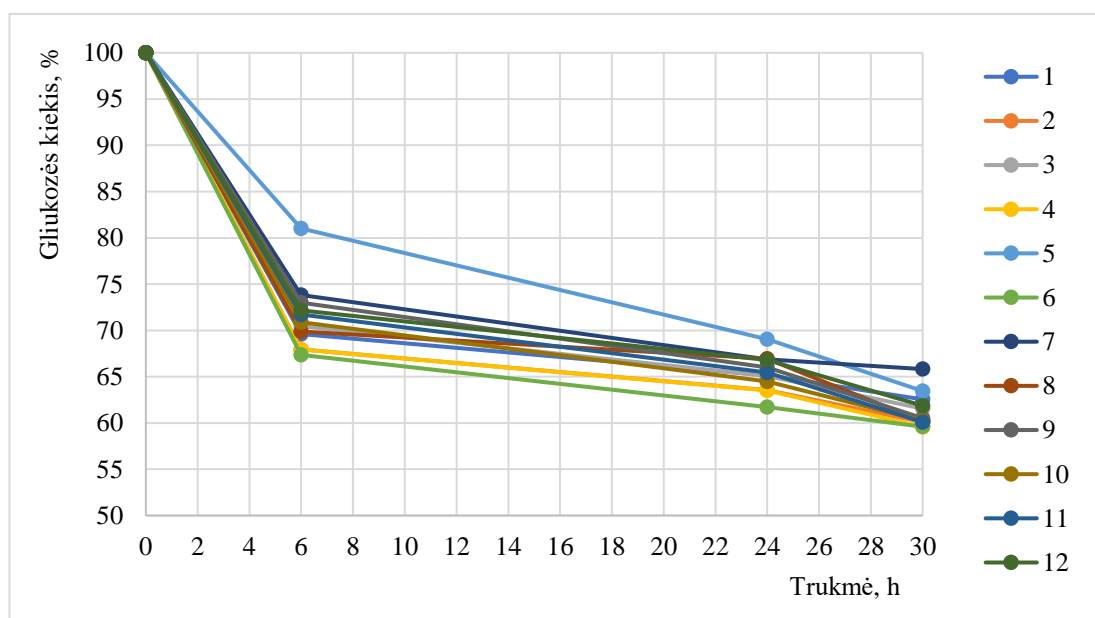
Gliukozės izomerizacijos į fruktozę metu gliukozės kiekis mažėja didėjant fruktozės kiekiui mėginiuose. Gliukozės kiekio mažėjimas laiko atžvilgiu pavaizduotas 19 pav., fruktozės didėjimas – 20 pav. Praėjus 6 h nuo izomerizacijos pradžios, gliukozės kiekis sparčiai mažėjo, o fruktozės didėjo  $3,56 \pm 1,13$  %/h greičiu. Išmatavus monosacharidų kiekius po 24 h, pastebimas izomerizacijos sulėtėjimas (fruktozės susidarymo greitis –  $0,55 \pm 0,19$  %/h). Po 30 h gliukozės ir fruktozės kiekis daugumoje mėginių beveik nebekito arba kito lėčiau ( $0,43 \pm 0,27$  %/h greičiu). Nustatyti galutinė gliukozės išėiga 59,57–65,82 %, o fruktozės – 32,68–40,32 %. Pradiniam etape lėčiausiai izomerizavosi mėginys, kurio pH buvo 7,5 ir gliukozės izomerazės kiekis mažiausias (2,59 IGIU/g sirupo). Mėginiai, kurių pH buvo mažiausias (pH 6,79) arba didžiausias (pH 8,21), taip pat pasižymėjo mažu konversijos greičiu ir maža fruktozės išėiga, todėl galima teigti, kad per mažas ir per didelis pH reakciją slopina. Didžiausia išėiga (40,32 %) gauta, kai pH 7,5 ir naudojamas

didžiausias fermento kiekis (5,41 IGIU/g sirupo). Didelė fruktozės išeiga (39,86 %) taip pat gauta naudojant šiek tiek mažesnį fermento kiekį (5,00 IGIU/g sirupo), bet esant didesniai pH (pH 8).

**9 lentelė.** Centriško kompozicinio plano parametru vertės gliukozės izomerizacijos proceso optimizavimui ir gautos atsako vertės

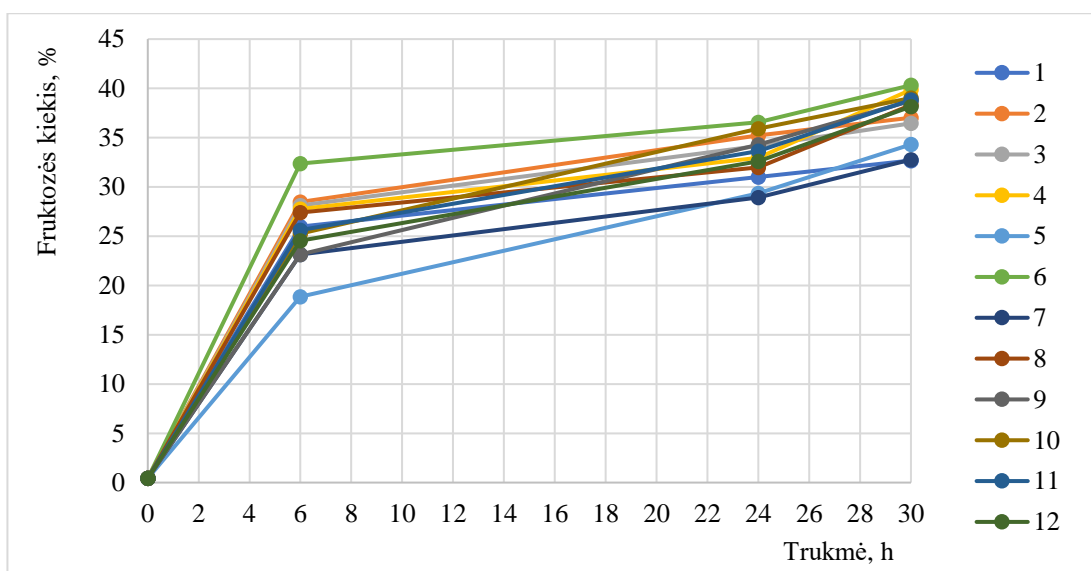
Eil. nr.	Optimizuojami parametrai		Fruktozės kiekis, %	
	Gliukozės izomerazės kiekis, IGIU/g sirupo	pH	Eksperimentinis	Prognozuojamas
1	3,0	7,0	32,68±0,27 <sup>a</sup>	32,40
2	5,0	7,0	37,02±0,89 <sup>bc</sup>	36,92
3	3,0	8,0	36,45±0,71 <sup>b</sup>	36,47
4	5,0	8,0	39,86±0,44 <sup>de</sup>	40,07
5	2,59	7,5	34,31±0,18 <sup>a</sup>	34,48
6	5,41	7,5	40,32±0,80 <sup>e</sup>	40,23
7	4,0	6,79	32,77±1,07 <sup>a</sup>	33,02
8	4,0	8,21	38,31±0,10 <sup>bcd</sup>	38,13
9	4,0	7,5	38,73±0,71 <sup>cde</sup>	38,68
10	4,0	7,5	39,02±0,27 <sup>de</sup>	38,68
11	4,0	7,5	38,82±0,18 <sup>cde</sup>	38,68
12	4,0	7,5	38,15±0,11 <sup>bcd</sup>	38,68

Vidutinių verčių reikšmės, pažymėtos skirtingomis raidėmis, rodo, kad tame pačiame stulpelyje yra statistiškai reikšmingi skirtumai, įvertinti pagal Dunkano kriterijų ( $p \leq 0,05$ )



**19 pav.** Gliukozės kiekio kitimas izomerizacijos metu





20 pav. Fruktozės kiekio kitimas izomerizacijos metu

Šio optimizavimo eksperimento dispersinė analizė (ANOVA) pateikta 10 lentelėje. Tiriamo modelio analizė parodė, kad pagal Stjudento testą ( $p < 0,0001$ ,  $F = 131,84$ ) pats modelis yra reikšmingas, o klaidos tikimybė – nereikšminga ( $p > 0,05$ ), jos p-reikšmė lygi 0,6375. Egzistuoja tik 0,01 % tikimybė, kad toks didelis F kriterijus gautas dėl trikdžių. Determinacijos koeficientas ( $R^2 = 0,9910$ ) patvirtino sudaryto modelio adekvatumą. Eksperimento planui prognozuota  $R^2$  vertė lygi 0,9651 ir beveik lygi koreguotai  $R^2$  vertei (0,9835). Todėl galima teigti, kad modelis yra tinkamas optimalioms vertėms numatyti. Palyginamojo tikslumo santykinė vertė (23,71) taip pat didesnė nei 4 ir rodo signalo tikslumą. Abu nepriklausomi kintamieji yra reikšmingi, o iš viso modelyje yra 4 reikšmingi veiksniai ( $p < 0,05$ ), turintys įtakos fruktozės išėigai gliukozės konversijos į fruktozę procese: A (gliukozės izomerazės kiekis), B (pH vertė),  $A^2$ ,  $B^2$ . Iš nepriklausomų kintamųjų gliukozės izomerazės kiekis turi didesnę įtaką fruktozės išėigai nei pH. Jų Fišerio kriterijus atitinkamai 288,03 ir 227,60. Po to išsidėsto priklausomi kintamieji  $B^2$  ( $F = 134,40$ ) ir  $A^2$  ( $F = 24,61$ ).

10 lentelė. Gliukozės konversijos optimizacijos regresijos parametrų dispersinė analizė

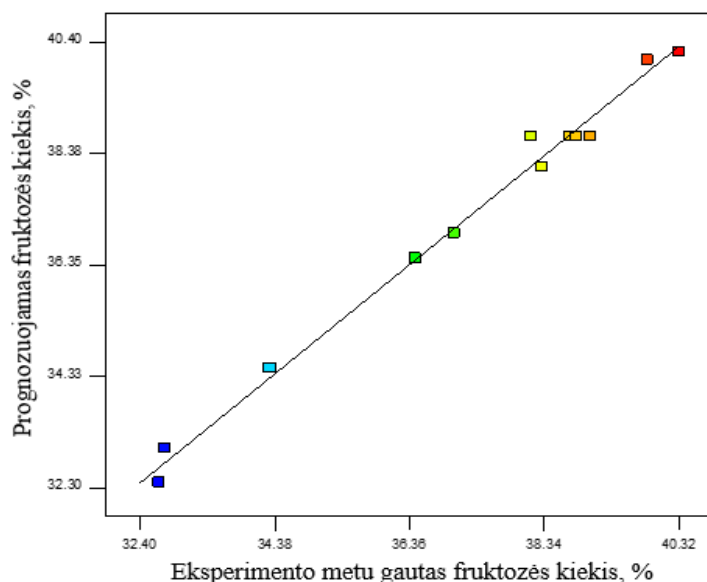
Kintamieji	Kvadratų suma	Laisvės laipsnis (df)	Kvadratų vidurkis	F – kriterijus	p–reikšmė
Modelis	75,53691	5	15,10738	131,8359	< 0,0001*
Gliukozės izomerazės (A, g)	33,00547	1	33,00547	288,0252	< 0,0001*
pH (B)	26,08133	1	26,08133	227,601	< 0,0001*
AB	0,216225	1	0,216225	1,886907	0,2187**
$A^2$	2,81961	1	2,81961	24,60558	0,0026*
$B^2$	15,40081	1	15,40081	134,3965	< 0,0001*
Liekana	0,687554	6	0,114592		
Klaidos tikimybė	0,268954	3	0,089651	0,642508	0,6375**
Klaida	0,4186	3	0,139533		
Bendra suma	76,22447	11			

F – Fišerio kriterijus; jei p-reikšmė – <0,05, tai kintamasis yra statistiškai reikšmingas (\* – reikšmingas, \*\* – nereikšmingas).

Iš rezultatų ir statistinės analizės matyti, kad atsakas geriausiai aprašomas kvadratinio modeliu. Pagal tai sudaryta proceso lygtis:

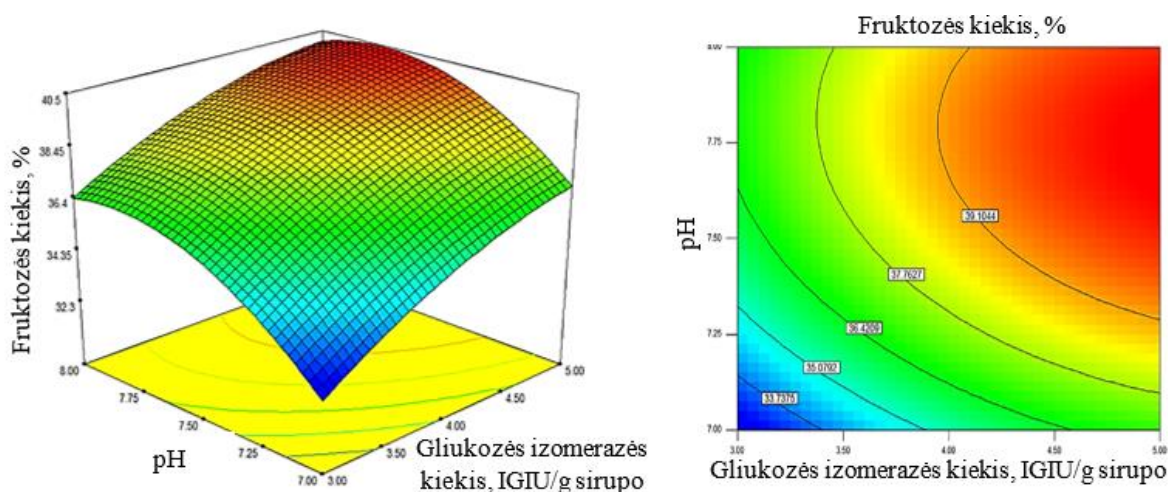
$$\text{Išeiga (\%)} = 38,68 + 2,03 \cdot A + 1,81 \cdot B - 0,23 \cdot AB - 0,66 \cdot A^2 - 1,55 \cdot B^2.$$

Fruktozės išeiga, gauta eksperimento metu, buvo palyginta su prognozuojamomis jos kiekio vertėmis (žr. 21 pav.). Taškai išsidėstę netoli nuo linijos, vadinasi, faktinės ir prognozuojamos išeigos gerai koreliuoja tarpusavyje.



21 pav. Prognozuojamų ir eksperimentinių fruktozės kiekių palyginimas

Siekiant išsiaiškinti ryšį tarp nepriklausomų kintamųjų (gliukozės izomerazės kiekio ir pH) ir atsako (fruktozės kiekio), buvo sudaryti proceso atsako paviršiaus 3D ir 2D modeliai (žr. 22 pav.). Nepriklausomų kintamųjų vertės vaizduojamos X ir Y ašyse, o atsako – Z ašyje. Grafikuose pateikti rezultatai rodo, kad fermento kiekis ir pH yra reikšmingi parametrai galutinei fruktozės išeigai. Didžiausia fruktozės išeiga gauta, kai gliukozės izomerazės kiekis buvo didesnis nei 4,25 IGIU/g sirupo, o pH tarp 7,4 ir 8,0.



22 pav. Atsako paviršiaus 3D ir 2D plotai, vaizduojantys parametų (gliukozės izomerazės kiekio ir pH) įtaką fruktozės išeigai



Atsižvelgiant į Design-Expert 7.0.0 programoje siūlomus fruktozės išėigos optimizavimo sprendimus, gliukozės izomerazės kiekis turėtų būti tarp 4,84 ir 5,00 IGIU/g sirupo, o pH – 7,69–7,87. Esant šioms optimizavimo parametrų vertėms, teorinės fruktozės išėigos turėtų siekti 40,32–40,42 %. Pakartojus eksperimentą su pasirinktomis vertėmis 4,98 IGIU/g sirupo ir pH 7,71, gautas fruktozės kiekis ( $40,35 \pm 0,21$  %) buvo artimas prognozuotam (40,42 %).

M. Gaily [87], tirdamas gliukozės izomerizacijos parametrų įtaką fruktozės išėigai, nustatė, kad parinkus tokius izomerizacijos parametrus: 10 % gliukozės sirupas, pH 7,5, 60 °C temperatūra, 0,5 g gliukozės izomerazės (1,8 IGIU/g sirupo), galima pasiekti 40,9 % gliukozės konversiją. Didinant fermento kiekį nuo 0,5 iki 1,5 g, izomerizacijos laikas sutrumpėjo nuo 60 iki 40 h. Šio eksperimento metu buvo gauta panaši fruktozės išėiga ( $40,35 \pm 0,21$  %) per trumpesnę laiką (30 h), naudojant mažesnę fermento kiekį (4,98 IGIU/g sirupo) ir didesnę pH (7,71). Tokius rezultatus galėjo lemti aukštesnė temperatūra ir didesnis pH. Aukštesnėje temperatūroje reakcija vyksta greičiau dėl didesnės aktyvacijos energijos. pH didėjant iki 8,0, gliukozės izomerazės aktyvumas didėja, tačiau stabilumas mažėja, todėl parinktas optimalus pH leidžia gauti didesnę gliukozės išėigą, panaudojant mažesnę fermento kiekį [100].

Optimizavus hidrolizės ir izomerizacijos parametrus iš duonos atliekų gautas gliukozės-fruktozės sirupas, kuriame yra  $58,28 \pm 0,58$  % gliukozės ir  $40,35 \pm 0,21$  % fruktozės. Sudaryta duonos atliekų perdirbimo į gliukozės-fruktozės sirupą technologija galėtų būti panaudota kuriant beatliekės duonos gamybos technologijas, o tuo pačiu vystant darniausias maisto sistemas.

### 3.2.3. Duonos atliekų fermentacija

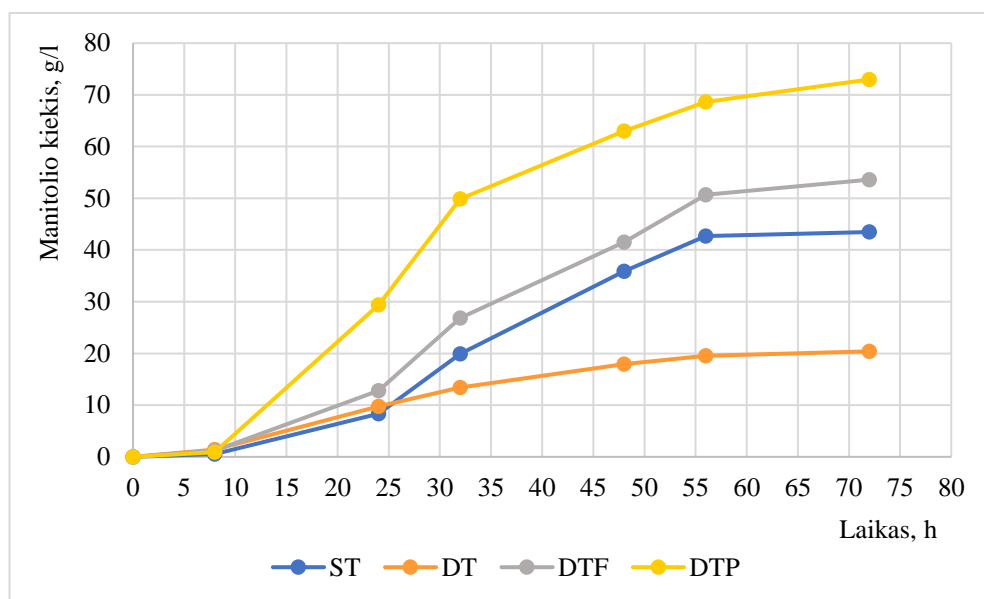
Duonos atliekų hidrolizės ir izomerizacijos metu gautas gliukozės-fruktozės sirupas pritaikytas manitolio gamybai naudojant *Lb. rossiae* GL14. Duonos atliekų tinkamumas perdirbimui į manitolį vertintas analizuojant 3 skirtingas terpes.

1. Iš duonos atliekų pagamintą gliukozės-fruktozės sirupą, kuriame gliukozės-fruktozės santykis 1,4:1 (DT).
2. Iš duonos atliekų pagamintą gliukozės-fruktozės sirupą su fruktozės priedu, kuriame gliukozės-fruktozės santykis 1:2 (DTF) (literatūros duomenimis optimalus manitolio gamybai [11, 28]).
3. Iš duonos atliekų pagamintą gliukozės-fruktozės sirupą su fruktozės priedu, kuriame gliukozės-fruktozės santykis 1:2 ir maistinių medžiagų (CSS, sojų peptono ir mangano sulfato) priedu (DTP) (šių maistinių medžiagų priedas literatūros duomenimis užtikrina azoto kiekį, reikalingą bakterijų dauginimuisi, o mangano sulfatas padidina manitolio išėigą [44, 55]).

Palyginamiesiems tyrimams naudota gliukozės-fruktozės modelinė sistema, kurioje fruktozės-gliukozės santykis 2:1 (ST).

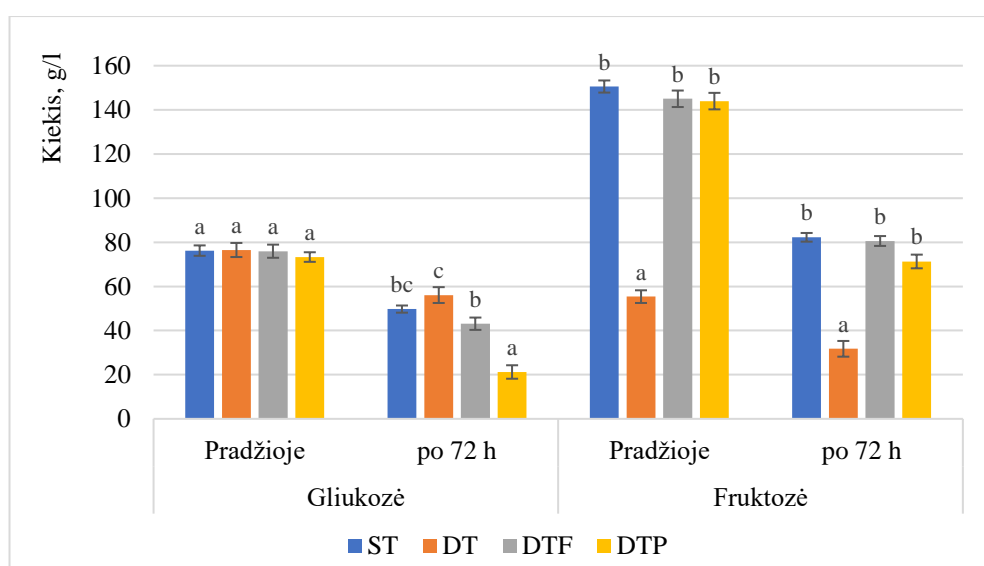
Manitolio koncentracijos didėjimas fermentacijos metu pavaizduotas 23 pav. Per pirmąsias 8 h, bakterijų prisitaikymo fazės metu, manitolio kiekis didėjo nežymiai. Manitolio susidarymo greitis buvo  $0,12 \pm 0,04$  g/l/h. Staigus manitolio kiekio augimas pastebimas tarp 8 ir 56 h, šiuo metu manitolio susidarymo greitis ST, DTF ir DTP atitinkamai siekė  $0,88 \pm 0,11$ ,  $1,03 \pm 0,04$  ir  $1,41 \pm 0,05$  g/l/h, DT buvo žymiai mažesnis –  $0,41 \pm 0,05$  g/l/h. Per paskutines 8 h manitolio koncentracijos augimas sulėtėjo ir susidarymo greitis siekė  $0,27 \pm 0,15$  g/l/h. Didžiausia manitolio koncentracija ( $72,98 \pm 4,89$

g/l) buvo gauta fermentuojant DTP, po to mažėjimo tvarka išsidėsto DTF, ST ir DT (atitinkamai 26,5, 40,4 ir 70,1 % mažiau).



**23 pav.** Manitolio kiekio kitimas fermentacijos metu

Fermentacijos terpėse nustatyti gliukozės ir fruktozės pokyčiai pateikti 24 pav. Fermentacijos metu didėjant manitolio kiekiui mažėjo gliukozės ir fruktozės kiekiai. Gliukozės kiekis eksperimento pradžioje visose fermentacijos terpėse buvo panašus, svyravo nuo 73,31 iki 76,51 g/l. Fruktozės kiekiai eksperimento pradžioje ženkliai skyrėsi, ST, DTF ir DTP buvo atitinkami 150,56, 145,01 ir 143,95 g/l (fruktozės-gliukozės santykis apytiksliai 2:1), DT – 55,38 g/l (1,4:1). Praėjus 72 h po fermentacijos, tiek gliukozės, tiek fruktozės kiekiai sumažėjo. Gliukozės kiekiai sumažėjo  $1,55 \pm 0,16$  kartus, išskyrus DTP, kurioje sumažėjo 3,45 kartus. Fruktozės kiekiai sumažėjo dar labiau –  $1,84 \pm 0,09$  kartus. Manitolio išeiga buvo apskaičiuota nuo pradinio fruktozės kiekio terpėje. Išeiga DTP buvo didžiausia ir siekė 51 %, DTF, ST ir DT mažesnė – atitinkamai 37, 29 ir 36 %.



**24 pav.** Gliukozės ir fruktozės kiekiai fermentacijos pradžioje ir pabaigoje (skirtingos raidės, rodo, kad yra statistiškai reikšmingi skirtumai, esant 95 % tikimybės lygiui)

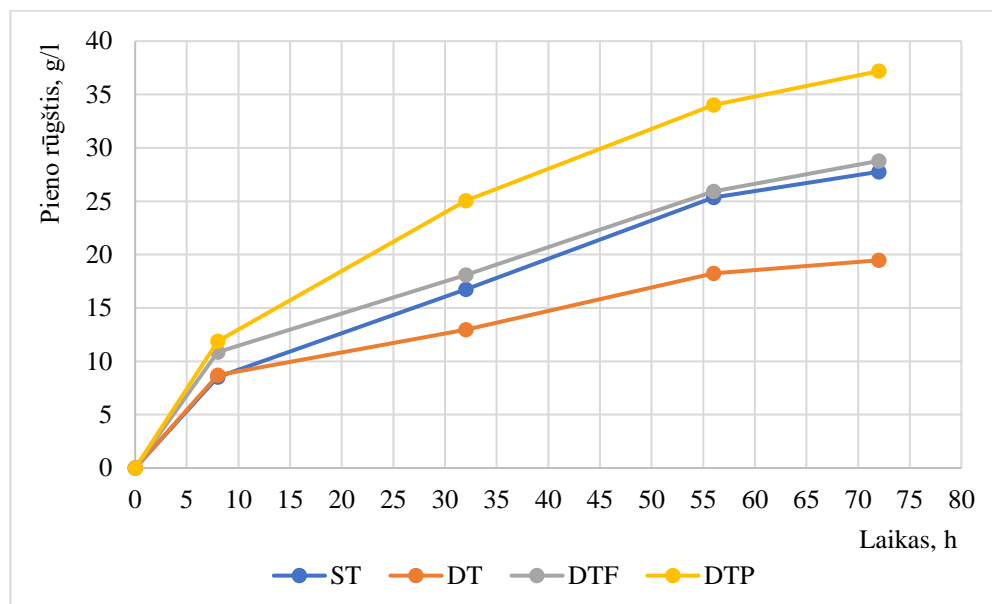
G. E. Otgonbayar'is et al. [101] lygino manitolio gamybą 9 *Leuconostoc* genties bakterijomis: *Leu. mesenteroides* ATCC9135, *Leu. mesenteroides* ATCC8293, *Leu. mesenteroides* NRRL B-512F, *Leu. mesenteroides* KCTC3719, *Leu. mesenteroides* NRRL B742C, *Leu. mesenteroides* D1, *Leu. mesenteroides* MU3, *Leu. citreum* KACC 91348P ir *Leu. pseudomesenteroides* AJ. Priklausomai nuo PRB, manitolio susidarymo greitis, MRS terpėje, esant fruktozės-gliukozės santykiui 2:1, siekė 0,98–1,27 g/l/h, o supaprastintoje terpėje (10 g/l triptono, 5 g/l mielių ekstrakto, 2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g/l MgSO<sub>4</sub>, 0,01 g/l MnSO<sub>4</sub>, 0,02 g/l CaCl<sub>2</sub> ir 0,02 g/l NaCl) – 0,63–1,09 g/l/h. *Leu. citreum* KACC 91348P pasižymėjo didžiausiu manitolio susidarymo greičiu abejose terpėse, o manitolio koncentracija siekė atitinkamai 30,4 ir 26,0 g/l. Lyginant su aptartais literatūros duomenimis, šio eksperimento metu manitolio susidarymo greitis buvo panašus (0,60–1,01 g/l/h), išskyrus DT, kurioje buvo žymiai mažesnis. Literatūroje pateikti ir didesni manitolio susidarymo greičiai. F. Carvalho et al. [49] nustatė, kad 8 skirtingų PRB manitolio susidarymo greičiai buvo didesni nei 1,31 g/l/h, o manitolio išeiga daugiau nei 0,70 g manitolio/g fruktozės (70 %). Didesnis manitolio susidarymo greitis ir didesnė išeiga buvo gauta fermentuojant su tomis PRB, kurios greičiau sunaudojo didesnę gliukozės kiekį. Tai gali būti paaiškinta skirtingu PRB metabolizmu, nes fermentuojant su padermėmis, kurios lėčiau naudojo gliukozę, buvo nustatytos didesnės acto rūgšties koncentracijos.

B. C. Saha ir F. M. Racine [52] fermentuojant terpę, kurioje buvo 250 g fruktozės, su *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 gavo 160,7 g manitolio ir nustatė 4,0 g/l/h manitolio susidarymo greitį. Tyrimo metu gauta manitolio išeiga siekė 64 %. N. von Weymarn'as et al. [46] nustatė dar didesnę manitolio susidarymo greitį (7,6 g/l/h), kuris buvo gautas fermentacijai naudojant *Lb. fermentum*. Fermentacijos metu buvo sunaudota 193,6 g fruktozės ir pagaminta 175,3 g manitolio (išeiga 90,5 %). Didelė manitolio išeiga galėjo būti gauta dėl greito bakterijų augimo fermentacijos terpėje, kurią sudarė 100 g/l fruktozės, 50 g/l gliukozės, 10 g/l triptono, 10 g/l mielių ekstrakto, 2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4 g/l MgSO<sub>4</sub>, 0,02 g/l MnSO<sub>4</sub>. Didžiausias manitolio susidarymo greitis buvo nustatytas tarp 4 ir 10 h, tuo tarpu šio eksperimento metu – tarp 8 ir 56 h. Vadinas, manitolio išeigos priklauso tiek nuo fermentacijos terpės, tiek nuo naudojamos PRB metabolizmo.

Literatūros duomenimis manitolio išeigos gali būti labai įvairios: nuo labai mažų iki didelių, kurios viršija net 90 %. Atrinkta *Lb. rossiae* GL14 padermė nors ir buvo perspektyviausia iš tirtų padermių, tačiau nepasiekė literatūroje pateiktų didžiausių išeigų.

Manitolio biotechnologinės gamybos su PRB metu iš fruktozės susidaro manitolis, o gliukozė naudojama kaip anglies šaltinis ir verčiama į pieno ir acto rūgštis [11]. Pieno rūgšties kiekis fermentacijos terpėse buvo tirtas siekiant nustatyti gliukozės įtaką fermentacijos produktų susidarymui. Fermentacijos metu nustatytas pieno rūgšties koncentracijos kitimas pavaizduotas 25 pav. Fermentacijos pabaigoje didžiausias pieno rūgšties kiekis (37,2 g/l) susidarė DTP. DTF, ST ir DT atitinkamai 22,6, 25,4 ir 47,6 % mažiau. DT susidarė mažiausiai pieno rūgšties, tačiau šioje terpėje buvo mažiausias gliukozės pokytis po 72 h. Fermentacijos pradžioje pastebimas staigus pieno rūgšties kiekio didėjimas fermentacijos terpėse. Per pirmąsias 8 h pieno rūgšties susidarymo greitis apytiksliai buvo 1,25±0,18 g/l/h. Vėliau visose fermentacijos terpėse susidarymo greitis sumažėjo iki 0,28±0,08 g/l/h. Gautas pieno rūgšties kiekis panašus su nustatytu B. C. Saha ir L. K. Nakamura [40] tyrimo metu. Straipsnyje pateiktose diagramose matyti, kad, fermentacijos pradžioje terpėje esant 150 g/l fruktozės, pasibaigus eksperimentui susidaro apie 28 g/l pieno rūgšties. Mažiausias pieno rūgšties kiekis gautas 50 g/l fruktozės pakeitus galaktoze (16,7 g/l), o didžiausias – pakeitus

arabinoze (41,1 g/l). F. Carcalheiro et al. [49] pateikti rezultatai taip pat panašūs su gautais eksperimento metu. Straipsnyje nurodyta, kad *Lactobacillus* genties bakterijos pagamino 14,9–27,0 g/l pieno rūgštis, kai terpėje buvo 92 g/l gliukozės ir fruktozės mišinio. Autoriai nustatė, kad daugiau pieno rūgštis susidarė kai PRB sunaudojo didesnę gliukozės kiekį. Šio tyrimo metu gauti pieno rezultatai taip pat koreliuoja su sunaudotu gliukozės kiekiu, todėl galima teigti, kad susidaręs pieno rūgštis kiekis priklauso nuo fermentacijos terpės sudėties ir PRB dauginimosi, kuriam įtakos turi maistinių medžiagų kiekis terpėje.



**25 pav.** Pieno rūgštis kiekio kitimas fermentacijos metu

Iš visų fermentacijos terpių labiausiai išsiskyrė DT, kurioje manitolio susidarymo greitis bei galutinė koncentracija buvo mažiausia (22,4 g/l). Ši terpė skyrėsi gliukozės ir fruktozės santykiu, joje fruktozės koncentracija buvo daugiau nei 2,5 karto mažesnė negu kitose terpėse. Šioje terpėje gliukozės koncentracija terpėje išliko didžiausia – 56,09 g/l. Nedidelę manitolio koncentraciją DT lėmė mažesnis fruktozės kiekis (išeiga nuo fruktozės – 36 %). Mažiausias susidariusios pieno rūgštis kiekis koreliuoja su didžiausia gliukozės koncentracija fermentacijos pabaigoje, iš kurios susidaro pieno rūgštis. Žymiai didesnės manitolio koncentracijos gautos fermentacijos terpėje esant gliukozės ir fruktozės santykiui 2:1. Duonos atliekų terpėje su fruktozės priedu gauta manitolio išeiga (37 %) panaši kaip ir DT, tačiau didesnė koncentracija buvo gauta dėl didesnio pradinio fruktozės kiekio. Nepaisant to, kad manitolio koncentracija ST siekė 43,47 g/l, fruktozės konversija į manitolį buvo mažiausia (29 %) ir vyko efektyvesnė konversija į pieno rūgštį. Šie tyrimai rodo, kad duonos terpė yra tinkamesnė manitolio gamybai nei modelinės sistemos terpė dėl didesnių manitolio ir mažesnių pieno rūgštis išeigų.

Didžiausia manitolio koncentracija (72,98 g/l) ir išeiga (51 %) gauta DTP, kurioje taip pat buvo sunaudotas didžiausias fruktozės ir gliukozės kiekis. Manoma, kad didžiausias pieno rūgštis kiekis susidarė dėl greičiausio PRB augimo. Didžiausia gauta išeiga terpėje, kuri buvo papildyta sojų peptonu, CSS ir mangano sulfatu, rodo maistinių medžiagų svarbą bakterijų augimui. Fermentacijos pabaigoje visose terpėse likusį nesufermentuotų sacharidų kiekį galėjo lemti per maža bakterijų augimui reikalingų maistinių medžiagų koncentracija, nes PRB pačios negali pagaminti daugelio būtinų medžiagų, reikalingų ląstelių augimui (aminorūgščių, vitaminų) [44].

Literatūroje pateikti atvejai, kai fermentacijos metu PRB gali sunaudoti beveik visą gliukozės ir fruktozės kiekį [40, 52, 86, 101]. Tokiu atveju gaunama didesnė galutinė manitolio koncentracija. B. C. Saha ir F. M. Racine [52] atlikti tyrimai rodo, kad fermentacijos terpė turi didelės įtakos galutinei manitolio išeigai. Tyrimams naudotos 3 fermentacijos terpės skyrėsi tik kukurūzų ekstrakto gamintojais. Iš 250 g/l fruktozės, naudojant skirtingas fermentacijos terpes, buvo gauta 124,1±6,0, 43,5±0,6, ir 15,5±0,2 g/l manitolio. Paskutinėse dvejose terpėse net po 134 h atitinkamai liko 46,0±1,3 ir 130,8±0,5 g/l fruktozės. Tokius didelius skirtumus lėmė terpėse esančios aminorūgštys. Nustatyta, kad mažesnės išeigos gautos terpėje, kuriose buvo riboti asparto rūgšties, glutamino, tirozino, histidino, triptofano ir tirozino kiekiai arba šių aminorūgščių iš viso nebuvo. Manoma, kad ir su šiame eksperimente naudota PRB galėtų būti gauta didesnė manitolio išeiga, parinkus alternatyvų azoto šaltinį arba padidinus fermentacijos terpėje reikiamų aminorūgščių koncentraciją.

Iš duonos atliekų pagaminta terpė nėra pirmasis bandymas manitolio gamybai panaudoti maisto pramonės atliekas, turinčias didelį cukrų kiekį. B. C. Saha [43] tyrė inulino, išgauto iš paprastosios trūkažolės šaknų, panaudojimą manitolio gamybai. Fermentuojant su *L. intermedius* B-3693 MRS terpėje, kurioje peptonas buvo pakeistas 5 g/l sojų peptonu, o mielių ekstraktas 50 g/l kukurūzų ekstraktu, iš 300 g/l inulino, sucukrinto inulinaze, buvo gauta 207 g/l manitolio. B. C. Saha [44] manitolio gamybai panaudojo šalutinį cukranendrių perdirbimo produktą – melasą. Melasos terpėje bendras cukrų kiekis siekė 150 g/l (116,1 g/l sacharozės, 17,7 g/l fruktozės ir 16,2 g/l gliukozės), o terpė buvo papildyta 10 g/l bakteriologiniu peptonu ir 50 g/l kukurūzų ekstraktu. Tokią terpę fermentuojant su *L. intermedius* B-3693 pagrindinis produktas buvo pieno rūgštis. Pakoregavus fruktozės-gliukozės santykį (3:1) panaudojant melasos ir fruktozės sirupą, iš 120 g/l fruktozės buvo gauta 104,4 g/l manitolio. M. E. Ortiz et al. [50] kaip pigų anglies šaltinį manitolio gamybai su *L. reuteri* CRL 1101 taip pat panaudojo cukranendrių melasą. Didžiausia manitolio koncentracija (38,4 g/l) po 24 h buvo gauta fermentuojant MRS terpę, papildytą 7,5 % melasos sirupo. Konversijos efektyvumas 82 %. C. Fontes et al. [48] manitolio gamybai pritaikė anakardžių vaisių sultis, kurių sudėtyje buvo 50 g/l redukuojančių cukrų, tarp jų 28 g/l fruktozės. Bakterijų augimui užtikrinti buvo naudota po 20 g/l mielių ekstrakto ir kalio fosfato. Fermentuojant su *Leu. mesenteroides* B-512F susidarė 18 g/l manitolio (fruktozės konversija 67 %). F. Carvalheiro et al. [49] tyrė saldžiųjų ceratonijų sirupo terpės tinkamumą manitolio gamybai. Sirupo cukrų, kuriuos sudarė fruktozė, gliukozė, sacharozė ir pinitolis, koncentracija buvo apie 200 g/l. Terpė buvo papildyta MRS maistinėmis medžiagomis, išskyrus amonio citratą, kuris buvo pakeistas 50 mM natrio citrato buferiu (pH 6,2). Fermentuojant su *L. fructosum* NRRL B-2041 manitolio koncentracija siekė 43,7 g/l, o fruktozės konversija buvo artima 100 %. Gautos manitolio išeigos labai priklausė nuo fermentacijai parinktos PRB ir naudotų maistinių medžiagų, todėl lyginant maisto pramonės atliekų, tarp jų ir duonos, tinkamumą manitolio gamybai teisingiausia būtų vertinti pagal iš jų pagamintoje terpėje esančios fruktozės kiekį. Kadangi iš duonos atliekose esančio krakmolo buvo gauta 84,35 % gliukozės, o iš jos 40,35 % fruktozės, fermentais apdorotos duonos atliekos taip pat yra tinkama terpė manitolio gamybai.

### 3.3. Manitolio įtaka kepinų kokybei ir juslinėms savybėms

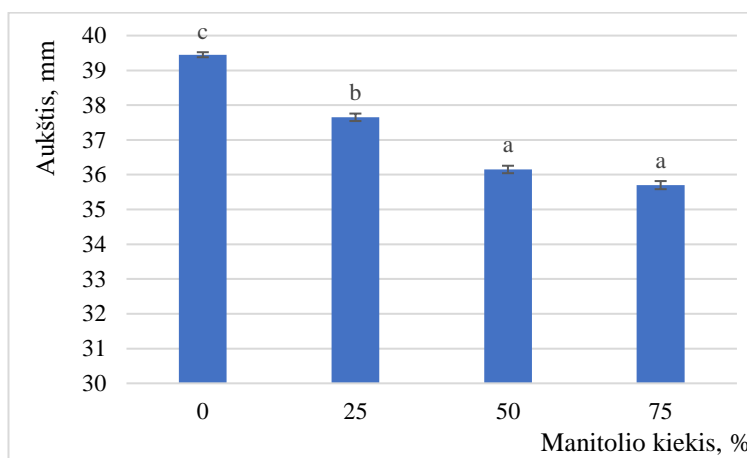
Vienas svarbiausių ingredientų saldžių kepinų gamyboje yra cukrus. Jis prisideda prie tešlos klamos, stabilizuoja emulsijų ir putų sistemas, didindamas disperguotų lašelių tankį. Cukrus taip pat suminkština kepinus, stabdo krakmolo retrogradaciją ir padidina gaminių tūrį. Nepaisant to, dideli suvartojamo cukraus kiekiai siejami su nutukimu ir padidėjusia rizika susirgti diabetu. Cukraus

kiekio sumažinimas kepinuose tampa vis didesniu prioritetu dėl diabetinio maisto gamybos poreikių ir mažiau kalorijų turinčių maisto produktų paklausos. Polioliai yra potencialūs cukraus pakaitalai, nes turi mažą glikemini indeksą, dėl ko nesukelia greito cukraus kiekio padidėjimo kraujyje, o jų kaloringumas 40 % mažesnis nei cukraus. Buvo nustatyta, kad kai kurie polioliai pasižymi savybe išlaikyti produktų drėgmę, pagerina tekstūrą ir stabdo žiedėjimo procesus. Daugelis mokslininkų tyrė poliolių, kaip saldiklių ir produktų turį didinančių medžiagų, panaudojimą kepinuose: pyraguose, sausainiuose, duonoje, bandelėse [19, 20, 102, 103, 104]. Šiame darbe manitolis išbandytas vienu populiariausių miltinės konditerijos kepinų – keksiukų gamyboje, siekiant nustatyti jo įtaką kepinų kokybei ir tinkamumo vartoti trukmei. Keksiukų receptūroje 25, 50 ir 75 % cukraus kiekio buvo keičiama manitolium. Nustatyta manitolio įtaka kepinų kokybei, juslinėms savybėms ir parinktas tinkamiausias manitolio kiekis tirtų kepinų gamybai.

### 3.3.1. Manitolio įtaka keksiukų kokybei

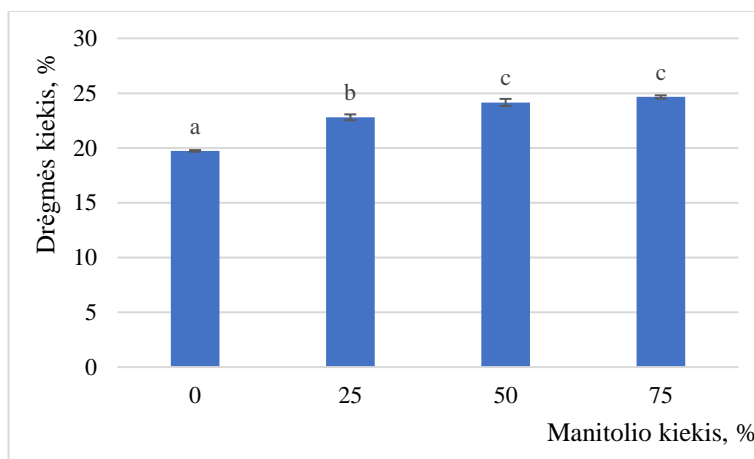
Vertinant manitolio panaudojimo galimybes keksiukų gamybai, analizuota jo įtaka gaminio aukščiui, spalvai, tešlos ir kepinio tekstūros parametrams (nustatytiems tekstūros analizatoriumi) bei juslinėms savybėms.

Keksiukų su skirtingu manitolio kiekiu aukščio pokyčiai pateikti 26 pav. Didžiausiu aukščiu pasižymėjo kontrolinis kepinys be manitolio, jo aukštis –  $39,45 \pm 0,07$  mm. Manitolio kiekiui kepinuose didėjant, o cukraus kiekiui mažėjant, keksiukų aukštis mažėjo. Pakeitus 25 % cukraus manitolium, keksiukų aukštis siekė  $37,65 \pm 0,11$  mm, o 50 ir 75 % – kepinų aukštis buvo dar mažesnis, atitinkamai  $36,15 \pm 0,11$  ir  $35,70 \pm 0,12$  mm. Manitolio kiekiui didėjant kas 25 %, keksiukų aukštis sumažėjo 4,6, 4,0 ir 1,3 %. S. Martinez-Cervera et al. [105] tyrinėjo kitų poliolių (sorbitolio, maltitolio, izomalto ir eritritolio) įtaką keksiukų aukščiui. Visų saldiklių panaudojimas sumažino keksiukų aukštį lyginant su kontroliniu kepinium. Toks efektas galėtų būti paaiškintas cukraus stabilizuojančia savybe. Kepimo metu sacharozė sulėtina glitimo formavimąsi, padidina kiaušinių baltymų denatūracijos ir krakmolo keisterizacijos temperatūrą. Tai padeda tešloje išlaikyti oro burbuliukus, pailgina jų išsiplėtimo laikotarpį, dėl ko gaunami didesnio tūrio kepiniai [104]. Manitolio ir kitų poliolių stabilizuojantis efektas mažesnis, todėl kepinų aukštis, tūris ir aktyumas sumažėja.



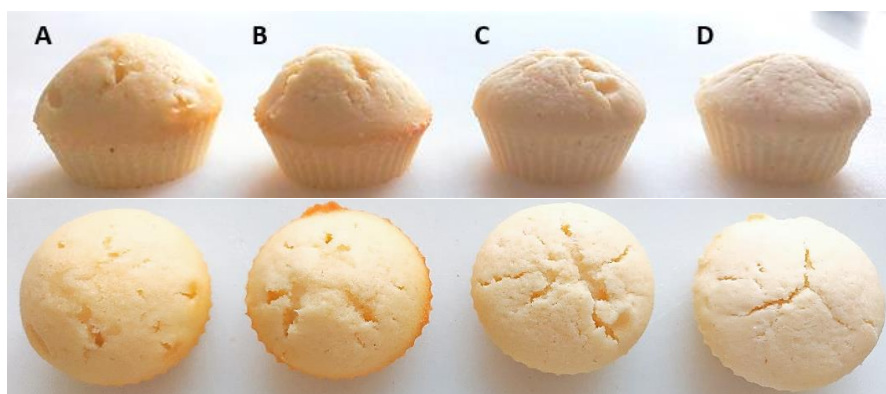
26 pav. Manitolio įtaka keksiukų aukščiui (skirtingos raidės, rodo, kad yra statistiškai reikšmingi skirtumai, esant 95 % tikimybės lygiui)

Keksiukų su skirtingu manitolio kiekiu drėgnis pateiktas 27 pav. Kepinių drėgmės kiekis skyrėsi priklausomai nuo pakeisto cukraus kiekio. Mažiausias drėgnis nustatytas keksiukuose be manitolio ( $19,93 \pm 0,13$  %). Didėjant manitolio kiekiui iki 25, 50 ir 75 %, keksiukų drėgnis padidėjo atitinkamai 10,8, 15,5 ir 19,7 %. Didesnis keksiukų su manitoliumi drėgnis gautas dėl manitolio humektantinių savybių, gebėjimo sulaikyti drėgmę [106].



**27 pav.** Manitolio įtaka keksiukų drėgniui (skirtingos raidės, rodo, kad yra statistiškai reikšmingi skirtumai, esant 95 % tikimybės lygiui)

Vertinant tiek vizualiai, tiek ir instrumentiniu metodu, nustatyti skirtumai tarp kepiinių su skirtingu manitolio kiekiu spalvos (žr. 28 pav.). Didėjant manitolio kiekiui, plutelės ir minkštimo spalva šviesėjo, mažėjo geltonos spalvos intensyvumas.



**28 pav.** A – keksiukas be manitolio (kontrolė), B – keksiukas su 25 % manitolio, C – keksiukas su 50 % manitolio, D – keksiukas su 75 % manitolio

Keksiukų minkštimo spalvos parametrų vertės pateiktos 11 lentelėje.  $L^*$ ,  $a^*$  ir  $b^*$  vertės apibūdina šviesumą, raudonumą ir geltonumą. Šviesiausias minkštimas nustatytas keksiukuose su 50 % manitolio ( $79,85 \pm 0,07$ ). Nustatyta, kad manitolio kiekiui didėjant nuo 0 iki 50 %, keksiukų minkštimas šviesėjo, o toliau perėjo į pilką atspalvį ( $L^*$  vertės didžiausios). Gautos  $a^*$  vertės artimos 0, tačiau minusinės vertės rodo, kad minkštimo spalva artimesnė žaliai nei raudonai spalvai. Daugiausia žalio atspalvio nustatyta keksiukuose su 75 % manitolio, mažiausiai – su 50 %. Kontrolinio kepinio ir keksiukų su 25 % manitolio  $a^*$  vertės buvo vienodos. Gautos  $b^*$  vertės rodo, kad didėjant manitolio kiekiui mažėjo geltonos spalvos intensyvumas. Geltoniausi buvo kontroliniai keksiukai be manitolio, kurių  $b^*$  vertė –  $27,18 \pm 0,19$ . Įvertinus gautus rezultatus nustatyta, kad keksiukai su 25 % manitolio panašiausi į kontrolinius kepiinius. J. N. Kim et al. [107] straipsnyje

pateikti pyrago su ryžių miltais spalvos matavimo rezultatai, kuriuose lyginamas kontrolinis kepinys ir kepiniai su 25, 50, 75 ir 100 % manitolio, rodo analogiškas tendencijas: pyrago minkštimo geltonos spalvos intensyvumas mažėjo didėjant manitolio kiekiui. V. Psimouli'io ir V. Oreopoulou [21] straipsnyje, tiriant įvairių saldiklių įtaką pyragų kokybei, nustatyta tokia pati manitolio įtaka kepinio spalvai. Autoriai nurodė, kad pakeitus visą cukrų manitoliumi, kepinio spalva patamsėjo ir geltonos spalvos intensyvumas sumažėjo. Gautus rezultatus galima paaiškinti kepinimo metu vykstančia Majaro reakcija. Majaro reakcija vyksta tarp redukuojančio sacharido glikozidinio hidroksilo ir aminorūgščių, peptidų ar baltymų amino grupių, susidarant rudos spalvos pigmentams – melanoidinams. Polioliai neturi redukuojančios aldehydinės ar ketoninės grupės ir nedalyvauja Majaro reakcijose, todėl didėjant manitolio kiekiui kepinuose, mažėjo susidaranti rudos spalvos junginių [108].

**11 lentelė.** Manitolio įtaka keksiukų minkštimo spalvai

Manitolio kiekis, %	Spalvų sistemos koordinatės		
	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>
0	82,57±0,24 <sup>c</sup>	-1,33±0,01 <sup>b</sup>	27,18±0,19 <sup>d</sup>
25	80,64±0,27 <sup>b</sup>	-1,33±0,01 <sup>b</sup>	26,94±0,09 <sup>c</sup>
50	79,85±0,07 <sup>a</sup>	-0,53±0,02 <sup>c</sup>	23,54±0,09 <sup>b</sup>
75	83,96±0,09 <sup>d</sup>	-1,37±0,01 <sup>a</sup>	22,86±0,08 <sup>a</sup>

Vidutinių verčių reikšmės, pažymėtos skirtingomis raidėmis, rodo, kad tame pačiame stulpelyje yra statistiškai reikšmingi skirtumai, įvertinti pagal Dunkano kriterijų ( $p \leq 0,05$ )

Keksiukų tešlos su skirtingu manitolio kiekiu tekstūros parametrų tyrimo tekstūros analizatoriumi rezultatai pateikti 12 lentelėje. Nustatytas ryšys tarp manitolio kiekio ir tešlos konsistencijos. Manitolio kiekiui didėjant tešlos konsistencijos vertės didėjo nuo 83,27±0,64 iki 106,98±0,46 g.s. Konsistencija yra susijusi su medžiagos tirštumu ir klampa. Kontrolinė tešla buvo skysčiausia, manitolio kiekiui didėjant tešla tirštėjo. Mažiausias kietumas ir rišlumas nustatytas kontrolinėje tešloje, atitinkamai 0,22±0,01 ir -0,16±0,01 N. Tešlos su manitoliumi pasižymėjo didesniu kietumu ir rišlumu. V. Psimouli'io ir V. Oreopoulou [21] straipsnyje aprašytos panašios tendencijos. Tyrimų metu buvo nustatyta, kad cukrų pakeitus manitoliumi, pyrago tešlos konsistencija tapo tirštesnė, o takumas sumažėjo. E. Zoulias et al. [103], tirdami cukraus pakeitimą polioliais ir acesulfamu-K nustatė, kad sausinių tešla su manitoliumi buvo kiečiausia ir ją buvo sunkiausia formuoti. Cukraus ir manitolio savybių skirtumai lėmė tirštesnę, kietesnę tešlos su manitoliumi tekstūrą. Cukrus maišymo metu padidina oro kiekį tešloje ir užtikrina jos stabilumą, tačiau manitolio kiekiui didėjant oro burbuliukų kiekis tešloje mažėja ir gaunama tirštesnės konsistencijos tešla [109].

**12 lentelė.** Keksiukų tešlos su skirtingu manitolio kiekiu tekstūros parametrai

Manitolio kiekis, %	Kietumas, N	Konsistencija, g.s	Rišlumas, N
0	0,22±0,01 <sup>a</sup>	83,27±0,64 <sup>a</sup>	-0,16±0,01 <sup>c</sup>
25	0,28±0,01 <sup>b</sup>	100,13±1,24 <sup>b</sup>	-0,31±0,02 <sup>a</sup>
50	0,26±0,02 <sup>b</sup>	101,11±1,45 <sup>b</sup>	-0,25±0,02 <sup>b</sup>
75	0,36±0,01 <sup>c</sup>	106,98±0,46 <sup>c</sup>	-0,32±0,01 <sup>a</sup>

Vidutinių verčių reikšmės, pažymėtos skirtingomis raidėmis, rodo, kad tame pačiame stulpelyje yra statistiškai reikšmingi skirtumai, įvertinti pagal Dunkano kriterijų ( $p \leq 0,05$ )



Tekstūros parametrai, nustatyti analizuojant keksiukų minkštimą praėjus 24 h po kepimo, pateikti 13 lentelėje. Manitolis neturėjo reikšmingos įtakos keksiukų kietumui. Visų keksiukų kietumas buvo labai panašus, kito nuo  $0,110 \pm 0,002$  iki  $0,110 \pm 0,002$  N. Kitoms tekstūros savybėms jo įtaka buvo reikšminga. Elastingumas, sukibimas, lipnumas, kramtomumas ir gebėjimas atsistatyti mažėjo didėjant manitolio kiekiui. Keksiukai, kuriuose 25 % cukraus buvo pakeista manitoliumi, mažiausiai skyrėsi nuo kontrolinio kepinio, jų savybės buvo panašiausios. Pakeitus 75 % cukraus, keksiukų minkštimo elastingumas sumažėjo 34,2 %, sukibimas – 24,4 %, lipnumas – 26,7 %, kramtomumas – 52,9 %, gebėjimas atsistatyti – 34,6 %. Panašios tendencijos nustatytos J. N. Kim et al. [107] tyrimų metu. Pyrago su ryžių miltais receptūroje pakeitus cukrų polioliais nebuvo reikšmingo skirtumo tarp pyragų kietumo, o elastingumas, sukibimas ir kramtomumas mažėjo didėjant manitolio kiekiui. Tokie pokyčiai aiškinami skirtinga cukraus ir manitolio geba surišti vandenį ir sąveikauti su krakmolu, kas turi įtakos krakmolo retrogradacijai.

**13 lentelė.** Keksiukų minkštimo tekstūros parametrai

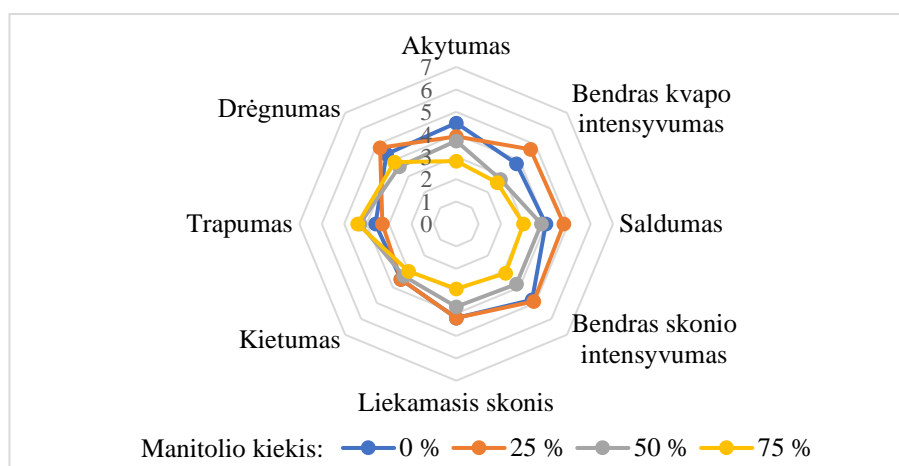
Manitolio kiekis, %	Kietumas, N	Elastingumas	Sukibimas	Lipnumas	Kramtomumas	Gebėjimas atsistatyti
0	$0,110 \pm 0,002^a$	$0,754 \pm 0,003^d$	$0,406 \pm 0,009^c$	$0,045 \pm 0,001^c$	$0,034 \pm 0,001^b$	$0,133 \pm 0,003^c$
25	$0,110 \pm 0,004^a$	$0,719 \pm 0,003^c$	$0,390 \pm 0,001^c$	$0,042 \pm 0,001^{bc}$	$0,031 \pm 0,001^b$	$0,123 \pm 0,001^c$
50	$0,105 \pm 0,006^a$	$0,527 \pm 0,010^b$	$0,350 \pm 0,003^b$	$0,037 \pm 0,002^{ab}$	$0,020 \pm 0,002^a$	$0,102 \pm 0,001^b$
75	$0,106 \pm 0,002^a$	$0,496 \pm 0,010^a$	$0,307 \pm 0,015^a$	$0,033 \pm 0,003^a$	$0,016 \pm 0,001^a$	$0,087 \pm 0,004^a$

Vidutinių verčių reikšmės, pažymėtos skirtingomis raidėmis, rodo, kad tame pačiame stulpelyje yra statistškai reikšmingi skirtumai, įvertinti pagal Dunkano kriterijų ( $p \leq 0,05$ )

### 3.3.2. Manitolio įtaka keksiukų juslinėms savybėms

Juslinės produkto savybės yra vienas iš svarbiausių veiksnių, lemiančių vartotojų nuomonę ir produktų pasirinkimą. Cukraus pakeitimas saldikliais turi įtakos kepinų išvaizdai, skoniu ir tekstūrai, todėl gali būti nepriimtinas vartotojui. Keksiukų juslinėms savybėms įvertinti pasirinkti vertinimo pagal skalę ir rikiavimo metodai. Vertinimo pagal skalę metodu nustatyti juslinių savybių intensyvumai, kurie lyginti su kontroliniu mėginiu. Rikiavimo metodas taikytas keksiukų pirmumui nustatyti.

Įvertinus keksiukų juslinės savybes ir jų intensyvumus, sudarytas juslinis profilis, pateiktas 29 pav.



**29 pav.** Keksiukų su skirtingu manitolio kiekiu juslinis profilis

Atlikus rezultatų analizę nustatyta, kad didesnis manitolio kiekis sumažino kepinio akytumą. Intensyviausias kvapas ir saldumas nustatytas keksiukuose su 25 % manitolio. Bendro ir liekamojo skonio intensyvumas vienodai įvertintas tiek kontroliniuose, tiek kepinuose su 25 % manitolio. Tarp manitolio kiekio ir kietumo nebuvo nustatyta reikšmingų skirtumų. Trapesniais ir mažiau drėgnais įvertinti keksiukai su 50 ir 75 % manitolio.

Pritaikius rikiavimo metodą, nustatyta reikšminga manitolio įtaka keksiukų priimtinumui (žr. 14 lentelė). Pagal bendrą priimtinumą keksiukai su 25 % manitolio surinko 35 rangus, kontrolė – 33 rangus, keksiukai su 50 ir 75 % manitolio atitinkamai 19 ir 13 rangų. Apskaičiavus Friedmano kriterijų  $F_{test.}$ , gauta vertė (20,64) buvo didesnė už 5 lentelėje pateiktą kritinę vertę (7,67), esant 10 vertintojų ir 4 mėginiams. Taigi, esant paklaidos tikimybei mažesnei arba lygiai 5 %, tarp mėginių buvo reikšmingas skirtumas. Taip pat buvo nustatyta, kad reikšmingas skirtumas yra tarp 4 iš 6 tiriamųjų mėginių porų. Reikšmingo skirtumo nebuvo nustatyta tik tarp keksiukų porų su 0 ir 25 % bei su 50 ir 75 % manitolio. Remiantis rikiavimo testo rezultatais, galima daryti išvadą, kad keksiukų gamyboje vartotojams priimtinas cukraus pakeitimo manitoliumi kiekis yra iki 25 %.

**14 lentelė.** Keksiukų su skirtingu manitolio kiekiu rikiavimo testo rezultatų suvestinė

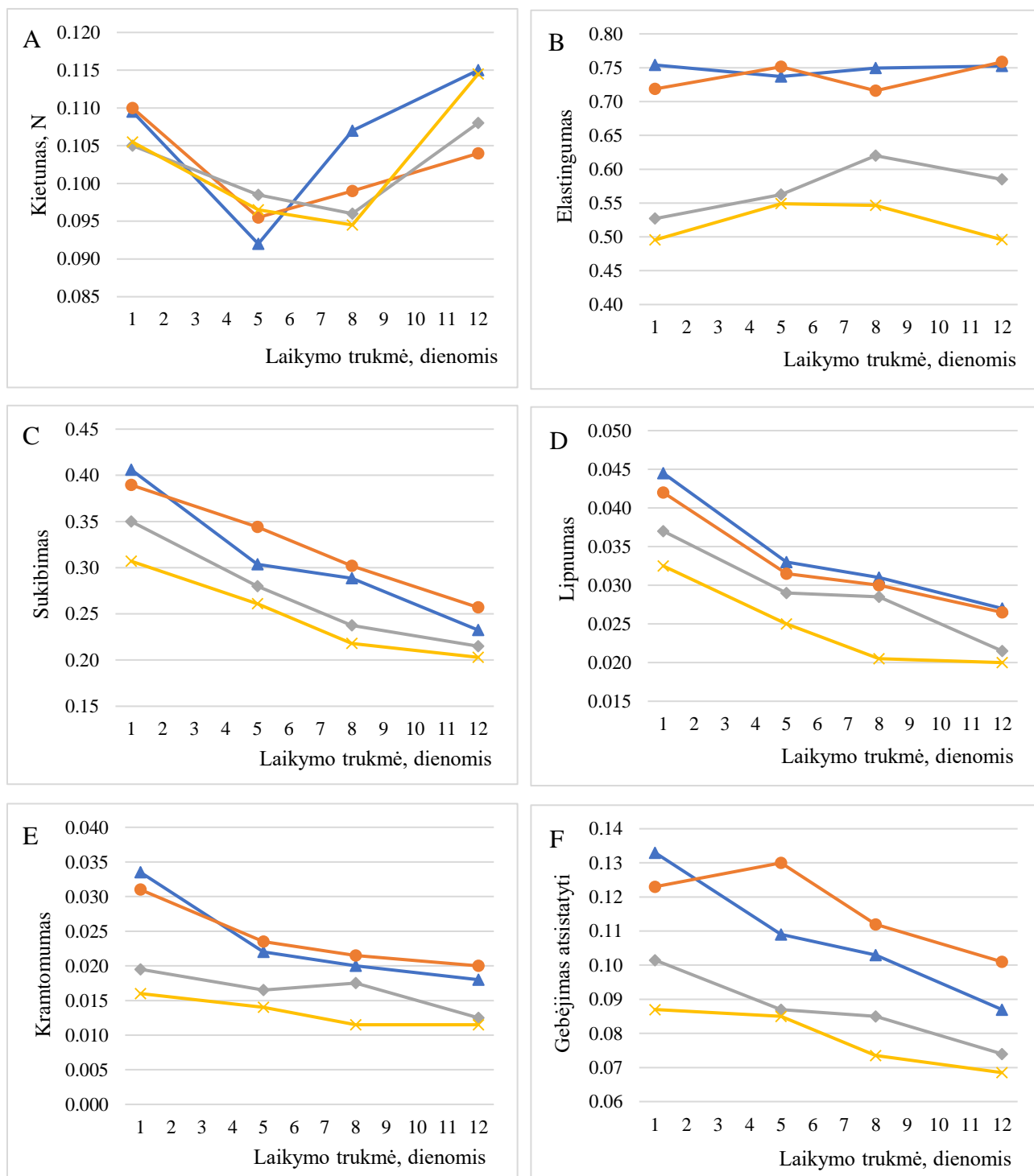
Vertintojas	Mėginiai				Rangų suma
	A (kontrolė)	B (25 % manitolio)	C (50 % manitolio)	D (75 % manitolio)	
1	2	4	1	3	10
2	4	3	2	1	10
3	3	4	1	2	10
4	3	4	2	1	10
5	4	3	2	1	10
6	3	4	2	1	10
7	4	2	3	1	10
8	3	4	2	1	10
9	4	3	2	1	10
10	3	4	2	1	10
Rangų suma mėginiams	33	35	19	13	100

A. W. Sahin et al. [20] vertino 0, 3, 5 ir 10 % (nuo visų produktų masės) manitolio įtaką bandelių juslinėms savybėms. Nustatyta, kad didėjant manitolio kiekiui iki 5 %, didėjo aromato intensyvumas, o po to sumažėjo. Skonio ir saldumo intensyvumas didžiausias bandelėse su 3 % manitolio, didinant manitolio kiekį šie parametrai mažėjo. S. Bhise ir A. Kaur [19] tyrė 0, 2, 4 ir 6 % glicerolio, sorbitolio ir manitolio įtaką duonos priimtinumui. Juslinei analizei buvo naudota 9 kategorijų intensyvumo skalė. Kontrolinis kepinys buvo įvertintas 7,87, o geriausiai įvertinta duona su 4 % manitolio (8,45). Didinant manitolio kiekį iki 6 %, duonos priimtinumas vartotojams sumažėjo. V. Psimouli's ir V. Oreopoulou [21] ir E. I. Zoulias et al. [103] tyrė cukraus pakeitimą įvairiais saldikliais. Nustatyta, kad pakeitus visą cukrų manitoliumi, pyrago ir sausainių juslinės savybės buvo mažiausiai priimtinos vartotojams. Kepinių su manitoliumi saldumas, skonis ir bendras priimtinumas buvo įvertinti mažiausiais balais. Remiantis literatūroje pateiktais ir eksperimento metu gautais rezultatais, galima

daryti išvadą, kad kepiinių su manitoliumi juslinės savybės pagerėja pakeitus nedidelę cukraus dalį, tačiau pakeitus visą cukrų gaminys tampa nebepriimtinas vartotojui.

### 3.3.3. Manitolio įtaka keksiukų pokyčiams laikymo metu

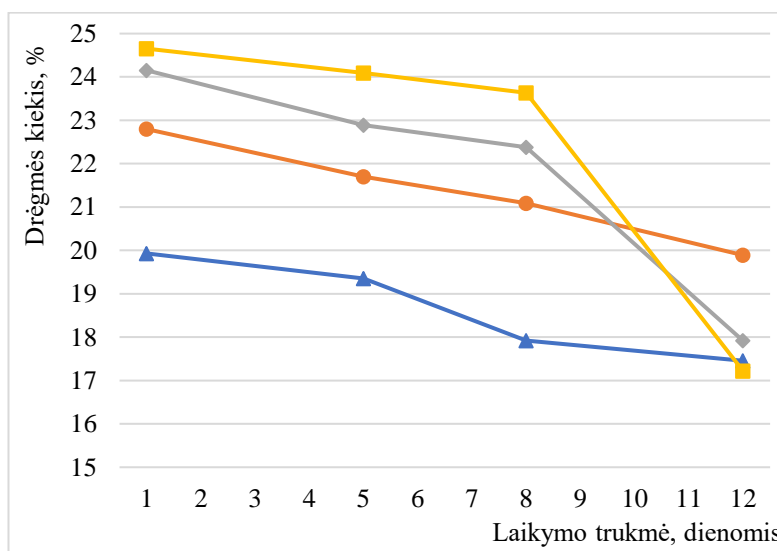
Siekiant nustatyti manitolio įtaką keksiukų kokybėms pokyčiams laikymo metu, atlikti minkštimo tekstūros ir drėgmės kiekio tyrimai po 5, 8 ir 12 dienų kepiinių laikymo polietilenuose pakuotėse kambario temperatūroje (žr. 30 pav.).



**30 pav.** Manitolio kiekio (▲ – 0% (kontrolė); ● – 25%; ◆ – 50%; × – 75%) įtaka keksiukų tekstūros pokyčiams laikymo metu: kietumo (A), elastingumo (B), sukibimo (C), lipnumo (D), kramtomumo (E) ir gebėjimo atsistatyti (F)

Poliolio įtaka minkštimo kietumo ir elastingumo pokyčiams laikymo metu nebuvo vienareikšmė. Kiti keksiukų tekstūros parametrai: minkštimo sukibimas, lipnumas, kramtomumas ir gebėjimas atsistatyti mažėjo ilgėjant laikymo trukmei. Didžiausi šių parametų verčių pokyčiai, išskyrus lipnumą, nustatyti kontroliniame kepinyje (atitinkami 42,7, 46,3 ir 34,59 %). Nustatyta, kad ilgėjant laikymo trukmei keksiukuose su manitoliumi minkštimo savybės kito mažiau nei kontrolinio kepinio. Pakeitus cukrų manitoliumi kepiųjų minkštimo sukibimo vertės mažėjo lėčiau nepriklausomai nuo manitolio kiekio (atitinkamai 34,0, 38,6 ir 33,9 %). Lipnumas visuose keksiukuose sumažėjo beveik tolygiai ( $39,15 \pm 1,81$  %). Kramtomumas sumažėjo didėjant pakeisto cukraus kiekiui atitinkami 35,9, 35,5 ir 28,13 %, gebėjimas atsistatyti – 17,9, 27,1 ir 21,3 %. Atsižvelgus į gautus rezultatus, galima teigti, kad, praėjus 12 dienų po kepimo, keksiukų, kuriuose pakeista 25 % cukraus, tekstūros parametų vertės išliko didžiausios.

Keksiukų minkštimo drėgmės kiekio pokyčiai laikymo metu pavaizduoti 31 pav. Ilgėjant keksiukų laikymo trukmei, visų kepiųjų minkštimo drėgmės kiekis mažėjo. Iki 8 dienos pastebimas nedidelis drėgmės kiekio sumažėjimas, kuris mažėjo didėjant pakeisto cukraus kiekiui (atitinkamai 10,1, 7,5, 7,3, 4,1 %). Nuo 8 iki 12 dienos keksiukuose su 50 ir 75 % manitolio drėgmės kiekis staigiai sumažėjo (19,9 ir 27,1 %). Tuo tarpu kontroliniuose ir su 25 % manitolio drėgmės kiekiu kitimo greitis išliko pastovus ( $0,26 \pm 0,04$  %/dieną). 12 dieną po kepimo didžiausiu drėgmės kiekiu išsiskyrė keksiukai su 25 % manitolio, juose drėgmės kiekis siekė  $19,89 \pm 0,11$  %. Kituose keksiukuose drėgmės kiekis buvo žymiai mažesnis ( $17,53 \pm 0,29$  %). S. Bhise ir A. Kaur [19] lygino duonos su skirtingais polioliais tinkamumo vartoti trukmę. Duona su manitoliumi, sorbitoliumi ir gliceroliumi pasižymėjo didesniu drėgmės kiekiu nei kontrolinis kepinys. Po 10 dienų duonoje su 4 % manitolio drėgmės kiekis sumažėjo, tačiau išliko didesnis nei kontrolinėje duonoje, o su 4 % sorbitolio – padidėjo. Abu polioliai yra humektantai ir pasižymi savybe išlaikyti produkto drėgmę, tačiau sorbitolis turi didesnę higroskopumą ir pradeda absorbuoti drėgmę, kai santykinis aplinkos drėgnis pasiekia 65 %, tuo tarpu manitoliumi santykinis drėgnis turėtų būti didesnis nei 90 % [110].



**31 pav.** Manitolio kiekio (▲ – 0 % (kontrolė); ● – 25 %; ◆ – 50 %; ■ – 75 %) įtaka keksiukų drėgmės kiekio pokyčiams laikymo metu

A. W. Sahin et al. [20], tirdami ksilitolio, manitolio ir maltitolio panaudojimą kepiuose, nustatė, kad manitolio savybės skyrėsi nuo kitų cukraus alkoholių. Didėjant manitolio kiekiui bandelėse, didėjo vandens aktyvumas. Manitolis yra nehigroskopiškas, todėl nesąveikauja su vandeniu. Dėl šios

priežasties susidaro didesnis laisvojo vandens kiekis. Vandens aktyvumas siejamas su mikrobiologiniu gedimu, todėl kepinuose rekomenduojamas maksimalus manitolio kiekis yra 50 % nuo bendro cukraus kiekio. Buvo tiriamos bandelių, kuriose 3, 5 ir 10 % cukraus pakeista polioliais, tinkamumo vartoti trukmės. Ilgiausia bandelių tinkamumo vartoti trukmė nustatyta į kepinį pridėjus 5 % manitolio, kuri buvo panaši kaip ir pridėjus 10 % cukraus. Didėjant manitolio kiekiui, tinkamumo vartoti trukmė trumpėjo. Tokie rezultatai panašūs į nustatytus keksiukų tyrimo metu. Ilgiausia tinkamumo vartoti trukmė pasižymėjo keksiukai su 25 % manitolio: jų drėgmės kiekio ir tekstūros parametrų vertės išliko didžiausios, o mikrobiologinio gedimo požymių nenustatyta. Keksiukuose su 50 ir 75 % manitolio po 12 dienų atsirado pilkos ir melsvos spalvos mikroorganizmų kolonijos. Prasidėjęs mikrobiologinis gedimas gali būti susijęs su didesniu vandens aktyvumu kepinuose, aprašytu literatūroje.

Pakeitus 25, 50 ir 75 % cukraus manitoliumi, keksiukuose sumažėjo su cukrumi gaunamų kalorijų kiekis atitinkamai 10, 20 ir 30 %. Atsižvelgus į tyrimų metu gautus rezultatus, rekomenduojamas cukraus pakeitimas manitoliumi keksiukuose ir kituose saldžiuose miltiniuose kepinuose iki 25 % nuo bendro cukraus kiekio receptūroje. Toks poliolio kiekis yra priimtinas vartotojui, net pagerina produkto juslines savybes, sumažina kalorijų kiekį bei pailgina tinkamumo vartoti terminą.

## Išvados

1. Ištyrus manitolio 2-dehidrogenazės, atsakingos už manitolio gamybą, aktyvumą 17-oje pieno rūgšties bakterijų padermių, priklausančių *Lactococcus*, *Lactobacillus* ir *Leuconostoc* gentims, didžiausiu šio fermento aktyvumu (0,07–0,24 AV/ml) išsiskyrė *Lb. rossiae* GL14, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *paracitrovorus* A230, A241, A211, *Lb. sanfranciscensis* MR29 ir W2.
2. Atlikus fermentacijos eksperimentus modelinėje sistemoje, kurioje fruktozės-gliukozės santykis 2:1, nustatyta, kad tinkamiausia manitolio gamybai yra *Lb. rossiae* GL14 padermė. Fermentuojant šiomis bakterijomis gautas didžiausias manitolio kiekis (43,47 g/l), mažiau manitolio susidarė panaudojant *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *paracitrovorus* A230 ir A211, atitinkamai 31,66 ir 17,24 g/l. Likusių bakterijų fermentacijos produktuose reikšmingesnio manitolio kiekio nebuvo nustatyta.
3. Nustatytos optimalios pusruginės duonos atliekų fermentinio apdorojimo parametrų vertės didžiausiai gliukozės-fruktozės išėigai gauti:
  - a) duonos krakmolo hidrolizės parametrai: duonos atliekų kiekis substrate – 18,64 masės %,  $\alpha$ -amilazės – 0,035 KNU/g duonos ir gliukoamilazės – 0,43 AGU/g duonos. Pritaikius šias vertes gauta gliukozės išėiga 84,35 % duonos sausųjų medžiagų arba 97,92 % krakmolo;
  - b) gliukozės izomerizacijos parametrai: gliukozės izomerazės kiekis 4,98 IGIU/g sirupo ir pH 7,71. Pritaikius šias parametrų vertes, gauta fruktozės išėiga 40,35 %.
4. Fermentuojant *Lb. rossiae* GL14 gliukozės-fruktozės sirupą, pagamintą iš duonos atliekų, manitolio koncentracija (20,4 g/l) buvo mažesnė nei modelinėje gliukozės-fruktozės sistemoje (43,47 g/l). Fruktosės priedas iki optimalaus fruktozės-gliukozės santykio (2:1) leido pasiekti 62 % didesnę manitolio koncentraciją. Didžiausia manitolio koncentracija (72,98 g/l) ir išėiga (51 %) buvo gauta papildžius terpę maistinėmis medžiagomis (kukurūzų išdžiovintomis dalelėmis, mangano sulfatu ir sojų peptonu). Tai rodo, kad duonos atliekos gali būti panaudotos manitolio gamybai biotechnologiniu būdu.
5. Nustatyta, kad 25 % cukraus pakeitimas manitoliumi keksiukų receptūroje turėjo teigiamą įtaką jų kokybei ir juslinėms savybėms: suteikė vertintojams priimtina skonį, intensyvesnę kvapą, didesnę produkto drėgnį, o laikymo metu tekstūros parametrai pakito mažiausiai. Vertintojams labiausiai patiko kontroliniai keksiukai ir keksiukai su 25 % manitolio, toliau didinant manitolio kiekį iki 75 %, jų priimtumas mažėjo, todėl rekomenduojamas manitolio kiekis keksiukų gamybai iki 25 %.

## Literatūros sąrašas

1. GHOSH, S. and M. SUDHA. A Review on Polyols: New Frontiers for Health-Based Bakery Products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* [interaktyvus]. Taylor & Francis, 2012, vol. 63(3), 372-379 [žiūrėta 2019-03-16]. doi: 10.3109/09637486.2011.627846
2. MOORADIAN, A. D., M. SMITH and M. TOKUDA. The Role of Artificial and Natural Sweeteners in Reducing the Consumption of Table Sugar: A Narrative Review. *Clinical Nutrition eSPen* [interaktyvus]. Elsevier, 2017, vol. 18, 1-8 [žiūrėta 2019-02-23]. doi: 10.1016/j.clnesp.2017.01.004
3. DAI, Y., Q. MENG, W. MU and T. ZHANG. Recent Advances in the Applications and Biotechnological Production of Mannitol. *Journal of Functional Foods* [interaktyvus]. Elsevier, 2017, vol. 36, 404-409 [žiūrėta 2019-02-13]. doi: 10.1016/j.jff.2017.07.022
4. PATRA, F., S. TOMAR and S. ARORA. Technological and Functional Applications of Low-calorie Sweeteners from Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Science* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2009, vol. 74(1), 16-23 [žiūrėta 2018-12-17]. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.01005.x
5. MONEDERO, V., G. PÉREZ-MARTÍNEZ and M. J. YEBRA. Perspectives of Engineering Lactic Acid Bacteria for Biotechnological Polyol Production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2010, vol. 86(4), 1003-1015 [žiūrėta 2018-12-15]. doi: 10.1007/s00253-010-2494-6
6. *New Zealand Food Waste Audits: Waste Not* [interaktyvus]. 2015 [žiūrėta 2019-01-02]. Prieiga per: <http://www.wasteminz.org.nz/wpcontent/uploads/Final-1-0-New-Zealand-FoodWaste-Audit-Report-2015.pdf>
7. HAROON, S., et al. Biotechnological Approaches for Production of High Value Compounds from Bread Waste. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* [interaktyvus]. Science Publications, 2016, vol. 12(2), 102-109 [žiūrėta 2018-01-12]. doi: 10.3844/ajbbsp.2016.102.109
8. HUDEČKOVÁ, H., P. ŠUPINOVÁ and L. BABÁK. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Waste Bread before Fermentation. *Acta Universitatis Agriculturae Et Silviculturae Mendelianae Brunensis* [interaktyvus]. Mendel University Press, 2017, vol. 65(1), 35-40 [žiūrėta 2018-09-30]. doi: 10.11118/actaun201765010035
9. SHAWKAT, H., M. WESTWOOD and A. MORTIMER. Mannitol: A Review of its Clinical Uses. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* [interaktyvus]. Oxford University Press, 2012, vol. 12(2), 82-85 [žiūrėta 2019-02-03]. doi: 10.1093/bjaceaccp/mkr063
10. NPCS Board of Consultants & Engineers. *Industrial Alcohol Technology Handbook*. Asia Pacific Business Press Inc., 2010. 431-433 p. ISBN 8178331438.
11. WISSELINK, H., et al. Mannitol Production by Lactic Acid Bacteria: A Review. *International Dairy Journal* [interaktyvus]. Elsevier, 2002, vol. 12(2-3), 151-161 [žiūrėta 2018-12-06]. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00153-4
12. HUA, Tse C., Bao L. LIU and Haimei ZHANG. *Freeze-drying of pharmaceutical and food products*. Woodhead Publishing, 2010. 280 p. ISBN 9781845697471.
13. PARK, Y., et al. Recent Advances in Biological Production of Sugar Alcohols. *Current Opinion in Biotechnology* [interaktyvus]. Elsevier, 2016, vol. 37, 105-113 [žiūrėta 2019-02-13]. doi: 10.1016/j.copbio.2015.11.006
14. *The Herbarium Catalogue, Royal Botanic Gardens* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2019-02-02]. Prieiga per: <https://pfaf.org/Admin/PlantImages/FraxinusOrnus.gif>



15. EUROPOS KOMISIJA. 2012 m. gegužės 16 d. Komisijos reglamentas (ES) Nr. 432/2012 dėl tam tikrų leidžiamų vartoti teiginių apie maisto produktų sveikumą, išskyrus teiginius apie susirgimo rizikos mažinimą, vaikų vystymąsi ir sveikatą, sąrašo sudarymo [interaktyvus]. [žiūrėta 2019-03-05]. Prieiga per: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/LT/TXT/?uri=CELEX%3A32012R0432>
16. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and World Health Organization. Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some antimicrobials, antioxidants, emulsifiers, stabilizers, flour-treatment agents, acids, and bases. Geneva: World Health Organization, 1966 [interaktyvus]. [žiūrėta 2018-12-28]. Prieiga per: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v21je10.htm>
17. GREMBECKA, M. Sugar Alcohols—their Role in the Modern World of Sweeteners: A Review. *European Food Research and Technology* [interaktyvus]. Springer, 2015, vol. 241(1), 1-14 [žiūrėta 2019-01-25]. doi: 10.1007/s00217-015-2458-2
18. ORTIZ, M. E., J. BLECKWEDEL, R. R. RAYA and F. MOZZI. Biotechnological and in Situ Food Production of Polyols by Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2013, vol. 97(11), 4713-4726 [žiūrėta 2018-11-06]. doi: 10.1007/s00253-013-4884-z
19. BHISE, S. and A. KAUR. Baking Quality, Sensory Properties and Shelf Life of Bread with Polyols. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. Springer, 2014, vol. 51(9), 2054-2061 [žiūrėta 2019-03-19]. doi: 10.1007/s13197-014-1256-3
20. SAHIN, A. W., C. AXEL, E. ZANNINI and E. K. ARENDT. Xylitol, Mannitol and Maltitol as Potential Sucrose Replacers in Burger Buns. *Food & Function* [interaktyvus]. Royal Society of Chemistry, 2018, vol. 9(4), 2201-2212 [žiūrėta 2019-05-04]. doi: 10.1039/c8fo00066b
21. PSIMOULI, V. and V. OREOPOULOU. The Effect of Alternative Sweeteners on Batter Rheology and Cake Properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2012, vol. 92(1), 99-105 [žiūrėta 2019-04-23]. doi: 10.1002/jsfa.4547
22. RONDA, F., M. GÓMEZ, C. A. BLANCO and P. A. CABALLERO. Effects of Polyols and Nondigestible Oligosaccharides on the Quality of Sugar-Free Sponge Cakes. *Food Chemistry* [interaktyvus]. Elsevier, 2005, vol. 90(4), 549-555 [žiūrėta 2019-03-03]. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.05.023
23. LIVESEY, G. Health Potential of Polyols as Sugar Replacers, with Emphasis on Low Glycaemic Properties. *Nutrition Research Reviews* [interaktyvus]. Cambridge University Press, 2003, vol. 16(2), 163-191 Prieiga per: 2019-03-10. doi: 10.1079/NRR200371
24. LE, Anh S. and Kathleen B. MULDERRIG. Sorbitol and Mannitol. In: *Alternative sweeteners*. Third Edition. CRC Press, 2001, pp. 317-335. ISBN 0824704371.
25. GHOREISHI, S. and R. G. SHAHRESTANI. Innovative Strategies for Engineering Mannitol Production. *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. Elsevier, 2009, vol. 20(6-7), 263-270 [žiūrėta 2019-05-07]. doi: 10.1016/j.tifs.2009.03.006
26. BHATT, S. M., A. MOHAN and S. K. SRIVASTAVA. Challenges in Enzymatic Route of Mannitol Production. *ISRN Biotechnology* [interaktyvus]. Hindawi Publishing Corporation, 2012, vol. 2013, 1-13 [žiūrėta 2019-05-07]. doi: 10.5402/2013/914187
27. Grand View Research. Mannitol Market Analysis by Application (Food Additive, Pharmaceuticals, Industrial, Surfactants) and Segment Forecasts to 2024. *Market Research Report*, 2016, 1-115 [žiūrėta 2019-05-07]. Prieiga per: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/mannitol-market>.



28. SAHA, B. C. and F. M. RACINE. Biotechnological Production of Mannitol and its Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2011, vol. 89(4), 879-891 [žiūrėta 2018-10-28]. doi: 10.1007/s00253-010-2979-3
29. DEIS, R. C. and M. W. KEARSLEY. Sorbitol and Mannitol. *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2012, 331-346 [žiūrėta 2019-01-12]. doi: 10.1002/9781118373941.ch15
30. DEVOS, F. Process for the Manufacture of Mannitol. *U.S. Patent US 5466795*, 1995 [žiūrėta 2019-04-21].
31. ORTIZ, M. E., et al. Global Analysis of Mannitol 2-Dehydrogenase in *Lactobacillus Reuteri* CRL 1101 during Mannitol Production through Enzymatic, Genetic and Proteomic Approaches. *PLoS One* [interaktyvus]. Public Library of Science, 2017, vol. 12(1), 1-21 [žiūrėta 2018-11-27]. doi: 10.1371/journal.pone.0169441
32. VON WEYMARN, Niklas. *Process Development for Mannitol Production by Lactic Acid Bacteria*. Helsinki University of Technology, 2002. ISSN 951-22-5885-4.
33. SONG, S. H. and C. VIEILLE. Recent Advances in the Biological Production of Mannitol. *Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2009, vol. 84(1), 55-62 [žiūrėta 2018-12-03]. doi: 10.1007/s00253-009-2086-5
34. SAHA, Badal C. Production of Mannitol by Fermentation. In: *ACS Symposium Series*. Washington, DC, American Chemical Society, 2003, pp. 67-88.
35. EL-KADY, I., M. MOUBASHER and M. E. MOSTAFA. Accumulation of Sugar Alcohols by Filamentous Fungi. *Folia Microbiologica* [interaktyvus]. Springer, 1995, vol. 40(5), 481-486 [žiūrėta 2019-01-18]. doi: 10.1007/BF02814727
36. BHATT, S. M., A. MOHAN and S. K. SRIVASTAVA. Challenges in Enzymatic Route of Mannitol Production. *ISRN Biotechnology* [interaktyvus]. Hindawi Publishing Corporation, 2012, vol. 2013, 1-13 [žiūrėta 2018-12-06]. doi: 10.5402/2013/914187
37. GASPAR, P., et al. Engineering *Lactococcus Lactis* for Production of Mannitol: High Yields from Food-Grade Strains Deficient in Lactate Dehydrogenase and the Mannitol Transport System. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol. 70(3), 1466-1474 [žiūrėta 2018-12-28]. doi: 10.1128/AEM.70.3.1466-1474.2004
38. NEVES, A. R., et al. Metabolic Characterization of *Lactococcus Lactis* Deficient in Lactate Dehydrogenase using in vivo <sup>13</sup>C-NMR. *European Journal of Biochemistry* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2000, vol. 267(12), 3859-3868 [žiūrėta 2019-01-15]. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01424.x
39. GASPAR, P., et al. High Yields of 2,3-Butanediol and Mannitol in *Lactococcus Lactis* through Engineering of NAD(+) Cofactor Recycling. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, vol. 77(19), 6826-6835 [žiūrėta 2018-12-28]. doi: 10.1128/AEM.05544-11
40. SAHA, B. C. and L. K. NAKAMURA. Production of Mannitol and Lactic Acid by Fermentation with *Lactobacillus Intermedius* NRRL B-3693. *Biotechnology and Bioengineering* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2003, vol. 82(7), 864-871 [žiūrėta 2019-02-19]. doi: 10.1002/bit.10638
41. SOETAERT, Wim, D. SCHWENGENERS, K. BUCHHOLZ and EJ VANDAMME. A wide range of carbohydrate modifications by a single micro-organism: *Leuconostoc mesenteroides*. In: *Progress in Biotechnology*. Elsevier, 1995, pp. 351-358
42. GROBBEN, G. J., et al. Spontaneous Formation of a Mannitol-Producing Variant of *Leuconostoc Pseudomesenteroides* Grown in the Presence of Fructose. *Appl. Environ. Microbiol.*

- [interaktyvus]. *Am Soc Microbiol*, 2001, vol. 67(6), 2867-2870 [žiūrėta 2019-05-12]. doi: 10.1128/AEM.67.6.2867-2870.2001
43. SAHA, B. C. Production of Mannitol from Inulin by Simultaneous Enzymatic Saccharification and Fermentation with *Lactobacillus Intermedius* NRRL B-3693. *Enzyme and Microbial Technology* [interaktyvus]. Elsevier, 2006, vol. 39(5), 991-995 [žiūrėta 2019-01-23]. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.02.001
  44. SAHA, B. C. A Low-Cost Medium for Mannitol Production by *Lactobacillus Intermedius* NRRL B-3693. *Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2006, vol. 72(4), 676-680
  45. YUN, J. W. and D. H. KIM. A Comparative Study of Mannitol Production by Two Lactic Acid Bacteria. *Journal of Fermentation and Bioengineering* [interaktyvus]. Elsevier, 1998, vol. 85(2), 203-208 [žiūrėta 2019-03-26]. doi: 10.1016/S0922-338X(97)86768-2
  46. VON WEYMARN, N., M. HUIJANEN and M. LEISOLA. Production of D-Mannitol by Heterofermentative Lactic Acid Bacteria. *Process Biochemistry* [interaktyvus]. Elsevier, 2002, vol. 37(11), 1207-1213 [žiūrėta 2019-04-27]. doi: 10.1016/S0032-9592(01)00339-9
  47. VON WEYMARN, N., K. KIVIHARJU and M. LEISOLA. High-Level Production of D-Mannitol with Membrane Cell-Recycle Bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2002, vol. 29(1), 44-49 [žiūrėta 2019-02-13]. doi: 10.1038/sj.jim.7000262
  48. FONTES, C. P., T. L. HONORATO, M. C. RABELO and S. RODRIGUES. Kinetic Study of Mannitol Production using Cashew Apple Juice as Substrate. *Bioprocess and Biosystems Engineering* [interaktyvus]. Springer, 2009, vol. 32(4), 493-499 [žiūrėta 2019-05-14]. doi: 10.1007/s00449-008-0269-6
  49. CARVALHEIRO, F., et al. Mannitol Production by Lactic Acid Bacteria Grown in Supplemented Carob Syrup. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2011, vol. 38(1), 221-227 [žiūrėta 2018-09-29]. doi: 10.1007/s10295-010-0823-5
  50. ORTIZ, M. E., M. J. FORNAGUERA, R. R. RAYA and F. MOZZI. *Lactobacillus Reuteri* CRL 1101 Highly Produces Mannitol from Sugarcane Molasses as Carbon Source. *Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2012, vol. 95(4), 991-999 [žiūrėta 2019-05-07]. doi: 10.1007/s00253-012-3945-z
  51. ERTEN, H. Metabolism of Fructose as an Electron Acceptor by *Leuconostoc Mesenteroides*. *Process Biochemistry* [interaktyvus]. Elsevier, 1998, vol. 33(7), 735-739 [žiūrėta 2019-02-16]. doi: 10.1016/S0032-9592(98)00041-7
  52. SAHA, B. C. and F. M. RACINE. Effects of pH and Corn Steep Liquor Variability on Mannitol Production by *Lactobacillus Intermedius* NRRL B-3693. *Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2010, vol. 87(2), 553-560 [žiūrėta 2019-02-19]. doi: 10.1007/s00253-010-2552-0
  53. SOETAERT, Wim, Petra T. VANHOOREN and Erick J. VANDAMME. The production of mannitol by fermentation. In: *Carbohydrate biotechnology protocols*. Springer, 1999, pp. 261-275. ISBN 978-1-59259-261-6.
  54. SAHA, B. C. A Low-Cost Medium for Mannitol Production by *Lactobacillus Intermedius* NRRL B-3693. *Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2006, vol. 72(4), 676-680 [žiūrėta 2019-04-05]. doi: 10.1007/s00253-006-0364-z
  55. SAHA, B. C. Effect of Salt Nutrients on Mannitol Production by *Lactobacillus Intermedius* NRRL B-3693. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2006, vol. 33(10), 887-890 [žiūrėta 2018-11-28]. doi: 10.1007/s10295-006-0140-1

56. PAPAGIANNI, M. and M. LEGIŠA. Increased Mannitol Production in *Lactobacillus Reuteri* ATCC 55730 Production Strain with a Modified 6-Phosphofructo-1-Kinase. *Journal of Biotechnology* [interaktyvus]. Elsevier, 2014, vol. 181, 20-26 [žiūrėta 2018-12-28]. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.04.007
57. HELANTO, M., et al. Improved Mannitol Production by a Random Mutant of *Leuconostoc Pseudomesenteroides*. *Journal of Biotechnology* [interaktyvus]. Elsevier, 2005, vol. 116(3), 283-294 [žiūrėta 2019-05-12]. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.11.001
58. Weymarn, F Niklas W von, K. J. KIVIHARJU, S. T. JÄÄSKELÄINEN and M. S. LEISOLA. Scale-up of a New Bacterial Mannitol Production Process. *Biotechnology Progress* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2003, vol. 19(3), 815-821 [žiūrėta 2019-04-07]. doi: 10.1021/bp025718s
59. SLATNER, M., et al. Enzymatic Production of Pure D-Mannitol at High Productivity. *Biocatalysis and Biotransformation* [interaktyvus]. Taylor & Francis, 1998, vol. 16(5), 351-363 [žiūrėta 2019-04-23]. doi: 10.3109/10242429809003628
60. FAO. *Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention*. Rome: , 2011. 1-29 p. ISBN 978-92-5-107205-9.
61. MENA, C., B. ADENSO-DIAZ and O. YURT. The Causes of Food Waste in the Supplier–retailer Interface: Evidences from the UK and Spain. *Resources, Conservation and Recycling* [interaktyvus]. Elsevier, 2011, vol. 55(6), 648-658 [žiūrėta 2019-02-15]. doi: 10.1016/j.resconrec.2010.09.006
62. MELIKOGLU, M. Production of Sustainable Alternatives to Petrochemicals and Fuels using Waste Bread as a Raw Material. *PhD Thesis* [interaktyvus]. The University of Manchester, United Kingdom, 2008
63. BRANCOLI, P., K. ROUSTA and K. BOLTON. Life Cycle Assessment of Supermarket Food Waste. *Resources, Conservation and Recycling* [interaktyvus]. Elsevier, 2017, vol. 118, 39-46 [žiūrėta 2019-02-19]. doi: 10.1016/j.resconrec.2016.11.024
64. MELIKOGLU, Mehmet and Colin WEBB. *Food Industry Wastes. Chapter 4. Use of Waste Bread to Produce Fermentation Products* [interaktyvus]. Academic Press, 2013. 338 p. ISBN 9780123919281.
65. MANDALA, I. Physical Properties of Fresh and Frozen Stored, Microwave-Reheated Breads, Containing Hydrocolloids. *Journal of Food Engineering* [interaktyvus]. Elsevier, 2005, vol. 66(3), 291-300 [žiūrėta 2019-01-24]. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.03.020
66. RIBOTTA, P. D. and A. LE BAIL. Thermo-Physical Assessment of Bread during Staling. *LWT – Food Science and Technology* [interaktyvus]. Elsevier, 2007, vol. 40(5), 879-884 [žiūrėta 2019-02-26]. doi: 10.1016/j.lwt.2006.03.023
67. HUI, Yiu H., et al. *Food biochemistry and food processing*. 1st. Arnes, AI, United States: Iowa State University Press, 2006. 770 p. ISBN 9780813803784.
68. NEEDHAM, R., et al. Early Detection and Differentiation of Spoilage of Bakery Products. *Sensors and Actuators B: Chemical* [interaktyvus]. Elsevier, 2005, vol. 106(1), 20-23 [žiūrėta 2019-03-05]. doi: 10.1016/j.snb.2004.05.032
69. ESPINOZA-ORIAS, N., H. STICHNOTHE and A. AZAPAGIC. The Carbon Footprint of Bread. *The International Journal of Life Cycle Assessment* [interaktyvus]. Springer, 2011, vol. 16(4), 351-365 [žiūrėta 2019-04-15]. doi: 10.1007/s11367-011-0271-0
70. BENABDA, O., M. KASMI, F. KACHOURI and M. HAMDJ. Valorization of the Powdered Bread Waste Hydrolysate as Growth Medium for Baker Yeast. *Food and Bioprocess Technology* [interaktyvus]. Springer, 2014, vol. 7(12), 1711-1718 [žiūrėta 2019-04-15]. doi: 10.1007/s11464-014-0311-1

- Processing* [interaktyvus]. Elsevier, 2018, vol. 109, 1-8 [žiūrėta 2019-03-07]. doi: 10.1016/j.fbp.2018.02.007
71. DEMIRCI, A. S., I. PALABIYIK, T. GÜMÜS and Ş ÖZALP. Waste Bread as a Biomass Source: Optimization of Enzymatic Hydrolysis and Relation between Rheological Behavior and Glucose Yield. *Waste and Biomass Valorization* [interaktyvus]. Springer, 2017, vol. 8(3), 775-782 [žiūrėta 2018-05-12]. doi: 10.1007/s12649-016-9601-6
  72. LEUNG, C. C. J., et al. Utilisation of Waste Bread for Fermentative Succinic Acid Production. *Biochemical Engineering Journal* [interaktyvus]. Elsevier, 2012, vol. 65, 10-15 [žiūrėta 2019-05-02]. doi: 10.1016/j.bej.2012.03.010
  73. DOI, T., H. MATSUMOTO, J. ABE and S. MORITA. Feasibility Study on the Application of Rhizosphere Microflora of Rice for the Biohydrogen Production from Wasted Bread. *International Journal of Hydrogen Energy* [interaktyvus]. Elsevier, 2009, vol. 34(4), 1735-1743 [žiūrėta 2019-05-03]. doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.12.060
  74. HAN, W., J. HUANG, H. ZHAO and Y. LI. Continuous Biohydrogen Production from Waste Bread by Anaerobic Sludge. *Bioresource Technology* [interaktyvus]. Elsevier, 2016, vol. 212, 1-5 [žiūrėta 2019-05-09]. doi: 10.1016/j.biortech.2016.04.007
  75. ODA, Y., B. PARK, K. MOON and K. TONOMURA. Recycling of Bakery Wastes using an Amylolytic Lactic Acid Bacterium. *Bioresource Technology* [interaktyvus]. Elsevier, 1997, vol. 60(2), 101-106 [žiūrėta 2019-02-24]. doi: 10.1016/S0960-8524(97)00008-4
  76. KUMAR, J. V., R. MATHEW and A. SHAHBAZI. Bioconversion of Solid Food Wastes to Ethanol. *Analyst* [interaktyvus]. Royal Society of Chemistry, 1998, vol. 123(3), 497-502 [žiūrėta 2019-05-07]. doi: 10.1039/a706088b
  77. KAWA-RYGIELSKA, J., W. PIETRZAK and A. CZUBASZEK. Characterization of Fermentation of Waste Wheat-Rye Bread Mashs with the Addition of Complex Enzymatic Preparations. *Biomass and Bioenergy* [interaktyvus]. Elsevier, 2012, vol. 44, 17-22 [žiūrėta 2018-12-07]. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.04.016
  78. DAIGLE, P., P. GÉLINAS, D. LEBLANC and A. MORIN. Production of Aroma Compounds by *Geotrichum Candidum* on Waste Bread Crumb. *Food Microbiology* [interaktyvus]. Elsevier, 1999, vol. 16(5), 517-522 [žiūrėta 2019-05-07]. doi: 10.1006/fmic.1999.0269
  79. ASGHAR, M., et al. Production of  $\alpha$ -Amylase by *Arachniotus* Sp. using Waste Bread Medium. *International.-Int.J.Agri.Biol*, 2002, vol. 4(1), 26-28 [žiūrėta 2019-05-07]. Prieiga per: [http://www.fspublishers.org/published\\_papers/30992..pdf](http://www.fspublishers.org/published_papers/30992..pdf).
  80. LAM, W., D. PLEISSNER and C. LIN. Production of Fungal Glucoamylase for Glucose Production from Food Waste. *Biomolecules* [interaktyvus]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2013, vol. 3(3), 651-661 [žiūrėta 2019-05-08]. doi: 10.3390/biom3030651
  81. GUZMÁN-MALDONADO, H., O. PAREDES-LÓPEZ and C. G. BILIADERIS. Amylolytic Enzymes and Products Derived from Starch: A Review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* [interaktyvus]. Taylor & Francis, 1995, vol. 35(5), 373-403 [žiūrėta 2019-04-16]. doi: 10.1080/10408399509527706
  82. EBRAHIMI, F., M. KHANAHMADI, S. ROODPEYMA and M. J. TAHERZADEH. Ethanol Production from Bread Residues. *Biomass and Bioenergy* [interaktyvus]. Elsevier, 2008, vol. 32(4), 333-337 [žiūrėta 2018-11-30]. doi: 10.1016/j.biombioe.2007.10.007
  83. MOJOVIĆ, L., S. NIKOLIĆ, M. RAKIN and M. VUKASINOVIĆ. Production of Bioethanol from Corn Meal Hydrolyzates. *Fuel* [interaktyvus]. Elsevier, 2006, vol. 85(12-13), 1750-1755 [žiūrėta 2019-04-15]. doi: 10.1016/j.fuel.2006.01.018

84. SCHENCK, F. W. Glucose and Glucose-containing Syrups. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2000, 58-60 [žiūrėta 2019-01-20]. doi: 10.1002/14356007.a12\_457.pub2
85. PARMENTIER, S., F. ARNAUT, W. SOETAERT and E. J. VANDAMME. Enzymatic Production of D-Mannitol with the *Leuconostoc Pseudomesenteroides* M Annitol Dehydrogenase Coupled to a Coenzyme Regeneration System. *Biocatalysis and Biotransformation* [interaktyvus]. Taylor & Francis, 2005, vol. 23(1), 1-7 [žiūrėta 2018-05-02]. doi: 10.1080/10242420500071664
86. RACINE, F. M. and B. C. SAHA. Production of Mannitol by *Lactobacillus Intermedius* NRRL B-3693 in Fed-Batch and Continuous Cell-Recycle Fermentations. *Process Biochemistry* [interaktyvus]. Elsevier, 2007, vol. 42(12), 1609-1613 [žiūrėta 2018-05-14]. doi: 10.1016/j.procbio.2007.09.001
87. GAILY, M. H., B. M. ELHASSAN, A. E. ABASAEED and M. AL-SHRHAN. Isomerization and Kinetics of Glucose into Fructose. *International Journal of Engineering & Technology* [interaktyvus]. IJENS, 2010, vol. 10(3), 1-10 [žiūrėta 2018-10-18]. Prieiga per: <http://ijens.org/102503-4848%20IJET-IJENS.pdf>.
88. MALL, P., et al. Physicochemical Parameters Optimization for Enhanced Nisin Production by *Lactococcus Lactis* (MTCC 440). *Brazilian Archives of Biology and Technology* [interaktyvus]. SciELO Brasil, 2010, vol. 53(1), 203-209 [žiūrėta 2018-06-02]. doi: 10.1590/S1516-89132010000100025
89. GROISILLIER, A. and T. TONON. Determination of Mannitol-2-Dehydrogenase Activity from *Zobellia Galactanivorans*. *Bio-Protocol*, 2015, vol. 5(21), 1-6 [žiūrėta 2019-01-14]. doi: 10.21769/BioProtoc.1634
90. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST 1492:2013]. Duona ir pyrago kepiniai. Drėgmės kiekio nustatymo metodai = Bakery goods. Methods for determination of moisture content. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2013
91. AOAC. Official Method 935.39 Baked Products. In: *Official Method of Analysis*. Volume II. Washington: Association of Official Chemists, 1990
92. PAULAUSKIENĖ, Aurelija. Maisto chemija: Laboratorinių darbų aprašas. In: Aleksandro Stulginskio universitetas: , 2012, pp. 23-27
93. WHITWORTH, M. and F. GATES. Measuring and Addressing Texture Challenges in Healthy Baked Products. *Cereal Foods World* [interaktyvus]. AACC International, Inc., 2013, vol. 58(3), 120-125 [žiūrėta 2019-04-09]. doi: 10.1094/CFW-58-3-0120
94. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST ISO 4121:2004]. Juslinė analizė. Kiekybinių atsakų skalių taikymo nurodymai (ISO 4121:2003) = Sensory analysis. Guidelines for the use of quantitative response scales: tarptautinis standartas ISO 4121:2004 turi Lietuvos standarto statusą. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2004
95. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST ISO 8587:2007/A1:2015]. Juslinė analizė. Metodika. Rikiavimas. 1 keitinys (tapatus ISO 8587:2006/Amd.1:2013). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2015
96. ZHANG, M., et al. High-Yield Production of Mannitol by *Leuconostoc Pseudomesenteroides* CTCC G123 from Chicory-Derived Inulin Hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2017, vol. 44(8), 1237-1244 [žiūrėta 2018-12-06]. doi: 10.1007/s10295-017-1953-9
97. RODRÍGUEZ, C., et al. Mannitol Production by Heterofermentative *Lactobacillus Reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus Fermentum* CRL 573 in Free and Controlled pH Batch Fermentations.

- Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2012, vol. 93(6), 2519-2527 [žiūrėta 2019-04-10]. doi: 10.1007/s00253-011-3617-4
98. FUJII, M., T. HOMMA and M. TANIGUCHI. Synergism of A-amylase and Glucoamylase on Hydrolysis of Native Starch Granules. *Biotechnology and Bioengineering* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 1988, vol. 32(7), 910-915 [žiūrėta 2019-02-23]. doi: 10.1002/bit.260320710
  99. OLSEN, Hans S. Enzymes in starch modification. In: *Enzymes in Food Technology*. Sheffield: Wiley-Blackwell, 2002, pp. 200-222. ISBN 9781444309935.
  100. LAMBEIR, A., et al. *Glucose Isomerases with an Altered pH Optimum* [interaktyvus]. U.S. Patent Nr. 5,384,257, 1995, 1-34 [žiūrėta 2019-04-11]. Prieiga per: <https://patentimages.storage.googleapis.com/9d/d8/ce/b060e9ea85c8e7/US5384257.pdf>.
  101. OTGONBAYAR, G. E., et al. Mannitol Production by *Leuconostoc Citreum* KACC 91348P Isolated from Kimchi. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, vol. 21(9), 968-971 [žiūrėta 2019-03-12]. doi: 10.4014/jmb.1105.05034
  102. HEENAN, S. P., et al. The Influence of Ingredients and Time from Baking on Sensory Quality and Consumer Freshness Perceptions in a Baked Model Cake System. *LWT-Food Science and Technology* [interaktyvus]. Elsevier, 2010, vol. 43(7), 1032-1041 [žiūrėta 2019-05-14]. doi: 10.1016/j.lwt.2009.12.009
  103. ZOULIAS, E. I., S. PIKNIS and V. OREOPOULOU. Effect of Sugar Replacement by Polyols and acesulfame-K on Properties of Low-fat Cookies. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2000, vol. 80(14), 2049-2056 [žiūrėta 2019-04-27]. doi: 10.1002/1097-0010(200011)80:143.0.CO;2-Q
  104. BAEVA, M., I. PANCHEV and V. TERZIEVA. Comparative Study of Texture of Normal and Energy Reduced Sponge Cakes. *Food/Nahrung* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2000, vol. 44(4), 242-246 [žiūrėta 2019-02-25]. doi: 10.1002/1521-3803(20000701)44:43.0.CO;2-1
  105. MARTÍNEZ-CERVERA, S., A. SALVADOR and T. SANZ. Comparison of Different Polyols as Total Sucrose Replacers in Muffins: Thermal, Rheological, Texture and Acceptability Properties. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. Elsevier, 2014, vol. 35, 1-8 [žiūrėta 2019-04-23]. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.07.016
  106. GLIEMMO, M., C. CAMPOS and L. N. GERSCHENSON. Effect of Sweet Humectants on Stability and Antimicrobial Action of Sorbates. *Journal of Food Science* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2004, vol. 69(2), fms39-fms44 [žiūrėta 2019-04-12]. doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb15513.x
  107. KIM, J., S. PARK and W. SHIN. Textural and Sensory Characteristics of Rice Chiffon Cake Formulated with Sugar Alcohols Instead of Sucrose. *Journal of Food Quality* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2014, vol. 37(4), 281-290 [žiūrėta 2019-04-23]. doi: 10.1111/jfq.12083
  108. STRUCK, S., D. JAROS, C. S. BRENNAN and H. ROHM. Sugar Replacement in Sweetened Bakery Goods. *International Journal of Food Science & Technology* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2014, vol. 49(9), 1963-1976 [žiūrėta 2019-04-24]. doi: 10.1111/ijfs.12617
  109. LAKSHMINARAYAN, S. M., V. RATHINAM and L. KRISHNARAU. Effect of Maltodextrin and Emulsifiers on the Viscosity of Cake Batter and on the Quality of Cakes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [interaktyvus]. Wiley Online Library, 2006, vol. 86(5), 706-712 [žiūrėta 2019-05-10]. doi: 10.1002/jsfa.2400
  110. O'DONNELL, Kay and Malcolm W. KEARSLEY. Sorbitol and Mannitol. In: *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. 2nd. Oxford, JK: John Wiley & Sons, 2012, pp. 331-346. ISBN 9781118373972.

## **Padėka**

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei doc. dr. Loretai Bašinskienei už magistro baigiamojo darbo idėją, patarimus, pasiūlymus, skatinimą tobulėti ir pagalbą tobulinant darbą. Taip pat noriu padėkoti doc. A. Šipailienei ir doc. M. Syrpas už patarimus ir konsultacijas tyrimų metu iškilusiais klausimais.

Dėkoju KTU Maisto institutui už tyrimams suteiktas pieno rūgšties bakterijas.

Dėkinga įmonei Novozymes A/S (Danija) už suteiktus moksliniam tyrimui reikalingus fermentinius preparatus.

Dėkoju Lietuvos mokslo tarybai už mokslinio tyrimo finansavimą Europos socialinio fondo lėšomis pagal priemonę Nr. 09.3.3-LMT-K-712 „Mokslininkų, kitų tyrėjų, studentų mokslinės kompetencijos ugdymas per praktinę mokslinę veiklą“, projekto Nr. 09.3.3-LMT-K-712 „Duonos atliekų biokonversija į gliukozės fruktozės sirupą aukštesnės vertės produktams gaminti“.