



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Fermentuotų pieno rūgšties bakterijomis įvairių vertingų
sėklų ir grūdų bioproduktų tyrimai bei panaudojimas kepinių
be glitimo gamybai**

Baigiamasis magistro projektas

Jolita Jagelavičiūtė

Projekto autorė

Doc., dr. Dalia Čižeikienė

Vadovė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Fermentuotų pieno rūgšties bakterijomis įvairių vertingų
sėklų ir grūdų bioproduktų tyrimai bei panaudojimas kepinių
be glitimo gamybai**

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

Jolita Jagelavičiūtė

Projekto autorė

Doc., dr. Dalia Čižeikienė

Vadovė

Doc., dr. Ina Jasutienė

Recenzentė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Jolita Jagelavičiūtė

Fermentuotų pieno rūgšties bakterijomis įvairių vertingų sėklų ir grūdų bioproduktų tyrimai bei panaudojimas kepinių be glitimo gamybai

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Jolitos Jagelavičiūtės, baigiamasis projektas tema „Fermentuotų pieno rūgšties bakterijomis įvairių vertingų sėklų ir grūdų bioproduktų tyrimai bei panaudojimas kepinių be glitimo gamybai“ 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 mokėjusi.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Jolita Jagelavičiūtė. Fermentuotų pieno rūgšties bakterijomis įvairių vertingų sėklų ir grūdų bioproduktų tyrimai bei panaudojimas kepinių be glitimo gamybai. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Dalia Čižeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: duona be glitimo, pieno rūgšties bakterijos, duonos raugai, fermentuoti sėklų produktai.

Kaunas, 2019. 86 p.

Santrauka

Baigiamajame projekte analizuota pieno rūgšties bakterijų (PRB) raugų panaudojimo galimybė kepinių be glitimo gamybai. Raugų panaudojimas kepinių gamyboje turi teigiamą poveikį duonos technologinėms ir funkcinėms savybėms bei maistinei vertei. Tai ypač aktualu kepiniams be glitimo, kurių paklausa pastaruoju metu auga. Atsižvelgiant į tai tyrimo metu buvo ruošiami kepiniai be glitimo, praturtinti kanapių, čija ir bolivinės balandos sėklomis bei su netradiciniais kukurūzų ir ryžių raugais, ruoštais su atrinktomis PRB.

Difuzijos į agarą metodu atrinktos didžiausiu antimikrobiniu poveikiu pasižyminčios PRB grūduose paplitusiems ir kepinių gedimą sukeliantiems mikroorganizmams, tokiems kaip *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* taip pat *Aspergillus niger*, *Fusarium* ir *Penicillium* mikroskopiniams grybams. Nustačius šių PRB antimikrobinį ir fitazinį aktyvumą iš 13 tyrime naudotų PRB padermių, priklausančių *Lactobacillus* ir *Leuconostoc* gentims, buvo atrinktos 3 PRB padermės: *Lactobacillus farraginis* 206, *Lactobacillus sanfranciscensis* W2 ir *Lactobacillus curvatus* 51, kurios buvo pritaikytos duonos raugų be glitimo gamybai. Viso paruošti šeši skirtingi raugai iš kukurūzų ir ryžių miltų su atrinktomis PRB. Nustatyti šių raugų pagrindiniai kokybės rodikliai: pH vertė, bendras titruojamasis rūgštingumas, lakusis rūgštingumas, D- ir L-pieno rūgšties izomerų kiekiai, PRB ir mielių skaičius, jų technologinės ir funkcinės savybės: amilazinis, ksilanazinis, proteazinis ir fitazinis aktyvumai. Raugų kokybės rodikliai priklausė nuo naudotų miltų bei PRB padermės.

Ruošti fermentuoti vertingų sėklų (čija, kanapių ir bolivinių balnadų) produktai. Nustatyti fermentuotų sėklų pH, BTR, fitaziniai aktyvumai. pH ir BTR priklausė ne tik nuo sėklų, bet ir nuo naudojamos PRB bei fermentacijos laiko. Didžiausiu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo sėklų produktai, fermentuoti su *L. sanfranciscensis* W2.

Kepta duona be glitimo su PRB raugais ir vertingomis bolivinės balandos, čija, kanapų sėklomis bei fermentuotas jų produktais. Tirti šių kepinių kokybės rodikliai, juslinės savybės ir priimtumas. Nustatyta, jog kepinių savybėms įtakos turėjo raugo fermentacijai naudojama PRB bei raugo kiekis. Fermentuoti sėklų produktai sumažino kepinių minkštimo pH vertes, savitąjį tūrį, tačiau tokie produktai pasižymėjo geresnėmis juslinėmis savybėmis. Priimtinausi kepiniai be glitimo buvo su čija ir bolivinės balandos fermentuotais produktais.

Jolita Jagelavičiūtė. Investigation And Application of Various Valuable Seeds And Grains Fermented With Lactic Acid Bacteria for the Production of Gluten-free Bakery Products/ supervisor doc. dr. Dalia Čižeikienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: gluten-free bread, lactic acid bacteria, sourdough, fermented seeds products.

Kaunas, 2019. 86.

Summary

The aim of this project was to evaluate the potential use of lactic acid bacteria (LAB) in fermentation of sourdough for gluten-free bread production. The quality of bread, in terms of enhanced texture, prolonged shelf life, improved organoleptic and nutritional profile, can be strongly influenced by the addition of sourdough. This is especially relevant for gluten-free bread, which demand is increasing constantly. The use of sourdough represents an attractive alternative to increase the quality of gluten-free bread. The use of hemp, chia, quinoa seeds as well as maize and rice flours fermented with selected LAB for gluten-free bread production was investigated.

The evaluation of antimicrobial activities of LAB against the most common spoiling fungi isolated from grain products belongs to *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Aspergillus niger*, *Fusarium*, and *Penicillium*, were performed using an agar well diffusion assay method. Based on antimicrobial and phytase activity results from 13 LAB strains belonging to *Leuconostoc* and *Lactobacillus* genus was chosen 3: *Lactobacillus curvatus* 51, *Lactobacillus farraginis* 206 and *Lactobacillus sanfranciscensis* W2. Six sourdoughs from maize and rice flours fermented with LAB were prepared. pH, total titratable acidity, volatile acidity, D-, L-lactic acid, quantity of LAB and yeast, amylase, xylanase, phytase, protease activity of sourdoughs fermented by LAB were investigated. Results showed that flour and bacteria strain had a significant influence on sourdough quality.

Fermented products of various valuable seeds (chia, hemp, quinoa) were produced. pH, total titratable acidity, phytase activity were determined. Fermentation time, seed and bacteria strain have a significant influence on fermented product pH, total titratable acidity values and content of LAB. The highest phytase activity was found of seeds products fermented with *L. sanfranciscensis* W2.

Gluten-free bread with sourdoughs, valuable quinoa, chia, hemp seeds, and their fermented products were produced. Bread quality, organoleptic properties, and acceptability were evaluated. Results showed that LAB strain and the addition of sourdough ratio had a significant influence on gluten-free bread quality and acceptability. Fermented seeds products decreased pH, specific volume of gluten-free bread. The addition of fermented products increased the acceptability of gluten-free bread. The most acceptable bread was produced with fermented chia and quinoa products.

TURINYS

Lentelių sąrašas	7
Paveikslų sąrašas	8
Santrumpų ir mikroorganizmų genčių sąrašas	9
IVADAS	10
1. Literatūros analizė	12
1.1. Glitimo sukelti sutrikimai ir jo įtaka kepinių savybėms	12
1.1.1. Glitimas ir jo įtaka kepiniams.....	12
1.1.2. Glitimo sukelti sutrikimai	12
1.2. Produktų neturinčių glitimo baltymų defektai ir vystymo svarba	13
1.3. Miltų be glitimo įtaka kepinių savybėms	14
1.4. Įvairių žaliavų panaudojimo galimybės kepinių be glitimo kokybei gerinti	15
1.5. Sėklų naudojimas kepinių gamybai	19
1.6. Raugai ir jų svarba kepinių be glitimo baltymų gamyboje.....	20
1.6.1. Tradiciniai duonos raugai	20
1.6.2. PRB raugų poveikis glitimo kiekiui	22
1.6.3. Miltų, neturinčių glitimo baltymų, fermentavimas.....	22
1.6.4. Raugų savybės ir funkcijos kepinuose	24
1.7. Duonos be glitimo gamyba.....	26
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	27
2.1. Pieno rūgšties bakterijų antimikrobinio aktyvumo tyrimas.....	27
2.1.1. Mikroorganizmai ir jų auginimo sąlygos	27
2.1.2. PRB paruošimas antimikrobinio aktyvumo tyrimui.....	27
2.1.3. Indikatorinių mikroorganizmų paruošimas tyrimui ir difuzijos į agarą metodas	28
2.2. Pieno rūgšties bakterijų fitazinio aktyvumo tyrimas	29
2.3. Fermentuotų produktų ruošimas	30
2.3.1. Raugų ruošimas	30
2.3.2. Fermentuotų sėklų produktų ruošimas	30
2.4. Raugų kokybės vertinimas	30
2.4.1. Raugų rūgštingumo vertinimo metodai	30
2.4.2. Raugų fermentinių aktyvumų nustatymo metodai	32
2.4.3. PRB skaičiaus nustatymas.....	35
2.5. PRB antimikrobinio poveikio rauguose fermentacijos metu nustatymas.....	35
2.6. Raugų, fermentuotų su pieno rūgšties bakterijomis, antimikrobinio poveikio tyrimai	36
2.7. Duonos be glitimo gamyba ir tyrimai.....	36
2.7.1. Duonos be glitimo gamyba naudojant raugus	36
2.7.2. Duonos be glitimo gamyba naudojant fermentuotus sėklų produktus	37
2.7.3. Kepinių ir pusgaminių kokybės įvertinimas.....	38
2.8. Matematinė statistinė duomenų analizė.....	39
3. Rezultatai	40
3.1. Pieno rūgšties bakterijų fermentinio ir antimikrobinio aktyvumo savybės.....	40
3.1.1. Pieno rūgšties bakterijų metabolizmo produktų antimikrobinės savybės	40
3.1.2. Pieno rūgšties bakterijų fitazinis aktyvumas	41

3.2. Pieno rūgšties bakterijų įtaka duonos raugų, ruošų iš kukurūzų ir ryžių miltų, kokybės rodikliams	43
3.2.1. Raugų pH ir BTR pokyčiai fermentacijos metu	43
3.2.2. PRB įtaka lakiajam rūgštingumui ir pieno rūgšties susidarymui rauguose	44
3.2.3. PRB įtaka raugų fermentiniams aktyvumams	46
3.2.4. Miltų rūšies įtaka PRB ir mielių skaičiui rauguose, ruoštuose su PRB.....	48
3.3. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuotų sėklų produktų savybės	49
3.3.1. Fermentacijos trukmės įtaka fermentuotų sėklų produktų BTR ir pH vertėms.....	49
3.3.2. Pieno rūgšties bakterijų įtaka fermentuotų sėklų fitaziniam aktyvumui	51
3.3.3. Sėklų įtaka pieno rūgšties bakterijų augimui.....	51
3.4. Pieno rūgšties bakterijų raugų įtaka <i>B. subtilis</i> pokyčiams duonos rauguose	52
3.4.1. PRB įtaka <i>B. subtilis</i> skaičiui raugų fermentacijos metu	52
3.4.2. PRB įtaka raugų antimikrobinėms savybėms.....	54
3.5. Pieno rūgšties bakterijų raugų įtaka tešlos ir kepinių kokybės rodikliams	55
3.5.1. Raugų, ruošų iš ryžių ir kukurūzų miltų, įtaka tešlų BTR ir pH vertėms.....	55
3.5.2. Raugų, ruošų iš ryžių miltų, įtaka kepinių kokybės rodikliams	56
3.5.3. Raugų, ruošų iš kukurūzų miltų, įtaka kepinių kokybės rodikliams	59
3.6. Sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka tešlų ir kepinių be glitimo kokybės rodikliams	61
3.6.1. Sėklų ir jų fermentuotų produktų įtaka tešlos savybėms.....	61
3.6.2. Fermentuotų sėklų produktų įtaka tešlos savybėms	62
3.6.3. Sėklų ir jų fermentuotų produktų įtaka kepinių kokybės rodikliams	63
3.6.4. Fermentuotų sėklų produktų įtaka kepinių kokybės rodikliams.....	66
IŠVADOS	71
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	72
PADĖKA	81
PRIEDAI	82
1 priedas. Hidrokolidai ir jų įtaka kepiniams bei sėklų, naudojamų duonos gamyboje, maistinė vertė	82
2 priedas. Kalibracinės tiesės fermentinių aktyvumų nustatymui	83
3 priedas. Raugo poveikis <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> sporoms, vertinant difuzijos į agarą metodu	84
4 priedas. Kepinių su ryžių ir kukurūzų miltų raugais nuotraukos.....	85
5 priedas. Kepinių su fermentuotų sėklų produktais nuotraukos	86

Lentelių sąrašas

1 lentelė. PRB kultūrų ir indikatorinių mikroorganizmų sąrašas ir kultivavimo sąlygos	27
2 lentelė. Raugų gamybos stadijos	30
3 lentelė. Fermentuotų sėklų gamybos receptūra	30
4 lentelė. Reagentai naudojami pieno rūgšties nustatyme	31
5 lentelė. Tyrimo metu gamintos duonos be glitimo praturtintos kanapėmis, čija sėklomis ir bolivine balanda receptūra (kontrolinis kepinys)	37
6 lentelė. Duonos be glitimo gamybos receptūra su fermentuotų sėklų produktais.....	37
7 lentelė. Duonos be glitimo receptūra su įvairiomis sėklomis ir fermentuotu sėklų produktu.....	38
8 lentelė. PRB metabolitų poveikis indikatoriniams mikroorganizmams.....	40
9 lentelė. Kukurūzų ir ryžių miltų raugų fermentiniai aktyvumai	47
10 lentelė. PRB skaičius fermentuotose sėklose	52
11 lentelė. PRB ir <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> skaičius rauguose po 24 ir 48 val. fermentacijos.....	53
12 lentelė. Raugų pH, BTR ir mikroorganizmų kiekio pokyčiai fermentacijos metu	54
13 lentelė. Ryžių ir kukurūzų miltų raugų, fermentuotų 72 val., poveikis <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> sporoms.....	55

Paveikslų sąrašas

1 pav. PRB fitazinis aktyvumas	42
2 pav. Ryžių (a) ir kukurūzų (b) miltų raugų pH verčių ir BTR, pokyčiai skirtinguose raugų gamybos etapuose	43
3 pav. PRB įtaka lakiajam rūgštingumui rauguose	45
4 pav. PRB įtaka D(-)- ir L(+)-pieno rūgšties izomerų kiekiui rauguose	46
5 pav. Miltų rūšies įtaka PRB ir mielių skaičiui rauguose, ruoštuose su PRB	48
6 pav. Fermentacijos trukmės ir pieno rūgšties bakterijų padermės įtaka fermentuotų sėklų: čija (a), kanapių (b) ir bolivinės balandos (c), pH vertėms.....	49
7 pav. Fermentacijos trukmės ir pieno rūgšties bakterijų padermės įtaka fermentuotų sėklų: čija (a), kanapių (b) ir bolivinės balandos (c), BTR vertėms.....	50
8 pav. Pieno rūgšties bakterijų įtaka fermentuotų sėklų fitaziniam aktyvumui	51
9 pav. Tešlų, ruoštų su ryžių (a) ir kukurūzų (b) miltų raugais, pH priklausomybė nuo raugo kiekio	56
10 pav. Tešlų, ruoštų su ryžių (a) ir kukurūzų (b) miltų raugais, BTR priklausomybė nuo raugo kiekio	56
11 pav. Duonos, kurios gamybai naudoti ryžių miltų raugai, minkštimo pH (a) ir BTR (b) verčių priklausomybė nuo PRB raugo kiekio.....	57
12 pav. Duonos, kurios gamybai naudoti ryžių miltų raugai, savitojo tūrio (a) ir aktyvumo (b) priklausomybė nuo PRB raugo kiekio	58
13 pav. Ryžių miltų raugų, ruoštų su <i>L. curvatus</i> 51 (a), <i>L. farraginis</i> 206 (b) ir <i>L. sanfranciscensis</i> W2 (c), įtaka kepinių be glitimo juslinėms savybėms.....	58
14 pav. PRB raugo kiekio įtaka duonos su kukurūzų miltų raugu minkštimo pH (a) ir BTR (b) vertėms	59
15 pav. PRB raugo kiekio įtaka duonos su kukurūzų miltų raugu savitajam tūriui (a) ir aktyvumui (b)	60
16 pav. Kukurūzų miltų raugų, ruoštų su <i>L. curvatus</i> 51 (a), <i>L. farraginis</i> 206 (b) ir <i>L. sanfranciscensis</i> W2 (c) pieno rūgšties bakterijomis, įtaka duonos be glitimo juslinėms savybėms.....	61
17 pav. Sėklų fermentuotų su <i>L. sanfranciscensis</i> W2 įtaka tešlų pH (a) ir BTR (b) vertėms	62
18 pav. Sėklų ir jų fermentuotų produktų įtaka tešlos be glitimo kietumui.....	62
19 pav. Fermentuotų sėklų produktų įtaka tešlų pH vertėms.....	63
20 pav. Sėklų produktų įtaka tešlos kietumui	63
21 pav. Fermentuotų sėklų įtaka kepinių minkštimo pH (a) ir BTR (b) vertėms.....	64
22 pav. Fermentuotų sėklų įtaka kepinių savitajam tūriui (a) ir aktyvumui (b).....	64
23 pav. Sėklų bei jų fermentuotų produktų įtaka minkštimo kietumui (a) ir žiedėjimo rodikliui (b).....	65
24 pav. Fermentuotų sėklų produktų įtaka kepinių juslinėms savybėms.....	65
25 pav. Sėklų produktų įtaka minkštimo pH (a) ir BTR (b) vertėms.....	66
26 pav. Sėklų produktų įtaka gaminių savitiesiems tūriams (a) ir aktyvumams (b).....	67
27 pav. Sėklų produktų įtaka kepinių drėgnumams	68
28 pav. Sėklų produktų įtaka kepinių minkštimo kietumui (a) ir žiedėjimo rodikliui (b)	68
29 pav. Sėklų produktų įtaka juslinėms savybėms kepinių, ruoštų su: a) čija sėklų priedu; b) kanapių sėklų priedu; c) bolivinių balandų priedu	69

Santrumpų ir mikroorganizmų genčių sąrašas

Santrumpos:

AV – aktyvumo vienetai;

BTR – bendrasis titruojamasis rūgštingumas;

GABA – γ -amino sviesto rūgštimi;

KSV – kolonijas sudarantys vienetai;

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

PRB – pieno rūgšties bakterijos.

Mikroorganizmų gentys:

A. – *Aspergillus*;

B. – *Bacillus*;

F. – *Fusarium*;

L. – *Lactobacillus*;

Leuc. – *Leuconostoc*;

Penic. – *Penicillium*;

S. – *Saccharomyces*.

ĮVADAS

Šiomis dienomis visuomenėje vis dažniau kalbama apie glitimo netoleravimą. Kai kuriems žmonėms glitimas, esantis kviečiuose, sukelia ir rimtesnius negalavimus, šie žmonės serga celiakija. Celiakija tai autoimuninė reakcija į maistą, kurią sukelia glitimo nurijimas ir yra susijusi su kviečiuose, miežiuose ir rugiuose aptinkamais prolaminais. Iš mitybos raciono pašalinus produktus, kuriuose yra glitimo, po kurio laiko ligos sukelti pažeidimai praeina.

Įvairūs grūdų produktai, įskaitant duonos gaminius, yra mitybinės piramidės pagrindas ir pagrindinis skaidulinių ir mineralinių medžiagų taip pat folio rūgšties, jodo, B grupės vitaminų šaltinis. Pastaruoju metu tiek užsienio šalyse, tiek Lietuvoje didėjant glitimo netoleruojančių gyventojų skaičiui didėja ir saugesnių bei aukštos kokybės duonos kepinių be glitimo paklausa. Pagrindinė kepinių be glitimo problema yra jų mažas aktyvumas, neįprastas skonis, greitas mikrobiologinis gedimas, ribotas mineralinių elementų pasisavinamumas iš tokių produktų be to ir asortimento trūkumas. Didėjantis vartotojų poreikis, sveikesniems maisto produktams, skatina ieškoti naujų natūralių ir sveikesnių konservuojančių medžiagų, gaunamų taikant pažangias biotechnologines priemones. Įvertinant šias problemas aktuali naujų biotechnologinių priemonių, leidžiančių padidinti kepinių be glitimo kokybę, saugą, technologines, funkcines ir juslines savybes, paieška.

Pieno rūgšties bakterijų (PRB) raugų panaudojimas kepinių gamyboje turi teigiamą poveikį duonos technologinėms ir funkcinėms savybėms bei maistinei vertei. PRB yra pagrindiniai raugų fermentacijos mikroorganizmai, glaudžiai susiję su sveika mityba. Todėl tai vienas iš pagrindinių šiuolaikinės biotechnologijos tyrimų objektų. PRB duonos kepiniams suteikia charakteringą skonį ir aromatą, pagerina tekstūrą, stabilumą laikymo metu bei sulėtina mikrobiologinį gedimą. Taip pat padidina produktų maistinę vertę ir priimtinumą, kas ir lemia unikalias tokių produktų savybes. Be to, fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB raugų panaudojimas duonos kepinių gamyboje padidina biologinį mineralinių elementų pasisavinamumą iš tokių produktų. Plečiant duonos be glitimo asortimentą svarbu pritaikyti tokių kepinių gamyboje ir antimikrobinio aktyvumu pasižyminčias PRB, kurios kepimas su raugais suteiktų ne tik malonų aromatą ir savitą skonį, bet ir prailgintų vartojimo laikotarpį.

Augant glitimo neturinčių produktų poreikiui svarbu pasiūlyti vartotojams aukštos kokybės gaminius pasižyminčius geromis juslinėmis savybėmis. Tokius gaminius galima pagaminti naudojant įvairius priedus, kurie suteiktų gaminiui geresnį skonį, aromatą bei tekstūros savybes.

Darbo tikslas – ištirti pieno rūgšties bakterijų raugų, ruoštų iš kukurūzų ir ryžių miltų, ir vertingų netradicinių sėklų (balandų, čijos ir kanapių) panaudojimo galimybes duonos be glitimo kokybei, saugai ir juslinėms savybėms pagerinti.

Tikslui pasiekti buvo sprendžiami šie uždaviniai:

1. nustatyti pieno rūgšties bakterijų antimikrobinį poveikį mikroorganizmams sukeliantiems kepinių ligas bei ištirti pienarūgščių bakterijų fitazinį aktyvumą;
2. nustatyti, atrinktų pieno rūgšties bakterijų, įtaką ryžių ir kukurūzų miltų raugų kokybės rodikliams (pH, BTR, pieno rūgšties bakterijų ir mielių skaičiui, acto ir pieno rūgšties kiekiui, fermentiniams aktyvumams: amilaziniam, ksilanaziniam, fitaziniam ir proteaziniam);

3. nustatyti atrinktomis pieno rūgšties bakterijomis fermentuotų čijos, kanapių bei bolivinės balandos sėklų produktų savybes (pH vertes, BTR, fitazinį aktyvumą ir PRB skaičių);
4. nustatyti PRB antimikrobinį poveikį raugų fermentacijos metu;
5. nustatyti kukurūzų ir ryžių raugų, ruoštų su atrinktomis pieno rūgšties bakterijomis, įtaką tešlų ir kepinų kokybės rodikliams, juslinėms savybėms ir priimtinumui;
6. nustatyti atrinktomis pieno rūgšties bakterijomis fermentuotų čijos, kanapių bei bolivinės balandos produktų įtaką kepinų kokybės rodikliams, juslinėms savybėms ir priimtinumui.

1. Literatūros analizė

1.1. Glitimo sukeliama sutrikimai ir jo įtaka kepinų savybėms

1.1.1. Glitimas ir jo įtaka kepinams

Grūdai yra vienas iš pagrindinių komponentų naudojamų kasdienėje mityboje. Tai svarbus energijos, baltymų, mineralinių medžiagų, vitaminų bei skaidulų šaltinis. Dalis grūdų yra ir glitimo šaltinis [1]. Glitimas tai kompleksinis baltymas, sudarytas iš netirpiųjų baltymų prolaminų (tirpių etanolyje) ir gliutelinų (netirpių alkoholyje). Šie baltymai randami grūduose priklausančiuose *Pooideae* pošeimiui iš *Gramineae* šeimos [2]. Kviečiai, rugiai, miežiai, avižos bei jų dariniai yra pagrindiniai šio baltymo šaltiniai [1].

Glitimo baltymai, esantys kviečių sėklų endosperme, sudaro 85 % baltymų, esančių miltuose. Alkoholyje tirpi frakcija kviečiuose vadinama gliadinu, miežiuose – hordeinu, rugiuose – sekaliniu ir avižose – aveninu. [2]. Kviečių glitimą beveik lygiomis dalimis sudaro gliadinų ir gliuteninų baltymai, kuriuose yra didelis kiekis amino rūgšties glutamino. Gliadinai, tai monomeriniai baltymai, susijungę nekovalentinėmis jungtimis [1]. Dauguma gliadinų yra vienodi savo amino rūgščių sudėtimi, jie pasižymi tuo, jog turi didelį kiekį glutamino ir lizino, mažą kiekį prolaminų ir kitų, sieros turinčių amino rūgščių. Gliadinai gali būti suskirstyti į keturias grupes: α -, β -, γ -, ω -gliadinas. γ -gliadinas skiriasi nuo α - ir β -gliadino asparto rūgšties, prolaminų, metionino, tirozino, fenilalanino ir triptofano kiekiu. O ω -gliadinas nuo kitų skiriasi tuo, jog savo sudėtyje neturi cisteino [2].

Gliuteninas turi tokią pačią amino rūgščių kompoziciją kaip ir gliadinas, tačiau labai skiriasi savo molekuline struktūra. Dėl to jis mažiausiai tirpus kviečių baltymas [2]. Gliuteninų polimerai sudaryti iš dviejų subvienetų grupių, kurios sujungtos disulfidinėmis jungtimis [1]. Šie baltymai gali būti išskirstyti pagal molekulinę masę į didelės molekulinės masės ir mažos molekulinės masės grupes. Didelės molekulinės masės grupė yra atsakinga už tešlos išsiplėtimo gebą ir yra stabilizuojama disulfidinėmis jungtimis, kurias lemia cisteinas [2].

Kvietiniai miltai išsiskiria iš kitų miltų dėl galimybės juos naudoti įvairiuose kepinuose. Baltymai (gliadinai ir gliuteninai) suteikia šių miltų gaminiams viskoelastinių savybių. Tačiau rugiuose, miežiuose ir avižose jų kiekis mažesnis. Gliadino ir gliutenino frakcija yra svarbi reologinėms tešlos savybėms. Prolaminai tešlai suteikia klampumo ir tamprumo, o gliutelinai atsakingi už elastingumą ir rišlumą [1]. Vykstant gliadino ir gliutenino baltymų hidratacijai maišant miltus su vandeniu ir homogenizuojant mechaniškai, gaminant kepyklų produktus, susiformuoja baltymų kompleksas, sujungtas vandenilinėmis jungtimis bei disulfidinėmis jungtimis, kurios formuoja glitimą ir suteikia tešlai vientisumą bei viskoelastinių savybių ir gebėjimą sulaikyti dujas [2].

1.1.2. Glitimo sukeliama sutrikimai

Celiakija. Celiakija yra autoimuninis sutrikimas, kurį sukelia glitimas [3]. Tai imuninė reakcija, sukelianti plonojo žarnyno irimą, kuris sutrikdo maistinių medžiagų pasisavinimą [2]. Tradicinis celiakijos simptomų apibūdinimas apima virškinamojo trakto sutrikimus: diarėją, svorio kritimą, vėmimą, pilvo skausmus, pilvo pūtimą, vidurių užkietėjimą ir kt. [4]. Celiakija sergantiems žmonėms pasireiškia glitimo atsparumas virškinamojo trakto proteolitiniams fermentams. Glitimui patekus į žarnyną T-ląstelės aktyvuojasi ir žarnynas pažeidžiamas uždegiminio proceso [1]. Toksinis efektas,

pasireiškiantis plonosiose žarnose, lengvai pranyksta, vos tik glitimas yra pašalinamas iš mitybos. Pagerėja maistinių medžiagų absorbcija ir išvengiama komplikacijų [4].

Celiakija paplitusi visame pasaulyje, jos paplitimas ženkliai padidėjo per pastaruosius dvidešimt metų. Nors patobulėjo šio sutrikimo diagnostika, tačiau daugelis susirgimų vis dar yra nediagnozuoti. Vakarų šalyse ši sutrikimą turi apie 1 % populiacijos, kitose šalyse sergančiųjų kiekis mažesnis, tačiau nuolatos didėja [5].

Kviečių alergija. Tai gliadino sukeliama imunoglobulino E reakcija. Šis baltymo fragmentas yra ir pagrindinis alergenų sukeliantis „Kepėjų astmą“. Kviečių alergija nuo celiakijos skiriasi tuo, jog iš mitybos nebūtina pašalinti kitų grūdinių produktų, turinčių glitimo (rugių, miežių ir avižų). Nors šios alergijos simptomai gali pasireikšti virškinamajame trakte, tačiau dažniausiai paveikiami kvėpavimo takai ir oda. Priešingai nei celiakija kviečių alergija nesukelia virškinamojo trakto ar kitų organų pažeidimo [6, 7].

Glitimo netoleravimas. Šis sutrikimas diagnozuojamas kai juntami negalavimai vartojant glitimo turinčius produktus, kurie neatitinka nei celiakijos, nei alergijos požymių. Šio negalavimo metu nepažeidžiamas virškinamasis traktas, o tyrimai nerodo alerginės reakcijos. Juntami virškinamojo trakto negalavimai (pykinimas, diareja, dirgliosios žarnos sindromas ir kt.) gali būti sunkiai atskiriami nuo kitų glitimo sukiamų negalavimų [6]. Atliktų tyrimų metu nustatyta, jog glitimo netoleravimas gali paveikti neurologinių ligų vystymąsi [7].

1.2. Produktų neturinčių glitimo baltymų defektai ir vystymo svarba

Kol kas vienintelis gydymas nuo celiakijos yra glitimo turinčių produktų pašalinimas iš mitybos raciono. Glitimo nevartojimas leidžia išgyti žarnynui bei išnykti kitiems simptomams, sumažėja rizika vystytis daugumai komplikacijų susijusių su celiakijos liga [8].

Atsižvelgiant į „Codex Alimentarius“ standartą glitimo neturintys maisto produktai susideda ar yra pagaminti iš vieno ar daugiau ingredientų, neturinčių kviečių (t. y. visų *Triticum* rūšių), rugių, miežių, avižų ar jų kryžmintų rūšių. Glitimo kiekis visame produkte negali būti didesnis kaip 20 mg/kg [9]. Vartojant glitimo neturinčius produktus sumažėja su maistu gaunamų skaidulų, mineralinių medžiagų, vitaminų kiekiai. Glitimo neturintuose produktuose B grupės vitaminų, geležies ir folio rūgšties kiekiai yra mažesni lyginant su kvietiniais gaminiais [10]. Tyrimai parodė, jog pacientai laikydami griežtos dietos, kurioje nėra glitimo, dažnai kenčia nuo įvairių mitybinių sutrikimų. C. Hallert'as ir kt. [11] nustatė, jog pacientams, sergantiems celiakija ir nevartojantiems glitimo turinčių produktų, pasireiškia vitaminų trūkumas. C. Ciacci ir kt. [12] nustatė, jog tokie žmonės turi ženkliai mažesnę svorį ir kūno masės indeksą. Pacientų mityba buvo nesubalansuota, jie didesnę kalorijų kiekį gavo iš riebalų ir mažesnę iš angliavandenių. Autoriai priskyrė tokią dietą prie netinkamų mitybos įpročių.

Nenaudojant glitimo susidaro defektai, paveikiantys ne tik maistinę vertę, bet ir gaminių kokybę bei priimtinumą. Produktuose, kuriuose nėra glitimo, pablogėja dujų sulaikymas, sumažėja kepinio tūris. Glitimo neturintys tešlos susidaro skystesnės, dėl to keptos duonos tekstūra būna biri, neryškios spalvos. Komerciniai, glitimo neturintys, produktai pasižymi nedideliu baltymų kiekiu bei lizino trūkumu [10]. Ištyrus kepinų, neturinčių glitimo baltymų, maistinę vertę nustatyta, jog baltymų, riebalų ir mineralinių medžiagų kiekiai, skirtinguose kepinuose, labai skiriasi, tačiau visi jie buvo krakmolingi, mažai baltymingi ir pasižymėjo dideliu riebalų kiekiu bei glikeminiu indeksu [13].

Duona be glitimo pasižymi greitu žiedėjimu bei trumpesniu galiojimo terminu, jų juslinės savybės mažiau priimtinesnės lyginant su duona, kurioje yra glitimo [8, 14]. Gaminiuose, kuriuose nėra glitimo baltymų, sudėtinga atkartoti aromatą, tekstūrą ir tokį patį skonį kaip gaminių, kuriuose yra glitimo [10]. Dauguma duonos, biskvito, makaronų, tortų, sausainių produktų yra gaminama naudojant kviečius. Norint išvengti šių produktų reikia visiškai pakeisti savo mitybą. Dėl visų šių priešasčių produktų be glitimo paklausa šiomis dienomis didėja [8].

1.3. Miltų be glitimo įtaka kepinių savybėms

Kepinių, neturinčių glitimo baltymų, gamybai gali būti naudojami įvairūs miltai be glitimo. Jie visi pasižymi tiek skirtinga maistine verte, tiek fizikinėmis savybėmis. Šių kepinių gamybai dažniausiai naudojami ryžių, kukurūzų ir grikių miltai [15]. Malimo ir sijojimo procesai yra svarbūs cheminei miltų kompozicijai, kadangi krakmolai, kiti angliavandeniai, įskaitant skaidulas, lipidai, baltymai, mineralinės medžiagos ir vitaminai įvairiose augalo dalyse yra pasiskirstę nevienodai. Dėl to juos lengva atskirti fizinės separacijos metu. Paprastų cukrų kiekis svarbus fermentacijos procesui, o polisacharidai geba sujungti vandenį ir prisideda prie tešlos reologinių savybių. Miltuose be glitimo esantys baltymų polimerai taip pat prisideda prie vandens adsorbcijos, tačiau jų suteikiamos savybės ne tokios svarbios lyginant su kvietinių miltų baltymais [16].

Sojų miltai. Šie miltai padidina kepinio tūrį bei pagerina tešlos konsistenciją [15]. Nustatyta, jog didėjant sojų miltų kiekiui lėtėja gaminių žiedėjimas [17]. Manoma, jog sojų baltymai turi didesnę vandens sulaikymo gebą ir prisideda prie krakmolo retrogradacijos lėtinimo [15]. Kepinius papildant su soja galima pagerinti jų maistinę vertę, tačiau didesnis šių miltų kiekis suteikia neigiamą poveikį duonos reologinėms ir juslinėms savybėms [18].

Javams prilyginamos kultūros. Griekiai, bolivinės balandos ar burnočiai dažniausiai naudojami kepinių be glitimo gamybai dėl savo maistinės vertės [19]. Burnočio ir bolivinės balandos miltai praturtina gaminius baltymais, skaidulomis, kalciu, geležimi, vitaminu E ir polifenoliais, juose yra natūralių emulsiklių [20, 21]. Nustatyta, jog grikių ir bolivinės balandos miltais praturtinus kvietinius kepinus mineralinių medžiagų kiekis (Fe, K, Mg, Mn ir Zn) didėja didėjant miltų kiekiui, tačiau tokiuose kepinuose didėja ir fito rūgšties kiekis [22]. Funkcinės šių miltų savybės priklauso nuo malimo, dalelių dydžio, jų pasiskirstymo bei miltų apdorojimo [19]. Atlikti tyrimai parodė, jog 10 % bolivinės balandos sėlenų pagerina kepinų išpurenimą, manoma, jog šios sėlenos yra tinkamas substratas mielėms [15]. Dalį grikių miltų pakeitus bolivinės balandos miltais didėja tešlos klampa didėjant tirpių skaidulų kiekiui, kurių bolivinės balandos miltuose yra daugiau lyginant su grikių miltais [23]. Kepiniai su bolivinėmis balandomis, griekiais pasižymi tankia minkštimo struktūra, mažomis poromis [14]. Raugai, paruošti iš šių miltų, praturtina kepinus γ -amino sviesto rūgštimi (GABA) [18]. Nepaisant visų šių miltų teigiamų savybių nustatyta, jog raugas, ruoštas su grikių miltais, kepiniams gali suteikti kartų skonį, dėl šios priežasties kepiniai tampa nepriimtini daugumai vartotojų [24].

Ryžių miltai. Dėl savo hipoalerginių savybių, blankaus skonio ir lengvo prieinamumo priimtinausi miltai gaminant kepinus, neturinčius glitimo baltymų, yra ryžių ir kukurūzų miltai. Juose esantis mažas baltymų ir natrio bei prolaminų kiekis, lengvai virškinami angliavandeniai leidžia šiuos miltus vartoti vartotojams turintiems įvairių alergijų. Ryžių miltai dėl savo hidrofobinių baltymų, kurie yra netirpūs, nesugeba sudaryti viskoelastinio tinklo. Tešla iš šių miltų nesulaiko anglies dioksido, gaminiai gaunami su mažu savituoju tūriu ir pasižymi blogomis minkštimo tekstūros savybėmis [15,

25]. Ribotos miltų baltymų savybės apriboja jų panaudojimą kepinių gamyboje, todėl reikia papildomai naudoti komponentus, suteikiančius struktūrą formuojančias savybes [16]. Kepinių savybėms įtakos turi ir pažeistas krakmolos esantis miltuose, nustatyta, jog didėjant pažeisto krakmolo kiekiui mažėja kepinų savitasis tūris [26].

Abisininės posmilgės miltai. Šių miltų grūdinė žaliava gali būti keletu skirtingų spalvų, nuo baltos iki raudonos ar rudos, tačiau kepinų gamybai priimtinausia yra balta spalva. Gaminiai su šių miltų priedu bei ryžių ir grikių raugu pasižymi stipriu vaisiniu ir grūdų aromatu. Kepiniai pagaminti iš 100 % visų grūdo dalių miltų taip pat pasižymi geromis juslinėmis savybėmis [20]. Nors kepiniai pagaminti iš 100 % šių miltų pasižymi gera mitybine verte, tačiau gaminiai gaunami mažo savitojo tūrio ir pasižymi blogomis minkštimo struktūros savybėmis [23]. Šių miltų ir raugų kombinacija leidžia sukurti produktus, pasižyminčius specifiniu maloni aromatu [24].

Kukurūzų miltai. Kukurūzų miltai naudojami tortilijų gamybai bei kitiems nekildintiems gaminiams, priklausantiems rytų šalių virtuvei [25, 27]. Kukurūzuose yra virškinimui atsparaus krakmolo, karotinoidų, anticianinų ir kitų bioaktyvių medžiagų, siejamų su nauda sveikatai [27]. Duonos kepiniai, gaminti naudojant kukurūzų miltus, pasižymi stipria geltona spalva taip pat tyrimų metu nustatyta, jog jų savitasis tūris mažesnis, o minkštumas kietesnis lyginant su kvietiniais bei kai kuriais kitais kepiniais, neturinčiais glitimo baltymų [14]. Kukurūzai pasižymi didele energetine verte, tačiau jų baltymų biologinė vertė maža (nedidelis kiekis nepakeičiamų amino rūgščių lizino ir triptofano). Kukurūzuose yra mažai mineralinių medžiagų, vitaminų (ypač B grupės vitaminų) [15]. Kukurūzų miltų dalelių dydis turi reikšmingos įtakos tešlos pokyčiams vykstant fermentacijai ir gaminio tūriui bei tekstūrai. Miltai, pasižymintys didesniu dalelių dydžiu, yra tinkamesni kepinų be glitimo gamybai [28].

Ankštinių daržovių miltai. Kepiniams, neturintiems glitimo baltymų, dažnai naudojami įvairių ankštinių daržovių miltai: avinžirnių, įvairių pupelių, žirnių, lęšių ir kt. [19]. Raugai, ruošti naudojant lęšius ir avinžirnius, praturtina kepinus su GABA [18]. Tyrimų metu nustatyta, jog tešla, ruošta su saldžiosios ceratonijos miltais, pasižymi geromis reologinėmis savybėmis [23].

Sėklų miltai. Miltai gauti iš sėklų, o ne grūdų, yra įdomi alternatyva produktams be glitimo vystyti. Norint gauti švelnios struktūros produktus įdedant šių miltų turėtų padidėti vandens kiekis pradinėje receptūroje, kadangi tokių miltų skaidulose yra daugiau hidroksi grupių. Jos suriša daugiau vandens vandenilinėmis jungtimis sumažinant vandens prieinamumą tešloje ir tai suteikia tešlai plastiškų savybių. Tokie miltai gali iš dalies pakeisti bendrus miltus, naudojamus produktuose be glitimo. Įprastus miltus pakeičiant miltais, gautais iš sėklų, didesniais kiekiais (60 % ar daugiau) apribojama tešlos kilimo geba, dėl to produktų minkštumas tampa kietesnis. Jų geba absorbuoti vandenį gali neigiamai paveikti tolesnį krakmolo kleisterizavimąsi ir tešlos kilimą [29].

Maišant kaštainių miltus su ryžių miltais skirtingomis proporcijomis ir naudojant nedidelį kaštainių miltų kiekį (10–30 % nuo bendros miltų masės) kepinų savybės (kietumas, savitasis tūris) gerėja, o didesnis jų kiekis turi neigiamos įtakos [30]. Spontaniškai fermentuoti kaštainių miltai pasižymi teigiamu poveikiu kepinų savitajam tūriui ir minkštimo kietumui [23].

1.4. Įvairių žaliavų panaudojimo galimybės kepinų be glitimo kokybei gerinti

Glitimo turinčių gaminių technologinės savybės skiriasi nuo produktų be glitimo. Įvairios technologijos yra taikomos norint pagerinti jų priimtinumą vartotojui [10]. Atliekami įvairūs

moksliniai darbai tiriant šių gaminių savybes naudojant alternatyvius komponentus [8]. Sprendžiant technologines problemas naudojami priedai, galintys padėti imituoti glitimą [10]. Todėl tešlos ruošimui naudojami ne tik miltai, bet ir kitos žaliavos: baltymai, krakmolai, hidrokoloidai, skaidulos ir raugai [15]. Priedai, tokie kaip krakmolai, hidrokoloidai, fermentai, baltymai ir kt., dedami į miltus, kuriuose nėra glitimo, suteikia teigiamą poveikį kepinų tekstūrai, priimtinumui ir galiojimo terminui [10].

Krakmolai. Šis priedas, kepinų be glitimo baltymų gamyboje, gali pagerinti tešlos konsistenciją maišant, padidinti minkštumo švelnumą ir padėti kontroliuoti krakmolo kleisterizaciją kepimo metu [15]. Krakmolai kepimo metu sujungia vandens molekules ir sudaro dujoms pralaidžią struktūrą [19]. Terminis krakmolo-vandens sistemos apdorojimas sukelia granulių brinkimą, kurio metu padidėja tūris ir pasikeičia mechaninės savybės [16]. Kepinių, neturinčių glitimo baltymų, gamyboje dažniausiai naudojami kukurūzų, bulvių, ryžių ar tapijoka krakmolai [15]. Tačiau galima naudoti ir kviečių krakmolą, kuriame glitimo kiekis neviršytų leidžiamo kiekio (20 mg/kg) [19]. Kleisterizacijos procesas, gelio formavimo savybės ir galutinis kepinio tūris priklauso nuo krakmolo cheminės struktūros ir sudėties [19]. Krakmolai ir jo dariniai, tokie kaip chemiškai modifikuotas krakmolai, atsparus krakmolai, maltodekstrinai, atlieka svarbų vaidmenį tokio tipo produktuose. Maltodekstrinai reikšmingai paveikia krakmolo kleisterizaciją ir teigiamai paveikia duonos tūrį, sustiprina minkštumą. Virškinimui atsparus krakmolai taip pat gali būti naudojamas duonos gaminiuose, kuriuose nėra glitimo, norint pagerinti jų mitybinę vertę. Jį galima naudoti pakeičiant įprastą krakmolą. Nustatyta, jog virškinimui atsparus krakmolai padidina tešlos elastingumą [10].

Fermentai. Glitimo neturintys miltai pasižymi silpnomis funkcinėmis savybėmis formuojant struktūrą, tačiau jų kepimo savybės gali būti pagerintos naudojant fermentus. Dažnai tokių kepinų gamybai naudojama transgliutaminazė. Ji keičia baltymų funkcijas ir skatina jungčių tarp baltymų susidarymą. Nustatyta, jog transgliutaminazė efektyviai pagerina kepinų be glitimo charakteristiką nenaudojant hidrokoloidų. Naudojant šį fermentą pagerėja duonos tekstūra, vandens sulaikymo geba, tačiau didesnė šio fermento koncentracija padidina minkštumo kietumą [10, 31]. Susidaręs baltymų tinklo dydis priklauso nuo baltymų šaltinio (teigiamos įtakos turi pieno ir kiaušinio milteliai) ir fermento kiekio. Kepiniuose su transgliutaminaze nustatytas sumažėjęs amino rūgščių kiekis, manoma, kad jos prisijungė prie miltuose esančių baltymų. Toks susijungimas padidina tešlos elastingumą ir klampumą, o kepiniai pasižymi didesniu savituoju tūriu ir minkštumo stiprumu [25].

Proteazės padeda pagerinti duonos, pagamintos naudojant ryžių miltus, kokybę. Pridedant proteazių, tokių kaip bacilomicinas, papainas, subtilisinas, padidėja glitimo baltymų neturinčios duonos savitasis tūris 30–60 % lyginant su gaminiiais, į kuriuos nebuvo papildomai įdėta šių fermentų. Žiedėjimas kepinuose su proteazėmis taip pat mažėja [10]. Proteazių panaudojimas kepinų su bolivinės balandos miltais gamybai padeda pagerinti tešlos savybes bei gaminiams suteikia tamsesnę spalvą [32]. Fermentinis apdorojimas yra perspektyvi priemonė, leidžianti pagerinti produktų be glitimo kokybę [10].

Hidrokoloidai. Hidrokoloidai yra hidrofiliniai polimerai, gaunami iš daržovių, gyvūnų, mikroorganizmų ar sintetinių medžiagų, kuriuos daugiausiai sudaro hidroksi grupės. Hidrokoloidai plačiai naudojami kaip maisto priedai norint pagerinti maisto tekstūros ir klampumo charakteristikas, produktų kokybę laikymo metu, sulėtinti krakmolo retrogradaciją, padidinti vandens absorbciją, kaip riebalų pakaitalai taip pat gaminių, kuriuose nėra glitimo, savybėms pagerinti [25]. Duonos kokybei įtakos turi naudojamų hidrokoloidų tipas ir kiekis. Ksantano, guaro dervos, karboksimetilceliuliozė

yra tirpios šaltame vandenyje, tuo tarpu karageninas, dauguma alginatų tirpsta karštame vandenyje [19]. Didinat vandens kiekį tešloje hidrokoloidų įtaka kepinių savitajam tūriui ir kietumui mažėja [33]. Kepiniuose, neturinčiuose glitimo baltymų, naudojami hidrokoloidai, jų kiekiai ir įtaka gaminių savybėms pateikti 1 priede (žr. 1 priedas 1 lent.).

Baltymai bei baltymingos žaliavos. Duonos gaminiai be glitimo baltymų daugiausia sudaryti iš krakmolo ir yra apibūdinami kaip mažos mitybinės vertės produktai. Norint padidinti jų maistinę vertę miltai gali būti praturtinami baltymais ir mineralinėmis medžiagomis [10]. Baltymai naudojami kepiniams be glitimo gaminti padeda pagerinti gaminių kokybę. Pagerėja jų tekstūra, sumažėja žiedėjimas, padidėja vandens absorbcija bei sustiprėja Majaro reakcijos vyksmas [15].

Pieno produktai gali būti naudojami kepiniuose norint padidinti jų maistinę vertę ir pagerinti tekstūros savybes. Pieno baltymai pasižymi geromis mitybinėmis savybėmis ir yra dažnai naudojami dėl panašios į glitimą cheminės struktūros [19]. Gaminiuose, kuriuose nėra glitimo, pieno produktai padidina vandens absorbciją ir suteikia tešlai tvirtumo [10]. Išrūgų baltymai geba sudaryti struktūrą, padedančią gauti tvirtesnę tešlą. Nustatyta, jog gaminius papildžius išrūgų baltymų milteliais (6 % nuo miltų masės), baltymų kiekis produkte padidėja du kartus. Jie taip pat padidina vandens absorbciją tešloje [34].

Glitimui pakeisti taip pat gali būti naudojami kiaušinio baltymai. Jie padeda stabilizuoti minkštimą ir sudaryti gerą formą [19]. Atlikti tyrimai nustatant albuminų, kolageno, žirnių, lubinų ir sojos baltymų įtaką tešlai. Kepinių kietumas sumažėjo lyginant su kontroliniu kepiniumi. Taip pat nustatyta sumažėjusi amilopektino retrogradacija, dėl to sulėtėjo duonos žiedėjimas [10].

Vietoj baltymų izoliatų, glitimo neturinčius produktus galima papildyti miltais, turinčiais daug baltymų [10]. Ankštinių daržovių baltymai pasižymi geromis gelio formavimo savybėmis ir gali būti naudojami emulsijoms ir putoms formuoti. Tačiau jų funkcinės savybės priklauso nuo aplinkos parametrų (pH, temperatūros, joninių jėgų) [19]. Tešla su ankštinių augalų miltais suteikia gerų fizikocheminių ir juslinių savybių [10].

Skaidulinės medžiagos. Atsižvelgiant į duonos be glitimo menką maistinę vertę siūloma patobulinti jų gamybą įtraukiant skaidulines medžiagas [10]. Skaidulinės medžiagos pasižymi ne tik nauda sveikatai (cholesterolio ir riebalų surišimas, sumažėjęs gliukozės kiekis kraujyje, teikiama nauda virškinamajam traktui), bet ir produktams, neturintiems glitimo baltymų, teikia fizikocheminių ir funkcinių savybių [15]. Skirtingi skaidulų šaltiniai gali būti naudojami siekiant pagerinti produktų struktūrą ir minkštimo charakteristiką [29].

Manoma, jog skaidulos sąveikauja sinergetiškai su krakmolu susidarant stabilesnei jo struktūrai [15]. Tirpios skaidulos padidina tešlos tūrį fermentacijos metu ir suteikia duonai didesnę savitąjį tūrį, mažesnę kietumą bei šviesumą [10]. Jos geba suformuoti struktūrą, pagerinančią tešlos stabilumą ir prisidedančią prie kepinių žiedėjimo lėtinimo [29]. Netirpios skaidulos taip pat suteikia kepiniams didesnę savitąjį tūrį ir sumažina jų kietumą [10]. Šios skaidulos tešloje išlieka beveik nepakitusios. Jas apsupa krakmolo granulės, taip susidarant jų netaisyklingoms struktūroms tešloje. Dujų sulaikymas kildinimo ir kepimo metu gali sumažėti dėl atsirandančių plyšimo taškų tešlos struktūroje. Sumažinus netaisyklingos krakmolo-skaiduklų struktūros dydį, ši problema išsprendžiama ir leidžia pagerinti gaminių kokybę [29].

Kepinių gamybai galima naudoti gysločio luobeles (0–4 g/100 g nuo miltų masės), jos sumažina gaminių savitąjį tūrį bei padidina duonos kietumą [33]. Tačiau šios skaidulos pagerina tešlos fizikines savybes. Šis priedas taip pat pasižymi teigiamu poveikiu maistinei gaminio vertei [35]. Vaisių ir daržovių skaidulos sumažina duonos tūrį, įdėjus didelį jų kiekį. Tačiau nedidelis kiekis, toks kaip 5–6 %, pagerina gaminio juslines savybes nesutrikdant tešlos kilimo taip pat suteikia jai tvirtesnę tekstūrą [29].

Prebiotikai tai medžiagos, kurios selektyviai fermentuojamos žmogaus virškinamajame trakte ir sukelia specifinius virškinamojo trakto mikrobiotos kompozicijos ir (arba) jų aktyvumo pokyčius, kurie daro įtaką sveikatai. Prebiotikais laikomos tirpios maistinės skaidulos, tokios kaip fruktooligosacharidai, inulinas, virškinimui atsparus krakmolai, polioliai (laktitolis, manitolis, sorbitolis, ksilitolis), modifikuoti dekstrinai ir daugelis kitų. Tačiau labiausiai paplitę prebiotikai duonos be glitimo gamyboje yra inulinas, fruktooligosacharidai ir virškinimui atsparus krakmolai. Prebiotikai veikia panašiai kaip hidrokolidai. Vykstant sąveikai su vandeniu susidaro gelio struktūra, padidėja tešlos klampa ir geba sulaikyti dujas. Prebiotikai, tokie kaip inulinas, mažos molekulinės masės cukrūs (gliukozė, fruktozė, sacharozė), yra mielių substratai ir prisideda prie dujų susidarymo [29]. Inulino panaudojimas kepinių gamyboje padidina jų tūrį bei sumažina minkštimo kietumą, tačiau teigiamas įtakos minkštimo struktūrai tyrėjai nenustatė [36].

Technologiškai apdorotos žaliavos. Hidroterminiai apdoravimo būdai vis dažniau naudojami siekiant pagerinti krakmolo, kaip žaliavos, savybes [10]. Priklausomai nuo naudojamo terminio apdoravimo būdo gali būti ne tik modifikuojamas krakmolai, bet ir denatūruojami baltymai, inaktyvuojami fermentai, sumažinamas mikrobiotos kiekis, pakeičiamas skonis bei aromatas. Didėja susidomėjimas krakmolingų žaliavų hidroterminiu apdoravimo būdu, kuriuo galima pasiekti tokias pačias savybes kaip ir cheminio modifikavimo būdu nenaudojant jokių pagalbinių medžiagų [26]. Hidroterminio apdoravimo metu iš dalies kleisterizuojamas miltų krakmolai. Naudojant tokius miltus pagerėja gaminių savitasis tūris [10]. Hidroterminiu būdu apdoroti miltai ir krakmolai pasižymi geromis emulsinėmis savybėmis, dėl to pagerėja oro įterpimas į tešlą ir padidėja kepinio tūris [26].

Ekstruzijos metu gaunami miltai su kleisterizuotu krakmolu, denatūruotais baltymais ir Majaro reakcijos produktais. Ekstruduoti miltai pasižymi geresnėmis emulsinėmis ir putojimo savybėmis, jie tampa tinkamesni glitimo neturinčių produktų gamybai. Tokie miltai pasižymi teigiamu poveikiu duonos tūriui ir minkštimo struktūrai, padeda sumažinti kepinių kietumą, žiedėjimą [10].

Aromatinių junginių susidarymas. Aromatiniai junginiai glitimo neturinčiuose produktuose yra silpniau išreikšti lyginant su kepiniais, kuriuose yra glitimo [10]. Atlikus aromatinių junginių tyrimą nustatyta, jog kepinuose be glitimo baltymų aptinkamas nedidelis kiekis pagrindinių duonos aromato junginių, ypač pirazino ir 2-acetil-1-pirolino [37]. Norint patobulinti aromato profilį, tokiose duonos gaminiuose, gali būti naudojami skirtingi aromatiniai junginiai. Tačiau priimtinesnis būdas yra sudaryti sąlygas formuoti šioms junginiams kepimo metu. Majaro reakcijos junginiai, formuojantys skonį ir aromatą, glitimo turinčioje duonoje, prolinas ir gliukozė, buvo įdėti į glitimo neturinčią tešlą, tai paskatino Majaro reakciją kepimo metu. Gaminiai pasižymėjo priimtinesniu aromatu. Lakiųjų junginių chromatografinis įvertinimas parodė, jog kepiniai tapo panašesni į kvietinę duoną [10, 37].

Glitimo neturinčių miltų fermentacija panaudojant pieno rūgšties bakterijas (PRB) taip pat padidina aromatinių junginių formavimąsi [10]. Produktų, kurių gamybai naudoti raugai, skoniui įtakos turi naudojamos žaliavos, raugo fermentacija, starterinės kultūros, ruošinių kildinimo ir kepimo sąlygos.

Duonos gamybos metu aromatiniai junginiai gali pasišalinti iš tešlos ir (ar) kepinio arba susidaryti. Mikrobiologiniai ir fermentiniai angliavandenių, amino rūgščių ir lipidų pokyčiai tešloje suformuoja aromatinis junginius, susijusius su minkštimo kvapu, t. y. alkoholius, esterius ir kt., o plutos kvapui įtakos turi terminės reakcijos, vykstančios kepanant [38].

Vertinant kepinų be glitimo, gamintų naudojant skirtingus miltus (ryžių, abisininių posmilgių, grikių, burnočių ir bolivinės balandos), aromato savybes plutelėje ir minkštume nustatyta, jog visų grūdo dalių miltų kepiniai pasižymi stipresniu aromatu ir juose yra didesnis aromatinų junginių kiekis [39].

Emulsikliai. Jie kepinuose pagerina tešlos savybes ir kepinų struktūrą, tūrį, sumažina minkštimo kietumą ir žiedėjimą. Šie priedai sumažina paviršiaus įtempį dujų burbuliukams, todėl padidina tešloje dujų absorbciją. Susijungdami su krakmolo molekulėmis sulėtina retrogradaciją ir pagerina vandens sulaikymą. Įtaka kepinų kokybei priklauso nuo naudojamo emulsiklio bei jo kiekio. Atlikti tyrimai rodo, jog kepinų, neturinčių glitimo baltymų, kokybę galima pagerinti naudojant teisingai parinktą emulsiklį bei tinkamą jo kiekį [20].

1.5. Sėklų naudojimas kepinų gamybai

Duonos kepinų gamybai gali būti naudojamos įvairios sėklos. Keletas jų aprašytos šiame skyrelyje. Linų sėmenys kepinų gamyboje naudojamas kaip sėklos, tačiau gali būti naudojami ir jų miltai. Šiose sėklose yra didelis kiekis polinesočiųjų riebalų rūgščių, baltymų, skaidulų ir fitochemikalų [40]. Linų sėmenys padidina vandens absorbciją tešloje bei tešlos lipnumą. Linų sėmenų miltai padidina kvietinių kepinų tūrį, tokoferolių kiekį, lėtina kepinio žiedėjimą. Linų sėmenų gleivės, naudojamos kepinams gaminti, turi įtakos reologinėms tešlos savybėms. Pakeičiant guaro dervą ir pektiną šiuo priedu pagerėja kepinų juslinės savybės, priimtumas. Tyrimų rezultatai rodo, jog šių sėklų ekstraktą galima naudoti, kaip struktūrą formuojantį agentą, kepinų gamyboje. Priimtinausias linų sėmenų sėklų kiekis kepinuose yra 10 g, o sėklų miltų – 15 g [41, 42, 43].

Čija sėklos gali būti naudojamos kepinams be glitimo gaminti. Jos yra geras nesočiųjų riebalų rūgščių, omega-3 riebalų rūgščių, baltymų, antioksidantų, maistinių skaidulų šaltinis. Jų kiekis šiose sėklose didesnis nei tokiose žaliavose kaip soja, kukurūzai, kviečiai. Nustatyta, jog vartojant 37 g/per dieną šių sėklų pasireiškia teigiamas poveikis širdies ir kraujagyslių ligų prevencijai [44, 45]. Duonos kepiniai su 15 % čija sėklų miltų pasižymi mažesniu savituoju tūriu ir padidėjusiu kietumu. Šių miltų priedas taip pat suteikia kepinams tamsesnę spalvą. Tačiau naudojant ne miltus, o sėklas, šio neigiamo efekto nenustatoma [23]. Čija sėklos taip pat pasižymi gebėjimu sudaryti gelius. Čija gelis tai polisacharido pagrindo gelis daugiausia susidedantis iš skaidulų (58 %) ir angliavandenių (34 %). Jis gali būti naudojamas kaip tirštinimo agentas ar emulsiklis [46]. Pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 258/97 čija sėklų duonos kepinuose galima naudoti ne daugiau kaip 10 % [47].

Kanapių sėklos yra geras energijos, baltymų, mineralinių medžiagų ir vitaminų šaltinis. Jose yra polifenolių ir bioaktyvių peptidų, padidinančių jų maistinę vertę. Šių sėklų baltymuose yra visos nepakeičiamos amino rūgštys [48]. L. Nionelli ir bendraautorių [49] atliktas tyrimas parodė, jog fermentuotų kanapių miltų baltymų virškinamumas *in vitro* padidėja iki 90 %. Kanapių miltų raugai gali pagerinti kepinų mitybinę vertę, jų savitąjį tūrį bei padeda sumažinti glikeminį indeksą. Nors tyrėjai šį raugą naudojo kvietinių kepinų gamybai, bet gauti rezultatai parodė, jog fermentuotą kanapių produktą galima naudoti įvairiuose gaminiuose norint padidinti jų maistinę vertę.

Saulėgražų sėklos duonos gaminiuose gali būti naudojamos iki 16 % nuo miltų masės be reikšmingo efekto minkštimo spalvai bei tekstūros savybėms. Nors jos sumažina kepinų savitąjį tūrį bei elastingumą, tačiau suteikia kepinams priimtinesnį skonį bei pagerina maistinę vertę. Tokiuose kepinuose yra daugiau tokoferolių, nepakeičiamų riebalų rūgščių, vario, cinko, riebalų, skaidulų [50]. Saulėgražų sėklose esantys polifenoliai pasižymi geromis antioksidacinėmis savybėmis [51]. M. Nadeem ir kt. [52] atlikto tyrimo metu nustatė, jog saulėgražų sėklų miltai papildžius kvietinius kepinus pagerėja jų maistinė vertė, padidėja skaidulų, baltymų, riebalų bei pelenų kiekiai. Autoriai siūlo šiomis sėklomis papildyti ne tik kasdienį mitybos racioną, bet ir duonos kepinus.

Kepinių gamybai taip pat dažnai naudojamos ir moliūgų sėklos. Jos padidina vandens absorbciją, sumažina kepinio tūrį. Kepinių gamybai taip pat galima naudoti ir moliūgų sėklų baltymų izoliatą, fermentuotą sėklų produktą, kurie suteikia kepinams priimtinas juslines savybes. Moliūgo sėklos padeda praturtinti kepinus mikro- ir makroelementais, ypač kalciu, kaliumu, fosforu, variu, geležimi bei magniu. Kepiniuose su šiomis sėklomis padidėja baltymų kiekis, nepakeičiamų amino rūgščių kiekiai [53]. Moliūgo sėklos yra geras karoteno, vitaminų, pektino ir skaidulų šaltinis. Moliūgo baltymai pasižymi geromis funkcinėmis savybėmis [51].

Kepinių gamyboje galima naudoti ne tik bolivinių balandų miltus bet ir sėklas. Bolivinės balandos pasižymi dideliu lizino ir sieros turinčių amino rūgščių, cisteino ir metionino, kiekiu. Bolivinės balandos pasižymi ir dideliu riebalų kiekiu lyginant su kviečiais ar miežiais [54]. Tyrimų metu nustatyta, jog šių sėklų priedas turi įtakos tešlos reologinėms savybėms, tačiau kepinų juslinėms savybėms neigiamo poveikio neturi net 20 % šio priedo. Sėklų priedas padidina vandens absorbciją, tešlai suteikia kietumo [55]. Duonos kepinuose naudojamų sėklų maistinė vertė pateikta 1 priede (žr. 1 priedas 2 lent.).

1.6. Raugai ir jų svarba kepinų be gliūto baltymų gamyboje

1.6.1. Tradiciniai duonos raugai

Raugas tai miltų ir vandens mišinys, kuriame veikia metaboliškai aktyvios PRB ir mielės [56]. pH vertės išrūgusiuose rauguose yra 3,8–4,5, priklausomai nuo endogeninių faktorių (mikrobinės sudėties, naudojamų miltų) ir egzogeninių faktorių (temperatūros, fermentavimo laiko, tešlos kietumo) [27]. Grūdinėje žaliavoje gali vykti alkoholinė ir pieno rūgšties fermentacija. Alkoholinės fermentacijos metu pagrindinis susidarantis junginys yra etanolis, o fermentacijoje dominuojanti mikroflora – mielės. Susidarant pieno rūgščiai pagrindinė mikroflora yra PRB [56]. PRB daugiausia išskiria pieno rūgštį iš gliukozės gliukolizės būdu. Heterofermentinės PRB be pieno rūgšties taip pat išskiria anglies dioksidą, acto rūgštį ir (ar) etanolį (priklausomai nuo substrato) [57].

Raugo fermentacija kontroliuoja endogeninę mikrobiotą, endogeninės ksilanazės aktyvumą ir arabinoksilanų tirpumą. Fermentacija padidina fenolinių junginių kiekį [58]. Grūdų gemale yra trigliceridų ir lipazių bei lipoksigenazių. Dėl šių komponentų vyksta miltų oksidacija laikymo bei duonos gamybos metu. Raugų fermentacijos metu šių fermentų aktyvumas mažėja [18]. Ksilanazės, β-gliukanazės, α-amilazės, celiulazės ir ferulinės rūgšties esterazės veikiant kartu su *Saccharomyces cerevisiae* padidina *in vitro* ir *in vivo* fenolinės rūgšties ir jų metabolitų pasiekiamumą [18]. Fermentacijos metu grūdinėje žaliavoje mažėja angliavandenių kiekis. Taip pat gali susidaryti amino rūgštys ir pagerėti B grupės vitaminų pasisavinimas. Susidaro tinkama pH vertė fermentiniam fitatų skilimui. Vykstant grūdinės žaliavos fermentacijai susiformuoja lakieji junginiai, kurie sudaro

gaminio kompleksinį skonį ir aromatą. Mikroorganizmai, atsakingi už fermentaciją, gali būti natūraliai randami žaliavoje arba įdedami kaip starterinė kultūra [56].

Rauguose randamos PRB dažniausiai priklauso *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* ir *Streptococcus* gentims. PRB atsakingos už tešlos rūgštinimą, tačiau heterofermentinės bakterijos taip pat prisideda ir prie kildinimo proceso [56]. Duonos ruošimo metu iš aplinkos gali patekti pašalinių bakterijų (bacilų ar klostridijų), kurių augimą galima sustabdyti esant rūgštinei terpei. Acto rūgštis labiau pasižymi fungistatiniu poveikiu nei pieno rūgštis, todėl heterofermentinės PRB pasižymi didesniu antigrybiniu poveikiu. Antigrybiniai junginiai, išskiriami skirtingų PRB, yra pieno, acto rūgštis, anglies dioksidas, diacetilas, vandenilio peroksidas, heksano rūgštis, 3-hidroksi riebalų rūgštys, cikliniai dipeptidai, reuterinas bei bakteriocinai [57].

PRB ir mielių kiekis esantis rauguose nėra atsitiktinis, dažniausiai jų santykis 100:1, manoma, jog tai yra dėl šių mikroorganizmų sąveikos. Rauguose aptinkamos mielės yra skirtingų genčių. Dažniausiai aptinkamos mielės yra *Saccharomyces exiguus*, *Candida humilis*, *S. cerevisiae*. Mielių kiekis ir rūšis priklauso nuo keleto faktorių: tešlos tirštumo, naudojamų miltų, fermentavimo ir laikymo temperatūros. Mielės yra atsakingos už tešlos kildinimą [56].

Technologiškai raugai skirstomi į tris tipus. Pirmojo tipo (I) raugas tradiciškai apibūdinamas kaip produktas ilgalaikės, nuolat atšviežinamos fermentacijos, norint palaikyti aktyvius mikroorganizmus. Tokia fermentacija vykdoma kambario temperatūroje, kol pH vertė pasiekia galutinę vertę (apie 4). Antrojo tipo raugai (II) yra pusiau skysti, fermentuoti aukštesnėje nei 30 °C temperatūroje ilgą laikotarpį (bent dvi dienas). Trečiojo tipo raugai (III) yra sausi, jų gamybai naudojamos džiovavimo procesui atsparios PRB [56].

Tradiciškai I tipo raugų gamybai naudojamos grynios kultūros. Raugų starterinės kultūros gali būti išskiriamos iš: (i) skirtingų šaltinių (Ia tipas); (ii) spontaniškai sudaryto mišrių kultūrų raugo, pagaminto iš kviečių, rugių ar jų mišinio ruošiant keliomis fermentavimo stadijomis (Ib tipas); (iii) raugų, pagamintų tropiniuose regionuose, kurių fermentacijai naudota aukštesnė temperatūra (Ic tipas) [59].

Norint raugus paruošti greičiau buvo išvesti II tipo raugai. Tai pusiau skysti raugai, ruošiami silosuose. Jie daugiausia naudojami kaip tešlos rūgštintojai. Šie raugai ruošiami esant aukštesnei nei 30 °C temperatūrai, taip pagreitinant fermentacijos procesą. Raugai pasižymi žema pH verte (<3,5) jau po 24 val. fermentacijos. Mikroorganizmai tokiuose rauguose pasižymi tik metabolitiniu aktyvumu. Kadangi šie raugai yra laikomi švieži iki naudojimo (iki 1 savaitės), jie gali būti ruošiami dideliais kiekiais. III tipo raugai naudojami kaip rūgštintojai ir aromatizatoriai. Džiovavimo procesas taip pat padeda prailginti šių raugų galiojimo terminą [59]. Tešlų, ruošiamų su II ir III trečio tipo raugais, gamybai reikia kepimo mielių priedo, kaip kildinimo agento, tuo tarpu gaminiams su I tipo raugu šis priedas nėra būtinas [60].

Išskiriami ir 0 tipo raugai. Jiems ruošti naudojamos kepimo mielės (*S. cerevisiae*) [59]. Šio tipo raugai nėra ruošiami pagal raugų technologiją, tačiau dažnai mielių preparatuose yra ir PRB (ypač *Pediococcus*, *Lactococcus* ir *Leuconostoc* spp.), kurios labai nedaug prisideda prie tešlos rūgštinimo bei aromato formavimo tešloje per trumpą rauginimo laiką [57].

Mikroorganizmų pokyčiai, vykstantys fermentacijos metu, ir dominuojančių mikroorganizmų identifikavimas yra svarbus aspektas norint atrinkti padermes, galinčias dalyvauti transformacijos

procesuose. Starterinės kultūros fermentacijai atrenkamos atsižvelgiant į jų technologinius bruožus norint gauti gaminį, pasižymintį norimomis savybėmis. Priklausomai nuo duonos tipo PRB dažniausiai parenkamos pagal jų gebą išvystyti skonio ir aromato savybes, tešlos struktūrą, antimonybinių junginių mažinimą, gebėjimą konkuruoti su nepageidaujamais mikroorganizmais [56].

1.6.2. PRB raugų poveikis glitimo kiekiui

Proteolitiniu aktyvumu pasižyminčios PRB gali padėti sumažinti glitimo baltymų kiekį kvietiniuose kepinuose, taip sumažinant jų poveikį kviečių alergiją turintiems vartotojams [61]. α 2-gliadino peptidas, sudarytas iš trisdešimt trijų amino rūgščių, labiausiai domina tyrėjus, dirbančius su celiakija. Šis peptidas apibūdinamas kaip peptidazei atsparus ir yra plačiai naudojamas, kaip pavyzdinis peptidas, įvairiuose su glitimu susijusiuose tyrimuose vertinant jo suskaidymo galimybes [62]. Atlikti tyrimai rodo, jog glitimo kiekio sumažinimas vykdant raugo fermentaciją yra įmanomas, tačiau visiškai glitimo hidrolizė negali būti pasiekta dėl sumažėjusio peptidolitinio aktyvumo. Net didelis glitimo kiekis gali būti sumažinamas esant pH vertėms 4–5, o temperatūrai 40 ir 50 °C [63]. Tačiau nei viena padermė negali išskirti visų reikiamų peptidazių, reikalingų visiškam glitimo suskaidymui. Tačiau gali būti išskirtos dideliu aktyvumu pasižyminčios padermės. Tokių padermių kombinacija turi būti sudaryta iš bakterijų, gebančių kartu išskirti mažiausiai tris peptidazes, galinčias 33 amino rūgščių peptidą išskaidyti iki dipeptidų ir tripeptidų [62].

Kai kurie autoriai nustatė, jog skirtingos PRB gali sumažinti toksišką glitimo poveikį. Vykdant fermentaciją su pasirinktomis PRB ir grybinėmis proteazėmis sumažinamas glitimo kiekis kvietiniuose miltuose iki kiekio, nustatyto „Codex Alimentarius“ komisijos [56]. Gaminiai, pagaminti su raugu ir fermentais, padedančiais sumažinti glitimo kiekį, savo juslinėmis savybėmis primena įprastus kvietinius gaminius bei yra lengviau virškinami, o jų maistinė vertė didesnė [64].

1.6.3. Miltų, neturinčių glitimo baltymų, fermentavimas

Pagrindinės žaliavos, naudojamos duonos be glitimo gamybai, yra ryžiai, kukurūzai, sorai, bolivinės balandos, griekiai, burnočiai. Ryžiai yra vienas iš svarbiausių grūdų, naudojamų gamyboje, dėl jų angliavandenių frakcijos. Šiuose miltuose dominuojantis krakmolos yra sudarytas iš mažų granuliu. Amilopektinas, kuris lengvai virškinamas, sudaro didesnę kiekį lyginant su amiloze. Sorų miltai nerodo gerų rezultatų kepant gaminius, neturinčius glitimo baltymų, ir yra dažnai naudojami kartu su kitais miltais [56]. Raugai turi didelę įtaką duonos kepinių aromato formavimuisi. Miltų be glitimo fermentavimas su PRB suformuoja aromatinius junginius [65]. Nors PRB prisideda prie kepinių aromatinių junginių formavimosi, tačiau naudojamų miltų tipas turi didelę įtaką galutiniam rezultatui. Nuo jų tipo priklauso angliavandenių, kaip pirminių fermentacijos substratų, prieinamumas, azoto šaltinis, vitaminai, kaip augimo faktorius, mineralai ir buferinė talpa [56]. Pelenų kiekis, esantis miltuose, svarbus vertinant jų fermentavimo gebą. Pelenų kiekis, kuris svarbus PRB augimui, yra didesnis sėlenose nei endosperme. Jis taip pat turi įtakos raugų buferinėms savybėms [60].

Vykdant fermentaciją galima pakeisti sėklų bioaktyvius komponentus ar sudaryti sąlygas naujų susidarymui [27, 66]. Tyrimų metu nustatyta, jog baltymų, laisvų amino rūgščių, angliavandenių, pelenų, tiamino (B1), riboflavino (B2) kiekiai fermentuotose bolivinėse balandose didesni nei nefermentuotose sėklose. Tačiau nustatytas mažesnis maistinių skaidulų ir riebalų kiekis. Fermentavimo metu taip pat padidėja antioksidacinės jų savybės [67]. Kiti tyrėjai nustatė, jog naudojant autochonines PRB bolivinių balandų fermentacijai susidaro antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys peptidai [68].

Vykstant fermentacijos procesui sąveika tarp mikroorganizmų bei žaliavos yra svarbi kontroliuojant fermentaciją ir užtikrinant kokybės parametrus. Poveikis kepinio tūriui gali būti neigiamas arba teigiamas, priklausomai nuo ingredientų kombinacijos. Užtikrinant dujų susidarymą raugė, fermentacijos metu, visi esminiai mitybiniai komponentai turi būti prieinami bei turi būti užtikrinta pH vertė ir temperatūra. PRB ir (ar) mielių kultūrų augimui rauguose yra svarbi cukrų kompozicija (mono- ir disacharidų) miltuose. Pavyzdžiui, mažas maltozės kiekis sorgų miltuose turi neigiamos įtakos *Lactobacillus sanfranciscensis* augimui [15]. Gera sąveika tarp žaliavos komponentų ir atrinktų starterinių kultūrų leidžia padidinti funkcinės produktų savybės padidėjant bioaktyvių junginių kiekiui. PRB taip pat gali išskirti specifines proteazes ir peptidazes, gebančias išlaisvinti bioaktyvius peptidus iš oligopeptidų ar baltymų [69].

Vykstant raugo fermentacijai, glitimo neturinčiuose miltuose, įsitvirtina substratui specifinės PRB ir mielės, kurios dažniausiai skiriasi nuo įprastos kvietinių ir ruginių miltų raugų mikrofloros. Dažniausiai tradicinės fermentacijos (kviečių, rugių) rauguose aptinkamos rūšys (*Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus spicheri*) nerandamos tropinio klimato regionų fermentacijos produktuose. Juose daugiausia aptinkamos termofilinės PRB: *Lactobacillus fermentum* ir *Lactobacillus reuteri* [38]. Nustačius PRB ir mielių gebėjimą prisitaikyti rauguose, gamintuose iš miltų su ir be glitimo baltymų, nustatyta, kad nors kiekvienam raugui buvo naudotas tas pats starterinių kultūrų mišinys ir fermentuota tomis pačiomis sąlygomis, tačiau kiekvienos kultūros konkurencingumas priklausė nuo substrato. Tai rodo, jog starterinės kultūros nėra taip pat tinkamos miltų be glitimo fermentavimui, kaip glitimo turinčių miltų raugams ruošti. Specialūs starteriniai mišiniai turėtų būti išvesti tokiems miltams [38, 65].

Kai kurių miltų (grikių, abisininės posmilgės) rauguose dominuoja obligatinės ar fakultatyvinės heterofermentinės PRB, kurios dažniausiai siejamos su tradiciniais, kvietiniais ir ruginiais, raugais. Tačiau spontaninės fermentacijos metu pastebimos PRB padermės, kurios tradiciniuose rauguose dažniausiai neidentifikuojamos. Raugų mikrobiotos sudėtis priklauso ir nuo vykdomos fermentacijos sąlygų [70]. Dažniausiai aptinkamos PRB ryžių, kukurūzų, burnočių, grikių miltų rauguose yra *L. fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paralimentarius*, o tokios PRB kaip *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus sakei* ir *Pediococcus pentosaceus* yra aptinkamo tik įvairiuose glitimo neturinčių miltų rauguose [71]. Nustatyta, jog dažnai komerciškai naudojamos starterinės PRB padermės nėra tinkamos miltų be glitimo baltymų fermentavimui, dažniausiai jas uždominuoja mikroorganizmai, natūraliai esantys miltuose [72]. Atsižvelgiant į PRB ir mielių įvairovę, išskirtą iš glitimo neturinčių grūdų fermentacijos produktų, ir jų sutapimą su kviečių ir rugių grūdų rauguose esančia mikrobiota galima naudoti visas metabolitiškai aktyvias PRB ir mieles norint pagerinti duonos kokybę ir išplėsti glitimo neturinčių kepinų asortimentą [38].

Nors dauguma atliktų tyrimų rodo, jog raugo priedas turi teigiamos įtakos kepinų be glitimo savybėms, tačiau atliktų tyrimų metu nustatytas ir neigiamas grikių miltų raugo poveikis tešlos savybėms. Tešloje, naudojamoje kepinų gamybai, esančios rūgštys sumažino jos elastingumą ir padidino tvirtumą. Tai siejama su padidėjusiu baltymų ir (ar) baltymų-krakmolo komplekso geba sulaukyti vandenį. Taip pat nustatyta, jog raugo priedas sumažina mielių išskiriamo anglies dioksido kiekį, dėl to mažėja kepinio tūris ir didėja minkštimo kietumas [73].

1.6.4. Raugų savybės ir funkcijos kepinuose

Tarp skirtingų būdų, galinčių patenkinti celiakijos pacientų poreikį, buvo nustatyta, jog rūgščių naudojimas kepinų gamybai pagerina glitimo neturinčios duonos kokybę. Raugų fermentacija atvėrė naujas galimybes gerinant glitimo neturinčios duonos kokybę ir priimtinumą. Rūgščių susidarymas fermentacijos metu pagerina polisacharidų susidarymą, kurie gali iš dalies pakeisti glitimą ir pagerinti duonos be glitimo struktūrą. [10]. Raugų fermentacijos metu vykstanti mikroorganizmų veikla pasižymi teigiamu poveikiu tekstūrai, aromatui, mitybinėms savybėms, galiojimo terminui [58]. Žemiau aprašytos raugų teigiamos savybės bei funkcijos teikiamos kepinams.

Egzopolisacharidai. Dauguma PRB geba išskirti platų spektrą ilgos grandinės cukrų polimerus vadinamus egzopolisacharidais, kurių vieni nuo kitų skiriasi savo chemine sudėtimi, struktūra ir fizikinėmis savybėmis [71]. Egzopolisacharidai veikia kaip tirštikliai, kurie gali būti dedami į įvairius produktus, kur jie veikia kaip stabilizuojančios, emulsuojančios arba kleisterizuojančios medžiagos [38]. Šiuos polisacharidus išskiriančios bakterijos gali būti naudojamos kaip starterinės kultūros, todėl polimerai gali būti natūraliai išskirti į raugą vykstant fermentacijai [58]. Egzopolisacharidai skirstomi į dvi klases: homopolisacharidus (daugiausia gliukano ar fruktano polimerai) ir heteropolisacharidus. Homopolisacharidai dažniausiai naudojami duonos gamyboje. Jie yra sintetinami iš sacharozės veikiant gliukoziltransferazei ar fruktoziltransferazei [38]. PRB, išskirtos iš skirtingų grūdinių žaliavų, dažniausiai gamina homopolisacharidus iš sacharozės, kurie gali pagerinti technologines ir mitybines kepinų, neturinčių glitimo, savybes susidarant prebiotikams ar hidrokoloidams [71, 74].

Nors dažniausiai šaltiniuose apibūdinama egzopolisacharidų teikiama nauda kepinų tūriui, tačiau atlikti tyrimai naudojant 20 % raugo (grikių, bolivinės balandos, abisininės posmilgės, sorgų miltų), fermentuoto su PRB paderme, pasižyminčia šio junginio išskyrimu, parodė, jog raugo priedas įtakos savitajam kepinų tūriui neturėjo. Tačiau su šiais raugais pagamintų kepinų akytumas padidėjo, sumažėjo mikštimo kietumas, žiedėjimo rodiklis. Tiek kepinų, tiek tešlų savybės priklausė ne tik nuo raugo priedo, bet ir nuo naudotų miltų [75].

Antibakterinės savybės. Mikroskopiniai grybai yra svarbūs organizmai, prisidedantys prie duonos gaminių gedimo, tai lemia didelis duonos gaminių drėgnumas ir vandens aktyvumas ($a_w=0,94-0,97$) bei pH vertė, kurios reikšmė apytiksliai būna 6. Šios sąlygos yra tinkamos vystytis įvairiems mikroskopiniams grybams (geba greitai augti esant pH vertėms nuo 4,5 iki 6), kuriais duonos gaminiai gali būti užkrečiami gamybos ar laikymo metu. Daugiau kaip 90 % duonos gaminių apkrečiama įvairias mikroskopiniais grybais juos vėsinant, pjaustant ar pakuojant [76]. Dažniausiai sutinkami duonos gadintojai yra *Bacillus*, *Aspergillus* ir *Penicillium spp.* genties mikroorganizmai. Kai kurie mikroorganizmai gali išskirti toksiškus antrinius metabolizmo produktus vadinamus mikotoksinais. Norint prailginti duonos tinkamumą vartoti reikia kontroliuoti duonos gaminių užteršimą, nepageidaujama mikroorganizmais ir jų toksiniais. Kontroliuoti mikroskopinius grybus kepinuose galima apribojant jų patekimą ant gaminių, inaktyvuojant juos arba slopinant jų augimą [76]. Pakavimas modifikuotoje atmosferoje, švitinimas ir konservantai tai dažniausiai naudojamos priemonės norint užkirsti kelią pelėjimui. Augant natūralių ir aukštos kokybės produktų paklausai reikia atrasti naujų būdų mikrobiologiniam gedimui lėtinti. Raugai priskiriami natūralioms priemonėms, padedančioms padidinti duonos gaminių galiojimo laiką, kadangi jie gali sulėtinti pelėjimą [38].

Duonos gamybai naudojamose žaliavose, kaip pavyzdžiui miltuose, galima rasti ir patogeninių mikroorganizmų, tokių kaip *Salmonella* ir *Escherichia coli*, nors ir nedideli jų kiekiai randami žaliavose, tačiau retais atvejais pasitaiko produkto užteršimo atvejų [77]. *Staphylococcus aureus* yra gram teigiama fakultatyvinė bakterija, kurios 50–70 % rūšių numanoma, jog yra toksigeninės. Stafilokokinis maisto apsinuodijimas pasireiškia, kai maisto gaminyje šių bakterijų yra didelis kiekis (~10⁶/g), tuomet jos išskiria enterotoksinus. *S. aureus* maisto gaminiai dažniausiai apkrečiami gaminimo ar laikymo metu. Nors šios bakterijos žūva kaitinimo metu, tačiau jų išskirtas enterotoksinas yra atsparus kaitinimui. Dažniausi maisto apsinuodijimo atvejai susiję su *S. aureus* yra kilę dėl šio toksino [78].

Kepinių gamybai naudojant hidrokoloidus padidėja poreikis naudoti konservantus, nes padidėja kepinių vandens aktyvumas lyginant su kvietiniais kepiniais. PRB antimikrobinis aktyvumas, slopinantis duonos gedimus sukeliančius mikroskopinius grybus, yra daug žadanti alternatyva norint atsisakyti cheminių konservantų. Atlikti tyrimai parodė, jog naudojant 20 % raugo, fermentuoto su antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčiomis PRB, kepinių gamybai galiojimo terminą galima pailginti iki 3 dienų [71]. Raugo fermentacijos metu susidarę, antimikrobinėmis savybėmis pasižymintys, junginiai ir jų kiekiai priklauso tiek nuo naudojamų miltų, tiek nuo PRB padermės [79]. PRB išskiria platų spektrą įvairių bioaktyvių molekulių, įskaitant organines rūgštis, riebalų rūgštis ir bakteriocinus [80]. Įvairių tyrėjų atlikti moksliniai tyrimai parodė, jog kai kurios PRB padermės, naudojamos raugų gamyboje, gali pasižymėti geromis antimikrobinėmis savybėmis prieš įvairius mikroorganizmus, įskaitant ir mikroskopinius grybus [76]. Visi alternatyvūs grūdai, naudojami kepinių be glitimo gamybai, dažniausiai užauginami tropiniuose ir subtropiniuose regionuose, kur klimato ir laikymo sąlygos yra palankios mikroskopiniams grybams augti ir susidaryti mikotoksinams. Mikotoksinų susidarymas tokioje žaliavoje yra ne tik pavojingas bet ir didelė ekonominė problema. PRB, ypač rūšys priklausančios *Lactobacillus* genčiai, pasižymi antimikotoksinėmis savybėmis daugeliui kenksmingų toksinų, tokių kaip ochratoksinai, aflatoksinai ir kt. [71].

Fitatų hidrolizė. Fito rūgštis yra didžiausias fosforo saugojimo junginys grūduose, surišantis metalo jonus (Ca, Fe, K, Mg, Mn ir Zn.), kurie tampa netirpūs ir mitybiškai neprieinami. Fito rūgštis laikoma antimitybiniu junginiu, ypač celiakija sergantiems pacientams, kurie kenčia nuo mikroelementų trūkumo. Duonos gamybos metu fito rūgštis yra sumažinama veikiant fitazėms, kurioms įtakos turi temperatūra, pH, fermentacijos laikas ir priedai. Raugų fermentacija gali turėti įtakos mikroelementų biologiniam prieinamumui. Fermentacijos metu susidaro optimali pH vertė endogeninei fitazei ir tinkamos sąlygos mineralų tirpumui [38]. Glitimo neturintuose miltuose yra įvairus kiekis fitatų (ryžių miltuose – 0,12 %, burnočiuose – 0,47 %, lubinuose – 0,77 %, kukurūzuose – 0,92 %, bolivinėje balandoje – 1,18 %). Kadangi dažniausiai fitatai randami aleurono sluoksnyje jų kiekis miltuose priklauso nuo grūdų malimo ir apdorojimo [71]. Naudojant raugus, pasižyminčius fitaziniu aktyvumu, galima sumažinti fitatų kiekį. Atliktų tyrimų metu nustatyta, jog naudojant tokį raugą padidėja kalcio, cinko ir magnio kiekiai kepinuose [81].

Biologiškai aktyvių junginių susidarymas. Fermentacija pagerina biologiškai aktyvių junginių ekstrahavimą iš žaliavų arba padeda išsilaisvinti funkcinėms biomolekulėms, kurios yra PRB ir (ar) mielių metabolizmo dalis. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuojant miltus be glitimo baltymų galima praturtinti kepinus bioaktyviais junginiais. Nustatyta, jog parenkant PRB galima padėti susidaryti GABA kviečių, rugių, speltos, avižų, grikių, ryžių, burnočių, sorų, avinžirnių, sojų ir bolivinių balandų miltų rauguose fermentacijos metu [10].

Žiedėjimo lėtinimas. Krakmolo retrogradacija yra vienas iš duonos žiedėjimą lemiančių veiksnių, ši problema yra svarbi duonos gaminiams, kuriuose nėra glitimo, kadangi jų didžiąją dalį sudaro krakmolos. Nustatyta, jog duonos su raugu žiedėjimui įtakos turi biologinis jų rūgštingumas bei parinktų starterinių kultūrų proteazinis ir amilazinis aktyvumas. Amilaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB panaudojimas gaminant duoną su raugais, kuriuose nėra glitimo, turi teigiamų savybių lyginant su kontrolinio kepinio žiedėjimu [38].

Proteazinis aktyvumas. Baltymų skilimas, raugų fermentacijos metu, yra vienas iš pagrindinių veiksnių turinčių įtakos duonos, gamintos su raugu, kokybei. Dauguma rauguose esančių PRB, tuo tarpu ir *L. sanfranciscensis*, nepasižymi ekstraląsteliniu proteaziniu aktyvumu. PRB daugiausia veikia peptidus intraląstelinėmis proteazėmis. Joms veikiant susidaro dipeptidai ir amino rūgštys, tai suteikia tešlai švelnumo palyginus su chemiškai parūgštintomis tešlomis [38]. Raugų fermentacija gali padėti užmaskuoti sumažintą druskos kiekį kepinuose. Fermentacijos metu susidariusios laisvos amino rūgštys ir jų pirmtakai leidžia kompensuoti druskos sumažinimo pojūtį, kuris priklauso ir nuo fermentacijai naudojamoms padėms [18]. Proteolizės metu produktuose, kuriuose nėra glitimo, vandenyje tirpūs baltymai suskaidomi iki peptidų. Nustatyta, jog baltymų agregatų nesusidarė tokios duonos minkštyme kepimo metu, kai tuo tarpu chemiškai rūgštintos tešlos gaminyje baltymų agregatai buvo nustatyti. Raugų fermentacija taip pat prisideda prie stipresnio krakmolo gelio formavimosi. Atlikti tyrimai parodė, jog proteazinis aktyvumas yra pageidaujamas rauguose. Paveikiami vandenyje tirpūs baltymai, susidaro geresnės kokybės kepiniai [38]. Raugų fermentacijai naudojant PRB, pasižyminčias proteaziniu aktyvumu, galima sumažinti gaminių, užterštų glitimu, riziką. Naudojant tokį raugą esant 400 ppm ir mažesniai glitimo kiekiui gaminyje, kepinų rauginimo ir (ar) kildinimo metu, glitimo kiekis gali sumažėti iki 20 ppm [81].

1.7. Duonos be glitimo gamyba

Duonos be glitimo gamyba skiriasi nuo standartinės kvietinės duonos gamybos. Tradiciškai kvietinė tešla sumaišoma, fermentuojama, dalinama, formuojama, kildinama ir kepama. Dauguma tešlų be glitimo turi didesnį vandens kiekį ir skystą struktūrą. Tokius pusgaminius reikia trumpiau maišyti, kildinti. Naujas metodas gaminant aukštos kokybės duonos be glitimo kepinus buvo išvystytas M. Moore ir kt. tyrėjų, kuris susidėjo iš maišymo, kildinimo ir kepimo. Šis metodas buvo sėkmingai taikomas kituose tyrimuose duonos be glitimo gamybai [25].

Kvietinėse tešlose vandens kiekis yra labiau apribotas nei glitimo neturinčiose tešlose, dėl to krakmolo granulės tik iš dalies kleisterizuojasi. Glitimo neturinčiose tešlose vandens kiekis yra didesnis, todėl krakmolo kleisterizacija įvyksta iki galo [15]. Pokyčiai, vykstantys fermentacijos ir kepimo metu, priklauso nuo krakmolo granuliu ir miltų dalelių struktūros ir morfologijos. Didelės miltų dalelės iš dalies išlaiko jų vientisumą maišymo ir minkymo metu susidarant tešlai, kuri yra atsparesnė šlyties įtempiui. Tokie kepiniai gaunami su mažesniu savituoju tūriu. Krakmolo granulės morfologija, dydis, vandens absorbavimas, kleisterizavimosi temperatūra turi įtakos krakmolo sąveikai su kitomis medžiagomis. Naudojant krakmolą, turintį skirtingo dydžio granules (pvz.: kviečių krakmolą), galima gauti tolygesnę krakmolo-hidrokoloido struktūrą [82].

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Pieno rūgšties bakterijų antimikrobinio aktyvumo tyrimas

2.1.1. Mikroorganizmai ir jų auginimo sąlygos

Tyrimams naudotos PRB, anksčiau buvo išskirtos iš lietuviškų ir daniškų duonos raugų bei kitų maisto produktų, pateiktos 1 lentelėje. PRB saugotos minus 70 °C temperatūroje 25 % glicerolio tirpale. Prieš analizę PRB dauginamos naudojant MRS (*De Man, Rogosa and Sharpe*) mitybinę terpę atitinkamoje temperatūroje (žr. 1 lent.) 24 val. Indikatoriniai mikroorganizmai naudoti PRB antimikrobinio aktyvumo vertinimui pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. PRB kultūrų ir indikatorinių mikroorganizmų sąrašas ir kultivavimo sąlygos

Mikroorganizmai	Mitybinės terpės	Temperatūra, °C
PRB kultūros:		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 242	MRS terpė (Liofilchem, Italija)	30
<i>Lactobacillus uvarum</i> 245		30
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> MR29		30
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> MW15		30
<i>Lactobacillus rossiae</i> M2		37
<i>Lactobacillus rossiae</i> GL14		37
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> W2		30
<i>Lactobacillus frumenti</i> H10		30
<i>Lactobacillus crustorum</i> W19		30
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> MR24		30
<i>Lactobacillus brevis</i> R26		30
<i>Lactobacillus farraginis</i> 206		30
<i>Lactobacillus curvatus</i> 51		30
Indikatoriniai mikroorganizmai:		
<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	„Plate count“ terpė (Liofilchem, Italija)	30
<i>Aspergillus niger</i>	Mielių gliukozės ir chloramfenikolio terpė (Liofilchem, Italija)	25
<i>Fusarium saloni</i>		25
<i>Penicillium verrucosum</i>		25
<i>Fusarium poae</i>		25

2.1.2. PRB paruošimas antimikrobinio aktyvumo tyrimui.

Antimikrobiniam tyrimams PRB augintos 24 val. atitinkamoje temperatūroje MRS sultinyje (sudarytame iš: peptono (10 g/l), jautienos ekstrakto (10 g/l), mielių ekstrakto (5 g/l), gliukozės (20 g/l), K₂HPO₄ (2 g/l), natrio acetato (5 g/l), amonio citrato (2 g/l), magnio sulfato (0,2 g/l), mangano sulfato (0,05 g/l), tvino 80 (1 ml/l)), ruoštame pagal gamintojo rekomendacijas. Terpė sterilizuota 15 min 121 °C temperatūroje.

Susidarę bakteriocinai ir kiti metabolizmo produktai išsiskiria į mitybinę terpę. Po 24 val. kultivavimo PRB ląstelės nucentrifuguotos (5000 g, 20 min, 4 °C) ir atskirtos nuo į mitybinę terpę išskirtų

metabolizmo produktų. Supernatantai filtruoti pro sterilų 0,2 µm filtrą, bakterijų likučių pašalinimui, ir perpilti į naujus mėgintuvėlius, kurie iki analizės laikyti 4 °C temperatūroje.

Antimikrobinis PRB aktyvumas, difuzijos į agarą metodu, vertintas tikrinant: (1) PRB supernatantų (bendrą metabolizmo produktų) aktyvumą, kaip organinių rūgščių bei kitų į terpę išsiskyrusių metabolitų ir (2) kaip neutralizuotų supernatantų (neutralizuotų metabolizmo produktų), t.y. pašalinus organinių rūgščių poveikį, jas neutralizavus su 5M NaOH iki pH vertės 6,5, priimant kaip į bakteriocinus panašią medžiagų tirpalą.

2.1.3. Indikatorinių mikroorganizmų paruošimas tyrimui ir difuzijos į agarą metodas

PRB antimikrobinio poveikio vertinimui naudoti indikatoriniai mikroorganizmai pateikti 1 lentelėje. Indikatorinės bakterijos augintos 24 val. atitinkamoje temperatūroje (žr. 1 lent.) ant nuožulnaus „Plate count“ agaro (sudaryto iš: agaro (9,0 g/l), dekstrozės (1,0 g/l), triptono (5,0 g/l), mielių ekstrakto (2,5 g/l), terpės pH 7±0,2 esant 25 °C) ruošto pagal gamintojo rekomendacijas, sterilizuoto 15 min 121 °C temperatūroje. Vertinant PRB antimikrobinį poveikį, indikatorinių bakterijų sporoms, bakterijų mėginių suspensijos buvo paruoštos pagal McFarland 0,5 bario sulfato standartą ir kaitintos 80 °C temperatūroje 15 min. Po 100 µl, paruoštos sporų suspensijos (~10⁶ KSV/ml), išpilstytos į Petri lėkšteles ir užpiltos po ~20 ml „Plate count“ mitybine terpe.

Indikatoriniai mikroskopiniai grybai auginti 96 val. atitinkamoje temperatūroje (žr. 1 lent.) ant nuožulnaus mielių, gliukozės ir chloramfenikolio agaro (sudaryto iš: mielių ekstrakto (5,0 g/l), gliukozės (20 g/l), chloramfenikolio (0,1 g/l), agaro (18 g/l), terpės pH 6,6±0,2 esant 25 °C) ruošto pagal gamintojo rekomendacijas ir sterilizuoto 15 min 121 °C temperatūroje. Antimikrobinio poveikio mikroskopiniams grybams įvertinimui buvo paruošta jų sporų suspensijos, iš kurių buvo paimtas atitinkamas kiekis mėginio, kad į Petri lėkštelę patektų ~10⁵ KSV/ml grybų sporų. Į Petri lėkšteles išpilstytos grybų sporos užpiltos po ~20 ml mielių, gliukozės ir chloramfenikolio mitybinės terpės. Mikroskopinių grybų sporų kiekis apskaičiuotas naudojant „Neubauer Chamber“ kamerą. Mikroskopinių grybų sporos skaičiuotos „Neubauer Chamber“ kameros kvadratėliuose, kurių plotas 0,0625 mm², o tūris 6,25·10⁻⁶ ml. Bendras sporų kiekis apskaičiuotas taip: sporų skaičių, kameros atitinkamuose kvadratuose, padalinus iš kvadratų skaičius ir padauginus iš 160000.

Paruošose Petri lėkštelėse su indikatoriniais mikroorganizmais terpėje, steriliu cilindru išpjautos 7 mm skersmens įdubos ir atskirtas agaras pašalintas. Į gautus šulinėlius supilta po 150 µl PRB metabolizmo produktų mėginio. Petri lėkštelės su pasėliais inkubuotos termostate – indikatoriniams mikroorganizmams palankiose temperatūrose (žr. 1 lent.).

Antimikrobinis PRB poveikis prieš indikatorines bakterijas įvertintas po 48 val., o prieš mikroskopinius grybus – po 3 parų. Vertinta skaidri zona (augimo slopinimo) apie šulinėlius, išmatuojant slopinimo zonos plotį (spindulys aplink šulinėlį). Bakteriocidinis arba fungicidinis poveikis priimtas, kai slopinimo zona skaidri, o fungistatinis ir bakteriostatinis poveikis, kai indikatorinio mikroorganizmo augimas arba sporų susidarymas sulėtintas. Papildomai stebėta PRB metabolizmo produktų įtaka mikroskopinių grybų sporų susidarymui laikant lėkšteles su pasėliais ilgesnį laiką – kol pradėjo ryškėti sporos.

2.2. Pieno rūgšties bakterijų fitazinio aktyvumo tyrimas

Fitazės katalizuoja fitatų hidrolizę susidarant neorganiniui fosforui. Fitazių aktyvumo nustatymo metu kaip substratas naudojama kalio fitato druska. Neorganinis fosfatas su amonio molibdatu, esant sieros rūgščiai, sudaro amonio fosfomolibdato kompleksą, kurio koncentracija tiesiogiai proporcinga neorganinių fosfatų koncentracijai ir yra išmatuojama fotometriškai. Fosforo ekvivalentas, išlaisvintas iš kalio fitato druskos per minutę, apskaičiuotas iš kalibracinės fosforo tiesės. Vienas fitazių aktyvumo vienetas yra reikalingas norint išlaisvinti 1 μmol neorganinio fosforo iš 3 mM kalio fitato druskos, esant 30 °C temperatūrai bei terpės pH vertei 5,5, per vieną minutę [83]. UV spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais išmatuota naudojant Genesys 10 (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Germany) spektrofotometrą esant 335 nm bangos ilgiui. Išlaisvinto fosforo ekvivalento vertės tiriamuosiuose tirpaluose apskaičiuotos iš kalibracinės tiesės. Fermentinis aktyvumas apskaičiuotas pagal 1 formulę:

$$AV/ml = \frac{\Delta c_P}{l \times t} \cdot \frac{V_{reakcijos}}{V_{fermento}} \quad (1)$$

čia: Δc_P – išmatuotas fosforo koncentracijos didžiausias pokytis laike, μmol ; t – reakcijos laikas, min; $V_{reakcijos}$ – reakcijos mišinio kiekis, ml; $V_{fermento}$ – reakcijai naudotas fermento tirpalo kiekis, 0,2 ml; l – spindulio kelias, cm.

Tyrimo metu naudojami tirpalai: acetatinis buferis (0,2 M, pH 5,5), kalio fitatas acetatiniame buferyje (0,022 g kalio fitato ir 10 ml acetatinio buferio), spalvinės reakcijos reagentas (1 dalis 10 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1 dalis 2,5 M H_2SO_4 : 2 dalys acetono).

Tyrimo eiga:

Fitazių aktyvumo nustatymas. Į vieną mėgintuvėlį įpilta 0,8 ml natrio acetato buferio, savo sudėtyje turinčio 3 mM kalio fitato, o į kitus du po 0,8 ml natrio acetato buferio. Mėgintuvėliai pamerkiami į 30 °C temperatūros vandens vonią 5 min. Tirpalams sušilus į pirmąjį įpilta 0,2 ml tiriamojo fermento tirpalo, į antrąjį mėgintuvėlį įpilta 0,2 ml tiriamojo fermento tirpalo (kontrolinis mėginys), o į trečiąjį mėgintuvėlį įpilta 0,2 ml natrio acetato buferio („tuščias“ mėginys). Reakcija vykdyta 30 °C temperatūros vandens vonioje 15 min. Įvykus reakcijai į mėgintuvėlius įpilta po 1 ml 10 % trichloracto rūgšties ir sumaišyta. Sustabdžius reakciją iš kiekvieno mėgintuvėlio imama po 0,2 ml reakcijos mišinio ir įpilta į naujus mėgintuvėlius. Reakcijos mišinys sumaišytas su 1,6 ml spalvinės reakcijos reagentu. Reakcija vykdyta 20 min. kambario temperatūroje. Išmatuota UV spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. „Tuščias“ mėginys naudotas matavimų pradžioje nustatant nulinę padalą.

Fosforo kalibracinė tiesė. Fosforo standartinis tirpalas maišytas su acetatiniu buferiu pagal proporcijas (0–3,23 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ koncentracijų tirpalai), mėgintuvėlių turinys sumaišytas (bendras reakcijos mišinio kiekis – 2 ml). 0,2 ml reakcijos mišinio sumaišyta su 1,6 ml spalvinės reakcijos reagentu ir po 20 min spektrofotometru išmatuota UV spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. Tyrimo metu gauta kalibracinė fosforo tiesė pateikta 2 priede (žr. 2 priedas 1 pav.). Standartinio fosforo tirpalo paruošimas: 0,4393 g KH_2PO_4 sumaišyta su 100 ml natrio acetato buferio, tuomet 1 ml gauto tirpalo sumaišytas su 9 ml natrio acetato buferio.

2.3. Fermentuotų produktų ruošimas

2.3.1. Raugų ruošimas

Raugai (fermentuoti produktai) ruošti keturiomis stadijomis, pagal G. Juodeikienė ir kt. [84] 30 °C temperatūroje, naudojant ryžių („Ustukių malūnas“) ir kukurūzų („Melvit“) miltus bei atrinktas PRB padermes: *Lactobacillus farraginis* 206, *Lactobacillus sanfranciscensis* W2 ir *Lactobacillus curvatus* 51 (viso 6 skirtingi raugai). Po kiekvienos stadijos nustatyti raugų aktyvūs ir bendrasis rūgštingumai. Raugų ruošimo stadijos ir naudotų žaliavų kiekiai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. Raugų gamybos stadijos

Žaliavos ir technologiniai parametrai	I stadija	II stadija	III stadija	IV stadija
PRB kultūra, g	5,5	—	—	—
Fermentuotas produktas, g	—	35,5	95,5	200,5
Miltai, g	10	20	35	70
Vanduo, g	20	40	70	70
Fermentavimo trukmė, val.	4	20	24	24

2.3.2. Fermentuotų sėklų produktų ruošimas

Prieš fermentaciją kanapių, čija ir bolivinės balandos sėklos buvo sumaltos (laboratorinis malūnas Mlynek WZ–1 (Zakład Badawczy Przemysłu Pierkarskiego Sp. zo.o, Lenkija)) ir sterilizuotos 15 min. 121 °C temperatūroje tam, kad būtų inaktyvuoti kiti sėklų mikroorganizmai. Fermentuotų sėklų gamybos receptūra pateikta 3 lentelėje.

3 lentelė. Fermentuotų sėklų gamybos receptūra

Žaliavos	Kiekis, g		
	Kanapės	Čija sėklos	Bolivinės balandos
Sėklos	18,41	16,19	15,83
Vanduo	81,59	83,81	84,17

Į sterilizuotus mėginius supilta atitinkamų pieno rūgšties bakterijų ląstelių suspensijos (~10⁶ KSV/g) prieš tai atskyrus jas nuo MRS sultinio. PRB ląstelių suspensija paruošta nucentrifugavus ląsteles (5000 g, 10 min, 4 °C), augintas MRS sultinyje 24 val. 30 °C temperatūroje. Po centrifugavimo MRS terpė nupilta, o ląstelės plautos su steriliu distiliuotu vandeniu bei vėl centrifuguotos, praplovimas kartotas 3 kartus. Po centrifugavimo pašalinus nuopylas į mėginius įpilta po 9 ml distiliuoto sterilaus vandens bei išmaišyta. Sėklų produktai fermentuoti PRB palankioje temperatūroje (30 °C) 72 val. kas 24 val. stebint pH verčių ir BTR pokyčius.

2.4. Raugų kokybės vertinimas

2.4.1. Raugų rūgštingumo vertinimo metodai

Aktyvusis rūgštingumas (pH). Tiriamųjų raugų pH vertės išmatuotos naudojant pH – metrą (PP – 15, Sartorius AG, Vokietija).

Bendrasis titruojamasis rūgštingumas (BTR). Bendrasis titruojamasis rūgštingumas išreikštas Neimano laipsniais ($^{\circ}\text{N}$), t.y. 1 N šarmo tirpalo mililitrų skaičiumi, reikalingu nutitruoti rūgštis, esančias 100 g produkto. Rūgštingumo nustatymui techninėmis svarstyklėmis pasverta 5 g mėginio, kuris sumaišytas su 50 ml distiliuoto vandens. Pridėjus 3–5 lašus 1 % fenolftaleino titruota 0,1 N NaOH tirpalu iki rausvos spalvos, kuri neišnyksta 1 min.

Lakusis rūgštingumas. Lakusis rūgštingumas išreikštas kiekiu (ml arba cm^3) 1 M NaOH, kuris sunaudotas 100 g produkto esančioms lakiosioms rūgštims neutralizuoti. Techninėmis svarstyklėmis pasverta 25 g raugo, kuris sumaišytas su 3 ml 5 % sieros rūgštimi ir 50 ml distiliuotu vandeniu. Vykdyta distiliacija vandens garais (Behr S4 distiliacijos įrenginys (UK), naudojant distiliacijos programą, kurios galingumas 80 %, o trukmė 540 s). Naudojant fenolftaleiną kaip indikatorių distiliatas titruotas 0,1 N NaOH tirpalu iki rausvos spalvos, neišnykstančios 1 min.

Pieno rūgšties kiekio nustatymas. Pieno rūgšties ir jos izomerų (D- ir L-) kiekiai nustatomi spektrofotometriškai, įvertinus spalvų pokyčius inicijuotus veikiant dviem fermentams. Pirmąją reakciją katalizuoja D-laktato dehidrogenazė (D-LDH), kurios oksiduoja D-izomerus iki piruvato susidarant nikotinamido-adenino dinukleotidui ((NAD⁺)). Antrosios reakcijos metu veikiant fermentui D-glutamato-piruvato transaminazei (D-GPT) vyksta piruvato konversijos į D-alaniną ir 2-oksoglutaratą. NADH kiekis koreliuoja su D-pieno rūgšties izomerų kiekiu, jis įvertinamas spektrofotometriškai, esant 340 nm bangos ilgiui. Pieno rūgšties ir jos izomerų skaičiavimai atlikti su fermentinio testo rinkiniu (D-/L-Lactic Acid Rapid Assay Kit, Megazyme) pagal gamintojų rekomendacijas. Šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais išmatuota naudojant Genesys 10 (Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Germany) spektrofotometrą.

Tyrimo eiga. Į kiuvetę atitinkamais kiekiais (žr. 4 lent.) supilti reagentai: distiliuotas vanduo, tiriamasis mėginys (į „tuščią“ mėginį pilamas atitinkamas kiekis vandens), buferinis tirpalas (pH 10, 0.6 M glicilglicinas, 0,1 M L-glutamato rūgštis), nikotinamido adenino dinukleotido (NAD) tirpalas, L-laktato dehidrogenazė (L-LDH) tada supilta glutamato piruvato transaminazė (D-GPT), po 5 min. išmatuota šviesos sugertis tiriamaisiais tirpalais. Po to supiltas D-laktato dehidrogenazės (D-LDH) tirpalas ir po 5 min. vėl išmatuota šviesos sugertis tiriamaisiais tirpalais.

4 lentelė. Reagentai naudojami pieno rūgšties nustatyme

Reagentai	„Tuščias“ mėginys	Tiriamasis mėginys
Distiliuotas vanduo	1,60 ml	1,50 ml
Tiriamasis mėginys	-	0,10 ml
Buferinis tirpalas	0,50 ml	0,50 ml
NAD	0,10 ml	0,10 ml
D-GPT	0,02 ml	0,02 ml
D-LDH	0,02 ml	0,02 ml
L-LDH	0,02 ml	0,02 ml

Pieno rūgšties izomerų koncentracijos apskaičiuojama pagal 2 (g/l) ir 3 (g/100g) formules:

$$c = \frac{V \times M}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{D(L)\text{-pieno rūgštis}} \quad (2)$$

čia: c – pieno rūgšties kiekis, g/l; V – tiriamo tirpalo tūris, ml; M – molekulinė tiriamojo junginio masė, g/mol; ε – NADH sugerties koeficientas prie 340 nm, $1 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$; d – spindulio kelias, cm; v – tiriamojo mėginio kiekis reakcijoje, ml; $\Delta A_{D(L)\text{-pieno rūgštis}}$ – tiriamojo ir „tuščio“ mėginio absorbcijų skirtumas.

$$c = \frac{c_{\text{pieno rūgštis}}}{m_{\text{mėginio masė}}} \quad (3)$$

čia: c – pieno rūgšties kiekis, g/100 g; $c_{\text{pieno rūgštis}}$ – pieno rūgšties kiekis, g/l; $m_{\text{mėginio masė}}$ – tiriamojo mėginio masė, g/l.

2.4.2. Raugų fermentinių aktyvumų nustatymo metodai

α -amilazės aktyvumas. α -amilazės fermentinis aktyvumas nustatomas pagal krakmolo koncentraciją naudojant kolorimetrinį metodą. Fermento aktyvumo vienetas išreiškiamas fermento kiekiu, kuris gali katalizuoti 1 mg tirpaus krakmolo hidrolizę, susidarant dekstrinams per 1 min., kai reakcijos terpės pH vertė yra 7,0, o temperatūra 30 °C [85]. Matavimai atlikti naudojant Genesys 10 (Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Germany) spektrofotometrą, esant 580 nm bangos ilgiui. Fermentinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal 4 formulę:

$$AV / ml = \frac{KEV \times 2,5 \times PF}{1 \times 30 \times 2,5_{KM}} \quad (4)$$

čia: KEV – krakmolo ekvivalento vertė (mg), gauta iš kalibracinės krakmolo tiesės, mg/ml; 2,5 – bendras reakcijos tūris, ml; 30 – fermentinės reakcijos trukmė, min; 1 – fermento tūris naudotas matavimams, ml; $2,5_{KM}$ – tūris naudotas kolorimetriniame nustatyme, ml.

Tyrimo metu naudojami tirpalai: substratas (krakmolo tirpalo 1,0 mg/ml), fosfatinis buferis (0,1 M, pH 7,0), jodo tirpalas (0,1269 g jodo ir 0,166 g KJ 200 ml vandens).

Fermentuotos terpės ekstrakto paruošimas. $5 \pm 0,01$ g terpės 10 min. homogenizuojama su 50 ml fosfatinio buferio (0,1 M, pH 7,0). Gautas homogenizatas centrifuguotas (6000g, 10 min.,) su centrifūga Heraeus Labofuge 200 (Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Germany).

Tyrimo eiga:

α – amilazės aktyvumo nustatymas. Į mėgintuvėlį įpilta 1 ml tiriamojo tirpalo, išlaikoma 10 min. 30 °C temperatūroje. Po kaitinimo į mėgintuvėlį su tiriamuoju mėginiu įpilta 1 ml substrato. Kontrolinis mėginys sudaromas iš 1 ml fosfatinio buferio ir 1 ml substrato, o į „tuščio“ mėginio mėgintuvėlį įpilta 2 ml fosfatinio buferio. Mėgintuvėlių turiniai sumaišyti ir mėgintuvėliai pamerkti į 30 °C temperatūros vandens vonią 30 min. Po kaitinimo fermentinė reakcija visuose mėgintuvėliuose stabdoma įpilant po 0,5 ml 1 M HCl ir sumaišoma. Tuomet į mėgintuvėlius įpilama po 2,5 ml jodo tirpalo ir po 5 ml distiliuoto vandens. Matuojama tiriamųjų tirpalų šviesos spindulio sugertis. Naudojant „tuščią“ tirpalą nustatoma nulinė padala spektrofotometre.

Krakmolo kalibracinės tiesės paruošimas. Paruošiami įvairių koncentracijų krakmolo tirpalai iš 1,0 mg krakmolo tirpalo (buvo paruošti 0–0,5 mg/ml krakmolo koncentracijų tirpalai, bendras reakcijos mišinio tūris – 2 ml). Tam į mėgintuvėlius supilama krakmolo tirpalo ir fosfatinio buferio atitinkamomis proporcijomis. Tirpalai sumaišomi ir į mėgintuvėlius supilama po 0,5 ml 1 M HCl, mėgintuvėlių turinys sumaišomas ir pilama po 2,5 ml jodo tirpalo ir praskiedžiama su 5 ml distiliuoto

vandens. Matuojama tiriamųjų tirpalų šviesos spindulio sugertis. Tyrimo metu gauta krakmolo kalibracinė tiesė pateikta 2 priede (žr. 2 priedas 2 pav.).

Proteazių fermentinis aktyvumas. Proteazių fermentinis aktyvumas nustatomas kaip substratą naudojant kazeino tirpalą. Kazeino tirpalą paveikus proteazėmis išsilaisvina amino rūgštys, tarp jų ir tirozinas, kuris reaguoja su Folin & Ciocalteus fenolio reagentu. Susidariusios mėlynos spalvos intensyvumas leidžia kiekybiškai įvertinti fermentinį aktyvumą išmatuojant šviesos spindulio sugertį tiriamuoju tirpalu, naudojant Genesys 10 (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Germany) spektrofotometrą esant 660 nm bangos ilgiui. Gautos vertės palyginamos su kalibracine tirozino tiese, kuri ruošta iš žinomos koncentracijos tirozino ir Folin & Ciocalteus fenolio reagento. Proteazių aktyvumas išreiškiamas aktyvumo vienetais (mikromoliais tirozino ekvivalento, kuris išlaisvinamas iš kazeino substrato per 1 min.), kai terpės pH vertė 7,5 ir esant 37 °C temperatūrai [86]. Fermentinis aktyvumas apskaičiuotas pagal 5 formulę:

$$AV / ml = \frac{TEV \times 11}{1 \times 10 \times 2} \quad (5)$$

čia: *TEV* – tirozino ekvivalento vertė iš standartinės kreivės, μmol; *11* – bendras reakcijos tūris, ml; *10* – fermentinės reakcijos trukmė, min.; *1* – fermento tūris naudotas matavimams, ml; *2* – tūris naudotas kolorimetriniame nustatyme, ml.

Naudojami tirpalai: kazeino tirpalas (0,13 g kazeino ištirpinama 20 ml vandens), 10 mM natrio acetato buferis su 5mM kalcio acetato buferiu (pH 7,5).

Fermento ekstrakto paruošimas. 5±0,01 g mėginio 10 min. homogenizuota su 50 ml buferio ruošto iš 10 mM natrio acetato buferio su 5 mM kalcio acetato buferio (pH 7,5, 37 °C temperatūroje). Mėginys filtruotas.

Tyrimo eiga:

Proteazių aktyvumo nustatymas. Į du mėgintuvėlius įpilta po 5 ml (0,65 %) kazeino tirpalo ir mėgintuvėliai pašildyti 5 min. 37 °C temperatūroje. Į pirmąjį mėgintuvėlį (tiriamasis mėginys) įpilta 1 ml tiriamojo fermento tirpalo ir sumaišyta. Mėgintuvėliai šildyti 37 °C temperatūroje 10 min. Po kaitinimo fermentinė reakcija stabdyta į mėgintuvėlius įpilant po 5 ml 110 mM trichloracto rūgšties, mėgintuvėlių turinys sumaišytas. Į antrąjį mėgintuvėlį („tuščias“ mėginys) įpilta 1 ml tiriamojo mėginio ir turinys gerai sumaišytas. Mėgintuvėliai pamerkiami į 37 °C temperatūros vandens vonią 30 min. Po kaitinimo mėgintuvėlių turinys filtruotas, 2 ml gauto filtrato sumaišyta su 5 ml 500 mM natrio karbonato tirpalo ir 1 ml Folin & Ciocalteus fenolio reagento tirpalu. Turinys sumaišytas ir mėgintuvėlis pamerktas į 37 °C temperatūros vandens vonią 30 min. Atvėsus iki kambario temperatūros išmatuota mėginių šviesos spindulio sugertis [86]. Išskaičiuojant L-tirozino koncentracijos ekvivalento vertei naudota reikšmė gauta iš tiriamojo mėginio sugerties atėmus „tuščio“ mėginio sugerties reikšmę.

Tirozino kalibracinės tiesės sudarymas. Į mėgintuvėlius atitinkamomis proporcijomis supilti reagentai: 1,1 mM L-tirozino standartas, distiliuotas vanduo, 0,5 M natrio karbonatas ir Folin & Ciocalteus fenolio reagento tirpalas (bendras reakcijos mišinio tūris – 8 ml). Mėginiai sumaišyti (paruošti 0,055 – 0,445 μmol koncentracijos tirpalai), šviesos sugertis tiriamaisiais tirpalais išmatuojama. Tyrimo metu gauta tirozino kalibracinė tiesė pateikta 2 priede (žr. 2 priedas 3 pav.).

Ksilanazinis aktyvumas. Ksilanazei veikiant vyksta ksilano hidrolizė, kurios metu susidaro ksilozė. Ksilozei reaguojant su DNS (3,5-dinitrosalicilo rūgšties reagentas), stipriai šarminėje aplinkoje, susidaro spalvoti junginiai. Vienas fermento aktyvumo vienetas gali iš ksilano (reakcijos sąlygomis) išskirti 1 μmol ksilozės ekvivalento per 1 min. Išmatuota šviesos spindulio sugertis tiriamuoju tirpalu, naudojant Genesys 10 (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Germany) spektrofotometrą, esant 540 nm bangos ilgiui. Fermentinis aktyvumas apskaičiuotas pagal 6 formulę:

$$AV / ml = \frac{KE \times PF \times 1}{30 \times 0,1 \times I_{KM}} \quad (6)$$

čia: *KE* – ksilozės ekvivalentas kalibracinėje tiesėje; *PF* – praskiedimo faktorius; 1 – reakcijos mišinio tūris, ml; 30 – fermentinės reakcijos trukmė (min.); 0,1 – paimtas fermento kiekis (ml); *I_{KM}* – tūris naudotas kolorimetriniame matavime.

Naudojami tirpalai: ksilozės standartinis tirpalas (1 mg/ml), 0,05 M natrio acetato buferis, Beržo ksilano tirpalas (5 mg/ml).

Fermento ekstrakto paruošimas. 5±0,01 g mėginio 10 min. homogenizuota su 50 ml 0,05 M natrio acetato buferio. Mėginys filtruojamas.

Tyrimo eiga:

Ksilanazės aktyvumo nustatymas. Į vieną mėgintuvėlį įpilta 0,8 ml acetatinio buferio ir 0,1 ml ksilano tirpalo, į kitą mėgintuvėlį („tuščias“ mėginys) pilta 0,9 ml acetatinio buferio, mėgintuvėliai pamerkti į 45 °C temperatūros vandens vonią 5 min. Tirpalams sušilus į mėgintuvėlius įpilta po 0,1 ml tiriamojo fermento tirpalo. Reakcija vykdyta 45 °C temperatūroje 30 min. Reakcijai pasibaigus, tirpalai atvėsinti ir į juos įpilta po 1 ml DNS reagento, mėgintuvėlių turinys sumaišomas. Mėgintuvėliai kaitinti 100 °C temperatūros vandens vonioje 5 min., po kaitinimo mėgintuvėliai atvėsinti ir įpilta po 6 ml distiliuoto vandens. Mėgintuvėlių turinys sumaišytas ir išmatuota šviesos spindulio sugertis tiriamuoju tirpalu. „Tuščias“ mėginys naudotas spektrofotometre nustatant nulinę padalą.

Ksilozės kalibracinės tiesės sudarymas. Į mėgintuvėlius pagal proporcijas supilstomi reagentai: ksilozės (1 mg/ml) tirpalas, acetatinis buferis, DNS reagentas (1 ml), bendras reakcijos mišinio tūris – 2 ml. Mėgintuvėliai 5 min. pamerkti į verdantį vandenį. Po kaitinimo greitai atvėsinti ir praskiesti su 6 ml distiliuotovandens. Mėgintuvėlių turinys sumaišomas ir spektrofotometru išmatuota šviesos spindulio sugertis tiriamuoju tirpalu. Tyrimo metu gauta kalibracinė tiesė pateikta 2 priede (žr. 2 priedas 4 pav.).

Fitazinis aktyvumas. Raugų fitazinis aktyvumas nustatytas pagal 2.2 skyrelyje pateiktą metodiką.

Fermento ekstrakto paruošimas. 5±0,01 g mėginio 10 min. homogenizuota su 50 ml acetatinio buferio (0,2 M, pH 5,5), paruoštas mėginys filtruotas.

Visi fermentiniai aktyvumai apskaičiuoti tiriamuosiuose rauguose perskaičiuoti į AV/g pagal 7 formulę:

$$AV / g = \frac{AV / ml}{g / ml} \quad (7)$$

2.4.3. PRB skaičiaus nustatymas.

PRB skaičius nustatomas pagal LST ISO 15214:2009 [87]. Atsverta 10 g mėginio, kuris sumaišytas su 90 ml skiediklio (0,9 % NaCl tirpalas, sterilizuotas 15 min. 121 °C temperatūroje) ir paruoštas pirmasis skiedinys. Tuomet 1 ml pirmojo skiedinio perkelta į mėgintuvėlį su 9 ml skiediklio ir gaunamas antrasis skiedinys. Tyrimo metu pagaminti 8 skiediniai, kiekvieno mėginio. Į Petri lėkšteles buvo perkelti 5–8 skiedinių mėginiai. 1 ml skiedinio sumaišytas su ~20 ml terpės. PRB skaičiui nustatyti buvo naudojamas MRS agaras ruoštas pagal gamintojo rekomendacijas, terpė sterilizuota 15 min. 121 °C temperatūroje. Petri lėkštelės inkubuotos 30 °C temperatūroje, anaerobinėmis sąlygomis. Tyrimams atrinktos Petri lėkštelės, kuriose išaugusių kolonijų daugiau nei 30, bet mažiau nei 300. Išaugusios kolonijos buvo suskaičiuotos po 2 dienų. Kolonijas sudarančių vienetų (KSV) skaičius 1 g produkto nustatomas pagal 8 formulę:

$$KSV/g = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) d} \quad (8)$$

čia: Σc – suma kolonijų, suskaičiuotų ant visų vertinimui atrinktų lėkštelių; n_1 – skaičius pirmojo skiedimo lėkštelių, kuriuose buvo suskaičiuota nuo 10 iki 300 kolonijų; n_2 – skaičius antrojo skiedimo lėkštelių, kuriuose buvo suskaičiuota nuo 10 iki 300 kolonijų; d – skiedinio koeficientas, atitinkantis pirmąjį skiedinį, kurio lėkštelės buvo atrinktos kolonijoms skaičiuoti.

2.5. PRB antimikrobinio poveikio rauguose fermentacijos metu nustatymas

***B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporų suspensijos paruošimas.** Kultūra auginta Petri lėkštelėse ant „Nutrient“ agaro ((Liofilchem, Italija) susidedančio iš: 5 g/l peptono, 3 g/l jautienos ekstrakto, 15 g/l agaro) 24 val., po to surinkta į sterilų distiliuotą vandenį ir kaitinta 80 °C temperatūroje 15 min. Sporų skaičius paruoštoje suspensijoje buvo ~10⁶ KSV/ml.

Pieno rūgšties bakterijų paruošimas. PRB buvo saugotos minus 70 °C temperatūroje 25 % glicerolio tirpale. Į MRS sultinį persėta kultūra auginta termostate 24 val. 30 °C temperatūroje.

Raugų paruošimas. Antimikrobinis PRB poveikis duonos rauguose fermentacijos metu indikatoriniams mikroorganizmams buvo vertintas dvejopai.

Pirmuoju atveju raugai ruošti 70 % drėgčio. Sterilizuoti miltai (kvietiniai visų grūdo dalių (KAUNO GRŪDŲ pilno grūdo kvietiniai miltai), kukurūzų ir ryžių miltai) buvo sumaišyti su steriliu vandeniu bei atrinktomis ir šviežiais padaugintomis pieno rūgšties bakterijomis *L. farraginis* 206 ir *L. curvatus* 51 (įneštas kiekis: 10⁷ KSV/g raugo). Raugai apkrėsti sporas formuojančiomis bakterijomis *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (įneštas kiekis: 3,9·10⁵ KSV/g raugo). Fermentacija vykdyta pieno rūgšties bakterijoms palankioje temperatūroje 30 °C 48 val.

Antruoju atveju raugai ruošti 65 % drėgčio sumaišant miltus, sterilizuotus 121 °C temperatūroje 15 min. ir sterilų vandenį bei PRB (*Lactobacillus curvatus* 51) kultūrą. Raugas su PRB fermentuotas 24 val. po to apkrėstas su *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporomis (10² KSV/g). Tuomet raugas dar fermentuotas 48 val. kas 24 val. vertinant PRB ir *B. subtilis* subsp. *spizizenii* kiekius jame.

Bakterijų skaičiaus rauguose nustatymas. PRB skaičiaus nustatymas pateiktas 2.4.3 skyriuje. *B. subtilis* subsp. *spizizenii* skaičiaus nustatymas atliktas analogiškai. Pieno rūgšties bakterijų skaičiui nustatyti naudota MRS mitybinė terpė, o mikroorganizmai auginti anaerobinėmis sąlygomis naudojant „Anaerogen Oxoid“ anaerobinius maišelius. Lėkštelės su pasėliais inkubuotos 3 paras 30

°C temperatūroje. *B. subtilis* subsp. *spizizenii* skaičiaus nustatymui naudota „Nutrient“ mitybinė terpė. Lėkštelės su pasėliais inkubuotos 2 paras 30 °C temperatūroje. Buvo atlikta kontrolė patikrinant ar „Nutrient“ terpėje auga PRB, kadangi PRB neaugo, terpė parinkta, kaip tinkama įvertinti *B. subtilis* subsp. *spizizenii* skaičių.

2.6. Raugų, fermentuotų su pieno rūgšties bakterijomis, antimikrobinio poveikio tyrimai

PRB ir *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporų suspensijos paruošimas. Pieno rūgšties bakterijos ir *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporų suspensijos ruošimas pateiktas 2.5 skyriuje.

Raugų ruošimas. Tyrimo metu raugai buvo ruošti dvejopai.

Pirmuoju atveju sterilūs kvietiniai visų grūdo dalių miltai buvo fermentuoti su *L. curvatus* 51 paderme 48 val. (išlaikant analogišką raugo gamybos būdą pateiktą 2.5 skyriuje antruoju atveju).

Antruoju atveju buvo vertinti raugų, neturinčių glitimo baltymų, antimikrobinis poveikis. Šiuo atveju 121 °C temperatūroje 15 min. sterilizuoti miltai (kukurūzų ir ryžių) sumaišomi su steriliu vandeniu ir pieno rūgšties bakterijų suspensijomis (*Lactobacillus curvatus* 51, *Lactobacillus farraginis* 206 ir *Lactobacillus sanfranciscensis* W2) paruošiant 65 % drėgnio raugus. Raugai fermentuoti 72 val. 30 °C temperatūroje.

Antimikrobinio poveikio nustatymas. Paruošiamos Petri lėkštelės su $\sim 10^5$ KSV/ml *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporomis „Nutrient“ agare. Ant sustingusio agaro įterpiamas raugas ir užliejamas papildoma mitybine terpe su indikatorinių mikroorganizmų sporomis. Antimikrobinis poveikis vertintas po 24 val. inkubacijos 30 °C temperatūroje. Tyrimo metu buvo vertinta skaidri zona aplink į terpę įterptą raugą.

Raugų aktyviojo rūgštingumo ir bendrojo titruojamojo rūgštingumo (BTR) nustatymas. pH ir BTR nustatymo metodai pateikti 2.4.1 skyriuje.

2.7. Duonos be glitimo gamyba ir tyrimai

2.7.1. Duonos be glitimo gamyba naudojant raugus

Kvietiniuose kepinuose panaudojus 20 % raugo matomas žymus jo poveikis, tačiau kepinuose be glitimo reikšmingo skirtumo nepastebima [25]. Kiti tyrėjai grikių ir sorų miltų kepinuose naudojo apie 80% raugo, fermentuoto naudojant skirtingas PRB padermes [88]. Atsižvelgiant į tai gamintiems kepiniams buvo naudojamas skirtingas raugų kiekis (0, 20, 40, 60 ir 80 %) norint įvertinti raugo kiekio įtaką tešlos ir kepinų savybėms.

Tyrimo metu gaminta duona be glitimo praturtinta kanapėmis (lot. *Cannabis sativa* L.), čija sėklomis (lot. *Salvia hispanica*) ir bolivine balanda (lot. *Chenopodium quinoa*). Receptūra pateikta 6 lentelėje. Vandens kiekis tešlai buvo parinktas pagal Moore ir bendraautorius [89].

Kepinių gamyba. Tešla ruošta žaliavas maišant 5 min. lėtuju režimu (ELBA 7 W NEW maišykle). Paruošta tešla išdalinama į formeles po 500 g, ruošiniai kildinami 30 min., 35 °C esant 85 % sant. oro drėgnumui kildinimo kameroje (MIWE, Vokietija). Kildinimo sąlygos buvo parinktos pagal Moore ir bendraautorius [89]. Kepama 220 °C, 40 min. padinėje kepimo krosnyje (MIWE condo, Vokietija). Iškepę kepiniai aušinami aplinkos temperatūroje 24 val.

5 lentelė. Tyrimo metu gamintos duonos be glitimo praturtintos kanapėmis, čija sėklomis ir bolivine balanda receptūra (kontrolinis kepinys)

Žaliava	Kiekis, g
Miltai:	
Kukurūzų miltai	40
Ryžių miltai	40
Kukurūzų krakmolos	20
Viso miltų:	100
Saulėgrąžos	20
Kanapės	20
Bolivinė balanda	10
Čija	10
Druska	1,80
Cukrus	1,14
Sausos mielės	2,00
Aliejus	11,00
Vanduo	105,14

2.7.2. Duonos be glitimo gamyba naudojant fermentuotus sėklų produktus

Kepiniai su fermentuotomis sėklomis buvo ruošiami dvejopai. Pirmuoju atveju (žr. 6 lent.) gaminti gaminiai naudojant fermentuotų sėklų produktus, kurių sumaltų sėklų kiekis patenkantis į tešlą sudarė 5 % bendros miltų masės, kas atitiko 30,9, 27,2, 31,6 % fermentuotų čija, kanapių ir bolivinių balandų produktų. Norint įvertinti nefermentuotų smulkintų sėklų įtaką kepinių kokybei pagaminti kontroliniai kepiniai naudojant tokį patį nefermentuotų sėklų kiekį patenkantį į tešlą.

6 lentelė. Duonos be glitimo gamybos receptūra su fermentuotų sėklų produktais.

Žaliavos	Kiekis, g		
	Kontrolė I (be sėklų produktų)	Kontrolė II su nefermentuotais sėklų produktais	Kepiniai su fermentuotais sėklų produktais
Miltai:			
Kukurūzų miltai	40	37,5	37,5
Ryžių miltai	40	37,5	37,5
Kukurūzų krakmolos	20	20	20
Sėklų miltai*	-	5**	5
Viso miltų:	100		
Druska	1,80		
Cukrus	1,14		
Sausos mielės	2,00		
Aliejus	11,00		
Vanduo	105,14		

*čija, kanapių arba bolivinių balandų miltai; **nefermentuoti sėklų miltai.

Antruoju atveju duonos, neturinčios glitimo baltymų, receptūroje buvo naudojamos skirtingos vertingos sėklos, kurių dalis buvo pakeista fermentuotomis sėklomis (5 % nuo miltų masės). Gaminių receptūra pateikta 7 lentelėje.

7 lentelė. Duonos be glitimo receptūra su įvairiomis sėklomis ir fermentuotu sėklų produktu

Žaliavos	Kiekis, g			
	Kontrolė	Fermentuotų čija sėklų produktas	Fermentuotų kanapių sėklų produktas	Fermentuotų bolivinių balandų produktas
Miltai:				
Kukurūzų miltai	40			
Ryžių miltai	40			
Kukurūzų krakmolai	20			
Viso miltų:	100			
Saulėgrąžos	20			
Kanapės	20	20	20	15
Bolivinė balanda	10	10	5	10
Čija	10	5	10	10
Fermentuotos sėklos	-	5	5	5
Druska	1,80			
Cukrus	1,14			
Sausos mielės	2,00			
Aliejus	11,00			
Vanduo	105,14			

Kepinių gamyba pateikta 2.7.1 skyriuje

2.7.3. Kepinių ir pusgaminių kokybės įvertinimas

Tešlų kokybės rodikliai nustatyti prieš tešlos fermentaciją. Tai buvo pasirinkta atsižvelgiant į kitų tyrėjų gautus rezultatus, kurie nustatė, jog vykdant tešlos rauginimą 40 min. su 80 % raugo prieš ir po fermentacijos gauti rezultatai daugeliu atveju esminio skirtumo neturėjo, dėl trumpos rauginimo trukmės [88]. Kepinių kokybės rodikliai nustatyti praėjus 24 val. po kepimo.

Tešlos ir kepinio minkštimo aktyviojo rūgštingumo nustatymas. Tešlos ir duonos gaminių minkštimo pH vertės nustatytos 5 g medžiagos grūstuvėlyje sumaišant su 50 ml distiliuoto vandens ir vertes išmatuojant su pH-metru (PP – 15, Sartorius AG, Vokietija).

Titruojamasis rūgštingumas. Bendrasis kepinio minkštimo ir tešlos titruojamasis rūgštingumas nustatytas pagal metodą pateiktą 2.4.1 skyriuje.

Kepinio savitasis tūris. Savitais tūris apskaičiuojamas pagal tūrio ir masės santykį, cm^3/g [90].

Minkštimo akytumas. Naudojant Žuravliovo prietaiso cilindą išpjauti žinomo tūrio minkštimo mėginiai, kurie vėliau pasverti ir apskaičiuotas akytumas (%) [91].

Juslinis vertinimas. Tyrimo metu buvo vertintos duonos gaminių, gamintų su skirtingais PRB raugais ir jų kiekiais taip pat su fermentuotų sėklų produktais, juslinės savybės. Juslinių savybių intensyvumas ir bendrasis priimtinumumas buvo įvertinti 7 kategorijų skalėje (kur 1 – silpniausias, o 7 – stipriausias).

Raugų įtakos kepinų mikrobiologiniam gedimui vertinimas. Iškepti ir atvėsę duonos mėginiai buvo sudėti į polietileningus maišelius ir laikyti kambario temperatūroje (18–20 °C). Vizualiai įvertinant kepinų mikrobiologinio gedimo pirmuosius požymius.

Duonos minkštimo ir tešlos kietumo nustatymas. Tešlos ir duonos minkštimo, gamintos su fermentuotais sėklų produktais, kietumas nustatytas naudojant tekstūros analizatorių TA.XT plus (Stable Micro System, UK). Naudojant SMS P/20 darbinį kūną, kurio įsiskverbimas į gaminį buvo 10 mm. Duonos gaminiai buvo supjaustyti 20 mm storio riekėmis, o tešlos masė 50 g.

Duonos minkštimo ir fermentuotų produktų drėgno nustatymas. Į biuksus pasveriamas mėginys ir džiovinamas džiovinimo krosnyje 105 °C temperatūroje iki pastovios 0,001 g tikslumo masės. Iš gauto mėginio masės sumažėjimo apskaičiuojamas drėgnis.

Duonos minkštimo žiedėjimo rodiklio nustatymas. Minkštimo žiedėjimo rodiklis nustatomas pagal 9 formulę [14].

$$\text{Žiedėjimo rodiklis} = \frac{\text{kietumas}(\text{diena 4}-\text{diena 1})}{\text{kietumas diena 1}} \quad (9)$$

2.8. Matematinė statistinė duomenų analizė

Eksperimentai buvo kartoti 2–3 kartus, iš gautų rezultatų išvesti vidurkiai ir apskaičiuoti standartiniai nuokrypiai naudojant „Excel“ programinę įrangą. Rezultatų palyginimui naudotas Welch‘ s dvipusis t-testas. Vidutinių verčių reikšmės pažymėtos tokiomis pat raidėmis parodo, kad nėra esminių skirtumų ($p \leq 0,05$). Vertinant tešlų ir kepinų savybes rezultatai pažymėti „*“ rodo, jog yra esminis skirtumas lyginant su kontroliniu mėginiu ($p \leq 0,05$).

3. Rezultatai

3.1. Pieno rūgšties bakterijų fermentinio ir antimikrobinio aktyvumo savybės

3.1.1. Pieno rūgšties bakterijų metabolizmo produktų antimikrobinės savybės

Atsižvelgiant į PRB panaudojimo galimybes mikrobiologinio gedimo lėtinimui iširta 13-os PRB padermių antimikrobinis aktyvumas indikatoriniams mikroorganizmams ir mikroskopinių grybų sporų susidarymui. Gauti PRB antimikrobinų savybių rezultatai pateikti 8 lentelėje.

8 lentelė. PRB metabolitų poveikis indikatoriniams mikroorganizmams

PRB		<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	Po 3 dienų (augimui)				Po savaitės (sporuliacijai)			
			<i>F. solani</i>	<i>Penic. verrucosum</i>	<i>F. poae</i>	<i>A. niger</i>	<i>F. solani</i>	<i>Penic. verrucosum</i>	<i>F. poae</i>	<i>A. niger</i>
<i>Leuc. mesenteroides</i> 242	R	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-
	N	+/-	-	+++	-	-	-	-	-	-
<i>L. uvarum</i> 245	R	+++	-	-	-	-	-	+/-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
<i>L. sanfranciscensis</i> MR29	R	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
<i>L. sanfranciscensis</i> MW15	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. rossiae</i> M2	R	++	-	+/-	-	-	-	-	-	-
	N	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
<i>L. rossiae</i> GL14	R	-	-	+/-	-	-	+/-	++	-	-
	N	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
<i>L. sanfranciscensis</i> W2	R	+	-	+/-	-	-	-	+/-	+/-	-
	N	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
<i>L. frumenti</i> H10	R	+++	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
	N	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
<i>L. crustorum</i> W19	R	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
	N	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
<i>L. sanfranciscensis</i> MR24	R	++	-	+/-	+-	-	-	+/-	-	-
	N	-	-	+/-	+-	-	-	+/-	-	-
<i>L. brevis</i> R26	R	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
	N	-	-	+++	-	-	-	+/-	-	-
<i>L. farraginis</i> 206	R	+++	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-
	N	++	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-
<i>L. curvatus</i> 51	R	+++	-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-
	N	-	-	+/-	-	-	-	-	+	-

„R“ – antimikrobinis aktyvumas, kuriam įtakos turėjo susidarę metabolizmo produktai (organinės rūgštys ir kt.); „N“ – antimikrobinis aktyvumas, kuriam įtakos turėjo neutralizuoti metabolizmo produktai; „-“ – nepasizymėjo antimikrobinėmis savybėmis; „+/-“ – nežymiai pasizymėjo antimikrobinėmis savybėmis (augimo slopinimo dydis agaro

lėkštelėje 1–2 mm); „+“ – pasižymėjo vidutinėmis antimikrobinėmis savybėmis (augimo slopinimo dydis agarų lėkštelėje 2–4 mm); „++“ – gerai pasižymėjo antimikrobinėmis savybėmis (augimo slopinimo dydis agarų lėkštelėje 4–8 mm); „+++“ – labai gerai pasižymėjo antimikrobinėmis savybėmis (augimo slopinimo dydis agarų lėkštelėje >8 mm).

Difuzijos į agarą metodu buvo vertinta antimikrobinės PRB metabolizmo produktų: (i) visų metabolitų, įskaitant susidariusias organines rūgštis (R) ir (ii) neutralizuotų metabolizmo produktų (N) savybės indikatoriniams mikroorganizmams, sukeliantiems duonos gaminių gedimą. Geriausiomis antimikrobinėmis savybėmis (baktericidinėmis) prieš *B. subtilis* subsp. *spizizenii* pasižymėjo *L. farraginis* 206 ir *Leuc. mesenteroides* 242. *B. subtilis* subsp. *spizizenii* augimą slopino ne tik metabolizmo produktai, tokie kaip organinės rūgštys, bet ir neutralizuoti metabolizmo produktai, iš kurių buvo pašalintas organinių rūgščių poveikis. Taip pat geromis antibakterinėmis savybėmis prieš *B. subtilis* subsp. *spizizenii* pasižymėjo *L. uvarum* 245, *L. frumenti* H10, *L. curvatus* 51, tačiau šios PRB gerus rezultatus rodė tik veikiant jų metabolizmo produktams, kurie nebuvo neutralizuoti.

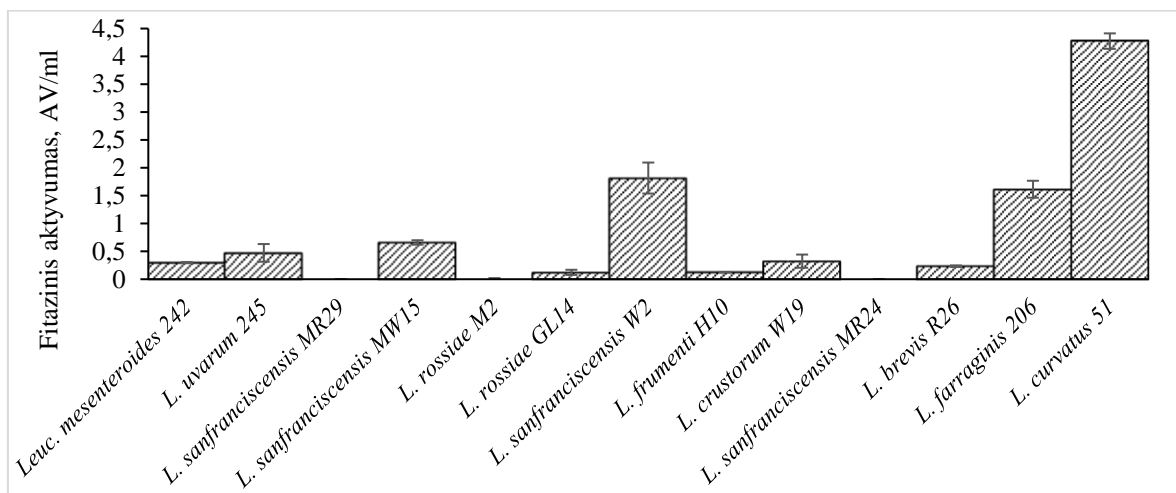
Vertinant PRB metabolitų poveikį mikroskopiniams grybams buvo nustatytas jų augimas po trijų dienų (poveikis augimui) ir po savaitės (poveikis sporų susidarymui). Nei viena iš tirtų PRB neslopino *F. solani* augimo, tačiau *L. rossiae* GL14, *L. farraginis* 206, *L. curvatus* 51 neutralizuoti metabolizmo produktai slopino *F. solani* sporų susidarymą. Prieš *Penic. verrucosum* geromis antimikrobinėmis savybėmis (fungistatinėmis) pasižymėjo *Leuc. mesenteroides* 242 metabolizmo produktai: tiek įvairios organinės rūgštys, tiek ir neutralizuoti metabolizmo produktai. Antimikrobinėmis savybėmis prieš *Penic. verrucosum* pasižymėjo *L. rossiae* M2, *L. rossiae* GL14, *L. sanfranciscensis* W2, *L. sanfranciscensis* MR24, *L. frumenti* H10, *L. crustorum* W19, *L. curvatus* 51 ir *L. brevis* R26 veikiant šių PRB metabolizmo produktais ir neutralizuotais metabolizmo produktais. *Penic. verrucosum* sporų susidarymą stipriausiai slopino *L. rossiae* GL14, o *L. uvarum* 245, *L. sanfranciscensis* MR29, *L. sanfranciscensis* W2, *L. frumenti* H10, *L. crustorum* W19, *L. sanfranciscensis* MR24, *L. curvatus* sporų susidarymą slopino kiek mažiau. *L. farraginis* 206 ir *L. brevis* R26 pasižymėjo silpnomis antimikrobinėmis savybėmis prieš *Penic. verrucosum* po savaitės veikiant neutralizuotais metabolizmo produktais. *F. poae* augimą slopino tik *L. sanfranciscensis* MR24, o sporų susidarymą slopino *L. sanfranciscensis* W2, *L. farraginis* 206 ir *L. curvatus* 51. Prieš *A. niger* antimikrobinėmis savybėmis nepasižymėjo nei viena iš tirtų PRB padermių.

Literatūros duomenimis *Leuc. mesenteroides* pasižymi tuo, jog išskiria bakteriociną vadinamą mesenterociną. Nustatyta, jog daugiausiai jo išskiria po 8 val. kultivavimo, kai terpės pH vertė yra 5,5, o bakterijų ląstelių kiekis $8 \cdot 10^8$ KSV/ml. H. Daba ir kt. mokslininkų atlikto tyrimo duomenimis šis bakteriocinas buvo efektyvus naudojant jį prieš *Listeria spp.* [92]. *L. sanfranciscensis* bakterijos išskiria įvairias organines rūgštis, pasižyminčias antimikrobinėmis savybėmis, daugiausiai prie šių savybių prisideda heksano rūgštis, kuri mažina pelėsių augimą. Corsetti ir kt. ištyrė įvairias PRB išskirtas iš kvietinio raugo, tačiau tik nedaugelis pasižymėjo antibakterinėmis savybėmis, tarp jų buvo ir viena iš *L. sanfranciscensis* padermių [80]. Larsen ir kt. buvo pirmieji ištyrę PRB, išskirtas iš skirtingų raugų, tyrimo metu ne visos bakterijos pasižymėjo šiomis savybėmis, tačiau tarp pasižymėjusių buvo *L. curvatus*. Nustatyta, kad šios PRB išskiria bakteriociną bavariciną A [80].

3.1.2. Pieno rūgšties bakterijų fitazinis aktyvumas

Specialus dėmesys skiriamas fito rūgščiai, tai pagrindinė fosforo saugojimo forma augaluose, sudaranti 50–85 % viso fosforo. Fito rūgštis nėra lengvai pasisavinami ir sudaro antitybinius junginius [93]. Įvairių tyrimų metu vykdant PRB fermentaciją, skirtinguose grūdų produktuose,

tokiuose kaip kukurūzų, sorgų, rausvosios pirštūnės, buvo nustatyta, jog PRB veikla gali efektyviai sumažinti fito rūgštis, taninų kiekį ir pagerinti baltymų pasisavinamumą [94]. Atsižvelgiant į tai buvo nustatytas PRB fitazinis aktyvumas, kadangi fitazės katalizuoja fitatų hidrolizę, ko pasekoje suardomi fitatų kompleksai ir atpalaiduojamos mineralinės medžiagos [93]. Tyrimo metu gauti PRB fitazių aktyvumai pateikti 1 paveiksle.



1 pav. PRB fitazinis aktyvumas

Didžiausiu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo *L. curvatus* 51 (4,27 AV/ml), taip pat lyginant su kitomis tirtomis bakterijomis dideliu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo ir *L. sanfranciscensis* W2 (1,82 AV/ml) bei *L. farraginis* 206 (1,62 AV/ml). *L. sanfranciscensis* MR29, *L. sanfranciscensis* MR24 ir *L. rossiae* M2 fitaziniu aktyvumu nepasižymėjo.

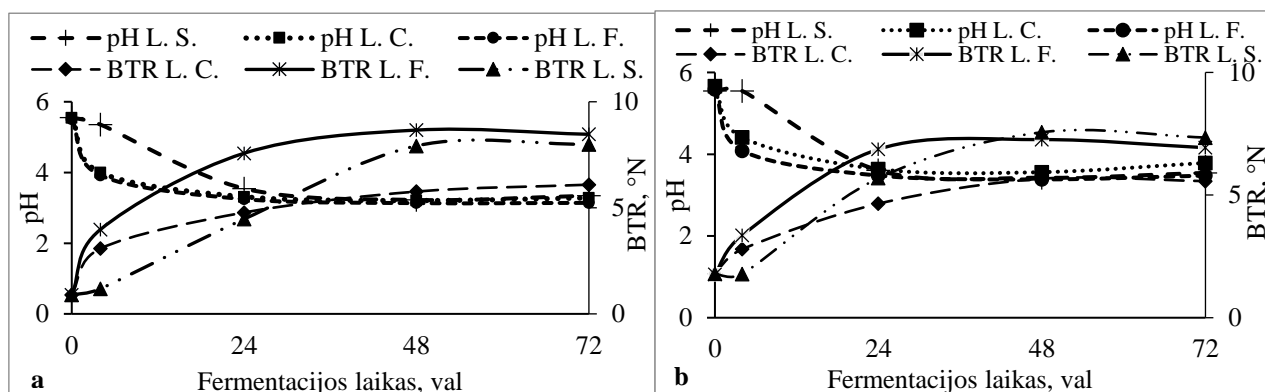
Literatūros duomenimis fitazinis aktyvumas daugiausiai priklauso nuo PRB padermės. M. de Angelis ir kt. [95] ištyrė vienuolika *L. sanfranciscensis* padermių, devynių iš jų fitazinis aktyvumas buvo 217–420 AV/ml, o vienos padermės mažesnis nei 10 AV/ml (7,6 AV/ml). T. Zotta ir kt. [96] ištyrė 41-os PRB fitazinį aktyvumą (*L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *Leuc. mesenteroides*, *Weissella cibaria* padermių), tarp tirtų PRB dideliu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo *Leuc. mesenteroides* ir *L. curvatus*. Kiti tyrėjai nustatė iš spontaninių raugų išskirtų PRB fitazinį aktyvumą. Tarp jų buvo *L. curvatus*, *L. brevis* ir *Leuc. mesenteroides*, kurios fitaziniu aktyvumu pasižymėjo priklausomai nuo substrato (fito rūgštis kalcio ir natrio druskos) [97]. Kitame tyrime 44-ių PRB išskirtų iš bolivinių balandų, fitazinis aktyvumas buvo nuo 7±2 iki 957±25 AV/ml priklausomai nuo PRB padermės, tačiau 6-ios PRB fitaziniu aktyvumu nepasižymėjo [98].

Atlikus PRB antimikrobinio aktyvumo ir fitazinio aktyvumo tyrimus buvo atrinktos trys PRB (*L. curvatus* 51, *L. farraginis* 206, *L. sanfranciscensis* W2) iš kurių ruošti ryžių ir kukurūzų miltų raugai. Šios bakterijos pasižymėjo didžiausiu fitaziniu aktyvumu (*L. curvatus* 51, *L. farraginis* 206, *L. sanfranciscensis* W2). Taip pat šios PRB pasižymėjo antimikrobinio poveikiu kai kuriems mikroskopiniams grybams ir *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporoms.

3.2. Pieno rūgšties bakterijų įtaka duonos raugų, ruošų iš kukurūzų ir ryžių miltų, kokybės rodikliams

3.2.1. Raugų pH ir BTR pokyčiai fermentacijos metu

Raugų fermentacija priklauso nuo mikrofloros kompozicijos ir fermentacijos sąlygų. Raugų mikroflora dažniausiai susideda ne tik iš PRB, bet ir iš mielių, todėl šių mikroorganizmų sąveika rauguose yra svarbi metaboliniam jų aktyvumui [99]. Rūgščių susidarymas turi įtakos tirpiems struktūrą formuojantiems komponentams, tokiems kaip krakmolai, arabinoksilanai, ir teigiamai veikia javų endogeninių fermentų aktyvumą [25]. Atsižvelgiant į tai buvo nustatyti raugų, ruošų su atrinktomis PRB (*L. farraginis* 206, *L. sanfranciscensis* W2, *L. curvatus* 51), vandenilio jonų aktyvumas (pH) ir bendrasis titruojamasis rūgštingumas (BTR) skirtingose kukurūzų ir ryžių miltų raugų ruošimo (gausinimo) stadijose, gauti rezultatai pateikti 2 paveiksle.



2 pav. Ryžių (a) ir kukurūzų (b) miltų raugų pH verčių ir BTR, pokyčiai skirtinguose raugų gamybos etapuose. Čia: L.S – *L. sanfranciscensis* W2; L.C – *L. curvatus* 51; L.F – *L. farraginis* 206

Fermentacijos metu ryžių miltų raugų pH vertės kito nuo 5,55 iki 3,13, o kukurūzų miltų pH vertės kito nuo 5,66 iki 3,38. Mažiausia raugo pH vertė buvo pasiekta po III-jo gausinimo etapo (t.y. po 48 val. fermentacijos). Raugų pH ir BTR vertės priklausė nuo naudotos PRB padermės ir miltų rūšies. Mažiausia pH vertė po 72 val. fermentacijos (3,14) tarp ryžių miltų raugų, buvo gauta fermentacijai naudojant *L. farraginis* 206, o didžiausia pH vertė (3,34) buvo raugo, ruošto su *L. sanfranciscensis* W2. Mažiausia pH vertė (3,48) iš kukurūzų miltų raugų buvo raugo, kurio fermentacijai naudota *L. farraginis* 206, o didžiausia pH vertė (3,79) buvo raugo, kurio fermentacijai naudota *L. curvatus* 51.

Fermentacijos metu ryžių miltų BTR kito nuo 0,90 iki 8,67 °N, o kukurūzų miltų raugų BTR kito nuo 1,80 iki 7,56 °N. Didžiausias BTR rauguose pasiektas III-ame raugų gausinimo etape, išskyrus vieno raugo, gaminto su ryžių miltais ir fermentuoto naudojant *L. curvatus* 51, kurio BTR paskutiniame IV-tame etape buvo 6,09 °N, o III-ame etape – 5,77 °N. Iš ryžių miltų ruošų raugų didžiausias BTR po 72 val. fermentacijos (8,46 °N) buvo raugo, kurio fermentacijai naudota *L. farraginis* 206, o mažiausias raugo, kurio fermentacijai naudota *L. curvatus* 51. Tarp kukurūzų miltų raugų didžiausias BTR (7,34 °N) buvo raugo, kurio fermentacijai naudotos *L. sanfranciscensis* W2 pieno rūgšties bakterijos, o mažiausias BTR (5,57 °N) buvo raugo, fermentuoto su *L. curvatus* 51 pienarūgštėmis. Sumažėjusiam BTR ir padidėjusiai pH vertei, paskutiniame gausinimo etape, įtakos galėjo turėti sumažėjęs raugo drėgmės kiekis (didesnis miltų kiekis pateko į raugą lyginant su ankstesniais gausinimais). Raugo rūgštėjimui įtakos turi jo drėgnis, nustatyta, jog kuo skystesnis raugas tuo greičiau didėja jo rūgštingumas. Esant didesniai drėgmės kiekiui greičiau vyksta organinių rūgščių difuzija į terpę [60, 100].

Iš rezultatų matyti, jog mažesnės pH vertės ir didesnis BTR buvo raugų, kurių gamyboje naudoti ryžių miltai. Ryžių miltuose angliavandenių yra apie 80,1 g/100g, o kukurūzų miltuose 70 g/100g, šis angliavandenių skirtumas, esantis miltuose, galėjo turėti įtakos terpės rūgštėjimui. Pagrindinis faktorius lemiantis terpės pH mažėjimą yra fermentuojamų angliavandenių kiekis. Dažniausiai PRB fermentuoja pentozes, heksozes, sacharozę ir maltozę, taip pat, kai kurios rūšys tokios kaip *L. sanfranciscensis*, pasižymi specifiskumu maltozei [99].

L. sanfranciscensis pieno rūgšties bakterijos, išskirtos iš duonos raugų, charakterizuojamos kaip turinčios ilgą uždelstą augimo fazę bei gebančios išskirti didelį rūgščių kiekį ir yra tolerantiškos rūgštinei aplinkai [101]. Iš gautų rezultatų matome, jog raugai, fermentuoti naudojant *L. sanfranciscensis* W2, lyginant su kitų PRB padermių raugais pasižymėjo lėtesniu pH mažėjimu pirmosiomis fermentacijos valandomis.

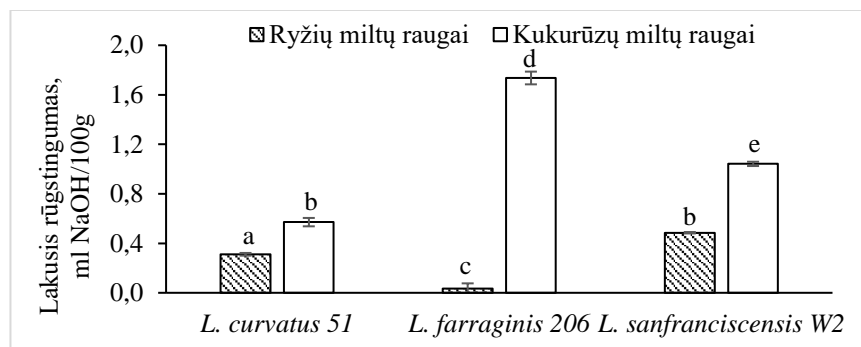
Literatūros duomenis raugų pH ir BTR vertės priklauso tiek nuo naudojamos PRB padermės tiek nuo miltų bei fermentavimo laiko. C. Axel ir bendraautoriai [79] nustatė, jog ryžių miltų raugų, fermentuotų su *Lactobacillus reuteri* R29 bei *Lactobacillus brevis* R2 ir L1105, pH vertės buvo 3,56–3,69, o BTR buvo 10,5–15 °N, priklausomai nuo naudotos PRB padermės. C. Mereoth ir kt. [102] nustatė pramoninių ryžių miltų raugų pH vertes („motininio“ raugo bei pagausintų raugų po 3 ir 5 fermentavimo dienų), kurios buvo 3,7–4,0. S. A. Vogelmann ir kt. [103] nustatė kukurūzų ir ryžių miltų raugų, fermentuotų naudojant skirtingas PRB 24 val., pH vertes. Ryžių miltų raugų pH vertės buvo 3,6–3,7, o kukurūzų miltų raugų – 3,5–3,8. L. Scarnato ir kt. [104] nustatė, jog ryžių ir kukurūzų miltus fermentuojant su *L. sanfranciscensis* ir *Candida milleri*, ryžių raugo pH vertė pakinta nuo 6,12 iki 3,43, o kukurūzų miltų pH pokytis yra nuo 5,58 iki 3,38. A. T. Falade ir bendraautoriai [105] nustatė kukurūzų miltų raugų pH vertes. Raugo, fermentuoto su *L. plantarium* 24 val., pH vertė buvo 3,3–3,6. Kitų tyrėjų atlikto tyrimo metu kukurūzų miltų fermentavimui naudojant skirtingas pieno rūgšties bakterijas raugų pH vertės nuo 5,62 sumažėjo iki 3,05–3,37 priklausomai nuo naudotos PRB (fermentacija vykdyta 28±2 °C, 12 val.). Taip pat buvo vykdyta spontaniinė fermentacija, jos metu galutinė raugo pH vertė buvo 3,71 [106]. L. Setanis ir bendraautoriai [107] ištyrė kvietinių raugų, fermentuotų skirtingomis PRB kultūromis 21 val., pH ir BTR vertes, nustatyta, jog raugų pH vertės buvo nuo 3,59 iki 4,14, o BTR – nuo 5,00 iki 8,40 °N. Kiti tyrėjai nustatė ruginių miltų raugų pH vertes, kurios buvo 3,84–4,11, o BTR – 12,8–14,1 °N [108].

3.2.2. PRB įtaka lakiajam rūgštingumui ir pieno rūgšties susidarymui rauguose

PRB fermentuoja maltozę, gliukozę susidarant pieno rūgščiai, jei tai homofermentinis metabolizmas, esant heterofermentiniam metabolizmui kartu su pieno rūgštimi susidaro CO₂, acto rūgštis ir (ar) etanolis [27]. Santykis tarp pieno rūgšties ir lakiojo rūgštingumo (acto rūgšties) yra svarbus faktorius prisidedantis prie galutinio duonos gaminio aromato. Be to, acto rūgštis turi didesnę poveikį nepageidaujama mikroflorai, kuri prisideda prie duonos gaminių gedimo lyginant su pieno rūgštimi [99]. Atsižvelgiant į tai nustatytas raugų lakusis rūgštingumas, rezultatai pateikti 3 paveiksle.

Lakusis rūgštingumas buvo didesnis kukurūzų miltų rauguose nei ryžių miltų rauguose (žr. 3 pav.). Ryžių miltų rauguose didžiausias lakusis rūgštingumas (0,49 ml NaOH/100g) buvo rauge, kurio fermentacijai naudota *L. sanfranciscensis* W2, o mažiausias (0,03 ml NaOH/100g) nustatytas rauge, fermentuotame su *L. farraginis* 206.

Kukurūzų miltų rauguose didžiausias lakusis rūgštingumas (1,74 ml NaOH/100g) buvo nustatytas rauge, fermentuotame su *L. farraginis* 206, o mažiausias (0,57 ml NaOH/100g) buvo rauge, kurio fermentacijai naudota *L. curvatus* 51.



3 pav. PRB įtaka lakiajam rūgštingumui rauguose

Akihito Endo ir Sanae Okada [109] savo tyrimuose aprašė *L. farraginis* kaip heterofermentines bakterijas, kurios išskiria pieno rūgštį, anglies dioksidą ir etanolį ar acto rūgštį iš D-gliukozės. *L. curvatus* 51 yra homofermentinė PRB [110], todėl šios bakterijos neišskiria acto rūgšties, tačiau fermentacijos metu susidariusios rūgšties kiekį galėjo nulemti miltuose esanti mikroflora, kurios miltuose galima aptikti $2 \cdot 10^4$ – $6 \cdot 10^6$ KSV/g [59]. *L. sanfranciscensis* yra obligatinė heterofermentinė bakterija, šios bakterijos gamina ne tik pieno rūgštį, bet ir išskiria acto rūgštį vykstant fermentacijos procesui [111].

Pieno rūgštis natūraliai randama dvejuose izomeruose kaip D(-)- ir L(+)-pieno rūgštis. Maisto gaminiuose yra pageidautina L(+)-pieno rūgštis, kadangi D(-)-pieno rūgšties izomeras tam tikrais atvejais yra žalingas žmonėms, nes gali sąlygoti rūgščių susidarymą bei sumažinti kalcio kiekį kauluose [110], todėl pageidautina, kad maisto pramonėje naudojamos PRB negamintų D(-)-pieno rūgšties izomero arba gamintų nedidelius jo kiekius. Nustatyti D(-) ir L(+)-pieno rūgšties izomerų kiekiai tiriamuosiuose rauguose, o gauti rezultatai pateikti 4 paveiksle.

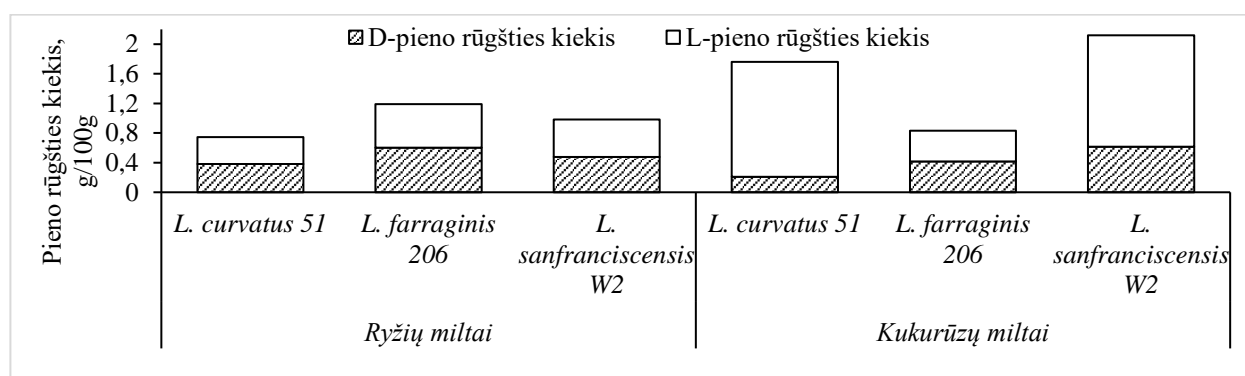
Visuose rauguose buvo nustatyti D(-) ir L(+) pieno rūgšties izomerų kiekiai. *L. curvatus* išskiria D(-)- ir L(+)-pieno rūgšties izomeras [27], šiomis bakterijomis fermentuojant ryžių miltus D(-)-pieno rūgšties (0,380 g/100g) susidarė daugiau nei L(+)-pieno rūgšties (0,367 g/100g), o kukurūzų miltuose susidarė daugiau L(+)-pieno rūgšties (1,554 g/100g) nei D(-)-pieno rūgšties (0,209 g/100g) izomero.

L. sanfranciscensis W2 pieno rūgšties bakterijomis fermentuotuose rauguose L(+)-pieno rūgšties susidarė daugiau nei D(-)-pieno rūgšties. Pieno rūgšties daugiau susidarė kukurūzų miltų rauge nei ryžių miltų rauge.

Akihito Endo ir Sanae Okada [109] nustatė, kad tirta *L. farraginis* padermė L(+)- ir D(-)-pieno rūgšties izomeras išskiria santykiu 1:1. Atlikus tyrimą pieno rūgšties izomerai rauguose ruoštuose su *L. farraginis* 206 buvo nustatyti panašiu santykiu. Nustatytas susidariusios pieno rūgšties kiekis buvo didesnis ryžių miltų rauge nei kukurūzų miltų rauge.

Lyginant ryžių miltų raugus didžiausias L(+)-pieno rūgšties izomero kiekis (0,588 g/100g) buvo nustatytas rauge, kurio fermentacijai naudota *L. farraginis* 206, o mažiausias kiekis (0,367 g/100g) buvo rauge, ruoštuose su *L. curvatus* 51. Didžiausias D(-)-pieno rūgšties izomero kiekis (0,602

g/100g) buvo raugė, fermentuotame su *L. farraginis* 206, o mažiausias kiekis (0,380 g/100g) nustatytas raugė, kurio fermentacijai naudota *L. curvatus* 51.



4 pav. PRB įtaka D(-)- ir L(+)-pieno rūgšties izomerų kiekiui rauguose

Lyginant kukurūzų miltų raugus didžiausiu L(+)-pieno rūgšties izomero kiekiu (1,554 g/100g) pasižymėjo raugus, kurio fermentacijai buvo naudotos *L. curvatus* 51 pieno rūgšties bakterijos, o mažiausias kiekis (0,418 g/100g) buvo nustatytas raugė, fermentuotame su *L. farraginis* 206. Didžiausias D(-)-pieno rūgšties izomerų kiekis (0,617 g/100g) buvo nustatytas raugė, kurio fermentacijai naudotos *L. sanfranciscensis* W2 pieno rūgšties bakterijos, o mažiausias kiekis (0,209 g/100g) nustatytas raugė, kurio fermentacijai buvo naudotos *L. curvatus* 51 pieno rūgšties bakterijos.

Literatūroje pateiktais duomenimis rūgščių susidariusių fermentacijos metu kiekis priklauso tiek nuo miltų tiek nuo PRB padermės. D. Novotni ir bendraautorai [112] nustatė miltų be glitimo (mišinys iš ryžių ir kukurūzų miltų, kukurūzų ir bulvių krakmolo, grikių miltų, cukraus), fermentuotų su *Lactobacillus fermentum*, pieno ir acto rūgšties kiekius, kurių atitinkamai buvo 0,171 ir 0,024 g/100g. Kiti tyrėjai nustatė pieno ir acto rūgšties kiekius ryžių miltų rauguose, kurių atitinkamai buvo 0,62–1,13 ir 0,06–0,19 g/100g priklausomai nuo PRB [79]. Panašus pieno ir acto rūgšties kiekis gali būti gaunamas ir tradiciniuose rauguose. L. Setanis ir kt. [107] ištyrė kvietinių raugų pieno ir acto rūgšties kiekius, kurių atitinkamai nustatė 1,36–4,81 ir 0,25–1,08 mg/g, rūgščių kiekis buvęs rauguose priklausė nuo starterinės PRB kultūros naudotos fermentacijai.

3.2.3. PRB įtaka raugų fermentiniams aktyvumams

Nustatyti tiriamųjų raugų amilazinis, ksilanazinis, fitazinis ir proteazinis aktyvumai pateikti 9 lentelėje.

Fermentuojant miltus be glitimo su PRB didesnis amilazinis aktyvumas pasireiškė kukurūzų miltų rauguose. Didžiausias amilazinis aktyvumas iš ryžių miltų raugų buvo raugo, kurio fermentacijai naudotos *L. sanfranciscensis* W2, o mažiausias aktyvumas buvo raugė, ruošiamame su *L. farraginis* 206. Rauguose, gamintuose su kukurūzų miltais, didžiausias amilazinis aktyvumas buvo raugė, kurio fermentacijai naudotos *L. curvatus* 51 pieno rūgšties bakterijos, o mažiausias aktyvumas buvo nustatytas raugė, ruošiamame su *L. farraginis* 206 pieno rūgšties bakterijomis.

Didžiausias ksilanazinis aktyvumas tarp ryžių miltų raugų buvo raugo, kurio fermentacijai naudotos *L. farraginis* 206 pieno rūgšties bakterijos, o mažiausiu aktyvumu pasižymėjo raugus, fermentuotas naudojant *L. sanfranciscensis* W2 pieno rūgšties bakterijas. Tačiau esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) tarp ryžių miltų raugų fermentuotų su skirtingomis PRB padermėmis nepastebėta. Iš kukurūzų miltų pagamintuose rauguose didžiausias ksilanazinis aktyvumas buvo nustatytas raugo, kurio

fermentacijai naudotos *L. curvatus* 51 pieno rūgšties bakterijos, o raugas, fermentuotas su *L. farraginis* 206 pieno rūgšties bakterijomis, aktyvumu nepasižymėjo.

9 lentelė. Kukurūzų ir ryžių miltų raugų fermentiniai aktyvumai

Fermentinis aktyvumas, AV/g	Ryžių miltų raugai			Kukurūzų miltų raugai		
	<i>L. curvatus</i> 51	<i>L. farraginis</i> 206	<i>L. sanfranciscensis</i> W2	<i>L. curvatus</i> 51	<i>L. farraginis</i> 206	<i>L. sanfranciscensis</i> W2
Amilazinis aktyvumas	0,13±0,01 ^a	0,11±0,01 ^a	0,42±0,03 ^c	0,24±0,01 ^b	0,10±0,05 ^a	0,15±0,04 ^a
Proteazinis aktyvumas	0,04±0,02 ^a	-	0,09±0,0 ^b	0,10±0,03 ^b	0,03±0,02 ^a	0,08±0,05 ^b
Ksilanazinis aktyvumas	43,69±2,02 ^{a,b}	45,18±2,29 ^{a,b}	41,52±0,97 ^b	44,88±0,82 ^a	-	40,68±0,0 ^b
Fitazinis aktyvumas	43,89±0,85 ^{a,b}	45,95±1,08 ^a	46,57±1,48 ^a	43,11±1,17 ^b	45,05±1,05 ^{a,b}	43,59±1,29 ^{a,b}

Vidutinių verčių reikšmės eilutėse pažymėtos tokiais pat raidėmis parodo, kad nėra esminių skirtumų ($p \leq 0,05$).

Rauguose, ruoštuose su skirtingomis PRB, didesnis fitazinis aktyvumas buvo ryžių miltų rauguose. Didžiausias fitazinis aktyvumas, iš ryžių miltų ruoštuose rauguose, buvo nustatytas rauge, kurio fermentacijai naudotos *L. sanfranciscensis* W2, o mažiausiu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo raugas, ruoštas su *L. curvatus* 51. Tačiau esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) tarp ryžių miltų raugų, ruošų naudojant skirtingas PRB padermes, nenustatyta. Tarp kukurūzų miltų raugų didžiausiu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo raugas, kurio fermentacijai buvo naudota *L. farraginis* 206, o mažiausias aktyvumas buvo raugo, ruošto su *L. curvatus* 51. Tačiau ir tarp kukurūzų miltų raugų, fermentuotų su skirtingomis PRB, esminis skirtumas ($p \leq 0,05$) nenustatytas.

Iš ryžių miltų pagamintuose rauguose didžiausias proteazinis aktyvumas nustatytas raugo, kurio fermentacijai naudotos *L. sanfranciscensis* W2, o raugas, ruoštas su *L. farraginis* 206, proteaziniu aktyvumu nepasižymėjo. Lyginant kukurūzų miltų raugus didžiausiu proteaziniu aktyvumu pasižymėjo *L. sanfranciscensis* W2 pienrūgštėmis fermentuotas raugas, tačiau esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) tarp šio raugo ir raugo, fermentuoto su *L. curvatus* 51 pieno rūgšties bakterijomis, nenustatyta.

α -amilazė turi teigiamos įtakos duonos kepinų tūriui, minkštimo ir plutelės spalvai, skoniui bei mažina gaminių žiedėjimą [113]. Duonos gaminiuose, kuriuose nėra glitimo, yra daugiau krakmolo, todėl tokie gaminiai greičiau žiedėja [27]. Ryžių miltuose pagrindinis komponentas yra angliavandeniai, kurių apie 80 % sudaro krakmolai. Šis fermentas hidrolizuoja polisacharidų α -1,4 glikozidines jungtis susidarant trumpos grandinės dekstrinams, kuriuos geba fermentuoti mielės. [25]. C. Axel ir bendraautorai [79] nustatė ryžių miltų α -amilazinį aktyvumą, kuris buvo 0,01 AV/g. Kiti tyrėjai nustatė kukurūzų miltų amilazinį aktyvumą, kuris buvo 0,02 AV/g. Ryžių miltų aktyvumas buvo mažesnis nei nustatymo ribos, o kvietinių miltų amilazinis aktyvumas 0,12 AV/g [114]. Atsižvelgiant į tai galima manyti, jog raugų fermentacija turėjo teigiamos įtakos amilaziniui aktyvumui, nes tiriamuosiuose rauguose šis fermentinis aktyvumas nustatytas didesnis. Taip pat lyginant kitų tyrėjų nustatytus miltų amilazinius aktyvumus, matyti, jog kvietinių miltų fermentinis aktyvumas didesnis.

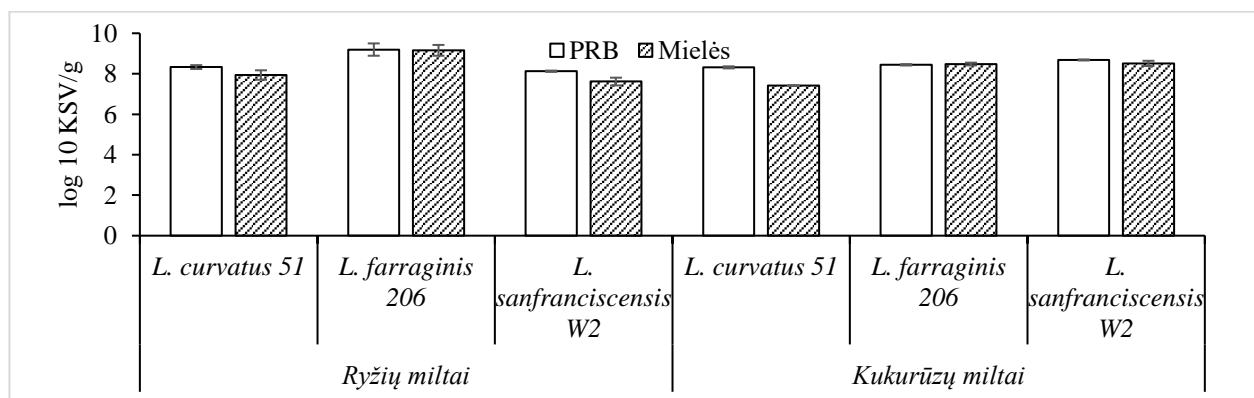
Ryžiuose fito rūgšties daugiausiai randama selenose, o kukurūzuose – endosperme. Nustatyta, jog vykdant fermentaciją galima žymiai sumažinti šio junginio kiekį ryžių miltuose, veikiant tiek mikrobinėms, tiek augalų fitazėms. Toks fito rūgšties suirimas gali padidinti tirpių ir lengviau

organizmo pasisavinamų geležies, cinko ir kalcio junginių kiekius [93]. Ryžių ir kukurūzų miltuose fitazinis aktyvumas yra 0,19–0,41 ir 0,04–0,23 AV/g atitinkamai, o tradiciniuose grūduse: rugiuose, kviečiuose ir miežiuose, aktyvumas yra 5,147–6,016, 0,67–2,89, ir 0,76–2,32 AV/g atitinkamai [115, 116, 117, 118]. Atsižvelgiant į kitų tyrėjų nustatytus miltų fitazinius aktyvumus, matyti, jog raugų fermentacija turėjo teigiamą poveikį fermentiniams aktyvumams, nes fermentacijos metu jie padidėjo.

Proteazės suskaldo vidines baltymų grandinės jungtis, taip sumažinant baltymo molekulinę masę ir susidarant peptidams [25]. Vykdamas raugo fermentaciją su PRB padidėja laisvų amino rūgščių kiekis, kai tuo tarpu mielės sumažina jų koncentraciją [25]. Raugų fermentavimo metu terpės pH vertei mažėjant aktyvuojasi endogeniniai fermentai ir vykstant proteolizei pirmiausia paveikiami baltymai susidarant polipeptidams. Tuomet iš šių polipeptidų išlaisvinamos laisvos amino rūgštys, šiam procesui daugiausia įtakos daro PRB peptidazių sistemos. Laisvos amino rūgštys gali daryti įtaką galutiniam produkto aromatai bei dalyvauti cheminėse reakcijose kepimo metu [25]. Tyrėjai nustatė proteazinius kukurūzų ir ryžių miltų aktyvumus, kurie atitinkamai buvo 0,10±0,12 ir 0,06±0,10 AV/g [119]. Šie aktyvumai panašūs į nustatytus PRB rauguose, todėl galima manyti, jog raugų fermentacija neturėjo įtakos proteaziniams aktyvumui.

3.2.4. Miltų rūšies įtaka PRB ir mielių skaičiui rauguose, ruoštuose su PRB

Bendras PRB ir mielių kiekis esantis rauguose, ruoštuose iš kukurūzų ir ryžių miltų, pateiktas 5 paveiksle. Iš ryžių miltų ruoštuose rauguose didžiausiu PRB skaičiumi ($1,8 \cdot 10^9$ KSV/g) pasižymėjo raugas, kurio gamybai naudota *L. farraginis* 206, taip pat šiame rauge nustatytas didžiausias mielių skaičius ($1,6 \cdot 10^9$ KSV/g). Mažiausiu PRB skaičiumi ($1,3 \cdot 10^8$ KSV/g) pasižymėjo raugas, kurio fermentacijai buvo naudota *L. sanfranciscensis* W2, šiame rauge taip pat nustatytas mažiausias mielių kiekis ($4,3 \cdot 10^7$ KSV/g). Tarp kukurūzų miltų raugų didžiausias PRB skaičius ($4,8 \cdot 10^8$ KSV/g) buvo rauge, kurio fermentacijai naudota *L. sanfranciscensis* W2, o mažiausiu PRB skaičiumi ($2,1 \cdot 10^8$ KSV/g) pasižymėjo raugas, ruoštas su *L. curvatus* 51, šis raugas taip pat pasižymėjo ir mažiausiu mielių kiekiu ($2,6 \cdot 10^7$ KSV/g).



5 pav. Miltų rūšies įtaka PRB ir mielių skaičiui rauguose, ruoštuose su PRB

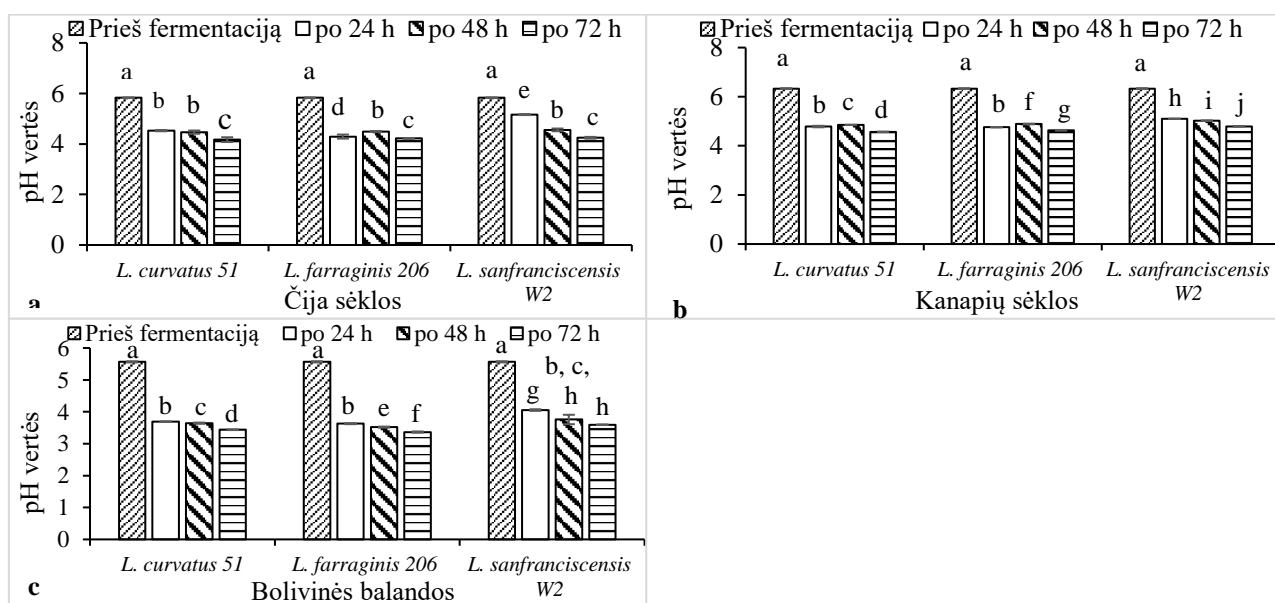
L. sanfranciscensis ir *L. curvatus* dažniausiai aptinkamos tradiciniuose, kvietiniuose ir ruginiuose, rauguose. *L. curvatus* buvo išskirta ir iš tradicinių portugalų kukurūzų miltų raugų. Tačiau kitame tyrime *L. curvatus*, naudojant kukurūzų miltų fermentavimui, ji nebuvo tarp dominuojančių PRB [101, 120]. S. Vogelmann ir bendraautoriai [103] įvertino PRB ir mielių kiekį įvairiuose rauguose, fermentuotose naudojant skirtingas PRB ir mielių kultūras. Tyrėjai nustatė, jog ryžių miltų rauge PRB

kiekis buvo $6,2 \cdot 10^8$ – $1,8 \cdot 10^9$ KSV/g, o mielių – $7,2 \cdot 10^6$ – $5,1 \cdot 10^7$ KSV/g. Kukurūzų miltų rauge nustatytas PRB kiekis buvo $8,7 \cdot 10^8$ – $2,2 \cdot 10^9$ KSV/g, o mielių – $1,9 \cdot 10^5$ – $9,1 \cdot 10^6$ KSV/g. Kitų tyrėjų atlikto tyrimo metu buvo įvertintas spontaniškai fermentuoto kukurūzų miltų raugo PRB ir mielių pokytis. Nustatyta, jog PRB kito nuo 4,62 iki 6,45 log 10 KSV/g, o mielių kiekis padidėjo nuo 4,18 iki 6,64 log 10 KSV/g, fermentaciją vykdant 48 val. 28 ± 2 °C temperatūroje [106]. Pramoniniuose ryžių miltų rauguose PRB ir mielių atitinkamai buvo $1,2 \cdot 10^9$ – $1,6 \cdot 10^9$ ir $2,7 \cdot 10^7$ – $5 \cdot 10^7$ KSV/g [102]. L. Setonis ir kt. [107] ištyrė PRB kiekį kvietiniuose rauguose, kuris buvo 8,29–9,72 log₁₀ KSV/g ir priklausė nuo starterinės PRB kultūros. Ruginiuose rauguose nustatytas PRB kiekis buvo nuo 6,56 iki 9,04 log₁₀ KSV/g, priklausomai nuo naudotos PRB padermės [121]. Iš literatūros duomenų matyti, jog PRB ir mielių kiekis rauguose priklauso tiek nuo PRB tiek nuo fermentacijos sąlygų ir žaliavos. O tradiciniuose rauguose ir rauguose iš miltų be glitimo PRB ir mielių kiekis panašus. Tačiau mielių skaičius kitų autorių atliktuose tyrimuose mažesnis ir su PRB rauguose dažniausiai buvo nustatomas santykiu 1:100. Kiti tyrėjai ištyrė PRB ir mielių įtaką raugų fermentavimui, nustatė jog PRB ir mielių kiekis priklauso nuo jų padermės bei pradinio kiekio ir gali fermentacijos pabaigoje būti aptinkamos santykiu 1:1 [122].

3.3. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuotų sėklų produktų savybės

3.3.1. Fermentacijos trukmės įtaka fermentuotų sėklų produktų BTR ir pH vertėms

Su atrinktomis PRB (*L. curvatus* 51, *L. farraginis* 206 ir *L. sanfranciscensis* W2) buvo fermentuoti čija, kanapių bei bolivinių balandų sėklų miltai. Fermentacijos metu vertintos produktų pH vertės 72 val. laikotarpyje kas 24 val., gauti rezultatai pateikti 6 paveiksle.

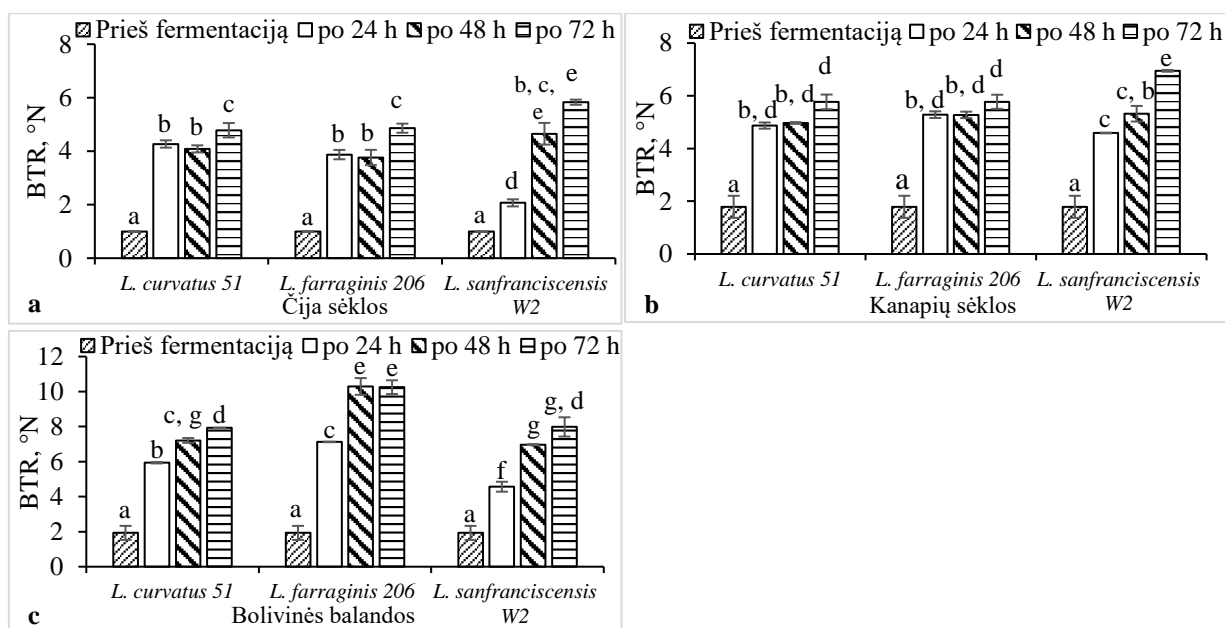


6 pav. Fermentacijos trukmės ir pieno rūgšties bakterijų padermės įtaka fermentuotų sėklų: čija (a), kanapių (b) ir bolivinės balandos (c), pH vertėms

Didžiausias pH pokytis nustatytas po 24 val. fermentacijos, o fermentuojant ilgiau, priklausomai nuo PRB, kito neženkliai. Lyginant skirtingas sėklų terpes mažiausia pH vertė buvo nustatyta fermentuotų bolivinių balandų mėginiuose, o didžiausia pH vertė fermentuotų kanapių sėklų. Po 72 val. fermentacijos, fermentuotų čija sėklų mėginiuose, esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) tarp skirtingomis PRB padermėmis fermentuotų produktų nenustatyta. Lyginant kanapių sėklų fermentuotus produktus mažiausia pH verte (4,6) pasižymėjo mėginys, fermentuotas su *L. curvatus* 51 pieno rūgšties

bakterijomis. O tarp fermentuotų bolivinės balandos mėginių mažiausia pH vertė (3,37) nustatyta mėginyje, fermentuotame su *L. farraginis* 206 pieno rūgšties bakterijomis.

Fermentacijos trukmės ir PRB padermės įtaka fermentuotų čija, kanapių ir bolivinės balandos sėklų BTR vertėms pateikta 7 paveiksle. Didėjant fermentacijos trukmei tarp BTR taip pat didėjo. Tačiau daugeliu atvejų esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) tarp BTR po 48 ir 72 val. fermentacijos nebuvo. Didžiausios BTR vertės buvo nustatytos mėginiuose su bolivinės balandos, o mažiausios – fermentuotuose čija sėklų produktuose. Didžiausiu BTR (5,8 °N) po 72 val. fermentacijos tarp čija sėklų produktų pasižymėjo mėginys, kurio fermentacijai buvo naudotos *L. sanfranciscensis* W2 pieno rūgšties bakterijos, o mažiausias BTR (4,8 °N) buvo mėginio, kurio fermentacijai naudotos *L. curvatus* 51 pieno rūgšties bakterijos, tačiau esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) tarp šio mėginio ir mėginio, fermentuoto su *L. farraginis* 206 pieno rūgšties bakterijomis, nebuvo. Tarp fermentuotų kanapių sėklų produktų didžiausias BTR (6,9 °N) buvo mėginio, fermentuoto su *L. sanfranciscensis* W2 pieno rūgšties bakterijomis, o tarp *L. curvatus* 51 ir *L. farraginis* 206 pieno rūgšties bakterijomis 24 val. fermentuotų mėginių esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) nebuvo. Didžiausiu BTR (10,3 °N) tarp fermentuotų bolivinės balandos produktų pasižymėjo su *L. farraginis* 206 fermentuotos bolivinės balandos sėklos, o tarp *L. curvatus* 51 ir *L. sanfranciscensis* W2 pieno rūgšties bakterijomis fermentuotų produktų esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) nebuvo po 48 ir 72 val.



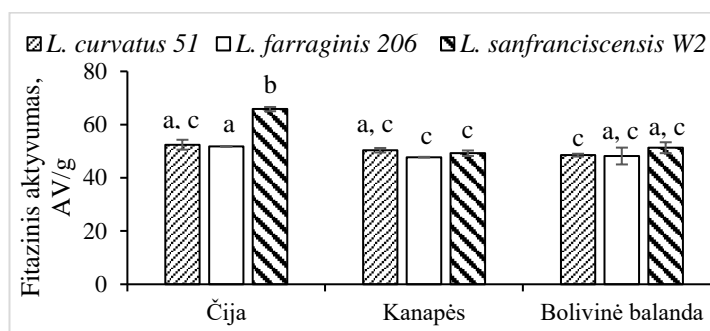
7 pav. Fermentacijos trukmės ir pieno rūgšties bakterijų padermės įtaka fermentuotų sėklų: čija (a), kanapių (b) ir bolivinės balandos (c), BTR vertėms

Literatūros duomenimis pH ir BTR vertės sėklų terpėse priklauso nuo naudojamos PRB ir fermentacijos laiko, tačiau gaunamos vertės tarp tų pačių sėklų mėginių panašios. Bolivinių balandų raugų, fermentuotų su *Lactobacillus amylovorus* padermėmis, pH vertės buvo 3,9 [123]. Kito tyrimo metu bolivinės balandos miltai buvo fermentuoti su *Lactobacillus reuteri* R29, *Lactobacillus brevis* R2 ir L1105 48 val. PRB palankioje temperatūroje. pH vertės fermentacijos pabaigoje buvo 4,14–4,34 [79]. S. Vogelmann ir kt. [103] nustatė bolivinės balandos miltų raugo, fermentuoto su skirtingomis PRB kultūromis 24 val. 30 °C temperatūroje, pH vertes, kurios buvo 3,8–3,9. A. Rizzelas ir bendraautorai [124] įvertino bolivinių balandų miltų raugo, fermentuoto su *Lactobacillus plantarum* T6B10 ir *L. rossiae* T0A16 30 °C temperatūroje 16 val., pH vertę. Nustatyta raugo pH

vertė buvo 3,83, taip pat nustatyta kontrolinio mėginio (miltai fermentuoti tomis pačiomis sąlygomis be starterinių kultūrų) pH vertė, kuri buvo 5,82. Kitų tyrėjų nustatytas bolivinių balandų miltų raugo, fermentuoto su *L. plantarium* FST 1.7 PRB kultūra, pH buvo 3,9, fermentaciją vykdant 24 val. [125]. L. Nionelli ir kt. [49] nustatė, jog vykdant kanapių miltų spontanią fermentaciją pH vertė nuo 5,9±0,2 sumažėja iki 4,5±0,3, BTR vertė padidėja nuo 4,1 iki 40,1 ml NaOH 0,1 M. Kanapių miltų raugo, fermentuoto su *L. plantarum*, *P. acidilactici*, ir *Leuc. mesenteroides* 24 val. 30 °C, pH vertė buvo 4,39±0,18, o prieš fermentaciją 6,0±0,2. E. Bartkienė ir kt. [126] nustatė kanapių, fermentuotų su *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* 48 val., pH vertes, kurios atitinkamai buvo 4,89–5,39 ir 4,75–4,81, priklausomai nuo terpės drėgumo. Taip pat įvertinti fermentuotų produktų BTR, kurie atitinkamai buvo 4,4–4,6 ir 1,5–2,0 °N [126]. Čija miltus fermentuojant su *L. plantarium* C8 24 val. terpės pH vertė pakinta nuo 6,3 iki 4,3–4 [127].

3.3.2. Pieno rūgšties bakterijų įtaka fermentuotų sėklų fitaziniam aktyvumui

Fito rūgšties yra daugelyje grūdų, ankštiniuose augaluose, sėklose ir riešutuose. Didžiausi jos kiekiai nustatomi išoriniame sėklos sluoksnyje [128]. Bolivinėse balandose yra 0,1–1,0 % fito rūgšties, kurios daugiausia randama gemale [25]. O kanapių sėklose fito rūgšties nustatytas kiekis yra apie 60 g/kg [49, 129]. Tyrimo metu naudoti sumalti čija, kanapių sėklų ir bolivinių balandų fermentuoti produktai, iš kurių nebuvo pašalintos sėklų luobelės. Atsižvelgiant į tai ir antimitybines fito rūgšties savybes pageidautina, jog fermentuoti sėklų produktai pasižymėtų fitaziniu aktyvumu. Fitazinis fermentuotų sėklų aktyvumas nustatytas po 48 val. fermentacijos, rezultatai pateikti 8 paveiksle.



8 pav. Pieno rūgšties bakterijų įtaka fermentuotų sėklų fitaziniam aktyvumui

Fitaziniu aktyvumu pasižymėjo visi fermentuoti sėklų produktai. Tarp fermentuotų čija sėklų produktų didžiausiu fitaziniu aktyvumu (65,8 AV/g) pasižymėjo mėginys, kurio fermentacijai buvo naudotos *L. sanfranciscensis* W2. Tarp bolivinės balandos fermentuotų sėklų mėginių šiek tiek didesniu fitaziniu aktyvumu taip pat pasižymėjo su *L. sanfranciscensis* W2 fermentuotos sėklos (51,3 AV/g), tačiau nei kanapių, nei bolivinių balandų terpėje reikšmingo skirtumo tarp PRB padermių fitaziniam aktyvumui nebuvo ($p \leq 0,05$).

Literatūros duomenimis fitazinis aktyvumas priklauso nuo fermentacijai naudojamos PRB padermės. C. Rizzelas ir bendraautoriai [124] įvertino bolivinės balandos miltų raugų fitazinius aktyvumus. Ištyrus su *L. plantarium* ir *L. rossiae* fermentuotą raugą bei kontrolinį (fermentuotą be starterinių kultūrų) nustatyta, jog raugų fitaziniai aktyvumai buvo 4,76 ir 1,73 AV atitinkamai.

3.3.3. Sėklų įtaka pieno rūgšties bakterijų augimui

Fermentuotų produktų gamybai naudoti sterilūs čija, kanapių sėklų ir bolivinių balandų miltai. Nustatytas PRB skaičius fermentuotuose produktuose po 48 val. fermentacijos pateiktas 10 lentelėje.

Tyrimai parodė, kad PRB prisitaikė ir dauginosi sėklų terpėje, o jų skaičius priklausė nuo naudotos žaliavos ir PRB padermės. Čija sėklose geriausiai dauginosi *L. sanfranciscensis* W2 pieno rūgšties bakterijos, kanapių sėklose – *L. farraginis* 206 pieno rūgšties bakterijos, o bolivinėse balandose – *L. curvatus* 51 pieno rūgšties bakterijos (žr. 10 lent.).

Atsižvelgiant į literatūroje pateiktus duomenis matyti, jog PRB skaičius fermentuotuose sėklų miltuose daugiausia priklauso nuo naudotų PRB ir fermentavimo laiko. L. Nionelli ir kt. [49] nustatė PRB kiekį kanapių sėklų miltuose ir spontaninės fermentacijos produktuose, fermentuotuose 24 val. ir 9 dienas 30 °C, kurių kiekis atitinkamai buvo 3,4, 8,1 ir 9,9 log₁₀ KSV/g. E. Bartkienė ir kt. [126] įvertino PRB kiekį kanapių sėklose bei jų fermentuotuose produktuose. PRB kiekis padidėjo nuo 2,1 iki 7,26–7,72 log₁₀ KSV/g, priklausomai nuo naudotos PRB ir produkto drėgnio. Vykdam spontaniinę bolivinių balandų fermentaciją PRB kiekis nuo 1,65 log₁₀ KSV/g padidėjo iki 7,52 log₁₀ KSV/g po 3 parų fermentacijos [130]. Čija sėklų miltuose nustatytas PRB kiekis po 24 val. fermentacijos – 9,2 log₁₀ KSV/g [127].

10 lentelė. PRB skaičius fermentuotose sėklose

Žaliava	PRB padermė	PBR skaičius, log ₁₀ KSV/g
Čija sėklos	<i>L. curvatus</i> 51	8,84±0,11
	<i>L. farraginis</i> 206	9,38±0,03
	<i>L. sanfranciscensis</i> W2	9,76±0,14
Kanapių sėklos	<i>L. curvatus</i> 51	9,63±0,10
	<i>L. farraginis</i> 206	10,46±0,03
	<i>L. sanfranciscensis</i> W2	10,05±0,03
Bolivinės balandos	<i>L. curvatus</i> 51	10,64±0,02
	<i>L. farraginis</i> 206	9,44±0,05
	<i>L. sanfranciscensis</i> W2	8,56±0,11

Atsižvelgiant į gautus fitazinio aktyvumo rezultatus kepinių be glitimo gamybai su fermentuotais sėklų produktais parinkta *L. sanfranciscensis* W2 pieno rūgšties bakterija.

3.4. Pieno rūgšties bakterijų raugų įtaka *B. subtilis* pokyčiams duonos rauguose

3.4.1. PRB įtaka *B. subtilis* skaičiui raugų fermentacijos metu

Šio etapo metu PRB poveikis *B. subtilis* subsp. *spizizenii* dauginimuisi duonos rauguose buvo vertintas dvejopai. Pirmuoju atveju sterilūs glitimo baltymų neturintys miltai (ryžių ir kukurūzų miltai) bei kontroliniui mėginiui naudoti kvietiniai visų grūdo dalių miltai buvo apkrėsti sporas formuojančiomis bakterijomis *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (įneštas kiekis: 3,9·10⁵ KSV/g raugo) ir fermentuota atrinktomis ir šviežiai padaugintomis pieno rūgšties bakterijomis: *L. farraginis* 206 ir *L. curvatus* 51, (įneštas kiekis: 10⁷ KSV/g raugo). Fermentacija vykdyta 24 ir 48 val., nustatytas PRB ir indikatorinių bakterijų kiekis rauguose pateiktas 11 lentelėje.

Nustatyta, jog atrinktos antimikrobiniu poveikiu, tiriant difuzijos į agarą metodu (žr. 8 lent.), pasižymėjusios PRB (*L. farraginis* 206 ir *L. curvatus* 51) neslopino *B. subtilis* subsp. *spizizenii* dauginimosi raugų fermentacijos metu. PRB ir *B. subtilis* subsp. *spizizenii* gerai augo ryžių ir kukurūzų miltų terpėse, tačiau didžiausias kiekis buvo nustatytas rauguose, ruoštuose iš kvietinių miltų. Kadangi fermentacija buvo vykdyta kartu veikiant tiek šviežiai įdėtoms PRB tiek *B. subtilis*

bakterijoms, todėl galima manyti, jog PRB nespėjo gaminti pakankamai metabolizmo produktų, kad jie slopintų *B. subtilis* subsp. *spizizenii* augimą rauguose, t.y. *B. subtilis* subsp. *spizizenii* galimai augo greičiau, nei buvo į terpę išskiriami PRB augimo metu produkuojami metabolizmo produktai ar susidarė reikiama jų koncentracija, reikalinga antimikrobiniam poveikiui pasireikšti. Todėl tiek PRB, tiek *B. subtilis* subsp. *spizizenii* terpėje augo, o jų skaičius rauguose po 24 ir 48 val. fermentacijos skyrėsi nežymiai (žr. 11 lent.).

11 lentelė. PRB ir *B. subtilis* subsp. *spizizenii* skaičius rauguose po 24 ir 48 val. fermentacijos

Mikroorganizmai	Raugai					
	Ryžių miltų		Kukurūzų miltų		Kvietinių visų grūdo dalių miltų	
	<i>L. farraginis</i> 206	<i>L. curvatus</i> 51	<i>L. farraginis</i> 206	<i>L. curvatus</i> 51	<i>L. farraginis</i> 206	<i>L. curvatus</i> 51
Po 24 val.						
PRB	8,31±0,08	9,25±0,31	8,94±0,01	8,72±0,43	9,36±0,09	8,48±0,32
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	8,37±0,10	8,21±0,02	9,06±0,10	8,40±0,05	9,26±0,21	8,48±0,17
Po 48 val.						
PRB	8,40±0,16	8,81±0,17	8,86±0,08	8,89±0,06	9,36±0,26	9,48±0,23
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	8,36±0,08	8,71±0,05	8,81±0,01	8,86±0,08	9,23±0,04	9,17±0,03

Vertinant miltų, kaip žaliavos, tinkamumą PRB dauginimuisi nustatyta, jog didžiausias skaičius PRB (9,48 log₁₀ KSV/g) buvo kvietiniame rauge, ruoštame su *L. curvatus* 51 pieno rūgšties bakterijomis ir fermentuotame 48 val., todėl šios PRB ir kvietiniai miltai buvo pasirinkti tolimesniame šio tyrimo etape norint įvertinti PRB ir *B. subtilis* bakterijų kiekius fermentacijos metu, kai miltuose šių bakterijų sporų kiekis mažesnis.

Antruoju atveju sterilizuoti visų grūdo dalių kvietiniai miltai fermentuoti su *L. curvatus* 51. Po 24 val. fermentacijos į raugą įnešta 10² KSV/g *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporų suspensijos. Nustatytas PRB ir *B. subtilis* subsp. *spizizenii* skaičius po 24 ir 48 val. fermentacijos bei tyrimo metu vykę raugų pH verčių ir BTR pokyčiai pateikti 12 lentelėje. Mažiausia pH vertė ir didžiausia BTR reikšmė buvo pasiekta po 48 val. fermentavimo kartu su *B. subtilis* subsp. *spizizenii* priedu (žr. 12 lent.). Visos fermentacijos metu pH vertė mažėjo, o BTR didėjo, todėl, galima manyti, jog *B. subtilis* subsp. *spizizenii* neturėjo neigiamos įtakos terpės rūgštėjimui tirtuoju laikotarpiu.

Didžiausias PRB ir *B. subtilis* subsp. *spizizenii* kiekis nustatytas po 24 val. fermentavimo kartu su *B. subtilis* subsp. *spizizenii* bakterijomis (žr. 12 lent.). O mažiausias PRB ir *B. subtilis* subsp. *spizizenii* kiekis buvo nustatytas po 48 val. fermentavimo kartu su *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (žr. 12 lent.). Tačiau reikšmingo skirtumo tarp PRB kiekio po fermentavimo su *B. subtilis* subsp. *spizizenii* priedu ir prieš užkrečiant raugus su šiais mikroorganizmais nepastebėta. Po 48 val. fermentavimo vykdyto kartu su *B. subtilis* subsp. *spizizenii* buvo pasiektas tiek mažiausias šių indikatorinių bakterijų kiekis, tiek raugo pH vertė, todėl, galima manyti, jog fermentacijos metu sumažėjęs raugo aktyvusis rūgštingumas bei padidėjęs BTR galėjo turėti neigiamos įtakos indikatorinių mikroorganizmų kiekiui. Tačiau, fermentacijos pradžioje *B. subtilis* subsp. *spizizenii* kiekis buvo didesnis nei PRB, todėl

galima manyti, jog vykdant fermentaciją PRB nestabdė šių sporų sudygimo rauguose ir sudygsių bakterijų dauginimosi.

12 lentelė. Raugų pH, BTR ir mikroorganizmų kiekio pokyčiai fermentacijos metu

Raugai		Prieš fermentaciją	Po 24 val. fermentacijos su PRB	Po 24 val. fermentacijos su <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> *	Po 48 val. fermentacijos su <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> *
pH		5,58±0,01 ^a	4,18±0,32 ^b	3,8±0,03 ^c	3,06±0,04 ^d
BTR, °N		3,19±0,1 ^a	3,9±0,1 ^b	9,3±0,5 ^c	11,3±0,2 ^d
log ₁₀ KSV/g	PRB	-	9,51±0,41 ^{a,b}	9,89±0,06 ^a	9,39±0,08 ^b
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	-	-	10,26±0,02 ^a	9,27±0,06 ^b

Vidutinių verčių reikšmės eilutėse pažymėtos tokiomis pat raidėmis parodo, kad nėra esminių skirtumų ($p \leq 0,05$). * *B. subtilis* subsp. *spizizenii* buvo įdėta į 24 val. fermentuotą su PRB raugą.

R. Elsanhoty ir bendraautorių [131] atlikto tyrimo metu buvo nustatyta, jog vykdant fermentaciją trimis stadijomis *B. subtilis* kiekis rauguose mažėja. Kiekvieno etapo metu į jau 24 val. fermentuotą raugą papildomai įdedant vandens ir miltų, taip jį pagausinant, ir toliau vykdant fermentaciją. PRB kiekis nuo 3,35–3,49 log₁₀ KSV/g padidėjo iki 8,67–8,80 log₁₀ KSV/g trečiajame gamybos etape, priklausomai nuo tyrime naudotos PRB padermės. *B. subtilis* kiekis kiekvieno etapo metu mažėjo nuo 3,35–3,49 log₁₀ KSV/g kol paskutiniojo etapo metu nebuvo nustatytas. Tačiau visų etapų metu didėjo mielių ir pelėsių kiekis tirtuosiuose rauguose, kurių kiekis kito nuo 5,59 iki 6,68 log₁₀ KSV/g. Autoriai pastebėjo, jog raugų antimikrobiniui poveikiui įtakos turėjo terpės rūgštėjimas, vykstantis vykdant fermentaciją su pasirinktomis PRB padermėmis.

Dauguma *Bacillus* genties bakterijų geba augti terpės pH vertei esant apie 4 [132]. *B. subtilis* dažniausiai randami įvairiuose produktuose tarp jų ir rauguose, kuriuose jie kartu su kitais mikroorganizmais dalyvuoja fermentacijoje išskirdami proteazes, lipazes ir amilazes. *Bacillus* genties bakterijos taip pat geba išskirti junginius pasižyminčius antimikrobinėmis savybėmis. Autoriai nustatė, jog *B. subtilis* TR50 pasižymi antimikrobinėmis savybėmis prieš *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* [133].

3.4.2. PRB įtaka raugų antimikrobinėms savybėms

Raugų poveikis *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporoms, difuzijos į agarą metodu, vertintas dvejopai. Pirmuoju atveju 48 val. buvo fermentuoti visų grūdo dalių kvietiniai miltai su *L. curvatus* 51 pieno rūgšties bakterijomis (pH vertė buvo 3,86) ir įterpti į terpę su *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporomis. Raugas pasižymėjo teigiamu poveikiu šių bakterijų augimo slopinimui (žr. 3 priedas 1 pav.), aplink raugą buvo skaidri zona (*B. subtilis* subsp. *spizizenii* augimo slopinimo zona). Išmatavus bakterijų augimo slopinimo zoną skirtingose vietose, inhibicijos zona (baktericidinė) apie raugą agare buvo 5,6±1,8 mm. Iš gautų rezultatų matyti, jog kvietinis visų grūdo dalių miltų raugas, vertinant difuzijos į agarą metodu, stabdo šių bakterijų augimą, kai tuo tarpu PRB antimikrobinis poveikis nepasireiškė *B. subtilis* subsp. *spizizenii* bakterijoms raugų fermentacijos metu (žr. 11 ir 12 lent.). Tam gali turėti įtakos tai, jog fermentacijos pradžioje pieno rūgšties bakterijos dar nespėja į terpę išskirti tiek rūgščių bei kitų junginių galinčių stabdyti maisto gedimus sukeliančių bakterijų augimą, todėl proceso pradžioje *B. subtilis* subsp. *spizizenii* intensyviai dauginasi.

Antruoju atveju vertintas duonos raugų, neturinčių gliatimo baltymų, antimikrobinis poveikis indikatorinių mikroorganizmų sporoms. Sterilūs ryžių ir kukurūzų miltai 72 val. fermentuoti su *L. sanfranciscensis* W2, *L. curvatus* 51 ir *L. farraginis* 206 pieno rūgšties bakterijomis. Tyrimo metu naudotų raugų pH vertės ir BTR reikšmės bei inhibicijos zonos pateiktos 13 lentelėje. Raugai pasižymėję mažiausiomis pH vertėmis taip pat pasižymėjo ir antimikrobinėmis savybėmis prieš *B. subtilis* subsp. *spizizenii*. Išmatavus bakterijų augimo slopinimo zonas skirtingose vietose, tarp inhibicijos zonų (baktericidinių) apie raugus, fermentuotus su *L. farraginis* 206 ir *L. sanfranciscensis* W2, reikšmingo skirtumo ($p \leq 0,05$) nenustatyta.

13 lentelė. Ryžių ir kukurūzų miltų raugų, fermentuotų 72 val., poveikis *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporoms

Raugai	Ryžių miltai			Kukurūzų miltai		
	<i>L. curvatus</i> 51	<i>L. farraginis</i> 206	<i>L. sanfranciscensis</i> W2	<i>L. curvatus</i> 51	<i>L. farraginis</i> 206	<i>L. sanfranciscensis</i> W2
pH	4,68±0,03 ^a	4,42±0,05 ^b	4,63±0,07 ^a	4,19±0,03 ^c	4,03±0,05 ^d	4,11±0,07 ^{c,d}
BTR, °N	1,38±0,23 ^a	1,97±0,0 ^a	2,86±0,14 ^b	5,76±0,32 ^{c,d}	5,57±0,02 ^c	4,77±0,24 ^d
Inhibicijos zona, mm	-	-	-	-	4,22±1,6 ^a	4,17±1,6 ^a

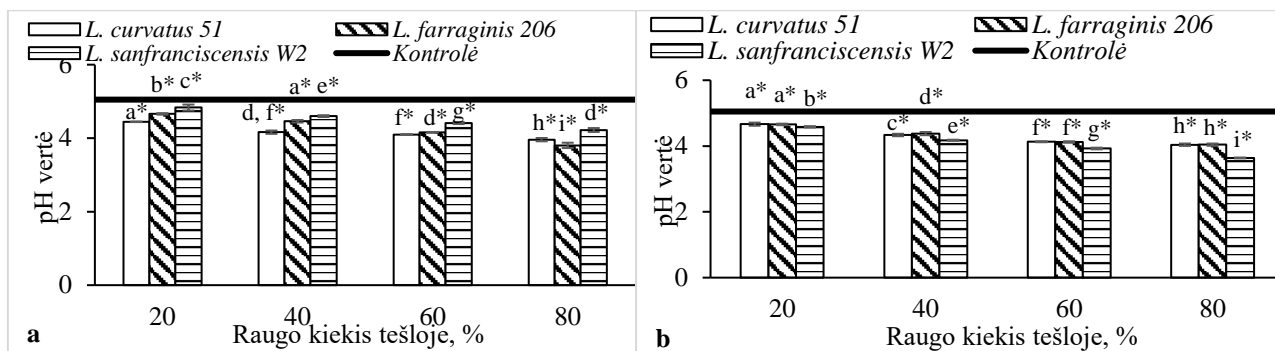
Vidutinių verčių reikšmės eilutėse pažymėtos tokiomis pat raidėmis parodo, kad nėra esminių skirtumų ($p \leq 0,05$).

Literatūros duomenimis įvairūs raugai padeda slopinti nepageidaujamos mikrofloros vystymąsi. M. Edena ir bendraautorai [106] įvertino kukurūzų miltų raugų, fermentuotų skirtingomis PRB bakterijomis, antimikrobinį poveikį *Salmonella typhi* ir *Escherichia coli* bakterijoms. Nustatyta, jog išrūgusius raugus apkrėtus šiomis bakterijomis jų kiekis nuo ~6 log KSV/g sumažėja iki ~2 log KSV/g (fermentuojant 24 val. 35 °C). Tyrime naudotų kukurūzų raugų pH vertės buvo nuo 4,54 iki 3,03 [106]. Kiti tyrėjai įvertino kepinų su raugais pH vertes, slopinančias *B. subtilis* vystymąsi. Nustatyta, jog pH vertei esant mažesnei nei 3,8 bakterijos nebesivysto, o pH vertei esant 4,3–3,9 šių bakterijų vystimasis kvietiniuose kepinuose yra sulėtinamas [134]. *L. sanfranciscensis* pasižymi antimikrobinėmis savybėmis prieš *B. subtilis*, tačiau neveikia mielių ir pelėsių esančių rauguose [101]. Atsižvelgiant į gautus rezultatus, galima manyti, jog šių bakterijų antimikrobinis aktyvumas priklauso nuo terpės (ryžių miltų raugas nepasižymėjo poveikiu indikatoriniam mikroorganizmui, o kukurūzų miltų raugas pasižymėjo).

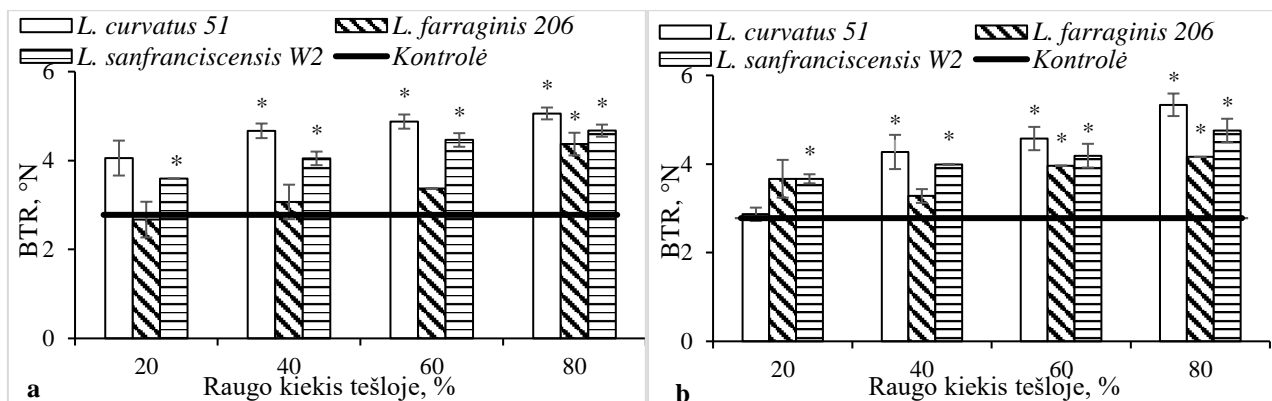
3.5. Pieno rūgšties bakterijų raugų įtaka tešlos ir kepinų kokybės rodikliams

3.5.1. Raugų, ruoštų iš ryžių ir kukurūzų miltų, įtaka tešlų BTR ir pH vertėms

Skirtingų raugų bei raugo kiekio įtaka tešlos rūgštingumui pateikta 9 ir 10 paveiksluose. Tešlos pH ir BTR vertės daugiausia priklausė nuo naudotos PRB padermės ir miltų rūšies. Didinant raugo kiekį receptūroje tešlos pH vertės mažėjo. Tešlų, gamintų iš ryžių miltų raugų, mažiausia pH vertė daugiausia buvo tešlų su *L. curvatus* 51 raugu, o didžiausia pH vertė buvo tešlų su *L. sanfranciscensis* W2 raugu. Tešlų, gamintų su kukurūzų miltų raugu, mažiausios pH vertės buvo nustatytos su *L. sanfranciscensis* W2 raugu. Esminio skirtumo tarp *L. curvatus* 51 ir *L. farraginis* 206 kukurūzų raugų panaudojimo tešlų pH vertėms, kai raugo gamybai buvo naudojama 20, 60 ir 80 %, nebuvo ($p \leq 0,05$). Visų tirtųjų tešlų pH vertės pasižymėjo reikšmingu skirtumu ir buvo mažesnės lyginant su kontrolinės tešlos mėginiu, kurios gamybai raugas naudotas nebuvo.



9 pav. Tešlų, ruoštų su ryžių (a) ir kukurūzų (b) miltų raugais, pH priklausomybė nuo raugo kiekio



10 pav. Tešlų, ruoštų su ryžių (a) ir kukurūzų (b) miltų raugais, BTR priklausomybė nuo raugo kiekio

Didinant raugo kiekį tešloje, BTR didėjo. Tešlų, kurių gamybai naudota 20, 40 ir 60 % ryžių miltų raugo, fermentuoto su *L. farraginis* 206 pieno rūgšties bakterija, reikšmingas skirtumas ($p \leq 0,05$) lyginant su kontrolinės tešlos mėginiu, kurios gamybai raugas nebuvo naudotas, nenustatytas. Iš tešlų, kurių gamybai buvo naudoti kukurūzų miltų raugai, didžiausiu BTR pasižymėjo mėginiai su *L. curvatus* 51 fermentuotu raugu. Mažiausi BTR nustatyti mėginiuose, gamintuose su *L. farraginis* 206 fermentuotais raugais.

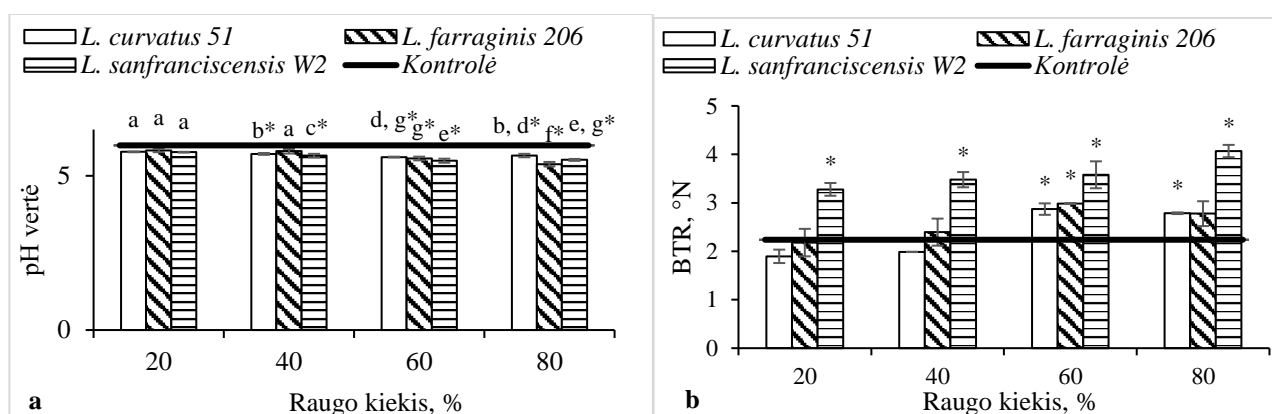
Iš literatūroje pateiktų duomenų matyti, jog tešlų pH ir BTR vertės daugiausia priklauso ne tik nuo raugo kiekio bei miltų, bet ir fermentacijai naudotos PRB. M. Moore ir bendraautoriai [135] įvertino tešlos be gliutimo, gamintos naudojant 40 % raugo fermentuoto su *L. plantarum* FST 1.7 arba *L. sanfranciscensis* RMW1.52 pieno rūgšties bakterijomis, rūgštingumą. Nustatytos tešlų pH vertės buvo atitinkamai 5,20 ir 5,28, o BTR 5,95 ir 5,50 °N, taip pat įvertintas kontrolinio kepinio rūgštingumas, pH vertė buvo 6,32, o BTR 2,90 °N. Kiti tyrėjai ištyrė visų grūdo dalių ryžių miltų tešlų su skirtingu ryžių miltų raugo (0, 10, 20, 30 ir 40 %) kiekiu pH vertes. Tešlų pH vertės atitinkamai buvo 5,31, 4,98, 4,49, 4,22 ir 4,13 [136]. Sorų miltų tešlų gamybai naudojant apie 80 % raugo jų pH vertės buvo nuo 4,20 iki 5,39 priklausomai nuo PRB [88].

3.5.2. Raugų, ruoštų iš ryžių miltų, įtaka kepinų kokybės rodikliams

Vertintos kepinų, ruoštų su skirtingais PRB raugais iš ryžių miltų ir įvairiais jų kiekiais pH vertės bei BTR (žr. 11 pav.). Visų gaminių su PRB raugais minkštimo pH vertės buvo mažesnės lyginant su kontroliniu kepinu, kurio gamybai raugai nebuvo naudoti. Tačiau esminio skirtumo tarp kontrolinio mėginio ir mėginių, gamintų su 20 % ryžių miltų raugais, fermentuotais skirtingomis PRB, nepastebėta. Mažiausiomis pH vertėmis pasižymėjo *L. sanfranciscensis* W2 pieno rūgšties

bakterijomis fermentuoto raugo gaminiai. Išskyrus kepinį, kurio gamybai buvo naudota 80 % raugo, mažiausia pH vertė nustatyta kepinio, gaminto su *L. farraginis* 206 fermentuotu raugu.

Didėjant raugo kiekiui tešloje minkštimo BTR taip pat didėjo. Didžiausiu BTR pasižymėjo kepiniai su *L. sanfranciscensis* W2 pieno rūgšties bakterijų raugais. Lyginant raugų įtaką kepinių BTR vertėms nustatyta, jog tarp *L. curvatus* 51 ir *L. farraginis* 206 to paties raugo kiekio panaudojimo reikšmingo skirtumo ($p \leq 0,05$) nebuvo. Tarp kontrolinio mėginio, gaminto be raugo, bei duonos kepinių gamintų su *L. farraginis* 206 pieno rūgšties bakterijų raugu, esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) taip pat nenustatyta, išskyrus kepinį su 60 % raugo. Tačiau tarp kepinių, kurių gamybai buvo naudotas šis raugas, esminio skirtumo nebuvo. Tarp kepinių, gamintų su *L. sanfranciscensis* W2 pieno rūgšties bakterijų raugu esminis skirtumas nustatytas tik tarp gaminių su 20 ir 80 % raugo.

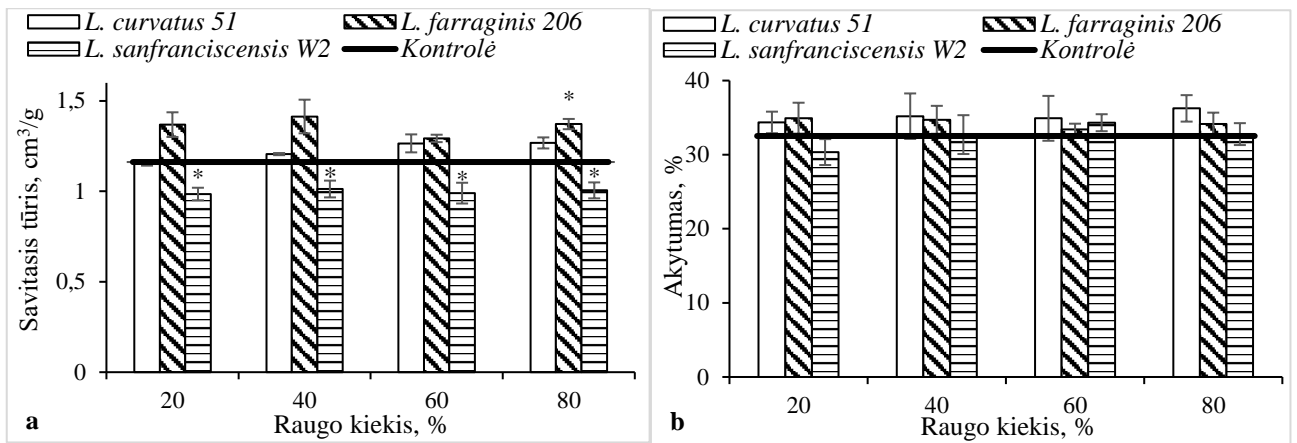


11 pav. Duonos, kurios gamybai naudoti ryžių miltų raugai, minkštimo pH (a) ir BTR (b) verčių priklausomybė nuo PRB raugo kiekio

Literatūros duomenimis pH vertės priklauso tiek nuo PRB padermės, tiek nuo raugo kiekio. C. Axel ir kt. [79] nustatė kepinių ruošimų su 20 % ryžių miltų raugu įtaką kepinių minkštimo pH vertei. Raugų fermentacijai naudotos *L. reuteri* ir *L. brevis* PRB padermės, o minkštimo pH verės buvo 4,62–4,97, tuo tarpu kontrolinio kepinio 5,79. Kiti tyrėjai įvertino ryžių duonos, gamintos su skirtingais raugo kiekiais (0, 10, 20, 30 ir 40 %), minkštimo pH vertes. Didėjant raugo kiekiui minkštimo pH vertė mažėjo nuo 5,25 iki 4,24 tačiau esminio skirtumo tarp kontrolinio kepinio ir kepinio su 10 % raugo nenustatė [136].

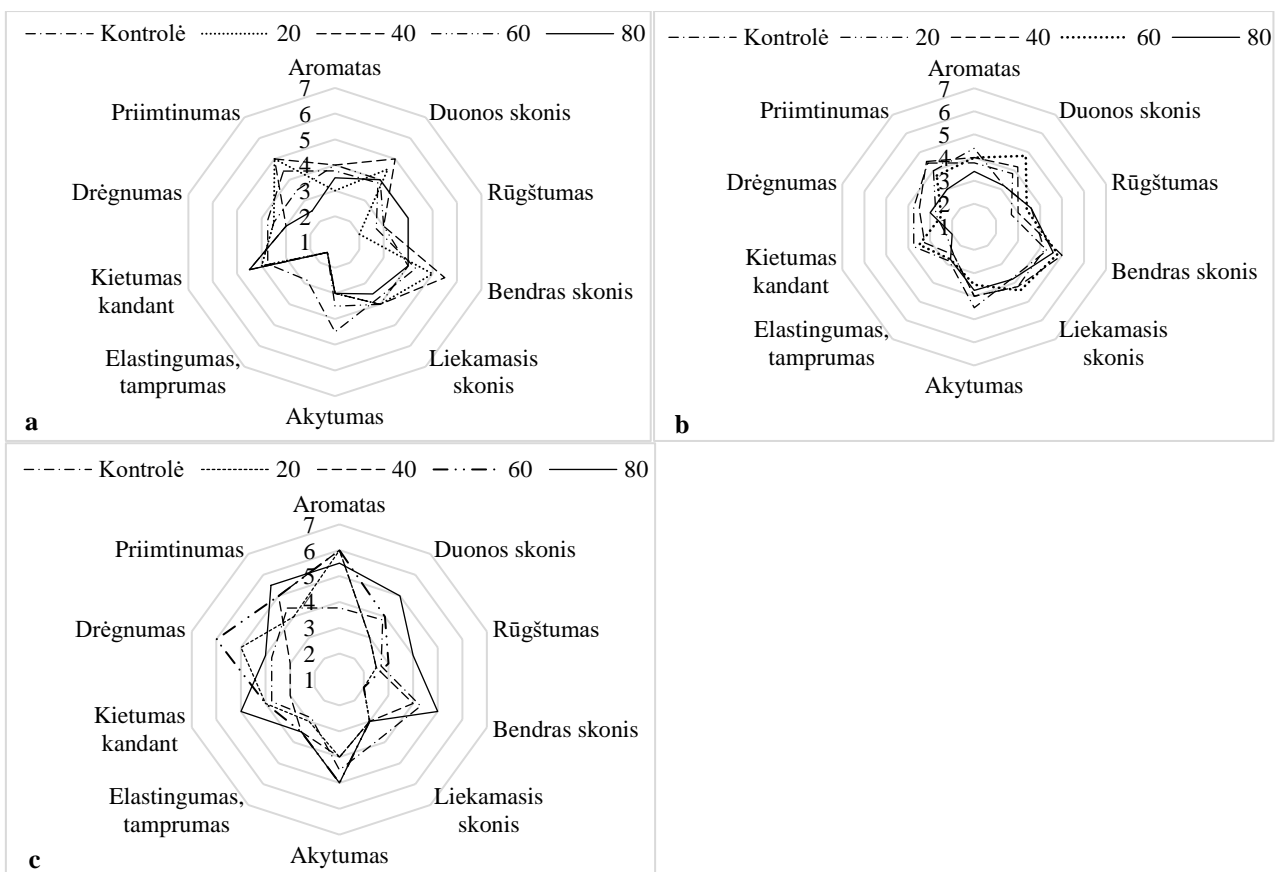
Nustatyti kepinių be glitimo savitieji tūriai ir akytumai pateikti 12 paveiksle. Nustatyta, jog didesnės įtakos kepinių savitajam tūriui turėjo raugo fermentacijai parinkta PRB padermė nei naudotas raugo kiekis. Didžiausiu savituoju tūriu pasižymėjo gaminiai, ruošti su 20, 40 ir 80 % *L. farraginis* 206 raugu, o mažiausiu savituoju tūriu pasižymėjo kepiniai su *L. sanfranciscensis* W2 raugu. Kepinių su *L. farraginis* 206 ryžių miltų raugu savitieji tūriai nustatyti didesni nei kontrolinio kepinio, kurio gamybai PRB raugai nebuvo naudoti, tačiau esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) nebuvo.

Kepinių akytumui įtakos neturėjo nei panaudoto raugo kiekis, nei naudota PRB padermė. Tarp kepinių gamintų naudojant raugus ir kontrolinio kepinio, gaminto be raugo priedo, reikšmingas skirtumas ($p \leq 0,05$) nenustatytas.



12 pav. Duonos, kurios gamybai naudoti ryžių miltų raugai, savitojo tūrio (a) ir akytumo (b) priklausomybė nuo PRB raugo kiekio

Kiti tyrėjai įvertino ryžių duonos tūrio pokyčius naudojant skirtingą raugo kiekį. Didinant raugo kiekį kepinų tūris mažėjo. Autoriai mano, jog tam įtakos galėjo turėti neigiamas rūgščių poveikis mielėms [136]. Panaši tendencija matoma ir su *L. sanfranciscensis* W2 raugais gamintais kepiniais. Šių kepinų BTR buvo didžiausi, o savitieji tūriai mažiausi lyginant su kitais kepiniais.



13 pav. Ryžių miltų raugų, ruoštų su *L. curvatus* 51 (a), *L. farraginis* 206 (b) ir *L. sanfranciscensis* W2 (c), įtaka kepinų be glitimo juslinėms savybėms

Duonos gaminių, ruoštų su skirtingais PRB raugais ir jų kiekiais, juslinės savybės, jų intensyvumai ir bendrieji priimtinumai buvo įvertinti 7 kategorijų skalėje (kur 1 – silpniausias, o 7 – stipriausias). Kepinių jusliniai vertinimai pateikti 13 paveiksle. Juslinėms kepinų savybėms ir priimtinumui įtakos turėjo raugo kiekis ir raugui ruošti naudota PRB padermė. Vertinant *L. curvatus* 51 įtaką kepinų su

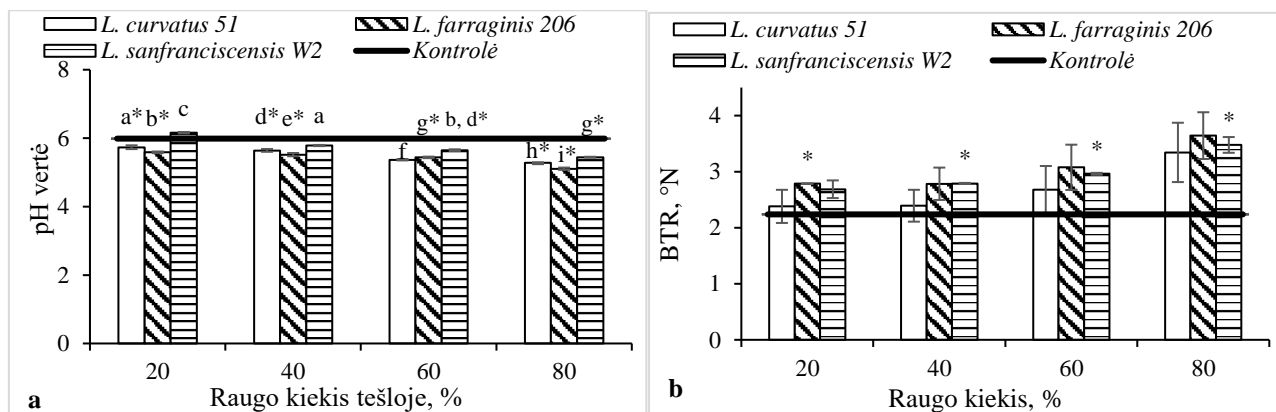
raugu priimtinumui nustatyta, kad priimtinausi vertintojams buvo kepiniai, kurių gamybai naudota 0, 20 ir 40 % šio raugo, o mažiausiai priimtini buvo kepiniai su 60 ir 80 % raugo. Panašios tendencijos gautos vertinant *L. farraginis* 206 ryžių miltų raugų įtaką priimtinumui, o vertinant *L. sanfranciscensis* W2 ryžių miltų raugo kiekio įtaką, nustatyta, kad priimtinausi buvo kepiniai su 80 ir 60 % raugo priedu. Stipriausiu aromatu pasižymėjo su *L. sanfranciscensis* W2 ryžių raugu ruošti kepiniai, o stipriausiu bendru skoniu pasižymėjo kepiniai ruošti su 20 ir 40 % *L. curvatus* 51 ryžių raugu. Didžiausiu drėgnumu pasižymėjo kepiniai ruošti su 20 ir 60 % *L. sanfranciscensis* W2 raugo priedu.

Kiti tyrėjai įvertino ryžių miltų duonos, keptos su skirtingais raugo kiekiais, juslines savybes. Nustatyta, jog kaip priimtinausi kepiniai įvertinti gaminiai su 10 ir 20 % ryžių miltų raugo priedu (pH 3,63) [136].

Tyrimo metu buvo stebėta duonos raugų įtaka gaminių pelėjimui. Visi duonos gaminiai supelijo praėjus savaitei nuo iškepimo, o raugų kiekis ir skirtingų PRB panaudojimas duonos gedimui reikšmingos įtakos neturėjo. Kepinių be glitimo baltymų, kurių gamyboje naudoti ryžių miltų raugai, nuotraukos pateiktos 4 priede (žr. 4 priedas 1 pav.).

3.5.3. Raugų, ruoštų iš kukurūzų miltų, įtaka kepinių kokybės rodikliams

Kepinių, ruoštų su skirtingais PRB raugais iš kukurūzų miltų ir įvairiais jų kiekiais pH bei BTR vertės pateiktos 14 pav. Visų gaminių su PRB raugais minkštimo pH vertės buvo mažesnės lyginant su kontroliniu kepiniumi, kurio gamybai raugai nebuvo naudoti, išskyrus kepinio su *L. sanfranciscensis* W2 raugu, kurio buvo naudota 20 % nuo miltų masės, tačiau esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) tarp mėginių nenustatyta. Kepiniai ruošti su *L. sanfranciscensis* W2 raugu pasižymėjo didžiausia pH verte. Mažiausia pH verte pasižymėjo kepiniai su *L. farraginis* 206 raugo 20, 40 ir 80 % priedu, o naudojant 60 % raugo mažiausia pH verte pasižymėjo gaminys, ruoštas su *L. curvatus* 51 raugu.

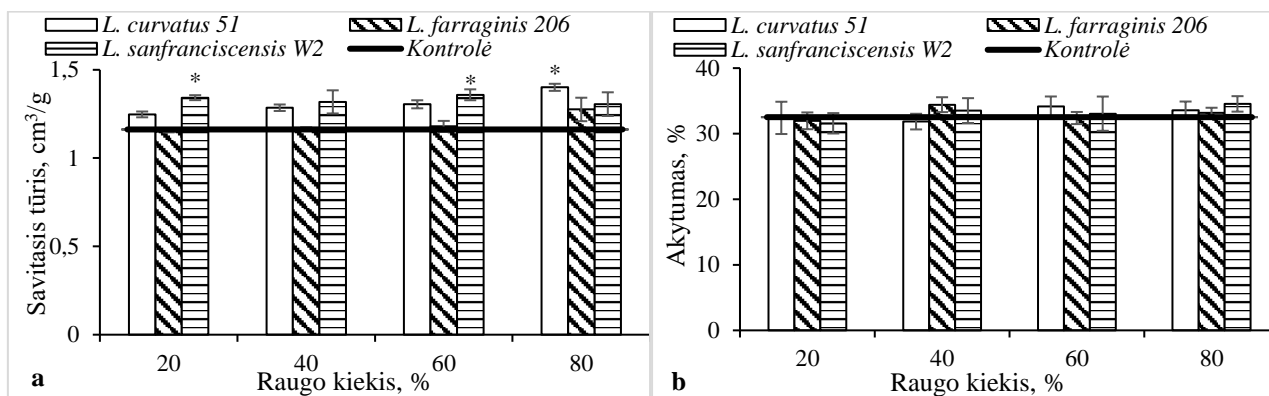


14 pav. PRB raugo kiekio įtaka duonos su kukurūzų miltų raugu minkštimo pH (a) ir BTR (b) vertėms

Kepinio minkštimo BTR vertėms bakterijų padermė, naudota kukurūzų raugų ruošimui, dažniausiai esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) neturėjo. Didžiausias BTR buvo nustatytas, kai duonos gamybai buvo naudota 80 % raugo. Didžiausiomis BTR vertėmis išsiskyrė kepiniai, gaminti su *L. farraginis* 206 pieno rūgšties bakterijomis, tačiau esminio skirtumo tarp kitų kepinų nebuvo nustatyta.

Kepinių be glitimo savitiejai tūriai pateikti 15 (a) paveiksle. Pastebėta, jog didesnės įtakos kepinų

savitajam tūriui turėjo raugo fermentacijai parinkta PRB padermė, nei naudotas raugo kiekis. Mažiausiu savituoju tūriu pasižymėjo gaminiai, kurių gamyboje buvo naudojami raugai ruošti su *L. farraginis* 206. Tuo tarpu *L. curvatus* 51 ir *L. sanfranciscensis* W2 kukurūzų miltų raugai didino kepinų savitąjį tūrį lyginant su kepiniais, kurių gamyboje nebuvo naudota šių PRB raugų, tačiau dažniausiai reikšmingo skirtumo ($p \leq 0,05$) nebuvo. Didžiausiu savituoju tūriu pasižymėjo kepinys, kurio gamybai buvo naudota 80 % raugo fermentuoto su *L. curvatus* 51. Kaip ir kepinuose su ryžių miltų raugais, mažiausiu savituoju tūriu pasižymėjo kepiniai, kurių BTR buvo didžiausi lyginant su kitais kepiniais.



15 pav. PRB raugo kiekio įtaka duonos su kukurūzų miltų raugu savitajam tūriui (a) ir akytumui (b)

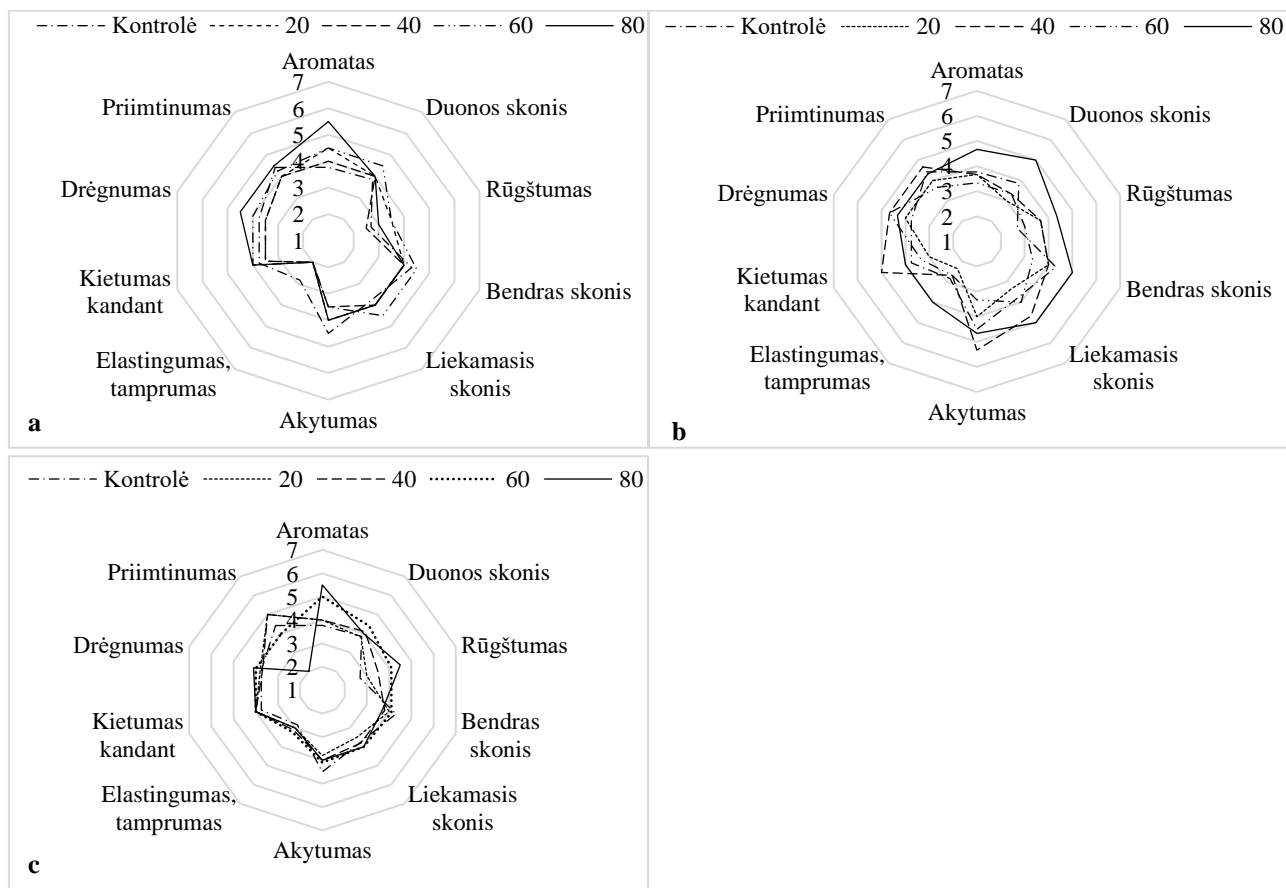
Literatūros duomenimis raugo priedas prisideda prie didesnio kepinų tūrio, tačiau priedo įtaka priklauso tiek nuo jo kiekio tiek nuo naudojamos PRB. D. Novotni ir kt. [112] įvertino raugo iš miltų be gliutimo (ryžių, kukurūzų miltų, kukurūzų ir bulvių krakmolo bei grikių miltų mišinys) įtaką kepinų savitajam tūriui. Kepinių gamybai naudoti skirtingi raugo kiekiai (0, 7,5, 15, 22,5 ir 30 %). Nustatyta, jog didžiausiu savituoju tūriu pasižymėjo kepinys su 15 % raugo (1,46 cm³/g), o didesni raugo kiekiai savitąjį tūrį mažino. A. Falade ir bendraautoriai [105] atlikto tyrimo metu nustatė, kad kukurūzų miltų raugo priedas padidina kukurūzų duonos savitąjį tūrį 25–26 %.

Kepinių akytumai pateikti 15 b paveiksle. Kepinių akytumui įtakos neturėjo nei panaudoto raugo kiekis, nei naudota PRB padermė. Tarp kepinų gamintų naudojant raugus ir kontrolinio kepinio, gaminto be raugo priedo, reikšmingas skirtumas ($p \leq 0,05$) nenustatytas.

Kepinių su kukurūzų miltų raugais jusliniai vertinimai pateikti 16 paveiksle. Juslinėms kepinų savybėms ir priimtinumui įtakos turėjo raugo kiekis ir raugui ruošti naudota PRB padermė. Tarp duonos gaminių, kurie buvo gaminti naudojant raugą, ruoštą su *L. curvatus* 51 pieno rūgšties bakterijomis, kaip priimtinausias gaminys įvertintas tas, kurio gamybai naudota 80 % raugo, šis gaminys taip pat buvo įvertintas kaip turintis stipriausią aromatą, drėgniausias bei kiečiausias kandant. Gaminys, pagamintas su 60 % raugu, pasižymėjo stipriausiu duonos, bendruoju bei liekamuoju skoniu, jis buvo įvertintas kaip rūgščiausias.

Iš gaminių, kurių gamybai buvo naudotas raugas, ruoštas su *L. farraginis* 206 pieno rūgšties bakterijomis, priimtinausias buvo gaminys, kurio gamybai buvo naudota 40 % raugo, šis gaminys taip pat buvo įvertintas kaip kiečiausias kandant bei jo akytumas buvo didžiausias. Gaminys pagamintas su 80 % raugo pasižymėjo stipriausiu aromatu, duonos, bendruoju, liekamuoju skoniu ir buvo įvertintas kaip rūgščiausias.

Iš gaminių, kurių gamybai buvo naudotas raugas, ruoštas su *L. sanfranciscensis* W2 pieno rūgšties bakterijomis, priimtinausias duonos gaminyje buvo tas, kurio gamybai buvo naudojama 20 ir 40 % raugo, o stipriausiu aromatu pasižymėjo gaminyje, kurio gamybai naudota 80 % raugo. Šis gaminyje taip pat pasižymėjo didžiausiu drėgnumu, turėjo stipriausią liekamąjį skonį, tačiau jo priimtumas buvo mažiausias lyginant su kitais gaminiais.



16 pav. Kukurūzų miltų raugų, ruošų su *L. curvatus* 51 (a), *L. farraginis* 206 (b) ir *L. sanfranciscensis* W2 (c) pieno rūgšties bakterijomis, įtaka duonos be gliutimo juslinėms savybėms

Tyrimo metu nustatyta, jog visi duonos gaminiai supelijo praėjus savaitei po iškepimo, o raugų kiekis ir skirtingų PRB panaudojimas duonos gedimui reikšmingos įtakos neturėjo. Nuotraukos kepinų, kurių gamyboje buvo naudojami kukurūzų miltų raugai, pateiktos 4 priede (žr. 4 priedas 2 pav.).

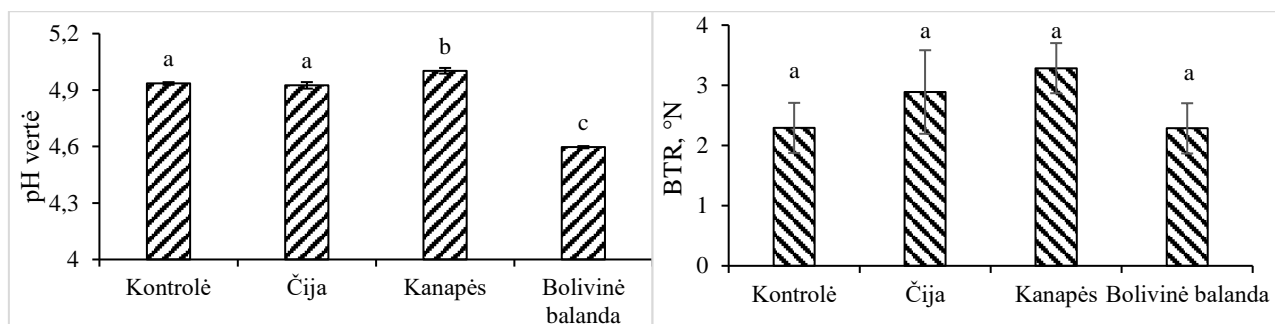
3.6. Sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka tešlų ir kepinų be gliutimo kokybės rodikliams

Šio etapo metu buvo ruoštos tešlos ir kepiniai dviem būdais: (i) naudojant įvairias sėklas ir dalį jų pakeičiant fermentuotais jų produktais (fermentuotų čija, kanapių ir bolivinių balandų produktų drėgniai atitinkamai buvo $84,27 \pm 0,8$, $81,24 \pm 0,3$ ir $86,70 \pm 0,08$ %); (ii) naudojant tik fermentuotas sėklas.

3.6.1. Sėklų ir jų fermentuotų produktų įtaka tešlos savybėms

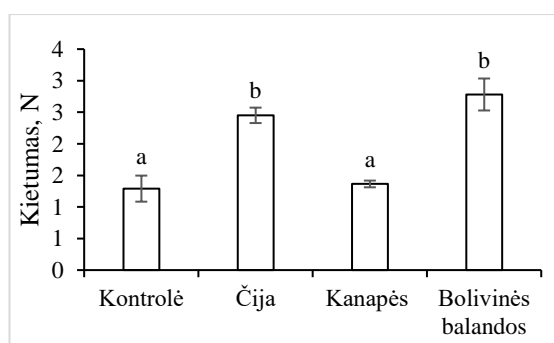
Sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka tešlų pH ir BTR vertės pateikta 17 paveiksle. Mažiausia pH vertė (4,60) buvo tešlos, kurios gamyboje buvo naudotos fermentuotos bolivinės balandos, o didžiausia pH vertė (5,00) buvo tešlos, gamintos su fermentuotomis kanapių sėklomis. Lyginant tešlos, kurios gamybai fermentuoti produktai nebuvo naudoti, ir tešlos su čija sėklų produktu pH

vertei esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) nebuvo. Didžiausias BTR ($3,28 \text{ }^\circ\text{N}$) buvo tešlos, ruoštos su fermentuotomis kanapių sėklomis, o mažiausias BTR ($2,28 \text{ }^\circ\text{N}$) buvo tešlos, gamintos su fermentuotomis bolivinės balandos sėklomis, tačiau tarp mėginių esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) nenustatyta.



17 pav. Sėklų fermentuotų su *L. sanfranciscensis* W2 įtaka tešų pH (a) ir BTR (b) vertėms

Sėklų įtaka tešų kietumui pateikta 18 paveiksle. Mažiausiu kietumu ($1,3 \text{ N}$) pasižymėjo tešla, kurios gamybai fermentuotos sėklos nebuvo naudotos, tačiau tarp šio mėginio ir mėginio gaminto, naudojant fermentuotą kanapių produktą, esminio skirtumo nenustatyta. Didžiausiu kietumu ($2,8 \text{ N}$) pasižymėjo tešla, gaminta naudojant fermentuotą bolivinių balandų produktą, tačiau tarp šio mėginio ir mėginio, gaminto naudojant fermentuotą čija sėklų produktą, esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) nenustatyta. Tešų, gamintų su fermentuotais produktais, kietumui įtakos galėjo turėti ir padidėjęs skaidulinių medžiagų kiekis. Kiti autoriai nustatė, jog bolivinių balandų skaidulos tešlai be glitimo suteikia daugiau elastingumo. Skaidulos taip pat įgeria daugiau vandens. Padidėjęs bet kokių luobelinių medžiagų kiekis tešloje padidina vandens absorbciją, kas tešlai suteikia kietumo ir tvirtumo [119]. Tešlas papildant su čija sėklomis sumažėja miltų vandens absorbcija, o naudojant čija sėklų miltus vandens absorbcija padidėja [137]. J. Korus ir kt. [138] ištyrė tešlos be glitimo savybes, ją papildant kanapių baltymais arba miltais. Tyrėjai nustatė, jog tešlos reologinėms savybėms įtakos turėjo tik kanapių baltymų priedas, o miltų priedas reikšmingos įtakos neturėjo, tešlos savybės buvo gautos artimos kontroliniam mėginiui. Panaši tendencija buvo ir tešloje su fermentuotu kanapių sėklų produktu (žr. 18 pav.).

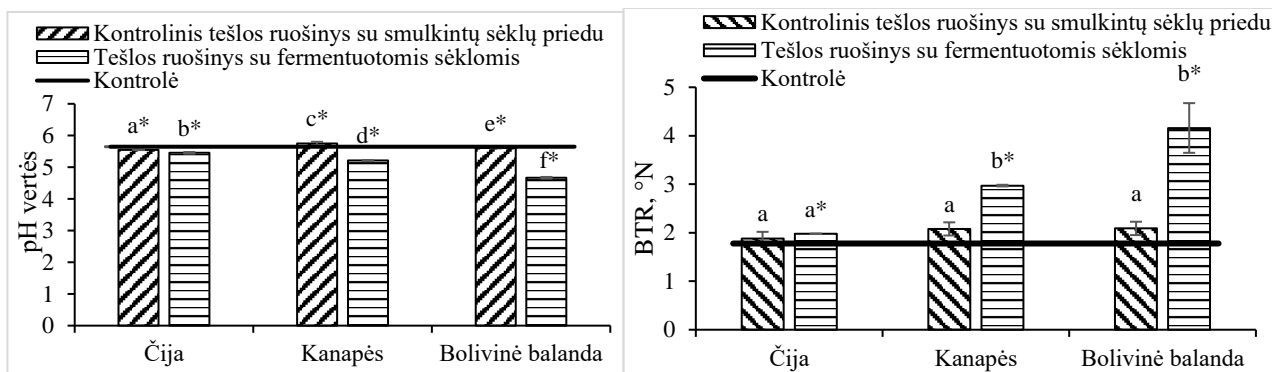


18 pav. Sėklų ir jų fermentuotų produktų įtaka tešlos be glitimo kietumui

3.6.2. Fermentuotų sėklų produktų įtaka tešlos savybėms

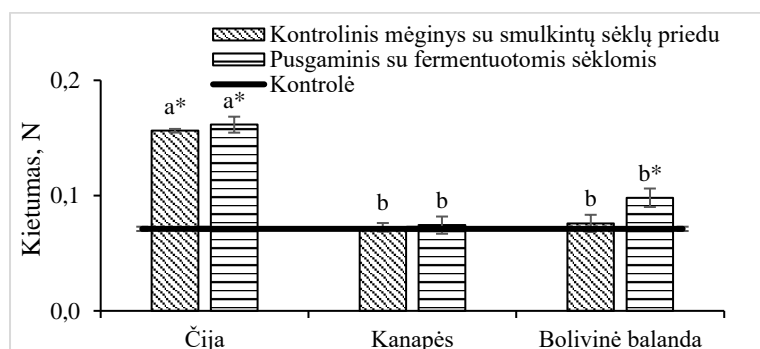
Kepinių, neturinčių glitimo baltymų, gamintų naudojant fermentuotus produktus bei nefermentuotus maltų sėklų produktus kontroliniams kepiniams, tešų pH ir BTR vertės pateiktos 19 paveiksle. Tešų, gamintų su fermentuotomis sėklomis, pH vertės buvo mažesnės, o BTR didesni lyginant su kontrolinėmis tešlomis, gamintomis naudojant nefermentuotų sėklų produktus. Mažiausia pH vertė ($4,67$), bet didžiausiu BTR ($4,16 \text{ }^\circ\text{N}$) pasižymėjo mėginys su fermentuota bolivine balanda, o

didžiausia pH vertė (5,74) – tešla su nefermentuotomis kanapių sėklomis. Tarp visų mėginių pH verčių buvo nustatytas esminis skirtumas. Mažiausiu BTR (1,78 °N) pasižymėjo kontrolinis mėginys, kurio gamybai sėklų produktai nebuvo naudoti.



19 pav. Fermentuotų sėklų produktų įtaka tešlų pH vertėms

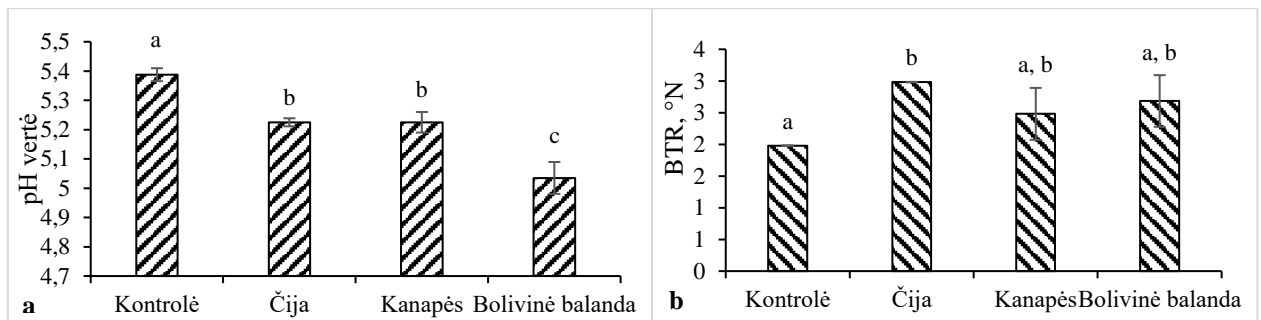
Sėklų įtaka tešlos kietumui pateikta 20 paveiksle. Mažiausias kietumas (0,07 N) nustatytas tešlos, kurios gamyboje sėklos nebuvo naudotos, tačiau tarp šio mėginio ir mėginių, ruošų su kanapėmis bei nefermentuotomis bolivinėmis balandomis, esminio skirtumo nebuvo. Ta pati tendencija su kanapių sėklų tešlomis buvo ir 3.6.1 skyrelyje (žr. 18 pav.). Lyginant tešlas ruoštas su skirtingomis sėklomis nustatyta, jog didesniu kietumu pasižymėjo tešlos ruoštos su fermentuotomis sėklomis, tačiau esminio skirtumo tarp mėginių, ruošų su fermentuotomis ir nefermentuotomis sėklomis, nebuvo. Esminio pH verčių skirtumo tešlų su kanapėmis ir bolivinėmis balandomis, taip pat nebuvo. Kiečiausi buvo mėginiai ruošti su čija sėklomis. Tai galima paaiškinti, tuo jog čija sėklos geba išskirti gelį, pasižymintį geromis vandens surišimo savybėmis, kuris gali būti naudojamas kaip tirštiklis įvairiuose maisto gaminiuose [46].



20 pav. Sėklų produktų įtaka tešlos kietumui

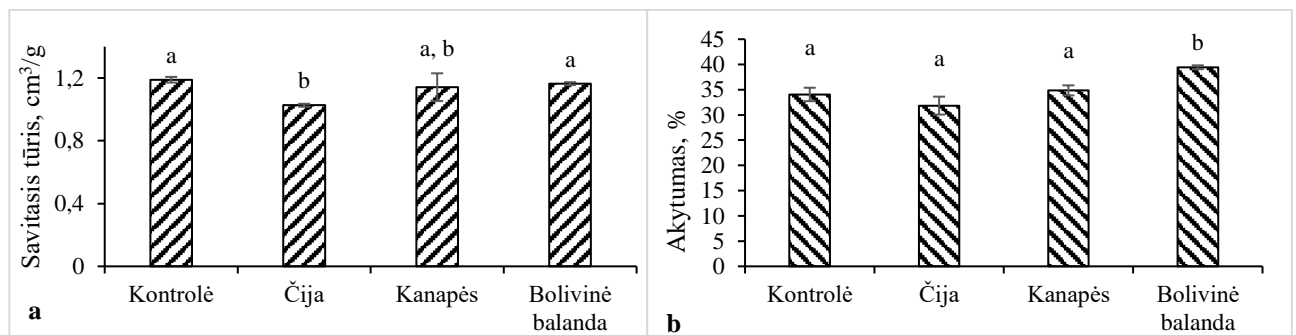
3.6.3. Sėklų ir jų fermentuotų produktų įtaka kepinų kokybės rodikliams

Kepinių minkštimo pH ir BTR vertės pateiktos 21 paveiksle. Mažiausia pH vertė (5,04) buvo kepinio, gaminto naudojant fermentuotas bolivines balandas, o didžiausia pH vertė (5,39) kontrolinio kepinio, kurio gamybai fermentuotos sėklos nebuvo naudotos. Mažiausiu BTR (1,98 °N) pasižymėjo kepinys, kurio gamybai fermentuotos sėklos nebuvo naudotos, o didžiausias BTR (2,98 °N) buvo kepinio minkštimo, kurio gamybai buvo naudotos fermentuotos čija sėklos.



21 pav. Fermentuotų sėklų įtaka kepinų minkštimo pH (a) ir BTR (b) vertėms

Fermentuotų sėklų įtaka kepinų savitajam tūriui ir akytumui pateikta 22 paveiksle. Mažiausias savitasis tūris ($1,03 \text{ cm}^3/\text{g}$) buvo kepinio, gaminto naudojant fermentuotas čija sėklas, o didžiausias savitasis tūris ($1,18 \text{ cm}^3/\text{g}$) buvo kontrolinio kepinio, tačiau tarp jo ir kepinų su fermentuotomis kanapių bei bolivinės balandos sėklomis, esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) nebuvo. Kepinių su fermentuotais produktais mažesniems savitiesiems tūriams įtakos galėjo turėti padidėjęs skaidulinių medžiagų kiekis lyginant su kontroliniu kepiniumi. Netirpios skaidulos mažina gaminių tūrį [139]. Kitų tyrėjų atlikti tyrimai parodė, jog duonos kepiniai, kuriuose yra 15 % čija miltų suteikė gaminiams mažesni savitąjį tūrį bei padidino jų kietumą [23].



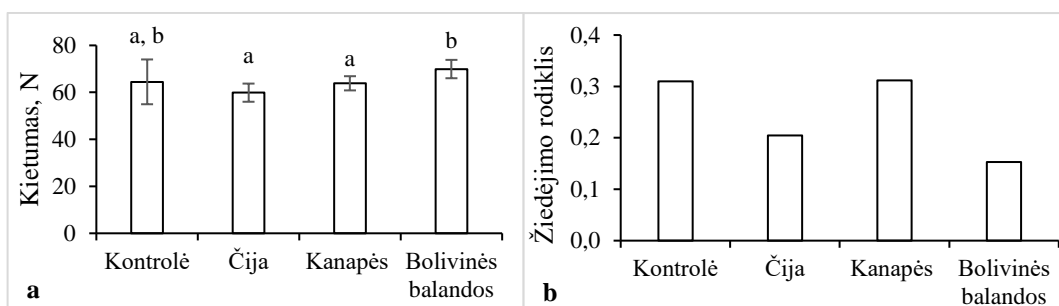
22 pav. Fermentuotų sėklų įtaka kepinų savitajam tūriui (a) ir akytumui (b)

Didžiausiu minkštimo akytumu (39,4 %) pasižymėjo gaminys, kurio gamybai buvo naudotos fermentuotos bolivinės balandos, o mažiausias akytumas (31,8 %) buvo kepinio, gaminto su fermentuotomis čija sėklomis, šis kepinys taip pat pasižymėjo ir mažiausiu savituoju tūriu. Tačiau lyginant kepinį, kurio gamybai fermentuoti produktai nebuvo naudoti, ir kepinius su kanapių ir čija sėklų fermentuotais produktais esminio skirtumo tarp akytumų ($p \leq 0,05$) nebuvo.

Literatūros duomenimis kepinų gamybai naudojant visų grūdo dalių boliviinių balandų miltus padidėja dujų susidarymas tešloje. Dėl luobelėjų padidėjęs tešlos tvirtumas padeda sulaikyti susidariusį anglies dioksidą, tačiau per didelis jų kiekis mažina kepinų tūrį bei akytumą [119]. Kiti tyrėjai įvertino boliviinių balandų raugo įtaką kepinų savitajam tūriui. Naudojant 20 % raugo kepinų savitasis tūris didėjo ($1,12-1,11 \text{ cm}^3/\text{g}$) lyginant su kontroliniu kepiniumi ($1,06 \text{ cm}^3/\text{g}$) [123].

Fermentuotų sėklų įtaka kepinų kietumams bei žiedėjimo rodikliui pateikta 23 paveiksle. Lyginant kepinų minkštimo kietumą didžiausiu kietumu (69,9 N) pasižymėjo kepinys, pagamintas naudojant fermentuotą boliviinių balandų produktą, o mažiausiu kietumu (59,9 N) – kepinus su fermentuotų čija sėklų produktu. Esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) minkštimo kietumui tarp mėginio, kurio gamybai fermentuotų sėklų produktai nebuvo naudoti, ir kepinų su fermentuotų sėklų produktais, nebuvo.

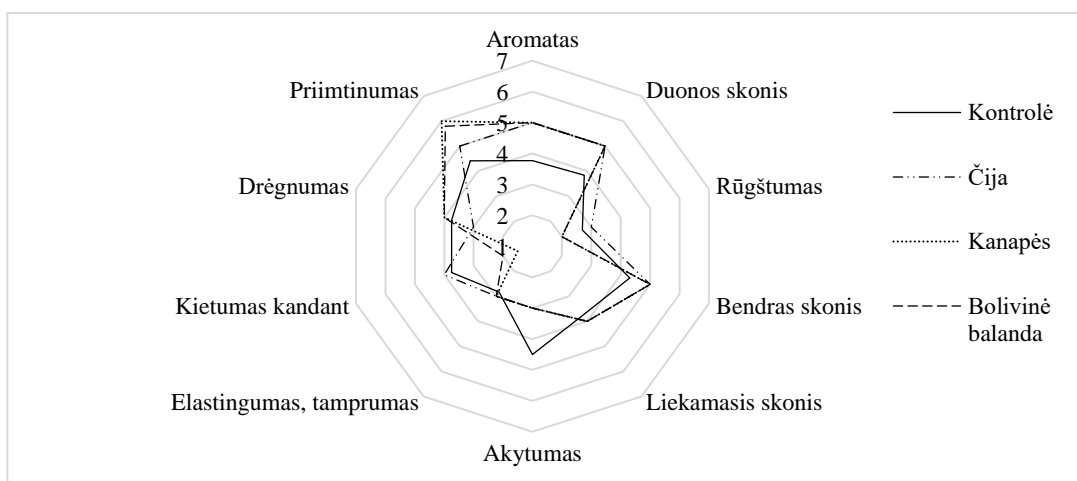
Mažiausiu žiedėjimo rodikliu pasižymėjo kepinys su fermentuotų bolivinių balandų produktu, o didžiausias žiedėjimo rodiklis buvo kontrolinio kepinio, kurio gamybai fermentuotų sėklų produktai nebuvo naudoti. Atsižvelgiant į gautus rezultatus galima manyti, jog fermentuoti čija ir bolivinių balandų produktai turėjo teigiamos įtakos kepinių žiedėjimo lėtinimui. Kiti autoriai nustatė, jog čija sėklų priedas kvietiniuose kepinuose pasižymėjo teigiamu poveikiu lėtinant amilopektino retrogradaciją, kas tiesiogiai susiję su kepinio žiedėjimo lėtinimu [137].



23 pav. Sėklų bei jų fermentuotų produktų įtaka minkštimo kietumui (a) ir žiedėjimo rodikliui (b)

E. Steffolani ir kt. [140] įvertino čija sėklų ir miltų (15 %) įtaką ryžių duonai. Nustatyta, jog tiek čija sėklos, tiek jų miltai mažino kepinio savitąjį tūrį (kontrolinio kepinio – 6,02 cm³/g, kepinio su sėklomis – 3,01 cm³/g, kepinio su čija miltais – 2,27–2,28 cm³/g). Sėklų ir jų miltų priedas padidino kepinų kietumą (kontrolinio kepinio – 0,67 N, kepinio su sėklomis – 6,41–8,42 N; kepinio su čija miltais – 21,52–22,49 N). Sėklų priedas kepinų priimtinumui įtakos neturėjo.

Fermentuotų sėklų produktų įtaka kepinų juslinėms savybėms pateikta 24 paveiksle. Tyrimo metu vertintojai kaip priimtinausią duonos gaminių įvertino tą, kurio gamybai buvo naudotos fermentuotos kanapių sėklos. Šis gaminys taip pat buvo įvertintas kaip mažiausiai kietas kandant bei kaip drėgniausias. Gaminiai, gaminti su fermentuotomis bolivinėmis balandomis bei kanapių sėklomis buvo įvertinti kaip pasižymintys stipriausiu duonos, bendruoju ir liekamuoju skoniu. Kaip rūgščiausias gaminys buvo įvertinta duona, gaminta su fermentuotomis čija sėklomis.



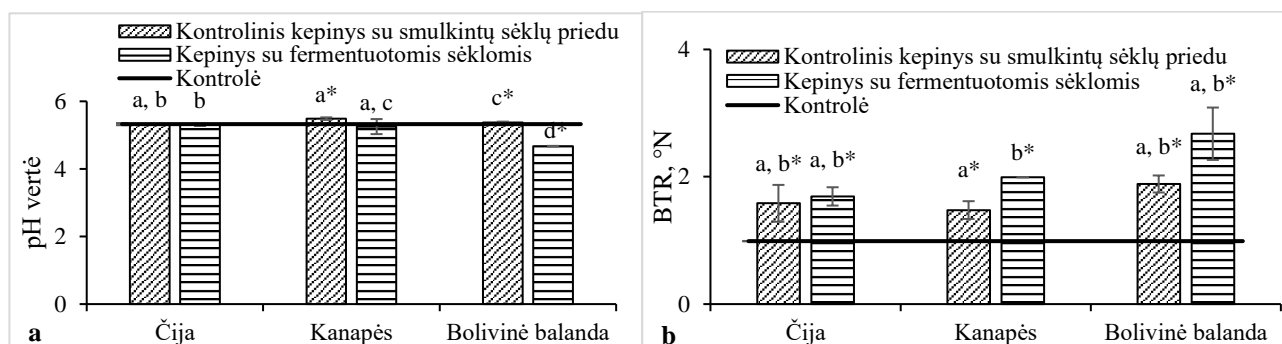
24 pav. Fermentuotų sėklų produktų įtaka kepinų juslinėms savybėms

Tyrimo metu buvo stebėta fermentuotų produktų įtaka gaminių gedimui, nustatyta, jog visi duonos gaminiai supelijo praėjus savaitei nuo iškepimo, o skirtingų fermentuotų sėklų panaudojimas duonos gedimui reikšmingos įtakos neturėjo. Nuotraukos kepinų, kurių gamyboje buvo naudojama su *L. sanfranciscensis* W2 fermentuotos sėklos pateiktos 5 priede (žr. 5 priedas 1 pav.).

Lieteratūros duomenimis fermentuotų sėklų priedas gali padėti pagerinti kepinų tekstūros savybes tiek juos naudojant kvietiniams, tiek glitimo neturintiems kepiniams. Kitų tyrėjų atlikti tyrimai su fermentuotais kanapių produktais naudojant juos kvietinių kepinų gamyboje, parodė jų teigiamą poveikį kepiniams. Tyrimo metu pastebėta, jog 20 % ir daugiau šio priedo kepiniams suteikė nepriimtina skonį, o geriausi rezultatai buvo pasiekti naudojant 5, 10 ir 15 % fermentuoto priedo [49]. Kepiniams naudojant 100 % fermentuoto bolivinių balandų priedo, nustatyta, jog kepinų maistinė vertė gauta geresnė nei kvietinių gaminių, o tekstūros savybės ir priimtumas priklausė nuo naudotos PRB padermės [141]. Fermentuotos čija sėklos taip pat geba pagerinti kvietinių kepinų savybes, padidino jų maistinę vertę [127].

3.6.4. Fermentuotų sėklų produktų įtaka kepinų kokybės rodikliams

Ruošti kepiniai su fermentuotais sėklų produktais bei kepiniai su nefermentuotais produktais, norint įvertinti sumaltų sėklų įtaką kepinų kokybės rodikliams. Sėklų produktų įtaka kepinų minkštimo pH vertės ir BTR pateikta 25 paveiksle.

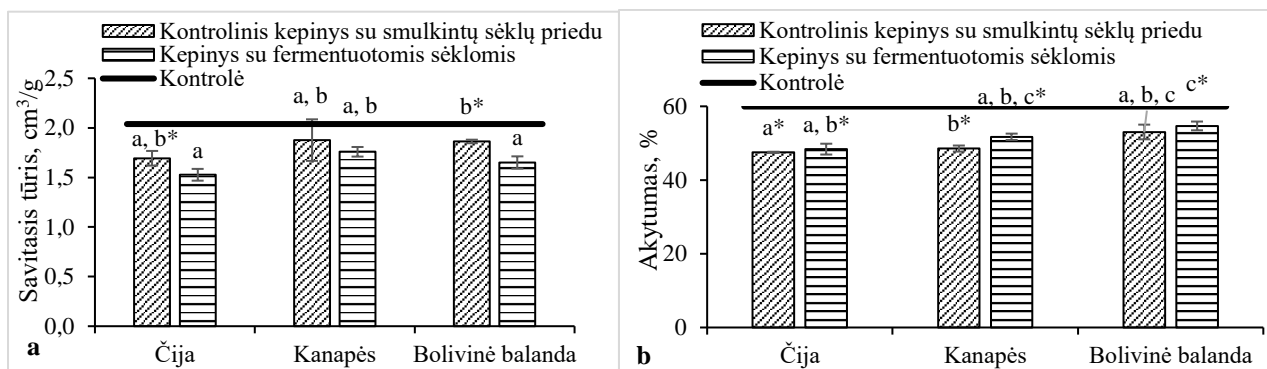


25 pav. Sėklų produktų įtaka minkštimo pH (a) ir BTR (b) vertėms

Mažesnėmis pH vertėmis ir didesniu BTR pasižymėjo kepiniai, kurių gamybai buvo naudotos fermentuotos sėklos. Mažiausia pH vertė (4,67) ir didžiausiu BTR (2,48 °N) pasižymėjo kepinys gamintas su fermentuotomis bolivinėmis balandomis, tačiau tarp šio kepinio BTR ir kitų kepinų BTR esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) nenustatyta. Didžiausia pH vertė (5,49) pasižymėjo kepinys su nefermentuotomis kanapių sėklomis, o mažiausiu BTR (0,99 °N) pasižymėjo kontrolinis kepinys, kurio gamyboje sėklos nebuvo naudotos.

Literatūros duomenimis kepinų minkštimo pH priklauso ne tik nuo naudojamo fermentuoto produkto kiekio, bet ir nuo fermentacijai naudotos PRB padermės. C. Axel ir kt. [123] įvertino bolivinės balandos, fermentuotos *Lactobacillus amylovorus*, raugo poveikį kepinų savybėms. Kepinio, kurio gamybai buvo naudotas nefermentuotos bolivinės balandos minkštimo pH vertė buvo 5,95, o chemiškai rūgštinto gaminio 5,40. Kepinių gamybai panaudojus 20 % raugo jų minkštimo pH vertė buvo 5,01–5,03. Kitame tyrime tie patys tyrėjai naudojo bolivinių balandų raugą fermentuotą su *L. reuteri* ir *L. brevis* 48 val. PRB palankioje temperatūroje. Kepinių gamybai naudojant 20 % raugo minkštimo pH vertės buvo 5,23–5,45 [79]. A. Wolter ir kt. [125] įvertino bolivinės balandos kepinų pH vertes su ir be raugo, fermentuoto naudojant *L. plantarum* FST 1.7 PRB. Nustatytas kontrolinio kepinio minkštimo pH vertė buvo 6, o kepinio su raugu (20 % fermentuotų miltų) – 5,3. Kiti tyrėjai įvertino grikių miltų raugų (pH 4,22) įtaką kepinų pH vertėms, nustatyta, jog naudojant 20 ir 30 % raugo minkštimo pH buvo 4,92 ir 4,78 atitinkamai [142].

Sėklų produktų įtaka kepinių savitiesiems tūriams pateikta 26 paveiksle. Nustatyta, jog didesniais savitaisiais tūriais pasižymėjo gaminiai, kuriuose buvo naudojamos nefermentuotos sėklos. Tačiau esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) tarp kepinių, gamintų su fermentuotomis ir nefermentuotomis čija sėklomis, bei kepinių, gamintų su kanapių sėklomis, nebuvo. Didžiausias savitasis tūris ($2,04 \text{ cm}^3/\text{g}$) nustatytas kepinio be sėklų priedo. Mažiausiu savituoju tūriu ($1,53 \text{ cm}^3/\text{g}$) pasižymėjo gaminys su fermentuotomis čija sėklomis.

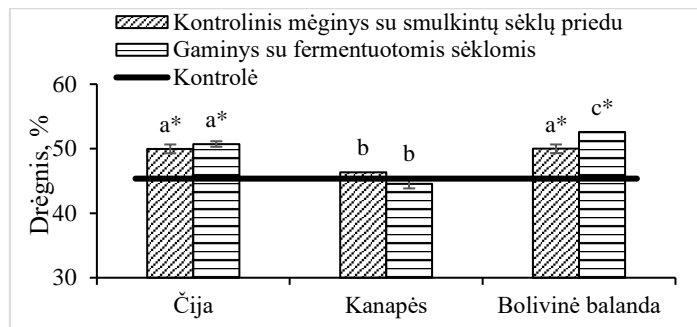


26 pav. Sėklų produktų įtaka gaminų savitiesiems tūriams (a) ir akytumams (b)

A. Moroni ir kt. [73] ištyrė grikių miltų raugo poveikį kepinių savybėms. Nustatyta, jog didėjant raugo kiekiui mažėja kepinių savitasis tūris bei didėja kietumas. Autoriai mano, jog organinės rūgštys esančios fermentuotuose produktuose gali turėti neigiamą poveikį struktūrai formojantiems komponentams, dėl to sumažėja tešlų elastingumas ir stiprumas, padidėja baltymų vandens absorbcija. Raugų priedas taip pat gali neigiamai paveikti anglies dioksido išsiskyrimą veikiant mielėms, dėl to kepiniai pasižymi mažesniu tūriu. Panaši tendencija matoma ir su fermentuotų sėklų produktų priedu, jų savitieji tūriai gauti mažesni lyginant su kontroliniais kepiniais.

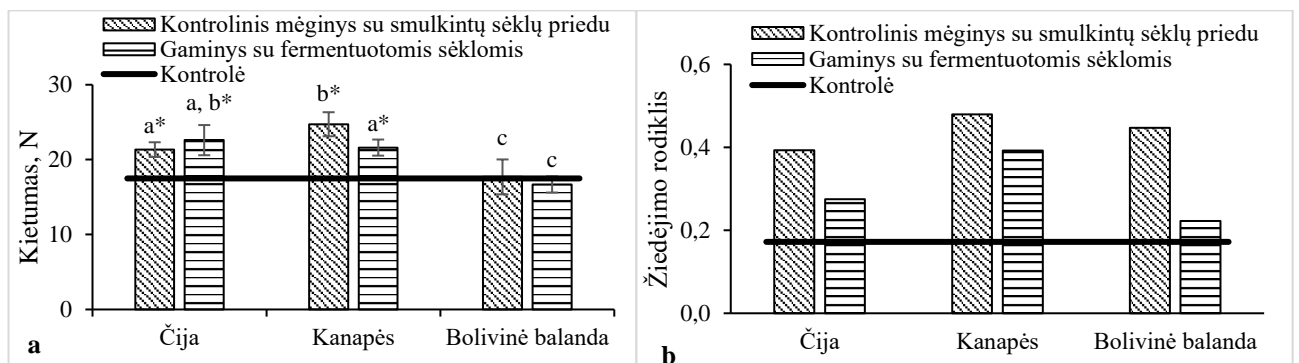
Didžiausiu akytumu (59,95 %) pasižymėjo kepinys, kurio gamybai sėklos nebuvo naudotos (šis kepinys taip pat pasižymėjo ir didžiausiu savituoju tūriu). Lyginant mėginius, kurių gamybai buvo naudotas fermentuotos ir nefermentuotos sėklos didesniu akytumu pasižymėjo gaminiai su fermentuotomis sėklomis, tačiau esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) tarp kepinių su tos pačios rūšies fermentuotais ir nefermentuotais sėklų produktais, nenustatyta. Tarp mėginių, kurių gamyboje buvo naudojamos fermentuotos sėklos, didžiausiu akytumu (54,68 %) pasižymėjo mėginys su bolivinėmis balandomis, o mažiausiu akytumu (48,39 %) pasižymėjo mėginys su čija sėklomis, tačiau esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) tarp šio gaminio akytumo ir gaminio su kanapėmis nebuvo.

Sėklų produktų įtaka kepinių drėgniui pateikta 27 paveiksle. Nustatyta, jog sėklų priedas, tiek fermentuotų, tiek nefermentuotų, kepinių mikštimo drėgnumą didino. Mažiausias drėgmės kiekis (44,55 %) buvo gaminio, gaminto su fermentuotomis kanapių sėklomis, tačiau tarp šio mėginio ir kontrolinio gaminio, gaminto nenaudojant sėklų, esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) nebuvo. Tarp kepinių, ruošų su čija ir bolivine balanda, didesniais drėgniais pasižymi kepiniai su fermentuotais produktais, tačiau esminio skirtumo ($p \leq 0,05$) tarp kepinių su čija sėklomis nebuvo. Didžiausiu drėgniu (52,61 %) pasižymėjo kepinys su fermentuotom bolivinėm balandom. Kiti autoriai įvertino kepinių be glitimo, papildytų bolivinių balandų miltais, drėgnius. Jie nustatytė, jog miltų priedas sumažino kepinių drėgnius, o jų vertės buvo nuo 40,9 iki 47,5 % [143]. Tačiau šios tendencijos kepinuose su bolivinėmis balandomis nenustatyta, šių miltų priedas kepinio drėgnį didino.



27 pav. Sėklų produktų įtaka kepinių drėgnumams

Sėklų produktų įtaka kepinių minkštimo kietumams bei žiedėjimo rodikliams pateikta 28 paveiksle. Mažiausiu kietumu (16,68 N) pasižymėjo kepinys su fermentuotu boliviinių balandų produktu. Tačiau tarp šio kepinio ir kepinio, gaminto naudojant nefermentuotas bolivines balandas, bei kontrolinio gaminio, gaminto nenaudojant sėklų, esminis skirtumas ($p \leq 0,05$) nenustatytas. Didžiausiu kietumu (24,7 N) pasižymėjo gaminys, kurio gamybai buvo naudojamos nefermentuotos kanapių sėklos. Šio gaminio žiedėjimo rodiklis taip pat buvo didžiausias lyginant su kitais kepiniais. Mažiausias žiedėjimo rodiklis nustatytas kontrolinio kepinio, kurio gamybai sėklos nebuvo naudojamos. Iš gautų rezultatų matyti, jog sėklų priedas turi neigiamos įtakos gaminių žiedėjimui, tačiau naudojant fermentuotus produktus žiedėjimo rodiklis mažesnis lyginant su nefermentuotų sėklų priedu.



28 pav. Sėklų produktų įtaka kepinių minkštimo kietumui (a) ir žiedėjimo rodikliui (b)

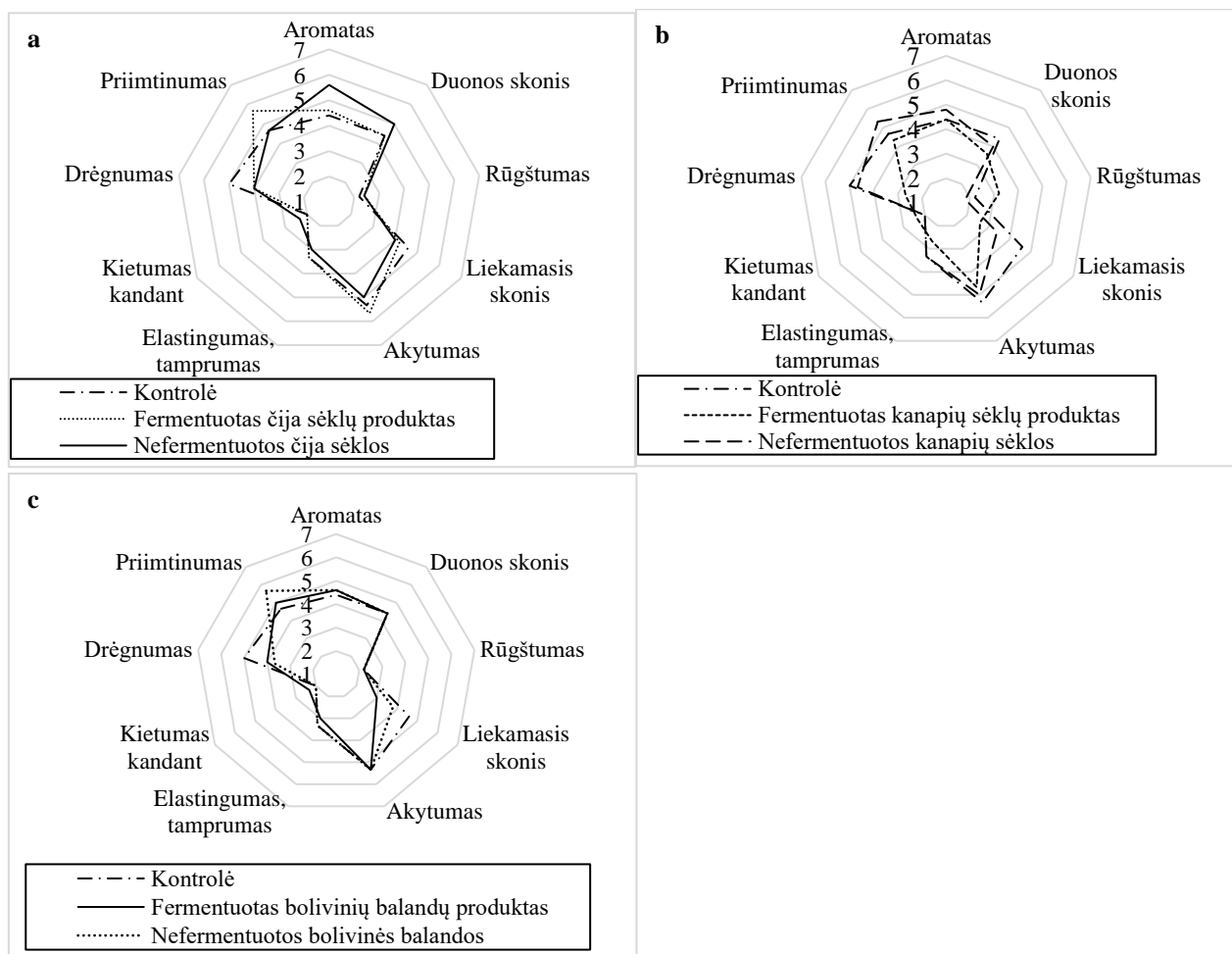
Tyrimo metu taip pat nustatyta, jog kepiniai, kurių gamybai buvo naudotos sėklos ir jų fermentuoti produktai pasižymėjo didesniu kietumu (žr. 23 pav). Todėl galima manyti, jog sėklų priedas turėjo neigiamos įtakos kepinių kietumui.

Kitų tyrėjų atlikto tyrimo metu buvo vertinamos duonos be glitimo, gamintos naudojant skirtingus miltus, savybės. Tarp tyrimo objektų buvo ir ryžių, kukurūzų bei boliviinių balandų miltų kepiniai. Kiečiausias kepinys buvo gamintas naudojant kukurūzų miltus, o kepinio ruošto iš boliviinių balandų miltų kietumas buvo beveik du kart mažesnis. Taip pat šio kepinio ir žiedėjimo rodiklis buvo mažesnis nei kukurūzų duonos. Tarp miltų neturinčių glitimo kaip minkščiausias kepinys išsiskyrė duona su ryžių miltais, šio gaminio žiedėjimo rodiklis taip pat buvo vienas iš mažesnių [14].

Literatūros duomenimis kepinių savitėji tūriai, naudojant įvairius sėklų miltus, dažniausiai priklauso nuo jų kiekio ir fermentacijos. C. G. Rizzelas ir bendraautorai [124] įvertino boliviinių balandų miltų įtaką kvietinių kepinių savitajam tūriui. Nustatyta, jog kepinius papildžius šių sėklų miltais (12,5 % nuo miltų masės) savitasis tūris sumažėjo, tačiau naudojant 20 % boliviinių balandų miltų raugo priedą savitasis kepinių tūris padidėjo ir neturėjo esminio skirtumo lyginant su kvietinio kepinio savituoju

tūriu. L. Nionelli ir kt. [49] ištyrė kanapių sėklų miltų priedo įtaką kvietinių kepinų savybėms. Nustatyta, jog nedidelis priedo kiekis savitąjį tūrį didino, o didesnis kiekis mažino. Kepinių keitimai didinant priedo kiekį didėjo. A. Mikulec ir kt. [144] panaudojo kanapių sėklų miltus kvietinių gaminių gamybai. Nors šių sėklų priedas padidino baltymų kiekį kepinuose, tačiau turėjo neigiamą poveikį kepinų tūriui bei pablogino juslines gaminio savybes. Tyrėjai nustatė, jog naudojant šių sėklų priedą sulėtėja kepinų žiedėjimo indeksas. Tuo tarpu kiti tyrėjai ištyrė kanapių miltų įtaką ryžių miltų duonos savitajam tūriui, nustatyta, jog šių sėklų priedas neturėjo įtakos kepinų savitajam tūriui [145]. Bartkienė ir kt. [126] įvertino fermentuotų kanapių sėklų priedo įtaką kvietinių kepinų savitajam tūriui, kietumui bei juslinėms savybėms. Kepinių, gamintų su fermentuotų kanapių priedu (10 %) savitasis tūris sumažėjo, o kietumas padidėjo lyginant su kvietiniu kepinu. Nefermetuotų sėklų priedas mažino savitąjį tūrį ir didino kietumą. Kvietinių miltų kepinys taip pat buvo įvertintas kaip priimtinausias. Hruškova ir Švecas [146] ištyrė čija miltų įtaką kvietinių kepinų savybėms. Nustatyta, jog šie miltai turi teigiamą poveikį kepinų tūriui (padidėjo apie 20 %).

Sėklų produktų įtaka gaminių juslinėms savybėms pateikta 29 paveiksle.



29 pav. Sėklų produktų įtaka juslinėms savybėms kepinų, ruoštų su: a) čija sėklų priedu; b) kanapių sėklų priedu; c) bolivinių balandų priedu

Vertintojai kaip drėgniausią įvertino kontrolinį gaminį, gamintą nenaudojant sėklų, tačiau tyrimai parodė, jog šio gaminio drėgnis buvo vienas mažiausių lyginant su kitais gaminiais. O kaip mažiausiai drėgnas buvo įvertintas kepinys, gamintas su fermentuotomis kanapių sėklomis, tyrimai parodė, jog šio gaminio drėgnis buvo mažiausias lyginant su kitais gaminiais. Šis kepinys buvo įvertintas ir kaip

rūgščiausias, tačiau mažiausia minkštimo pH verte pasižymėjo kitas kepinys, gamintas su fermentuotomis bolivinėmis balandomis. Kaip mažiausiai rūgštus buvo įvertintas kepinys gamintas su nefermentuotomis kanapių sėklomis. Stipriausiu aromatu bei duonos skoniu pasižymėjo gaminys su nefermentuotomis čija sėklomis. O kepinys su fermentuotomis čija sėklomis buvo įvertintas kaip pasižymintis didžiausiu akytumu, šis kepinys taip pat buvo įvertintas kaip priimtinausias. Kaip priimtinausias taip pat buvo įvertintas ir kepinys su nefermentuotomis bolivinėmis balandomis. Šis kepinys taip pat buvo įvertintas kaip mažiausiai kietas kandant bei elastingiausias kaip ir kepiniai, gaminti su nefermentuotomis kanapių sėklomis, fermentuotomis čija sėklomis bei kontroliniu kepinium, kurio gamybai sėklos nebuvo naudotos.

L. Nionelli ir bendraautoriai [49] įvertino kanapių sėklų raugų įtaką kvietinių kepinų juslinėms savybėms. Nustatyta, jog kepiniai su didesniu nei 20 % fermentuoto produkto kiekiu pasižymėjo nepriimtiniu karčiu skoniu, o geriausi rezultatai gauti su kepiniais, kuriuose fermentuotų kanapių kiekis buvo mažesni nei 15 %.

Vertinant fermentuotų produktų įtaką kepinų pelėjimui, nustatyta, jog greičiausiai supelijo kepiniai, gaminti su čija sėklų produktais (po 5 dienų). Šie kepiniai taip pat pasižymėjo ir didžiausia pH verte bei mažiausiu BTR. Kiti kepiniai supelijo praėjus 7 dienos nuo pagaminimo. Duonos be glitimo kepinų su fermentuotais sėklų produktais nuotraukos pateiktos 5 priede (žr. 5 priedas 2 pav).

IŠVADOS

1. Stipriausiomis antibakterinėmis savybėmis prieš *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* pasižymėjo *Lactobacillus farraginis* 206 gaminami metabolizmo produktai. *Penicillium verrucosum* augimą daugiausiai slopino *Leuconostoc mesenteroides* 242, o *Fusarium poae* – *L. sanfranciscensis* MR24. Prieš *Aspergillus niger* ir *Bacillus subtilis* antimikrobinėmis savybėmis nepasižymėjo nei viena PRB padermė. Didžiausiu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo *Lactobacillus curvatus* 51 (4,27 AV/ml), taip pat dideliu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo ir *L. sanfranciscensis* W2 ir *L. farraginis* 206, todėl šios 3 pieno rūgšties bakterijos (PRB) buvo parinktos tolimesniems tyrimams.
2. Nustatyta, kad tiek PRB padermė, tiek miltų rūšis turėjo įtakos raugų kokybės rodikliams. Fermentacijos metu ryžių miltų raugų pH vertės kito nuo 5,55 iki 3,13, o BTR kito nuo 0,90 iki 8,67 °N. Kukurūzų miltų pH vertės kito nuo 5,66 iki 3,38, o BTR kito nuo 1,80 iki 7,56 °N. Visuose rauguose buvo nustatyti D(-)- ir L(+)-pieno rūgšties izomerų kiekiai. Didžiausi L(+)- (1,554 g/100g) ir D(-)-pieno rūgšties izomero kiekiai (0,617 g/100g) nustatyti kukurūzų miltų rauguose, ruoštuose atitinkamai su *L. curvatus* 51 ir *L. sanfranciscensis* W2. Didžiausias amilazinis (0,43 AV/g) ir fitazinis aktyvumai (46,57 AV/g) buvo ryžių miltų raugo, fermentuoto su *L. sanfranciscensis* W2. Didžiausias ksilanazinis aktyvumas (45,18 AV/g) buvo ryžių miltų raugo, ruošto su *L. farraginis* 206. Didžiausias proteazinis aktyvumas buvo kukurūzų miltų raugo (0,093 AV/g), ruoštame su *L. sanfranciscensis* W2. Lakusis rūgštingumas buvo didesnis kukurūzų miltų rauguose. Didžiausias lakusis rūgštingumas (1,74 ml NaOH/100g) nustatytas rauge, ruoštame su *L. farraginis* 206. Didžiausias PRB skaičius ($1,8 \cdot 10^9$ KSV/g) nustatytas rauge, kurio gamybai buvo naudota *L. farraginis* 206, šiame rauge taip pat nustatytas didžiausias mielių skaičius ($1,6 \cdot 10^9$ KSV/g).
3. Fermentuojant bolivinės balandos, čija ir kanapių sėklas mažiausia pH vertė nustatyta bolivinės balandos fermentuotuose sėklų produktuose, o didžiausia pH vertė buvo fermentuotų kanapių sėklų mėginiuose. PRB prisitaikė ir dauginosi sėklų terpėje, o jų skaičius priklausė nuo naudotos žaliavos ir PRB padermės. Didžiausiu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo fermentuotų sėklų produktai, kurių fermentacijai buvo naudotos *L. sanfranciscensis* W2.
4. Raugų fermentacijos metu PRB neslopino *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporų sudygimo ir dauginimosi. Vertinant raugo antimikrobinį poveikį difuzijos į agarą metodu, raugų antimikrobinis poveikis *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporoms pasireiškė kukurūzų miltų rauguose, fermentuotuose su *L. farraginis* 206 ir *L. sanfranciscensis* W2.
5. Tešlų gamybai naudojant skirtingą PRB raugo kiekį, tešlų ir kepinų savybės daugiausia priklausė nuo naudotos PRB padermės, miltų rūšies ir raugo kiekio. Didinant raugo kiekį receptūroje tešlos pH vertės mažėjo, o BTR didėjo. Didėjant raugo kiekiui mažėjo duonos gaminių minkštimo pH vertės ir didėjo BTR. Kepinių savitajam tūriui įtakos turėjo PRB padermė, naudota raugų ruošimui. Raugo kiekis įtakos aktyvumui neturėjo. Juslinėms kepinų savybėms ir priimtinumui įtakos turėjo raugo kiekis ir raugų ruošti naudota PRB padermė.
6. Fermentuoti sėklų produktų priedai mažino tešlos ir kepinio minkštimo pH vertes bei didino BTR. Tešlos kietumui įtakos turėjo tiek sėklų, tiek jų produktų priedas. Sėklų ir jų fermentuotų produktų priedas gaminių savitąjį tūrį mažino. Kepinių aktyvumą sėklų ir jų fermentuotų produktų priedas dažniausiai didino, išskyrus kepinį su čija sėklomis. Tačiau naudojant tik fermentuotus sėklų produktus kepinų aktyvumas sumažėjo lyginant su kepiniais be fermentuotų produktų. Sėklų ir jų produktų priedas įtakos kepinio kietumui neturėjo ir priklausė nuo naudotų produktų. Kepinių žiedėjimą lėtino čija ir bolivinių balandų fermentuoti produktai. Juslinės savybės priklausė nuo naudojamų fermentuotų produktų. Priimtinausi kepiniai be glitimo buvo su bolivinėmis balandomis.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. RIVERA, H. *Gluten: Food Sources, Properties and Health Implications*. Hauppauge: Hauppauge: Nova Science Publishers, Incorporated , 2016, p. 113-117. ISBN 9781536103861.
2. WALTER, D.B. *Gluten : Sources, Composition and Health Effects*. New York: Nova Science Publishers, Inc , 2013, p. 55-66. ISBN 9781626183438;.
3. Scientific Opinion on the Evaluation of Allergenic Foods and Food Ingredients for Labelling Purposes. *EFSA Journal*, 2014, vol. 12, ISBN 1831-4732. DOI: 10.2903/j.efsa.2014.3894.
4. REWERS, M. Epidemiology of Celiac Disease: What are the Prevalence, Incidence, and Progression of Celiac Disease? *Gastroenterology Elsevier* , 2005, vol. 128, p. 47-51. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.02.030.
5. BAI, J.C. ir kt. Celiac Disease. World Gastroenterology Organisation , 2016, p. 35-9. Prieiga per:<http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/ceeliac-disease/ceeliac-disease-english>.
6. PIETZAK, M. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*. Elsevier Inc , 2014, p. 133-141. ISBN 9780124017160;. Prieiga per: DOI: 10.1016/B978-0-12-401716-0.00011-8.
7. FASANO, A. *Clinical Guide to Gluten-Related Disorders*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2013, p. 7-70. ISBN 9781451182637.
8. JNAWALI, P., KUMAR, V. ir TANWAR, B. Celiac Disease: Overview and Considerations for Development of Gluten-Free Foods. *Food Science and Human Wellness*, 2016, vol. 5, p. 169-176. ISBN 2213-4530. DOI: 10.1016/j.fshw.2016.09.003.
9. ALIMENTARIUS, C. Draft Revised Standards for Glutenfree Foods, Report of 25th Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses. November , 2003, .
10. NAQASH, F., GANI, A., GANI, A. ir MASOODI, F.A. Gluten-Free Baking: Combating the Challenges - A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, vol. 66, p. 98-107. ISBN 0924-2244. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.06.004.
11. HALLERT, C. ir kt. . Evidence of Poor Vitamin Status in Coeliac Patients on a Gluten-free Diet for 10 Years. *Alimentary pharmacology and therapeutics*, 2002, vol. 16, p. 1333-9. ISBN 0269-2813. DOI: 10.1046/j.1365-2036.2002.01283.x.
12. CIACCI, C., CIRILLO, M., CAVALLARO, R. ir MAZZACCA, G. Long-Term Follow-Up of Celiac Adults on Gluten-Free Diet: Prevalence and Correlates of Intestinal Damage. *Digestion Switzerland*: S. Karger AG, Basel , 2002, vol. 66, p. 178-185. ISBN 00122823. DOI: 10.1159/000066757.
13. MATOS SEGURA, M. ir ROSELL, C. Chemical Composition and Starch Digestibility of Different Gluten-Free Breads. *Plant Foods for Human Nutrition*, Boston: Springer US , 2011, vol. 66, p. 224-230. ISBN 15739104. DOI: 10.1007/s11130-011-0244-2.
14. HAGER, A. ir kt. . Investigation of Product Quality, Sensory Profile and Ultrastructure of Breads made from a Range of Commercial Gluten-Free Flours Compared to their Wheat Counterparts. *European Food Research and Technology*, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag , 2012, vol. 235, p. 333-344. ISBN 14382377. DOI: 10.1007/s00217-012-1763-2.
15. FOSCHIA, M., HORSTMANN, S., ARENDT, E.K. ir ZANNINI, E. Nutritional Therapy – Facing the Gap between Coeliac Disease and Gluten-Free Food. *International journal of food microbiology*, 2016, vol. 239, p. 113-124. ISBN 0168-1605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.014.
16. WITCZAK, M., ZIOBRO, R., JUSZCZAK, L. ir KORUS, J. Starch and Starch Derivatives in Gluten-Free Systems – A Review. *Journal of cereal science*, 2016, vol. 67, p. 46-57. ISBN 0733-5210. DOI: 10.1016/j.jcs.2015.07.007.
17. SCIARINI, L., RIBOTTA, P., LEÓN, A. ir PÉREZ, G. Influence of Gluten-Free Flours and their Mixtures on Batter Properties and Bread Quality. *Food and Bioprocess Technology*, 2010, vol. 3, p. 577-585. ISBN 1935-5130. DOI: 10.1007/s11947-008-0098-2.
18. GOBBETTI, M. ir kt. . Novel Insights on the Functional/Nutritional Features of the Sourdough Fermentation. *International journal of food microbiology*, 2018, ISBN 0168-1605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.018.
19. HOUBEN, A., HÖCHSTÖTTER, A. ir BECKER, T. Possibilities to Increase the Quality in Gluten-Free Bread Production: An Overview. *European Food Research and Technology*, 2012, vol. 235, p. 195-208. ISBN 1438-2377. DOI: 10.1007/s00217-012-1720-0.

20. CAPRILES, V.D. ir ARÊAS, J., Alfredo G. Novel Approaches in Gluten-Free Breadmaking: Interface between Food Science, Nutrition, and Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, vol. 13, p. 871-890. ISBN 1541-4337. DOI: 10.1111/1541-4337.12091.
21. ALVAREZ-JUBETE, L., AUTY, M., ARENDT, E. ir GALLAGHER, E. Baking Properties and Microstructure of Pseudocereal Flours in Gluten-Free Bread Formulations. *European Food Research and Technology*, 2010, vol. 230, p. 437-445. ISBN 14382377. DOI: 10.1007/s00217-009-1184-z.
22. BILGIÇLI, N. ir İBANOĞLU, Ş. Effect of Pseudo Cereal Flours on some Physical, Chemical and Sensory Properties of Bread. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, vol. 52, p. 7525-7529. ISBN 00221155. DOI: 10.1007/s13197-015-1770-y.
23. WANG, K. ir kt. . Recent Developments in Gluten-Free Bread Baking Approaches: A Review. *Food Science and Technology SciELO Brasil*, 2017, vol. 37, p. 1-9. DOI: 10.1590/1678-457x.01417.
24. CAMPO, E. ir kt. . Impact of Sourdough on Sensory Properties and Consumers' Preference of Gluten-Free Breads Enriched with Teff Flour. *Journal of cereal science*, 2016, vol. 67, p. 75-82. ISBN 0733-5210. DOI: 10.1016/j.jcs.2015.09.010.
25. ARENDT, E.K. ir DAL BELLO, F. *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. Elsevier Inc. , 2008, p. 81-100; 149-190; 203-288; 237-265; 267-319. ISBN 9780123737397. Prieiga per: DOI: 10.1016/B978-0-12-373739-7.X5001-1.
26. GÓMEZ, M. ir MARTÍNEZ, M.M. Changing Flour Functionality through Physical Treatments for the Production of Gluten-Free Baking Goods. *Journal of cereal science*, 2016, vol. 67, p. 68-74. ISBN 0733-5210. DOI: 10.1016/j.jcs.2015.07.009.
27. PATEL, V., WATSON, R.R. ir PREEDY, V.R. *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*. Amsterdam: Academic Press , 2011, p. 37-47; 89-101. ISBN 9780123808868;.
28. HERA, D.L., TALEGÓN, M., CABALLERO, P. ir GÓMEZ, M. Influence of Maize Flour Particle Size on Gluten-free Breadmaking. *Journal of the science of food and agriculture*, 2013, vol. 93, p. 924-932. ISBN 0022-5142. DOI: 10.1002/jsfa.5826.
29. TSATSARAGKOU, K, PROTONOTARIOU, S. ir MANDALA, I. Structural Role of Fibre Addition to Increase Knowledge of Non-Gluten Bread. *Journal of cereal science*, 2016, vol. 67, p. 58-67. ISBN 0733-5210. DOI: 10.1016/j.jcs.2015.10.003.
30. DEMIRKESEN, I., MERT, B., SUMNU, G. ir SAHIN, S. Utilization of Chestnut Flour in Gluten-Free Bread Formulations. *Journal of Food Engineering*, 2010, vol. 101, p. 329-336. ISBN 0260-8774. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2010.07.017.
31. MOHAMMADI, M. ir kt. . Development of Gluten-Free Bread using Guar Gum and Transglutaminase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2015, vol. 21, p. 1398-1402. ISBN 1226-086X. DOI: 10.1016/j.jiec.2014.06.013.
32. ROMANO, A. ir kt. . Effect of Added Enzymes and Quinoa Flour on Dough Characteristics and Sensory Quality of a Gluten-Free Bakery Product. *European Food Research and Technology*, 2018, vol. 244, p. 1595-1604. ISBN 1438-2377. DOI: 10.1007/s00217-018-3072-x.
33. MANCEBO, C.M., SAN MIGUEL, M.Á, MARTÍNEZ, M.M. ir GÓMEZ, M. Optimisation of Rheological Properties of Gluten-Free Doughs with HPMC, Psyllium and Different Levels of Water. *Journal of cereal science*, 2015, vol. 61, p. 8-15. ISBN 0733-5210. DOI: 10.1016/j.jcs.2014.10.005.
34. MOLLAKHALILI MEYBODI, N., MOHAMMADIFAR, M. ir FEIZOLLAHI, E. Gluten-Free Bread Quality: A Review of the Improving Factors. *Journal of food quality and hazards control*, 2015, vol. 2, p. 81-85. Prieiga per: <http://jfqhc.ssu.ac.ir/article-1-180-en.html>.
35. MARIOTTI, M., LUCISANO, M., AMBROGINA PAGANI, M. ir NG, P.K.W. The Role of Corn Starch, Amaranth Flour, Pea Isolate, and Psyllium Flour on the Rheological Properties and the Ultrastructure of Gluten-Free Doughs. *Food Research International*, 2009, vol. 42, p. 963-975. ISBN 0963-9969. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.04.017.
36. ZIOBRO, R., KORUS, J., JUSZCZAK, L. ir WITCZAK, T. Influence of Inulin on Physical Characteristics and Staling Rate of Gluten-Free Bread. *Journal of Food Engineering*, 2013, vol. 116, p. 21-27. ISBN 0260-8774. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.10.049.
37. PACYŃSKI, M., WOJTASIAK, R.Z. ir MILDNER-SZKUDLARZ, S. Improving the Aroma of Gluten-Free Bread. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, vol. 63, p. 706-713. ISBN 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.03.032.

38. MORONI, A.V., DAL BELLO, F. ir ARENDT, E.K. Sourdough in Gluten-Free Bread-Making: An Ancient Technology to Solve a Novel Issue? *Food Microbiology*, 2009, vol. 26, p. 676-684. ISBN 0740-0020. DOI: 10.1016/j.fm.2009.07.001.
39. PICO, J., HANSEN, ÅS. ir PETERSEN, M.A. Comparison of the Volatile Profiles of the Crumb of Gluten-Free Breads by DHE-GC/MS. *Journal of cereal science*, 2017, vol. 76, p. 280-288. ISBN 0733-5210. DOI: 10.1016/j.jcs.2017.07.004.
40. KAJLA, P., SHARMA, A. ir SOOD, D.R. Flaxseed—a Potential Functional Food Source. *Journal of food science and technology* Springer , 2015, vol. 52, p. 1857-1871.
41. MENTEŞ, Ö, BAKKALBAŞŞI, E. ir ERCAN, R. Effect of the use of Ground Flaxseed on Quality and Chemical Composition of Bread. *Food Science and Technology International* London, England: Sage Publications, 2008, vol. 14, p. 299-306. DOI: 10.1177/1082013208097192.
42. KORUS, J., WITCZAK, T., ZIOBRO, R. ir JUSZCZAK, L. Linseed (*Linum Usitatissimum* L.) Mucilage as a Novel Structure Forming Agent in Gluten-Free Bread. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, vol. 62, p. 257-264. ISBN 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.01.040.
43. MARPALLE, P., SONAWANE, S.K. ir ARYA, S.S. Effect of Flaxseed Flour Addition on Physicochemical and Sensory Properties of Functional Bread. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, vol. 58, p. 614-619.
44. DA SILVA, B.P. ir kt. . Chemical Composition of Brazilian Chia Seeds Grown in Different Places. *Food Chemistry*, 2017, vol. 221, p. 1709-1716. ISBN 0308-8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.115.
45. VALDIVIA-LÓPEZ, M.Á ir TECANTE, A. Chia (*Salvia Hispanica*): A Review of Native Mexican Seed and its Nutritional and Functional Properties. *Is: Advances in food and nutrition research*, 2015, p. 53-75. Prieiga per: DOI: 10.1016/bs.afnr.2015.06.002.
46. COOREY, R., TJOE, A. ir JAYASENA, V. Gelling Properties of Chia Seed and Flour. *Journal of Food Science*, 2014, vol. 79, p. 859-866. ISBN 0022-1147. DOI: 10.1111/1750-3841.12444.
47. 2013/50/ES: 2013 m. Sausio 22 d. Komisijos Įgyvendinimo Sprendimas, Kuriuo Leidžiama Išplėsti Ispaninio Šalavijo (*Salvia Hispanica*) Sėklų Kaip Naujos Maisto Sudedamosios Dalies Paskirtį Pagal Europos Parlamento Ir Tarybos Reglamentą (EB) Nr. 258/97. Europos Sąjungos oficialusis leidinys, 2013.
48. PIHLANTO, A., MATTILA, P., MKINEN, S. ir PAJARI, A.-. Bioactivities of Alternative Protein Sources and their Potential Health Benefits. *Food & Function*, 2017, vol. 8, p. 3443-3458. ISBN 2042-6496. DOI: 10.1039/c7fo00302a.
49. NIONELLI, L. ir kt. . Pro-Technological and Functional Characterization of Lactic Acid Bacteria to be used as Starters for Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Sourdough Fermentation and Wheat Bread Fortification. *International journal of food microbiology* Elsevier BV , 2018, vol. 279, p. 14-25. ISBN 0168-1605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.036.
50. ŠKRBIĆ, B. ir FILIPČEV, B. Nutritional and Sensory Evaluation of Wheat Breads Supplemented with Oleic-Rich Sunflower Seed. *Food Chemistry* Elsevier , 2008, vol. 108, p. 119-129. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.052.
51. AGHAMIRZAEI, M., HEYDARI-DALFARD, A., KARAMI, F. ir FATHI, M. Pseudo-Cereals as a Functional Ingredient: Effects on Bread Nutritional and Physiological Properties-Review. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* SABI Publications , 2013, vol. 5, p. 1574.
52. NADEEM, M., ANJUM, F., ARSHAD, M. ir HUSSAIN, S. Chemical Characteristics and Antioxidant Activity of Different Sunflower Hybrids and their Utilization in Bread. *African Journal of Food Science*, Academic Journals , 2010, vol. 4, p. 618-626.
53. EL-SOUKKARY, F. Evaluation of Pumpkin Seed Products for Bread Fortification. *Plant Foods for Human Nutrition*, Springer , 2001, vol. 56, p. 365-384.
54. RIDOUT, C., PRICE, K. ir FENWICK, R. Quinoa. *Nutrition & Food Science*, 1990, vol. 90, p. 5-7. ISBN 0034-6659. DOI: 10.1108/eb059275.
55. DEMIN, M.A. ir kt. Buckwheat and Quinoa Seeds as Supplements in Wheat Bread Production. *Hemjska industrija*, 2013, vol. 67, p. 115-121. DOI: 10.2298/HEMIND120314048D.
56. SPERANZA, B., BEVILACQUA, A., CORBO, M.R. ir SINIGAGLIA, M. *Starter Cultures in Food Production*. Hoboken: John Wiley & Sons, Incorporated , 2017, p. 174-230. ISBN 9781118933763. Prieiga per: DOI: 10.1002/9781118933794.

57. CORSETTI, A. ir SETTANNI, L. Lactobacilli in Sourdough Fermentation. *Food Research International*, 2007, vol. 40, p. 539-558. ISBN 0963-9969. DOI: 10.1016/j.foodres.2006.11.001.
58. GOBBETTI, M., RIZZELLO, C.G., DI CAGNO, R. ir DE ANGELIS, M. How the Sourdough may Affect the Functional Features of Leavened Baked Goods. *Food Microbiology*, 2014, vol. 37, p. 30-40. ISBN 0740-0020. DOI: 10.1016/j.fm.2013.04.012.
59. DE VUYST, L. ir NEYSENS, P. The Sourdough Microflora: Biodiversity and Metabolic Interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 2005, vol. 16, p. 43-56. ISBN 0924-2244. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.02.012.
60. CHAVAN, R.S. ir CHAVAN, S.R. Sourdough Technology—a Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Wiley Online Library , 2011, vol. 10, p. 169-182. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00148.x.
61. RIZZELLO, C., ANGELIS, M., CODA, R. ir GOBBETTI, M. Use of Selected Sourdough Lactic Acid Bacteria to Hydrolyze Wheat and Rye Proteins Responsible for Cereal Allergy. *European Food Research and Technology* Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag , 2006, vol. 223, p. 405-411. ISBN 1438-2377. DOI: 10.1007/s00217-005-0220-x.
62. SCHERF, K.A., WIESER, H. ir KOEHLER, P. Novel Approaches for Enzymatic Gluten Degradation to Create High-Quality Gluten-Free Products. *Food Research International*, 2016, vol. 110, p. 62-72. ISBN 0963-9969. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.11.021.
63. WALTER, T., WIESER, H. ir KOEHLER, P. Degradation of Gluten in Rye Sourdough Products by Means of a Proline-Specific Peptidase. *European Food Research and Technology*, 2015, vol. 240, p. 517-524. ISBN 1438-2377. DOI: 10.1007/s00217-014-2350-5.
64. RIZZELLO, C.G. ir kt. Use of Fungal Proteases and Selected Sourdough Lactic Acid Bacteria for Making Wheat Bread with an Intermediate Content of Gluten. *Food Microbiology*, 2014, vol. 37, p. 59-68. ISBN 0740-0020. DOI: 10.1016/j.fm.2013.06.017.
65. ZANNINI, E., PONTONIO, E., WATERS, D. ir ARENDT, E. Applications of Microbial Fermentations for Production of Gluten-Free Products and Perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, vol. 93, p. 473-485. ISBN 01757598. DOI: 10.1007/s00253-011-3707-3.
66. GAN, R. ir kt. Effects of Fermented Edible Seeds and their Products on Human Health: Bioactive Components and Bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2017, vol. 16, p. 489-531. ISBN 1541-4337. DOI: 10.1111/1541-4337.12257.
67. LI, S. ir kt. . Improvement of Nutritional Value, Bioactivity and Volatile Constituents of Quinoa Seeds by Fermentation with *Lactobacillus Casei*. *Journal of cereal science*, 2018, vol. 84, p. 83-89. ISBN 0733-5210. DOI: 10.1016/j.jcs.2018.10.008.
68. RIZZELLO, C.G. ir kt. . Improving the Antioxidant Properties of Quinoa Flour through Fermentation with Selected Autochthonous Lactic Acid Bacteria. *International journal of food microbiology*, 2017, vol. 241, p. 252-261. ISBN 0168-1605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.035.
69. CODA, R., CAGNO, R.D., GOBBETTI, M. ir RIZZELLO, C.G. Sourdough Lactic Acid Bacteria: Exploration of Non-Wheat Cereal-Based Fermentation. *Food Microbiology*, 2014, vol. 37, p. 51-58. ISBN 0740-0020. DOI: 10.1016/j.fm.2013.06.018.
70. MORONI, A.V., ARENDT, E.K. ir BELLO, F.D. Biodiversity of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Spontaneously-Fermented Buckwheat and Teff Sourdoughs. *Food Microbiology*, 2011, vol. 28, p. 497-502. ISBN 0740-0020. DOI: 10.1016/j.fm.2010.10.016.
71. ARENDT, E.K., MORONI, A. ir ZANNINI, E. Medical Nutrition Therapy: Use of Sourdough Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory for Delivering Functional Biomolecules and Food Ingredients in Gluten Free Bread. *BioMed Central* , 2011, vol. 10, p. 15. DOI: 10.1186/1475-2859-10-S1-S15.
72. MORONI, A.V., ARENDT, E.K., MORRISSEY, J.P. ir BELLO, F.D. Development of Buckwheat and Teff Sourdoughs with the use of Commercial Starters. *International journal of food microbiology*, 2010, vol. 142, p. 142-148. ISBN 0168-1605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.014.
73. MORONI, A.V., BELLO, F.D., ZANNINI, E. ir ARENDT, E.K. Impact of Sourdough on Buckwheat Flour, Batter and Bread: Biochemical, Rheological and Textural Insights. *Journal of cereal science*, 2011, vol. 54, p. 195-202. ISBN 0733-5210. DOI: 10.1016/j.jcs.2011.04.008.
74. LYNCH, K.M., COFFEY, A. ir ARENDT, E.K. Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria: Their Techno-Functional Role and Potential Application in Gluten-Free Bread Products. *Food Research International*, 2017, vol. 110, ISBN 0963-9969. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.03.012.

75. WOLTER, A. ir kt. . Influence of Dextran-Producing *Weissella Cibaria* on Baking Properties and Sensory Profile of Gluten-Free and Wheat Breads. *International journal of food microbiology*, 2014, vol. 172, p. 83-91. ISBN 01681605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.015.
76. MAGAN, N., D., A. ir M., A. Mould Prevention in Bread. *Iš: Breadmaking : Improving Quality*. S.P. CAUVAIN 2nd ed. Philadelphia: Woodhead Publishing , 2012, p. 597-613. ISBN 9780857090607. Prieiga per: DOI: 10.1533/9780857095695.3.597.
77. CHAVEN, S. Honey, Confectionery and Bakery Products. *Iš: Food Safety Management*. H.L. YASMINE MOTARJEMI 1st ed. Elsevier Inc, 2014, p. 283-299. ISBN 978-0-12-381504-0. Prieiga per: DOI: 10.1016/B978-0-12-381504-0.00011-1.
78. SMITH, J. ir kt. Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products—A Review. *Critical reviews in food science and nutrition* Taylor & Francis Group , 2004, vol. 44, p. 19-55. ISBN 1040-8398. DOI: 10.1080/10408690490263774.
79. AXEL, C. ir kt. Antifungal Sourdough Lactic Acid Bacteria as Biopreservation Tool in Quinoa and Rice Bread. *International journal of food microbiology*, 2016, vol. 239, p. 86-94. ISBN 01681605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.006.
80. MESSENS, W. ir DE VUYST, L. Inhibitory Substances Produced by Lactobacilli Isolated from Sourdoughs—a Review. *International journal of food microbiology*, 2002, vol. 72, p. 31-43. ISBN 0168-1605. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00611-0.
81. DI CAGNO, R. ir kt. Use of Selected Sourdough Strains of *Lactobacillus* for Removing Gluten and Enhancing the Nutritional Properties of Gluten-Free Bread. *Journal of food protection* International Association for Food Protection, 2008, vol. 71, p. 1491-1495. DOI: 10.4315/0362-028X-71.7.1491.
82. MARTÍNEZ, M.M. ir GÓMEZ, M. Rheological and Microstructural Evolution of the most Common Gluten-Free Flours and Starches during Bread Fermentation and Baking. *Journal of Food Engineering*, 2017, vol. 197, p. 78-86. ISBN 0260-8774. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2016.11.008.
83. CIZEIKIENE, D. ir kt. Phytase Activity of Lactic Acid Bacteria and their Impact on the Solubility of Minerals from Wholemeal Wheat Bread. *International journal of food sciences and nutrition* Informa Healthcare, 2015, vol. 66, p. 736-742. ISBN 09637486. DOI: 10.3109/09637486.2015.1088939.
84. JUODEIKIENĖ, G. ir kt. . The Impact of Novel Fermented Products Containing Extruded Wheat Material on the Quality of Wheat Bread. *Food Technology and Biotechnology* University of Zagreb, 2011, vol. 49, p. 502-510. ISBN 1330-9862.
85. XIAO, Z., STORMS, R. ir TSANG, A. A Quantitative Starch–iodine Method for Measuring Alpha-Amylase and Glucoamylase Activities. *Analytical Biochemistry*, 2006, vol. 351, p. 146-148. ISBN 0003-2697. DOI: 10.1016/j.ab.2006.01.036.
86. CUPP-ENYARD, C. Sigma's Non-Specific Protease Activity Assay-Casein as a Substrate. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2008, p. 899. DOI: 10.3791/899.
87. *Maisto Ir Pašarų Mikrobiologija. Bendrasis Mezofilinių Pieno Rūgšties Bakterijų Skaičiavimo Metodas. Kolonijų Skaičiavimo 30 °C Temperatūroje Būdas (Tapatus ISO 15214:1998) (Elektroninis Išteklius)*. 2009-02-13. ed. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2009, .
88. BENDER, D. ir kt. . Effects of Selected Lactobacilli on the Functional Properties and Stability of Gluten-Free Sourdough Bread. *European Food Research and Technology*, 2017, p. 1-10. DOI: 10.1007/s00217-017-3020-1.
89. MOORE, M.M., SCHOBER, T.J., DOCKERY, P. ir ARENDT, E.K. Textural Comparisons of Gluten-free and Wheat-based Doughs, Batters, and Breads. *Cereal Chemistry* Wiley Online Library, 2004, vol. 81, p. 567-575. DOI: 10.1094/CCHEM.2004.81.5.567.
90. American Association of Cereal Chemists Approved Methods Committee. Guidelines for Measurement of Volume by Rapeseed Displacement, AACC Method 10-05. *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists*, 2000, .
91. *LST ISO 1442:1996. Duona Ir Pyrago Kepiniai. Akytumo Nustatymas*. 1996-04-30. ed. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 1996.
92. DABA, H. ir kt. Detection and Activity of a Bacteriocin Produced by *Leuconostoc Mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, vol. 57, p. 3450-3455. ISBN 0099-2240.
93. GUPTA, R., GANGOLIYA, S. ir SINGH, N. Reduction of Phytic Acid and Enhancement of Bioavailable Micronutrients in Food Grains. *Journal of Food Science and Technology* India: , 2015, vol. 52, p. 676-684. ISBN 0022-1155. DOI: 10.1007/s13197-013-0978-y.

94. CHARALAMPOPOULOS, D., WANG, R., PANDIELLA, S.S. ir WEBB, C. Application of Cereals and Cereal Components in Functional Foods: A Review. *International journal of food microbiology*, 2002, vol. 79, p. 131-141. ISBN 01681605. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00187-3.
95. DE ANGELIS, M. ir kt. . Phytase Activity in Sourdough Lactic Acid Bacteria: Purification and Characterization of a Phytase from *Lactobacillus Sanfranciscensis* CB1. *International journal of food microbiology*, 2003, vol. 87, p. 259-270. ISBN 01681605. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00072-2.
96. ZOTTA, T., RICCIARDI, A. ir PARENTE, E. Enzymatic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Cornetto Di Matera Sourdoughs. *International journal of food microbiology*, 2007, vol. 115, p. 165-172. ISBN 0168-1605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.026.
97. MANINI, F. ir kt. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Wheat Bran Sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, 2016, vol. 66, p. 275-283. ISBN 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.10.045.
98. CARRIZO, S.L. ir kt. . Ancestral Andean Grain Quinoa as Source of Lactic Acid Bacteria Capable to Degrade Phytate and Produce B-Group Vitamins. *Food Research International*, 2016, vol. 89, p. 488-494.
99. KATINA, K. *Sourdough: A Tool for the Improved Flavour, Texture and Shelf-Life of Wheat Bread*. 2005 ISBN 951-38-6650-5.
100. WICK, M., STOLZ, P., BÖCKER, G. ir LEBEAULT, J. Influence of several Process Parameters on Sourdough Fermentation. *Acta Biotechnologica* Wiley Online Library , 2003, vol. 23, p. 51-61.
101. YAZAR, G. ir TAVMAN, Ş. Functional and Technological Aspects of Sourdough Fermentation with *Lactobacillus Sanfranciscensis*. *Food Engineering Reviews*, 2012, vol. 4, p. 171-190. ISBN 1866-7910. DOI: 10.1007/s12393-012-9052-1.
102. MEROETH, C.B., HAMMES, W.P. ir HERTEL, C. Characterisation of the Microbiota of Rice Sourdoughs and Description of *Lactobacillus Spicheri* Sp. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, vol. 27, p. 151-159. ISBN 0723-2020. DOI: <https://doi.org/10.1078/072320204322881763>.
103. VOGELMANN, S.A. ir kt. . Adaptability of Lactic Acid Bacteria and Yeasts to Sourdoughs Prepared from Cereals, Pseudocereals and Cassava and use of Competitive Strains as Starters. *International journal of food microbiology*, 2009, vol. 130, p. 205-212. ISBN 0168-1605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.020.
104. SCARNATO, L. ir kt. . Combination of Transglutaminase and Sourdough on Gluten-Free Flours to Improve Dough Structure. *Amino acids*, 2016, vol. 48, p. 2453-2465. ISBN 0939-4451. DOI: 10.1007/s00726-016-2258-4.
105. FALADE, A.T., EMMAMBUX, M.N., BUYS, E.M. ir TAYLOR, J.R.N. Improvement of Maize Bread Quality through Modification of Dough Rheological Properties by Lactic Acid Bacteria Fermentation. *Journal of cereal science*, 2014, vol. 60, p. 471-476. ISBN 0733-5210. DOI: 10.1016/j.jcs.2014.08.010.
106. EDEMA, M.O. ir SANNA, A.I. Functional Properties of Selected Starter Cultures for Sour Maize Bread. *Food Microbiology*, 2008, vol. 25, p. 616-625. ISBN 0740-0020. DOI: 10.1016/j.fm.2007.12.006.
107. SETTANNI, L. ir kt. . An Integrated Technological Approach to the Selection of Lactic Acid Bacteria of Flour Origin for Sourdough Production. *Food Research International*, 2013, vol. 54, p. 1569-1578. ISBN 0963-9969. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.10.017.
108. BANU, I., VASILEAN, I. ir APRODU, I. Effect of Lactic Fermentation on Antioxidant Capacity of Rye Sourdough and Bread. *Food science and technology research*, 2010, vol. 16, p. 571-576. ISBN 13446606. DOI: 10.3136/fstr.16.571.
109. AKIHITO, E. ir SANAE, O. *Lactobacillus Farraginis* Sp. Nov. and *Lactobacillus Parafarraginis* Sp. Nov., *Heterofermentative Lactobacilli Isolated from a Compost of Distilled Shochu Residue*, Microbiology Society, 2007 vol 57, 708-712. ISBN 14665026. Prieiga per: DOI:10.1099/ijs.0.64618-0.
110. VIJAYAKUMAR, J., ARAVINDAN, R. ir VIRUTHAGIRI, T. Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid. *Chemical and biochemical engineering quarterly Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa* , 2008, vol. 22, p. 245-264.
111. ZAPPAROLI, G., TORRIANI, S. ir DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus Sanfranciscensis* Strains by Randomly Amplified Polymorphic DNA and Pulsed-field Gel Electrophoresis. *FEMS microbiology letters*, 1998, vol. 166, p. 325-332. ISBN 0378-1097. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13908.x.

112. NOVOTNI, D. ir kt. . Glycemic Index and Firming Kinetics of Partially Baked Frozen Gluten-Free Bread with Sourdough. *Journal of cereal science*, 2012, vol. 55, p. 120-125. ISBN 0733-5210. DOI: 10.1016/j.jcs.2011.10.008.
113. WHITEHURST, R.J. ir VAN OORT, M. *Enzymes in Food Technology*. Wiley Online Library , 2010, .
114. ELGETI, D. ir kt. Volume and Texture Improvement of Gluten-Free Bread using Quinoa White Flour. *Journal of Cereal Science*, 2014 , 2014, vol. 59, p. 41-47. ISBN 0733-5210. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.10.010>.
115. AZEKE, M., EGIELEWA, S., EIGBOGBO, M. ir IHIMIRE, I. Effect of Germination on the Phytase Activity, Phytate and Total Phosphorus Contents of Rice (*Oryza Sativa*), Maize (*Zea Mays*), Millet (*Panicum Miliaceum*), Sorghum (*Sorghum Bicolor*) and Wheat (*Triticum Aestivum*). *Journal of Food Science and Technology*, 2011, vol. 48, p. 724-729. ISBN 0022-1155. DOI: 10.1007/s13197-010-0186-y.
116. BRINCH-PEDERSEN, H., MADSEN, C.K., HOLME, I.B. ir DIONISIO, G. Increased Understanding of the Cereal Phytase Complement for Better Mineral Bio-Availability and Resource Management. *Journal of cereal science*, 2014, vol. 59, p. 373-381. ISBN 0733-5210. DOI: 10.1016/j.jcs.2013.10.003.
117. STEINER, T. ir kt. . Distribution of Phytase Activity, Total Phosphorus and Phytate Phosphorus in Legume Seeds, Cereals and Cereal by-Products as Influenced by Harvest Year and Cultivar. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, vol. 133, p. 320-334. ISBN 0377-8401. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2006.04.007.
118. DELIA, E., TAJAJ, M. ir MÄNNER, K. Total Phosphorus, Phytate and Phytase Activity of some Cereals Grown in Albania and used in Non-Ruminant Feed Rations. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Taylor & Francis , 2011, vol. 25, p. 2587-2590. ISBN 1310-2818. DOI: 10.5504/BBEQ.2011.0062.
119. FÖSTE, M. ir kt. . Impact of Quinoa Bran on Gluten-Free Dough and Bread Characteristics. *European Food Research and Technology*, 2014, vol. 239, p. 767-775. DOI: 10.1007/s00217-014-2269-x.
120. DE VUYST, L. ir kt. . Microbial Ecology of Sourdough Fermentations: Diverse Or Uniform? *Food Microbiology*, 2014, vol. 37, p. 11-29. ISBN 0740-0020. DOI: 10.1016/j.fm.2013.06.002.
121. VIIARD, E. ir kt. Diversity and Stability of Lactic Acid Bacteria in Rye Sourdoughs of Four Bakeries with Different Propagation Parameters. *PloS one Public Library of Science*, 2016, vol. 11, DOI: 10.1371/journal.pone.0148325.
122. HANSEN, B. ir HANSEN, Å. Volatile Compounds in Wheat Sourdoughs Produced by Lactic Acid Bacteria and Sourdough Yeasts. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung Springer*, 1994, vol. 198, p. 202-209.
123. AXEL, C. ir kt. Application of *Lactobacillus Amylovorus* DSM19280 in Gluten-Free Sourdough Bread to Improve the Microbial Shelf Life. *Food Microbiology*, 2015, vol. 47, p. 36-44. ISBN 0740-0020. DOI: 10.1016/j.fm.2014.10.005.
124. RIZZELLO, C.G., LORUSSO, A., MONTEMURRO, M. ir GOBBETTI, M. Use of Sourdough made with Quinoa (*Chenopodium Quinoa*) Flour and Autochthonous Selected Lactic Acid Bacteria for Enhancing the Nutritional, Textural and Sensory Features of White Bread. *Food Microbiology*, 2016, vol. 56, p. 1-13. ISBN 0740-0020. DOI: 10.1016/j.fm.2015.11.018.
125. WOLTER, A. ir kt. Impact of Sourdough Fermented with *Lactobacillus Plantarum* FST 1.7 on Baking and Sensory Properties of Gluten-Free Breads. *European Food Research and Technology Heidelberg: Springer Berlin* , 2014, vol. 239, p. 1-12. ISBN 1438-2377. DOI: 10.1007/s00217-014-2184-1.
126. BARTKIENĚ, E. ir kt. . Development and Quality Evaluation of Lacto-Fermented Product Based on Hulled and Not Hulled Hempseed (*Cannabis Sativa* L.). *LWT-Food science and technology*, 2016, vol. 72, p. 544-551. ISBN 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.05.027.
127. BUSTOS, A.Y. ir kt. Lactic Acid Fermentation Improved Textural Behaviour, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Chia (*L.*) Dough. *Food technology and biotechnology*, 2017, vol. 55, p. 381. ISBN 13309862. DOI: 10.17113/ftb.55.03.17.5133.
128. ŠVARC-GAJIĆ, J. *Nutritional Insights and Food Safety*. 1st ed. New York: Nova Science Publishers, Inc , 2011, ISBN 9781611221305.
129. GALASSO, I. ir kt. Variability in Seed Traits in a Collection of *Cannabis Sativa* L. Genotypes. *Frontiers in plant science* *Frontiers* , 2016, vol. 7, p. 688.

130. RUIZ RODRÍGUEZ, L. ir kt. . Biodiversity and Technological-functional Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Spontaneously Fermented Quinoa Sourdoughs. *Journal of applied microbiology* Wiley Online Library , 2016, vol. 120, p. 1289-1301. DOI: 10.1111/jam.13104.
131. ELSANHOTY, R.M., GHONAMY, A.G., EL-ADLY, N.A. ir FAWZY RAMADAN, M. Impact of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacterium on the Survival of Bacillus Subtilus during Fermentation of Wheat Sourdough. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, vol. 41, ISBN 0145-8892. DOI: 10.1111/jfpp.13086.
132. RUSSELL, N. ir GOULD, G. Major Preservation Technologies. *Is:Food preservatives*. Springer, 2003, p. 14-24. ISBN 9780387300429. Prieiga per: DOI: 10.1007/978-0-387-30042-9_2.
133. BARUZZI, F., QUINTIERI, L., MOREA, M. ir CAPUTO, L. Antimicrobial Compounds Produced by Bacillus Spp. and Applications in Food. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* Formatex: Badajoz, Spain, 2011, vol. 2, p. 1102-1111.
134. PEPE, O. ir kt. . Rope-Producing Strains of Bacillus Spp. from Wheat Bread and Strategy for their Control by Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr , 2003, vol. 69, p. 2321-2329. ISBN 0099-2240; 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.69.4.2321-2329.2003.
135. MOORE, M., BELLO, F. ir ARENDT, E. Sourdough Fermented by Lactobacillus Plantarum FST 1.7 Improves the Quality and Shelf Life of Gluten-Free Bread. *European Food Research and Technology*, 2008, vol. 226, p. 1309-1316. ISBN 1438-2377. DOI: 10.1007/s00217-007-0659-z.
136. RÓŻYŁO, R. ir kt. . Gluten-Free Bread Prepared with Fresh and Freeze-Dried Rice Sourdough-Texture and Sensory Evaluation. *Journal of Texture Studies*, 2016, vol. 47, p. 443-453. ISBN 0022-4901. DOI: 10.1111/jtxs.12180.
137. IGLESIAS-PUIG, E. ir HAROS, M. Evaluation of Performance of Dough and Bread Incorporating Chia (Salvia Hispanica L.). *European Food Research and Technology*, 2013, vol. 237, p. 865-874.
138. KORUS, J., WITCZAK, M., ZIOBRO, R. ir JUSZCZAK, L. Hemp (Cannabis Sativa Subsp. Sativa) Flour and Protein Preparation as Natural Nutrients and Structure Forming Agents in Starch Based Gluten-Free Bread. *LWT*, 2017, vol. 84, p. 143-150. ISBN 0023-6438. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.046>.
139. KUREK, M. ir WYRWISZ, J. The Application of Dietary Fiber in Bread Products. *Journal of Food Processing and Technology*, OMICS Publishing Group, 2015, vol. 6, DOI: 10.4172/2157-7110.1000447.
140. STEFFOLANI, E., HERA, E., PÉREZ, G. ir GÓMEZ, M. Effect of Chia (S Alvia Hispanica L) Addition on the Quality of Gluten-Free Bread. *Journal of Food Quality*, 2014, vol. 37, p. 309-317. ISBN 0146-9428. DOI: 10.1111/jfq.12098.
141. CEBALLOS-GONZÁLEZ, C., BOLÍVAR-MONSALVE, J., RAMÍREZ-TORO, C. ir BOLÍVAR, G.A. Effect of Lactic Acid Fermentation on Quinoa Dough to Prepare Gluten-free Breads with High Nutritional and Sensory Quality. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2018, vol. 42, ISBN 0145-8892. DOI: 10.1111/jfpp.13551.
142. RÓŻYŁO, R. ir kt. . Effect of Adding Fresh and Freeze-dried Buckwheat Sourdough on Gluten-free Bread Quality. *International Journal of Food Science & Technology*, 2015, vol. 50, p. 313-322. ISBN 0950-5423. DOI: 10.1111/ijfs.12622.
143. TURKUT, G.M., CAKMAK, H., KUMCUOGLU, S. ir TAVMAN, S. Effect of Quinoa Flour on Gluten-Free Bread Batter Rheology and Bread Quality. *Journal of Cereal Science*, 2016, vol. 69, p. 174-181. ISBN 0733-5210. DOI: 10.1016/j.jcs.2016.03.005.
144. MIKULEC, A. ir kt. . Hemp Flour as a Valuable Component for Enriching Physicochemical and Antioxidant Properties of Wheat Bread. *LWT*, 2019, vol. 102, p. 164-172. ISBN 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.12.028.
145. WANG, Y. ir kt. . Influence of Extrusion Condition and Hemp Addition on Wheat Dough and Bread Properties. *Food Science and Biotechnology*, 2013, vol. 22, p. 89-97. ISBN 1226-7708. DOI: 10.1007/s10068-013-0053-5.
146. HRUSKOVA, M. ir SVEC, I. Chemical, Rheological and Bread Characteristics of Wheat Flour Influenced by Different Forms of Chia (Salvia Hispanica L.). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2015, p. 872-877.
147. MOHAMMADI, M. ir kt. . Development of Gluten-Free Flat Bread using Hydrocolloids: Xanthan and CMC. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2013, vol. 20, p. 1812-1818. ISBN 1226-086X. DOI: 10.1016/j.jiec.2013.08.035.

148. LAZARIDOU, A. ir kt. . Effects of Hydrocolloids on Dough Rheology and Bread Quality Parameters in Gluten-Free Formulations. *Journal of Food Engineering*, 2007, vol. 79, p. 1033-1047. ISBN 0260-8774. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.03.032.
149. SCIARINI, L.S., RIBOTTA, P.D., LEÓN, A.E. ir PÉREZ, G.T. Effect of Hydrocolloids on Gluten-free Batter Properties and Bread Quality. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, vol. 45, p. 2306-2312. ISBN 09505423. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02407.x.
150. KITTISUBAN, P., RITTHIRUANGDEJ, P. ir SUPHANTHARIKA, M. Optimization of Hydroxypropylmethylcellulose, Yeast, β -Glucan, and Whey Protein Levels Based on Physical Properties of Gluten-Free Rice Bread using Response Surface Methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 2014, vol. 57, p. 738-748. ISBN 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.02.045.
151. MARIOTTI, M., PAGANI, M.A. ir LUCISANO, M. The Role of Buckwheat and HPMC on the Breadmaking Properties of some Commercial Gluten-Free Bread Mixtures. *Food Hydrocolloids*, 2013, vol. 30, p. 393-400. ISBN 0268-005X. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.07.005.
152. VEGA-GÁLVEZ, A. ir kt. . Nutrition Facts and Functional Potential of Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.), an Ancient Andean Grain: A Review. *Journal of the science of food and agriculture*, Wiley Online Library , 2010, vol. 90, p. 2541-2547. DOI: 10.1002/jsfa.4158.
153. 2009/827/EB: 2009 m. Spalio 13 d. Komisijos Sprendimas, Kuriuo Leidžiama Tiekiti Rinkai Ispaninio Šalavijo (*Salvia Hispanica*) Sėklas Kaip Naują Maisto Sudedamąją Dalį Pagal Europos Parlamento Ir Tarybos Reglamentą (EB) Nr. 258/97 . , 2009.
154. *Sveikatos Mokymų Ir Ligų Prevencijos Centras - Maisto Bazė* [interaktyvus]. [žiūrėta 2019-05-06]. Prieiga per: <http://foodbase.azurewebsites.net>.
155. CALLAWAY, J. Hempseed as a Nutritional Resource: An Overview. *Euphytica* Springer , 2004, vol. 140, p. 65-72. ISBN 1573-5060. DOI: 10.1007/s10681-004-4811-6.
156. *Nutrition Value* [interaktyvus]. [žiūrėta 2019-05-06]. 2019. Prieiga per: <https://www.nutritionvalue.org/>.

PADĖKA

Dėkoju mokslinio darbo vadovei doc., dr. Daliai Čižeikienei už palaikymą ir pastabas, skatinimą tobulėti ir naudingas konsultacijas visų studijų metu.

Dalis mokslinio tyrimo finansuota 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-712-03-0039 „Pieno rūgšties bakterijų raugų ir įvairių vertingų sėklų įtaka duonos be glitimo kokybei, saugai ir juslinėms savybėms“, 2017–2018, projekto vadovė D. Čižeikienė;
- Projekto Nr. 09.3.3-LMT-K-712-09-0052 „Pieno rūgšties bakterijų raugų įtaka kepinų mikrobiologinio gedimo lėtinimui ir juslinėms savybėms“, 2018, projekto vadovė D. Čižeikienė.

Mokslo konferencijų pranešimų medžiagos darbo tema

Darbo tema konferencijų metu pristatytų pranešimų medžiagų publikacijos:

- Jagelavičiūtė, J., ir Čižeikienė, D. Pieno Rūgšties Bakterijų įtaka Duonos Raugų, Neturinčių Glitimo Baltymų, Savybėms. *Chemija Ir Cheminė Technologija: Studentų Mokslinės Konferencijos Pranešimų Medžiaga*, Klaipėdos Universitetas, Jūros Technologijų Ir Gamtos Mokslų Fakultetas, 2018 M. Gegužės 18 D, 2018, 87-91.
- Jagelavičiūtė, J, ir Čižeikienė, D. Pieno Rūgšties Bakterijų Raugų Ir įvairių Vertingų Sėklų įtaka Duonos Be Glitimo Kokybei, Saugai Ir Juslinėms Savybėms. *Studentų Moksliniai Tyrimai* 2017, 2018, 58-60.

PRIEDAI

1 priedas. Hidrokolidai ir jų įtaka kepiniams bei sėklų, naudojamų duonos gamyboje, maistinė vertė

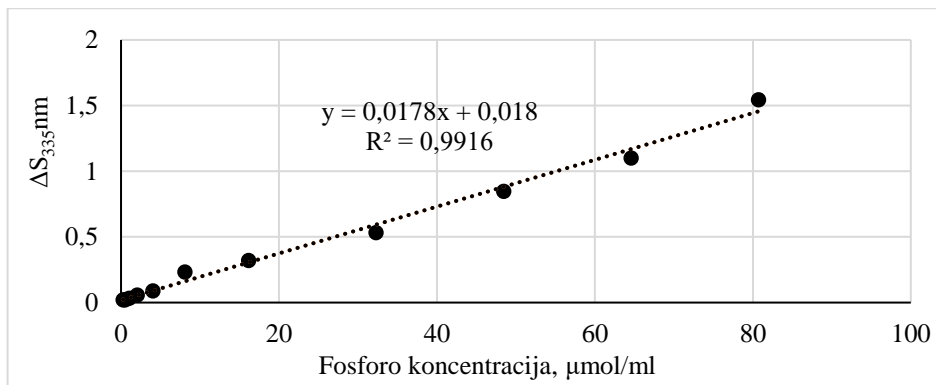
1 lentelė. Hidrokolidai ir jų įtaka kepinių be glitimo savybėms

Naudojamas priedas	Miltai	Kiekis nuo miltų masės	Suteikiamas poveikis	Šaltinis
Guaro derva	Ryžių	20 ir 30 g/kg	Padidėja kepinių savitasis tūris, gaunamas mažesnis minkštimo kietumas	[31]
Ksantano derva	Ryžių miltai ir kukurūzų krakmolai	5–20 g/kg	Padidėja drėgmės kiekis kepinuose. Didėjant priedui mažėja minkštimo kietumas ir didėja elastingumas	[147]
	Ryžių	1–2 %	Padidina minkštimo elastingumą ir šviesumą	[148]
	Ryžių 40 %, kukurūzų 40 %, sojų miltai 20 %	0,5 %	Padidėja kepinių savitasis tūris, porų dydis kepinio minkštyme, sumažėja minkštimo kietumas, žiedėjimas	[149]
Karboksimetilinė celiuliozė	Ryžių miltai ir kukurūzų krakmolai	5–20 g/kg	Didėjant priedui susidaro didesnės poros minkštyme	[147]
	Ryžių	1–2 %	1 % padidina kepinių akytumą	[148]
	Ryžių 40 %, kukurūzų 40 %, sojų miltai 20 %	0,5 %	Padidėja kepinių minkštimo porų dydis, sumažėja minkštimo kietumas bei žiedėjimas	[149]
Pektinas	Ryžių	1–2 %	Padidins kepinių tūrį. 2 % priedo ženkliai padidins minkštimo elastingumą ir akytumą	[148]
Agarozė	Ryžių	1–2 %	Pagerina kepinio tūrį	[148]
β-gliukanai	Ryžių	1–2 %	Padidina kepinių tūrį. 1 % padidina kepinių akytumą. 2 % padidina kepinių kietumą	[148]
Hidroksipropilmetilceliuliozė	Ryžių krakmolai	5 g/100g	Padidėja kepinių savitasis tūris	[150]
	Grikių	0,5 %	Padidėja kepinių drėgnis, padidėja kepinių tūris, sumažėja žiedėjimo greitis	[151]

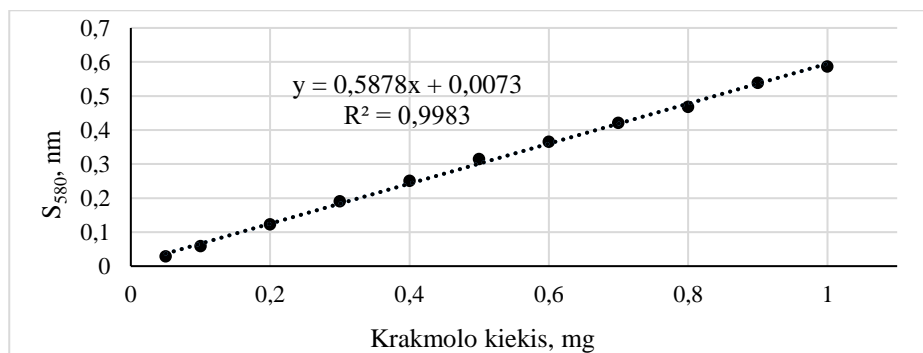
2 lentelė. Kai kurių vertingų sėklų, naudojamų duonos gamyboje, maistinė vertė [40, 152, 153, 154, 155, 156]

Maistinė vertė	Bolivinės balandos	Čija	Saulėgražos	Kanapės	Linų sėmenys	Moliūgo sėklos
Baltymai, g/100	12,5–16,7	20–22	22,50	24,8	20,3–23,40	30
Riebalai, g/100	5,5–8,5	30–35	49,00	35,5	31–37,1	49
Angliavandeniai, g/100	60,0–74,7	25–41	21,50	27,6	28,9–34	11
Skaidulos, g/100	1,92–10,5	18–30	2,70	27,6	24,40–24,5	6
Mineralinės medžiagos, g/100	3,0–3,8	4–6	3,30	5,6	2,40–3,90	4,78
Ca, mg/100g	27,5–148,7	631	98	145	170–195	46
P, mg/100g	140–468,9	860	618	1160	722–750	1233
Mg, mg/100g	26,0–502,0	335	420	483	291	592
Fe, mg/100g	1,4–16,8	7,72	6,30	14	2,7–8,20	8,82
Zn, mg/100g	2,75–4,8	4,58	5,20	7	7,80	7,81
K, mg/100g	7,5–1200	407	725	859	750–762	809
Cu, mg/100g	0,2–5,1	0,924	1,8	2	1,2	1,34

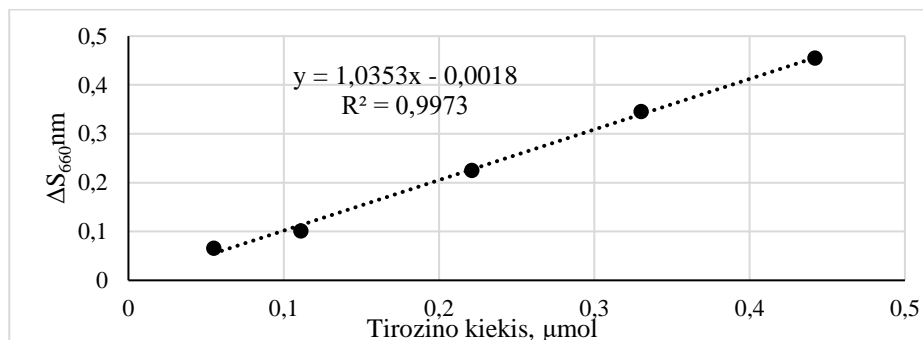
2 priedas. Kalibracinės tiesės fermentinių aktyvumų nustatymui



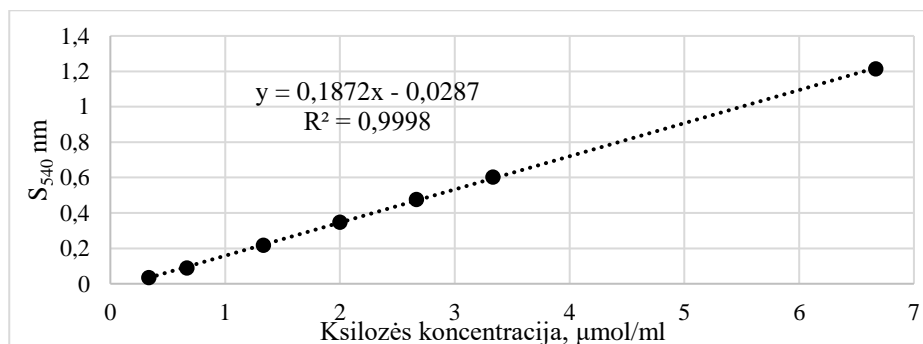
1 pav. Fosforo kalibracinė tiesė



2 pav. Krakmolo kalibracinė tiesė



3 pav. L – tirozino kalibracinė tiesė



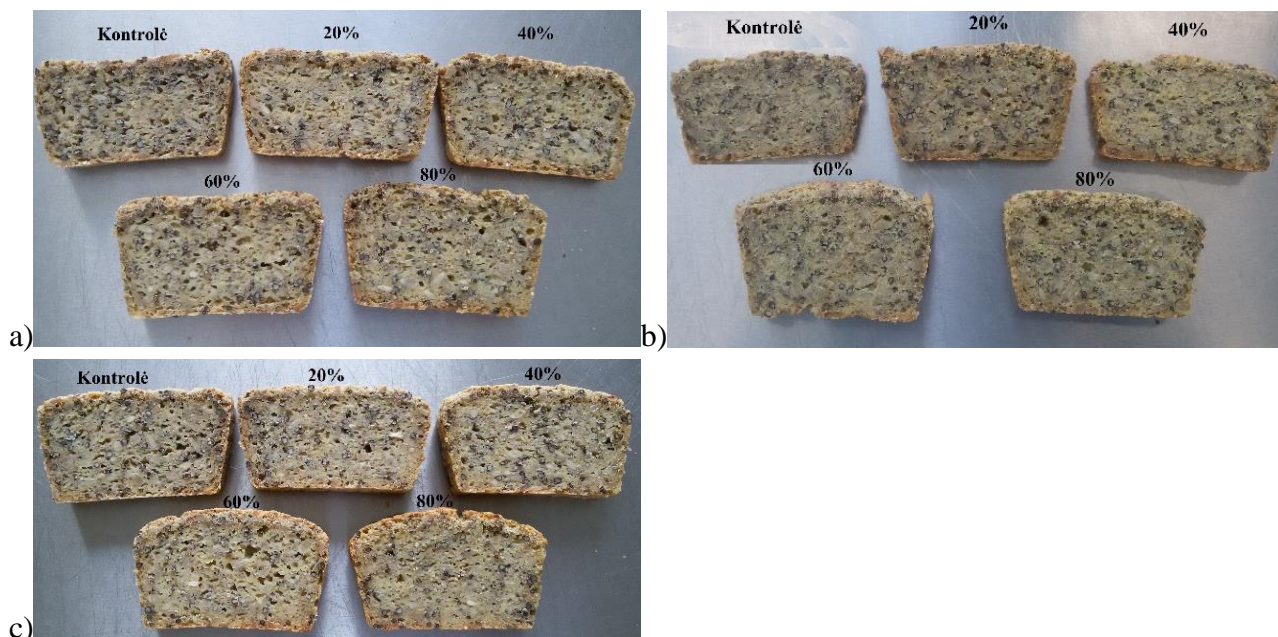
4 pav. Kalibracinė ksilozės tiesė

3 priedas. Raugo poveikis *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporoms, vertinant difuzijos į agarą metodu

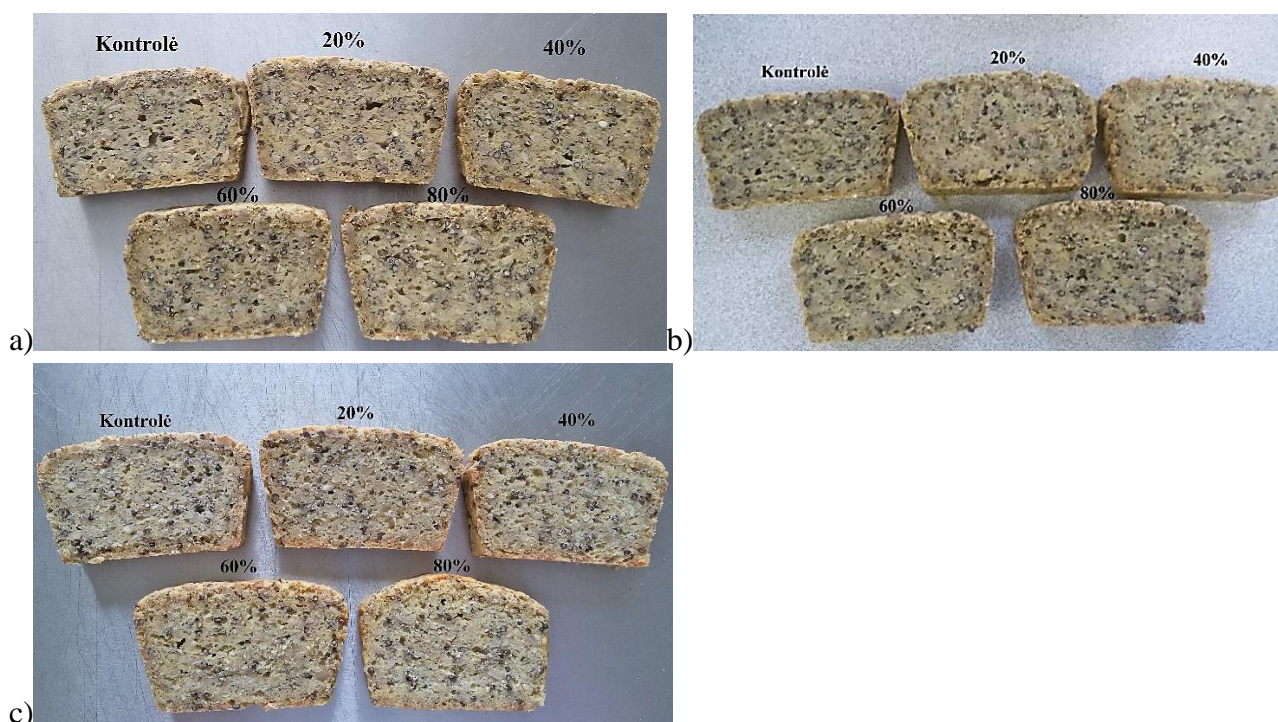


1 pav. Kvietinių visų grūdo dalių miltų raugo poveikis *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sporoms vertinant difuzijos į agarą metodu, po 24 val. pasėlių inkubavimo 30°C temperatūroje

4 priedas. Kepinių su ryžių ir kukurūzų miltų raugais nuotraukos

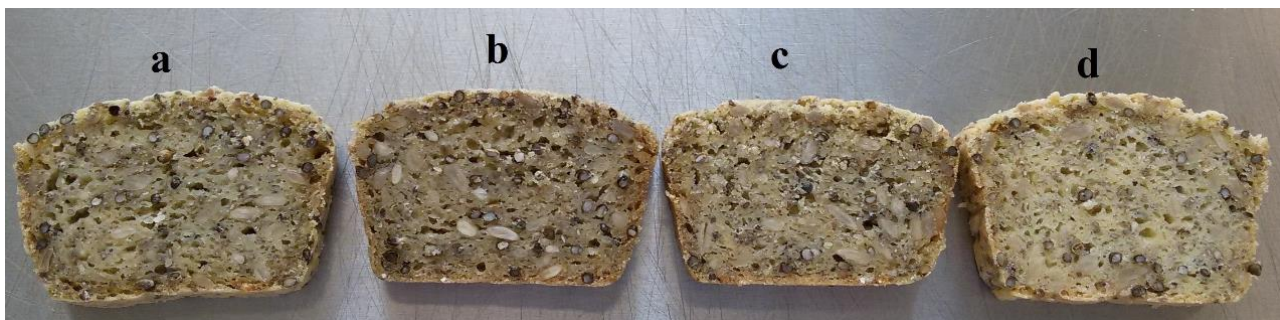


1 pav. Nuotraukos kepinėjų, kurių gamyboje buvo naudojami ryžių miltų raugai ruošti su *L. curvatus* 51 (a), *L. farraginis* 206 (b) ir *L. sanfranciscensis* W2 (c)

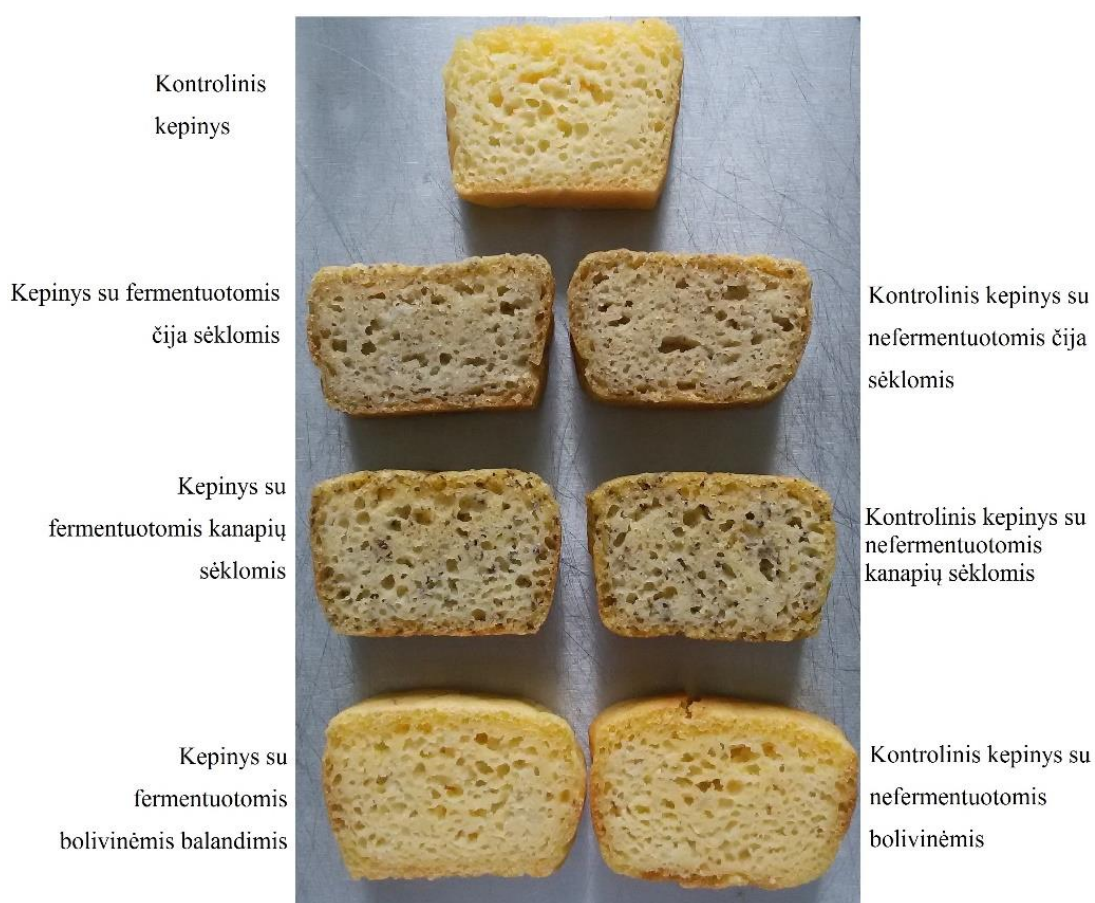


2 pav. Nuotraukos kepinėjų, kurių gamyboje buvo naudojami kukurūzų miltų raugai ruošti su *L. curvatus* 51 (a), *L. farraginis* 206 (b) ir *L. sanfranciscensis* W2 (c)

5 priedas. Kepinių su fermentuotų sėklų produktais nuotraukos



1 pav. Nuotraukos kepinų, kurių gamyboje buvo naudojamos su *L. sanfranciscensis* W2 fermentuotos sėklos: čija sėklos (b), kanapių sėklos (c), bolivinės balandos (d) ir kontrolinis kepinys, kuomet fermentuotos sėklos nebuvo naudotos (a)



2 pav. Duona be glitimo, gaminta naudojant fermentuotas (ir nefermentuotas) čija, kanapių sėklas ir bolivines balandas.