



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Fermentuotų bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės
sėklų produktų tyrimai bei panaudojimas kepiniams**

Baigiamasis magistro projektas

Ieva Gaidė

Projekto autorė

doc. dr. Dalia Čižeikienė

Vadovė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Fermentuotų bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų produktų tyrimai bei panaudojimas kepiniams

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

Ieva Gaidė

Projekto autorė

doc. dr. Dalia Čižeikienė

Vadovė

doc. dr. Milda Keršienė

Recenzentė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Ieva Gaidė

Fermentuotų bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų produktų tyrimai bei panaudojimas kepiniams

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Ievos Gaidės, baigiamasis projektas tema „Fermentuotų bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų tyrimai bei panaudojimas kepiniams“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

Ieva Gaidė

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Gaidė, Ieva. Fermentuotų bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų tyrimai bei panaudojimas kepiniams. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Dalia Čižeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: bolivinės balandos sėklos, pluoštinės kanapės sėklos, fermentacija.

Kaunas, 2020. 78 p.

Santrauka

Pastaruoju metu didelio vartotojų susidomėjimo sulaukė bolivinės balandos ir kanapių sėklos, kurios yra skaidulinių, makro- ir mikroelementų, baltymų, riebalų, folio rūgšties, jodo, B grupės vitaminų šaltinis. Pieno rūgšties bakterijos yra pagrindiniai maisto pramonėje naudojami mikroorganizmai, glaudžiai susiję su sveika mityba ir sveikata. Šio mokslinio darbo metu tirtos pieno rūgšties bakterijomis fermentuotų bolivinės balandos ir kanapių sėklų bei šių sėklų baltymų frakcijų technologinės ir funkcinės savybės bei fermentuotų sėklų produktų panaudojimo galimybės kepinų juslinėms savybėms ir kokybei gerinti.

Vertinant antimikrobines ir antioksidacines fermentuotų produktų savybes, didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu, vertinant DPPH laisvųjų radikalų surišimo metodu, pasižymėjo bolivinės balandos sėklos fermentuotos su *Lactobacillus plantarum* MR24 (169,4 mg troloksio ekvivalento (TE)/100 g fermentuotų sėklų). Didžiausiu antimikrobiniu aktyvumu pasižymėjo bolivinės balandos fermentuotos su *L. acidophilus* DSM 20079 slopinusios *Bacillus cereus* augimą; kanapių sėklos fermentuotos su *L. plantarum* MR24 slopinusios *Staphylococcus aureus* ir *Bacillus cereus*, kanapių sėklos fermentuotos su *L. acidophilus* DSM 20079 slopinusios *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* augimą. Didžiausiu fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo bolivinės balandos ir kanapių sėklos fermentuotos su *L. brevis* R26 (atitinkamai 61,4 ir 65,6 mg galo rūgšties ekvivalento (GRE)/100 g fermentuotų sėklų). Didžiausia L-pieno rūgšties izomero koncentracija nustatyta fermentuotose bolivinės balandos sėklose su *L. acidophilus* DSM 20079 (42,5 g/kg fermentuotų sėklų). Bolivinės balandos sėklų su *L. brevis* R26 ir *L. acidophilus* DSM 20079 fermentacija, lėtino produktų oksidacinį gedimą, juos saugant šaldymo kameroje –18 °C temperatūroje.

Baltymų frakcijose, kurios buvo hidrolizuotos pepsinu, neliko didesnės (45 kDa) molekulinės masės baltymų lyginant su frakcijomis prieš hidrolizę, po hidrolizės pepsinu daugiausiai nustatyti mažesnės (nuo 6,5 kDa iki 24 kDa) molekulinės masės baltymai. Nustatyta, kad ir pieno rūgšties bakterijų fermentacija, ir fermentinė hidrolizė pepsinu, daro įtaką baltymų frakcijų sudėčiai.

Baltymų frakcijos, tirpios 70 % etanolyje, pasižymėjo didesniu aktyvumu bei fenolinių junginių kiekiu nei tirpios druskų tirpaluose (0,8 M NaCl) ar vandenyje. Baltymų frakcijų hidrolizė pepsinu, ABTS ir DPPH laisvųjų radikalų sujungimo gebą sumažino lyginant su nehidrolizuotomis frakcijomis. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo nehidrolizuota bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. acidophilus* DSM 20079 baltymų frakcija, tirpinta 70 % etanolio tirpale, įvertinus tiek DPPH ir ABTS⁺ surišimo gebos metodu (atitinkamai 7716 ir 3261 mg TE/100

g baltymų). Bendru didžiausiu fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo nehidrolizuota bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. acidophilus* DSM 20079 baltymų frakcija, tirpinta 70 % etanolio tirpale (186 mg GRE/100 g baltymų). Fermentacija su *L. acidophilus* DSM 20079 ir *L. brevis* R26 padidino fenolinių junginių kiekį etanolinėse kanapių baltymų frakcijose. Antimikrobinis aktyvumas pasireiškė pepsinu hidrolizuotų kanapių baltymų frakcijų. Didžiausiu antimikrobiniu aktyvumu pasižymėjo 70 % etanolyje tirpių baltymų hidrolizuotos pepsinu frakcijos lyginant su frakcijomis tirpiomis 0,8 M NaCl tirpale ir vandenyje. Stipriausias antimikrobinis etanolinių frakcijų aktyvumas gautas kanapių sėklų fermentuotų su *L. acidophilus* DSM 20079 ir bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. plantarum* MR24 mėginiuose po hidrolizės pepsinu.

Keptos pagerintos bandelės su kanapių ir bolivinės balandos sėklomis fermentuotomis su *L. brevis* R26 bakterija, taip pat su nefermentuotomis maltomis ir nemaltomis kanapių ir bolivinės balandos sėklomis, o taip pat keptos bandelės be sėklų priedų (kontroliniai kepiniai). Nustatyti šių kepinių kokybės rodikliai (bendras titruojamasis rūgštingumas, akytumas, savitasis tūris, kepinio formos išlaikymo rodiklis), o taip pat juslinės savybės ir priimtumas. Kepinių savitasis tūris ir akytumas beveik visais atvejais nustatytas mažesnis su fermentuotomis sėklomis lyginant su kontroliniais mėginiais. Didžiausiu formos išlaikymo rodikliu pasižymėjo bandelės su 5 % nefermentuotų maltų bolivinės balandos sėklų priedu (0,57). Didžiausiu rūgštingumu pasižymėjo bandelės su 10 % fermentuotų kanapių sėklų priedu (2,4 °N).

Gaide, Ieva. Investigation of Fermented Quinoa and Hemp Seed and Its Application in Bakery Products. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. Dalia Cizeikiene; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: quinoa seeds, hemp seeds, fermentation.

Kaunas, 2020. 78.

Summary

In recent years, quinoa and hemp seeds gain more and more interest, because of the content of fiber, macro and micro compounds, protein, lipids, folic acid, iodine, vitamin B. Lactic acid bacteria are associated with health care and are the main microorganisms used in food industry. During this study, quinoa and hemp seeds were fermented using *Lactobacillus* bacteria strains. Technological and functional properties were evaluated of fermented quinoa and hemp seeds, and protein fractions extracted from these seeds. Bread was made using fermented and unfermented quinoa and hemp seeds.

The highest antioxidant activity was determined in quinoa seeds fermented with *Lactobacillus plantarum* MR24 (169.4 trolox equivalent in mg per 100 g of fermented seeds). The highest antimicrobial activity was obtained in quinoa seeds fermented with *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 against *Bacillus cereus*, hemp seeds fermented with *Lactobacillus plantarum* MR24 against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* and hemp seeds fermented with *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 against *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhimurium*. The highest total phenolic content was obtained in quinoa and hemp seeds fermented with *Lactobacillus brevis* R26 (61.4 and 65.6 galic acid equivalent in mg per 100 g of fermented seeds). The highest L-lactic acid concentration was obtained in quinoa seeds fermented with *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 (42.5 g per kg of fermented seeds). Quinoa seeds fermentation with *Lactobacillus brevis* R26 and *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 decreased lipid peroxidation during storage in freezer at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperature.

After hydrolysis with pepsin >45 kDa molecular weight proteins were hydrolysed. The main fractions after hydrolysis was from 6,5 kDa to 24 kDa. It was observed that fermentation using *Lactobacillus* bacteria strains and hydrolysis with pepsin has an influence on the size of proteins.

The highest antioxidant activity and total phenolic content were obtained in proteins fraction soluble in 70 % ethanol. Antioxidant activity was lower after enzymatic hydrolysis. Protein fraction soluble in 70 % ethanol obtained from quinoa seeds fermented with *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 showed the highest DPPH and ABTS radical scavenging activity (7716 and 3261 trolox equivalent in mg per 100 g of protein) and total phenolic content (186 galic acid equivalent in mg per 100 g of protein). In all cases, higher antimicrobial activity was obtained after hydrolysis with pepsin. The highest antimicrobial activity was obtained in protein fraction soluble in 70 % ethanol from hemp seeds fermented with *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 and quinoa seeds fermented with *Lactobacillus plantarum* MR24.

Bread was made using fermented and unfermented quinoa and hemp seeds. Texture properties (total titratable acidity, porosity, specific volume, shape retention) and sensory properties were determined. Specific volume and porosity (in almost all cases) were lower in bread with fermented seeds compared with control bread (without seed). Shape retention in bread with 5 % of unfermented quinoa flour was the highest (0.57). Total titratable acidity was the highest in bread with 10 % of fermented hemp seed (2.4 °N).

TURINYS

| | |
|--|-----------|
| SANTRUMPOS | 10 |
| ĮVADAS | 11 |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA | 13 |
| 1.1. Pluoštinės kanapės sėklų maistinė vertė ir funkcinės savybės | 13 |
| 1.2. Bolivinės balandos sėklų maistinė vertė ir funkcinės savybės | 14 |
| 1.3. Biotechnologinių priemonių taikymas bolivinės balandos ir kanapių sėklų produktų funkcionaliosios vertės padidinimui | 16 |
| 1.3.1. Fermentinių preparatų panaudojimas sėklų baltymų funkcinėms savybėms gerinti | 16 |
| 1.3.2. Fermentacijos panaudojimo galimybės sėklų baltymų funkcinėms savybėms gerinti | 17 |
| 1.4. Antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų junginių poveikis sveikatai | 19 |
| 1.5. Antimikrobinio aktyvumu pasižyminčių bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų junginių poveikis sveikatai | 20 |
| 1.6. Pluoštinės kanapės ir bolivinės balandos sėklose esantys bioaktyvieji peptidai | 21 |
| 1.7. Kanapių ir bolivinės balandos sėklų produktų įtaka kepiniams | 23 |
| 2. TYRIMŲ METODAI | 26 |
| 2.1. Pagrindinės tyrimų kryptys..... | 26 |
| 2.2. Tyrimų objektai | 26 |
| 2.3. Vandens aktyvumo nustatymas | 27 |
| 2.4. Pieno rūgšties bakterijų skaičius nustatymas | 27 |
| 2.5. Fermentuotų produktų aktyviojo ir bendrojo titruojamojo rūgštingumo nustatymas..... | 28 |
| 2.6. Fermentuotų sėklų produktų antimikrobinio aktyvumo nustatymas | 28 |
| 2.7. Fermentuotų sėklų produktų mėginių paruošimas bendram fenolinių junginių kiekio ir antioksidacinio aktyvumo, vertinant DPPH ir ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu, nustatymui | 29 |
| 2.8. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas..... | 29 |
| 2.9. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu..... | 29 |
| 2.10. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS radikalų surišimo gebos metodu | 30 |
| 2.11. Fermentinių aktyvumų nustatymas..... | 31 |
| 2.11.1. Celiuliazinis aktyvumas..... | 31 |
| 2.11.2. Amilazinis aktyvumas | 31 |
| 2.11.3. Fitazinis aktyvumas | 32 |
| 2.11.4. Proteazinis aktyvumas | 33 |
| 2.12. Vandens sugerties indekso nustatymas..... | 34 |
| 2.13. Lakiojo rūgštingumo nustatymas | 34 |
| 2.14. Pieno rūgšties izomerų koncentracijos nustatymas | 34 |
| 2.15. Peroksidų nustatymas fermentuotų sėklų ilgalaikio saugojimo metu | 34 |
| 2.16. Baltymų frakcijų išskyrimas | 35 |
| 2.17. Baltymų kiekio nustatymas | 36 |
| 2.18. Baltymų sudėties pagal molekulinės masės nustatymas gelio elektroforezės metodu..... | 36 |
| 2.19. Baltymų antimikrobinio aktyvumo nustatymas..... | 37 |
| 2.20. Baltymų mėginių paruošimas bendram fenolinių junginių kiekio nustatymui ir antioksidacinio aktyvumo, vertinant DPPH ir ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 2.21. Bandelių su fermentuotomis ir nefermentuotomis sėklomis gamyba ir tyrimai | 38 |
| 2.22. Statistinė analizė | 39 |
| 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS | 40 |
| 3.1. Terpės drėgno įtaka vandens aktyvumui | 40 |
| 3.2. Bolivinės balandos ir kanapių sėklų terpės įtaka pieno rūgšties bakterijų gyvybingumui | 40 |
| 3.3. Fermentacijos trukmės įtaka produktų aktyviajam ir bendram titruojamam rūgštingumui | 41 |
| 3.4. Fermentuotų sėklų produktų antioksidacinis aktyvumas..... | 42 |
| 3.5. Bendras fenolinių junginių kiekis fermentuotuose sėklų produktuose..... | 44 |
| 3.6. Fermentuotų sėklų produktų antimikrobinis poveikis | 45 |
| 3.7. Fermentuotų sėklų produktų fermentiniai aktyvumai | 47 |
| 3.8. Fermentacijos įtaka bolivinės balandos ir kanapių bioproduktų vandens įgėrimui | 49 |
| 3.9. Fermentacijos įtaka bolivinės balandos ir kanapių bioproduktų lakiajam rūgštingumui | 49 |
| 3.10. Fermentacijos įtaka pieno rūgšties izomerų susidarymui bolivinės balandos ir kanapių bioproduktuose | 50 |
| 3.11. Peroksidų pokyčiai fermentuotų sėklų ilgalaikio saugojimo metu..... | 51 |
| 3.12. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų sudėčiai pagal molekulinės mases..... | 52 |
| 3.13. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų antimikrobinėms savybėms | 54 |
| 3.14. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų antioksidaciniam aktyvumui | 58 |
| 3.15. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų fenolinių junginių kiekiui | 61 |
| 3.16. Sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka pagerintų bandelių, kokybei ir juslinėms savybėms .. | 62 |
| 3.16.1. Kanapių ir bolivinės balandos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių savitajam tūriui | 62 |
| 3.16.2. Kanapių ir bolivinės balandos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių aktyvumui... | 63 |
| 3.16.3. Kanapių ir bolivinės balandos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių formos išlaikymo rodikliui..... | 64 |
| 3.16.4. Kanapių ir bolivinės balandos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių rūgštingumui | 64 |
| 3.16.5. Kanapių ir bolivinės balandos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių juslinėms savybėms ir bendram priimtinumui | 65 |
| IŠVADOS | 68 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS..... | 70 |
| MAGISTRO DARBO REZULTATŲ VIEŠINIMAS | 78 |
| DALYVAVIMAS PROJEKTUOSE..... | 78 |
| PRIEDAI | 79 |
| 1 priedas. Amino rūgštys | 79 |
| 2 priedas. Apklauso anketa | 80 |

SANTRUMPOS

a_w – vandens aktyvumas

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfoninė rūgštis)

AV – aktyvumo vienetai

A. – *Aspergillus*

BTR – bendrasis titruojamasis rūgštingumas

B. – *Bacillus*

DPPH – 2,2-difenilpikrilhidrazilas

E. – *Escherichia*

GRE – galo rūgšties ekvivalentas

KSV – koloniją sudarantys vienetai

L. – *Lactobacillus*

MRS – De Man, Rogosa ir Sharpe mitybinė terpė

PRB – pieno rūgšties bakterijos

P. – *Penicillium*

St. – *Staphylococcus*

S. – *Salmonella*

TE – trolokso ekvivalentas

THC – Δ^9 -tetrahydrokanabinolis

ĮVADAS

Pastaruoju metu didelio vartotojų susidomėjimo sulaukė bolivinės balandos ir kanapių sėklos, kurios yra skaidulinių, makro- ir mikroelementų, taip pat baltymų, riebalų, folio rūgšties, jodo, B grupės vitaminų šaltinis. Bolivinės balandos sėklos išsiskiria gerai subalansuota amino rūgščių sudėtimi bei dideliu kiekiu lizino, ko stokoja tradicinė grūdinė žaliava, o taip pat dideliu kiekiu metionino, fenilalanino, triptofano, vitamino E, omega-6, polifenolių bei pasižymi dideliu kiekiu riebalų. Kanapių sėklos laikomos vienomis maistingiausių pasaulyje, jų sudėtyje randama daugiau nei 30 % riebalų, kurie turtingi omega-3, bei panašus kiekis baltymų, o taip pat nemažai vitaminų, makro- ir mikroelementų. Užsienio šalyse ir Lietuvoje vystant tiek kvietinių, tiek ir kepinų be gliuteno pramonę, šios sėklos dažnai naudojamos duonos ir pyrago kepiniams gardinti. Didėjant vartotojų poreikiui sveikesniems ir natūralesniems maisto produktams, maisto technologai skatinami kurti naujus, funkcinėmis savybėmis pasižyminčius, natūralius, mikrobiologinį bei oksidacinį gedimą lėtinančius, produktus, taikant pažangias biotechnologines priemones. Viena iš natūralių ir dažniausiai galimų naudoti kepinų kokybei pagerinti priemonių galėtų būti fermentacija pieno rūgšties bakterijomis (PRB). Įvertinant šias problemas, aktuali naujų biotechnologinių priemonių, leidžiančių pagerinti duonos ir pyrago kepinų technologines bei funkcines savybes, paieška. Pastaruoju metu didelio susidomėjimo maisto pramonėje sulaukė probiotinėmis savybėmis pasižyminčios PRB, kurios maisto gamybos procesuose naudojamos nuo seno, produktų kokybės ir saugos gerinimui. Fermentuoti PRB grūdų produktai turi teigiamą poveikį duonos technologinėms ir funkcinėms savybėms, todėl aktualu ištirti šiais mikroorganizmais fermentuotų ir didelio susidomėjimo sulaukusių bolivinės balandos bei kanapių sėklų bioproduktus. PRB yra pagrindiniai maisto pramonėje naudojami mikroorganizmai ir yra glaudžiai susiję su sveika mityba ir sveikata. Dėl šios priežasties šie mikroorganizmai yra 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 priimtumą, kas ir lemia unikalias tokių produktų savybes. Be to, kai kurios PRB pasižymi fitaziniu aktyvumu, dėl to padidėja mikro- ir makroelementų pasisavinamumas iš grūdų produktų. Pastaruoju metu mokslininkai atkreipė dėmesį į PRB, gaminančias tik L-pieno rūgšties izomerą, kurio poveikis žmogaus sveikatai yra priimtinas. Pageidautina, kad maisto produktų gamybai naudojamos PRB gamintų mažus kiekius D-pieno rūgšties izomero arba visai jo negamintų, todėl svarbu nustatyti netradicinėje terpėje kultivuotų PRB gaminamų izomerų santykį, kadangi jis priklauso nuo fermentacijos terpės. Plečiant kepinų asortimentą svarbu pritaikyti tokių kepinų gamyboje antimikrobiniu, antioksidaciniu ir fitaziniu aktyvumu pasižyminčias PRB, kurios kepiniams su fermentuotais sėklų produktais suteiktų malonų aromatą ir savitą skonį.

Šio mokslinio tyrimo tikslas – ištirti PRB fermentuotų bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų technologines ir funkcines savybes bei šių produktų panaudojimo galimybes kepinų juslinėms savybėms ir kokybei gerinti. Tikslui pasiekti suformuluoti uždaviniai:

1. įvertinti PRB *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* ir *Lactobacillus brevis* dauginimosi galimybes smulkintų bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų terpėse, nustatyti fermentuotų sėklų produktų antioksidacines, antimikrobines savybes bei fenolinių junginių kieki;
2. įvertinti PRB fermentuotų bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų produktų vandens įgėrimą, fermentinius aktyvumus (amilazinį, proteazinį, ksilanazinį, celiuliazinį, fitazinį), pieno rūgšties ir jos izomerų kiekį, lakujų rūgštingumą;

3. įvertinti peroksidų pokyčius užšaldytose fermentuotose bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklose jų laikymo -18°C temperatūroje metu;
4. įvertinti fermentacijos įtaką sėklų baltymų frakcijų antioksidacinėms, antimikrobinėms savybėms bei fenolinių junginių kieki;
5. įvertinti fermentuotų PRB bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų įtaką pagerintų kepinių kokybei ir jusliniams rodikliams.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Pluoštinės kanapės sėklų maistinė vertė ir funkcinės savybės

Pramoninės, ne narkotinio tipo kanapės (lot. *Cannabis sativa*) yra gerai žinomas, turintis didelę reikšmę, augalas, kaip pluošto, maisto ir bioaktyviųjų fitochemikalų šaltinis. Keletą dešimtmečių kanapių kultivavimas kai kuriose valstybėse dėl Δ^9 -tetrahidrokanabinolio (THC) – psichoaktyvios medžiagos, esančios šiame augale, buvo uždraustas. Dėl kultivarų, kuriuose THC kiekis yra labai mažas, pastaraisiais metais kanapių auginimas tampa legalus ir šio augalo rinka visame pasaulyje sparčiai didėja. Didelis susidomėjimas kanapių sėklomis (žr. 1 pav.) yra dėl jų maistinių medžiagų kiekio: 35,5 % riebalų, 24,8 % baltymų, 20–30 % angliavandenių, 27,6 % skaidulų (5,4 % virškinamų ir 22,2 % nevirškinamų) [1]. Nepaisant kanapių sėklų maistinės vertės, jos taip pat pasižymi teigiamu poveikiu sveikatai, įskaitant cholesterolio ir aukšto kraujo spaudimo mažinimą. Kanapių sėklos yra naudojamos maiste, liaudies medicinos preparatų bei pašarų gamyboje [2]. Be maistinės vertės, kanapių sėklos pasižymi dideliu kiekiu medžiagų, turinčių antioksidacinių savybių – fenoliniais junginiais, tokoferoliais, fitosteroliais. Šie junginiai prisideda prie rizikos mažinimo susirgti lėtinėmis ligomis (vėžiu, riebalų metabolizmo sutrikimu, širdies ir kraujagyslių, dermatologinių, virškinamojo trakto ligomis). Didelis kiekis įvairių polifenolių yra nustatyta kanapių sėklose, daugiausiai flavonoidų – flavanonai, flavanoliai, flavonoliai ir izoflavonai. Tokoferoliai yra randami kanapių sėklų aliejinėse frakcijose, jie veikia kaip antioksidantai ir neleidžia vykti nesočiųjų riebalų rūgščių oksidacijai [3]. Kanapių sėklų aliejuje yra gausu polinesočiųjų riebalų rūgščių ir toks aliejus yra naudojamas spausdintuvų dažuose, medienos konservantuose, detergentuose ir muiluose. Kanapių sėklų aliejus yra laikomas gerai subalansuotu žmonių mitybai dėl dviejų – linolo ir linoleno – polinesočiųjų riebalų rūgščių santykio (3:1) [2]. Šios sėklos turi nemažą kiekį sieros turinčių amino rūgščių, taip pat didelį kiekį arginino ir glutamo rūgšties [4]. Pluoštinės kanapės sėklų amino rūgščių sudėtis pateikta 1 lentelėje [5].

Globulinai (baltymai tirpūs druskos tirpaluose) yra pagrindinė baltymų frakcija (~75 %) kanapių sėklose. Kanapių sėklų globulinai daugiausiai sudaryti iš 11S ir 7S baltymų tipų, kurie gali būti atskirti naudojant skirtingus pH. Albuminai (baltymai tirpūs vandenyje) sudaro ~25 % kanapių sėklų baltymų, jie yra lanksčios hidrofiliškos struktūros, todėl apsaugoti nuo didelio susilankstymo ir daugelis baltymų liekanų yra kontakte su aplinka. Dėl šios priežasties, albuminai yra lankstesnės struktūros ir mažiau kompaktiški nei globulinai. Nepaisant to, antrinė albuminų struktūra pasižymi didesniu polipeptidų išsidėstymo tvarkingumu nei globulinų. Esant pH 3, albuminai pasižymi nedidele tretinės struktūros konformacija, kuri padidėja, padidėjus pH iki 7 ar 9 [6].

Remiantis Shan‘u ir kt., kanapių sėklas sudaro 35,08 % baltymų, iš kurių 43,4 % globulinai, 28,7 % albuminai, 3,3 % prolaminai – baltymai, tirpūs alkoholyje [7].

Buvo tirtas kanapių baltymų izoliatų hidrolizavimas pepsinu ir tripsinu. Prieš hidrolizę matomas didelis kiekis baltymų, kurių molekulinė masė 15–35 kDa, tačiau, jau per pirmą hidrolizės pepsinu minutę, baltymai buvo stipriai suskaidyti, išsiskiriant oligopeptidams, kurių molekulinė masė mažesnė nei 10 kDa. Tęsiant hidrolizę nuo 1 iki 120 min., oligopeptidų pasiskirstymas pagal molekulinę masę mažėjo, t.y. sumažėjo didesnės molekulinės masės oligopeptidų [8].

Iš kanapių sėklų išskirtas 10 kDa baltymas, kurį sudaro dvi 27 ir 61 amino rūgšties polipeptidinės grandinės, jo sudėtyje nustatyta daug amino rūgščių, kuriose yra sieros – metionino ir cisteino. Taip pat nustatyta, jog šis baltymas neturi slopinančio poveikio tripsinui, kurį turi kiti panašūs baltymai,

o tai lemia tai, jog tokie baltymai yra nepageidaujami maiste, nes trukdo normaliai virškinimo sistemos veiklai. Dėl šios priežastis, šis minėtas baltymas, išskirtas iš kanapių, gali būti naudingas praturtinant maisto produktus [9].



1 pav. Kanapių (lot. *Cannabis sativa*) sėklos

1 lentelė. Amino rūgščių sudėtis kanapių ir bolivinės balandos sėklose

| | Pluoštinės kanapės sėklos | Bolivinės balandos sėklos |
|--|---------------------------|---------------------------|
| Nepakeičiamosios amino rūgštys | | |
| Histidinas | 2,8 | 3,1 |
| Isoleucinas | 3,9 | 4,7 |
| Leucinas | 6,6 | 7,8 |
| Lizinas | 4,2 | 7,2 |
| Metioninas | 1,4 | 2,6 |
| Fenilalaninas | 4,6 | 5,3 |
| Treoninas | 4,6 | 4,5 |
| Valinas | 4,9 | 5,8 |
| Bendras nepakeičiamų amino rūgščių kiekis | 37,2 | 40,9 |
| Pakeičiamosios amino rūgštys | | |
| Alaninas | 4,5 | 6,1 |
| Argininas | 9,9 | 9,1 |
| Asparto rūgštis | 9,4 | 9,4 |
| Cisteinas | 0,2 | 0,0 |
| Glutamo rūgštis | 16,2 | 15,4 |
| Glicinas | 3,9 | 6,7 |
| Prolinas | 4,5 | 4,0 |
| Serinas | 5,1 | 4,8 |
| Tirozinas | 3,7 | 3,6 |
| Bendras pakeičiamų amino rūgščių kiekis | 53,7 | 59,1 |
| Pluoštinės kanapės ir bolivinės balandos sėklų [5, 16] amino rūgščių sudėtis pateikta g/100 g baltymų. | | |

1.2. Bolivinės balandos sėklų maistinė vertė ir funkcinės savybės

Bolivinė balanda (lot. *Chenopodium quinoa*) yra grūdų tipo maistinis augalas. Bolivinė balanda daugiausiai auginama Peru, Bolivijoje, Ekvadore, Argentinoje, Čilėje ir Kolumbijoje, tačiau paskutiniu metu pradėta kultivuoti Europoje, Šiaurės Amerikoje ir Afrikoje. Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacija yra pasiūliusi bolivinę balandą, kaip svarbų 21-ojo amžiaus maisto šaltinį [10]. Bolivinės balandos sėklose (žr. 2 pav.) yra nuo 13,1 % iki 16,7 % baltymų, o tai yra daugiau

nei ryžiuose, miežiuose, kukurūzuose ar rugiuose, ir artima tiek, kiek baltymų yra kviečiuose. Nepaisant nemažo baltymų kiekio bolivinės balandos sėklose, šie baltymai taip pat yra laikomi aukštos kokybės, dėl subalansuoto nepakeičiamų amino rūgščių kiekio (žr. 1 lentelę). Bolivinės balandos sėklose yra randamos visos nepakeičiamos amino rūgštys, taip pat didelis kiekis lizino, metionino ir treonino, kurių nėra plačiai vartojamose grūdinėse kultūrose – kviečiuose ir kukurūzuose. Nepaisant didelio kiekio ir aukštos biologinės vertės baltymų, bolivinės balandos sėklos turi daug riebalų savo sudėtyje (5,5–7,4 g/100 g), t.y. daugiau nei kviečiuose (1,7 g/100 g) ir ryžiuose (0,7 g/100 g), o tai leidžia šias sėklas laikyti alternatyviu aliejaus šaltiniu. Palmitino rūgštis yra pagrindinė nesočioji rūgštis bolivinės balandos sėklose, kuri sudaro 10 % viso riebalų kiekio, o nesočiosios riebalų rūgštys – oleino (19,7–29,5 %), linolo (49,0–56,4 %) ir alfa-linolenų (8,7–11,7 %) sudaro 88 % bendro riebalų kiekio, panašiai kaip ir sojos pupelėse. Ląstelių membranose esančios riebalų rūgštys yra gerai apsaugotos nuo laisvųjų radikalų poveikio, dėl vitamino E, kurio bolivinės balandos sėklose yra daugiau nei kviečiuose. Kitų vitaminų – riboflavino (B₂), piroksidino (B₆), folio rūgšties – kiekiai taip pat yra didesni šiose sėklose nei daugelyje kitų grūdinių kultūrų. Piroksidino ir folio rūgšties kiekiais, esantys 100 g bolivinės balandos sėklų, atitinka suaugusiojo paros normą, riboflavino kiekis atitinka 80 % vaikų ir 40 % suaugusiųjų paros normos. Mineralų sudėtis šiose sėklose taip pat yra svarbi žmonių sveikatai, jose randama kalcio, magnio, geležies, vario ir cinko, daugelis šių mineralų yra randami didesnėmis koncentracijomis nei kitose grūdinėse kultūrose [11]. Taip pat, bolivinės balandos sėklose nėra gliuteno, todėl jas gali vartoti celiakija (gliuteno netoleravimas) sergantys žmonės.



2 pav. Bolivinės balandos (lot. *Chenopodium quinoa*) sėklos

Bolivinės balandos sėklose yra randama didesnis kiekis fitosterolių negu miežiuose, rugiuose ar kukurūzuose. Fitosteroliai pasižymi antioksidaciniu, priešuždegiminiu, priešvėžiniu aktyvumais. Bolivinės balandos sėklose nustatytas didelis kiekis fenolinių junginių, kurie pasižymi antioksidaciniu aktyvumu. Daugiau nei 20 fenolinių junginių, laisvosiose ar konjuguotose formose, yra nustatyti šiose sėklose. Daugiausiai tai yra fenolinės rūgštys – vanilino ir ferulo rūgštys – bei jų junginiai – flavonoidai (kvercetas) ir glikozidai [11]. Šiose sėklose taip pat yra randama saponinų, t.y. didelė glikozidų klasė, kurie pasižymi antibiotinėmis, fungicidinėmis, insekticidinėmis ir terapeutinėmis savybėmis [12].

Tiriant bolivinės balandos sėklų baltymų izoliatus bei hidrolizatus, nustatyta, jog prieš hidrolizę ~60 % visų baltymų, sudarė baltymai didesni nei 10 kDa ir ~20 % <1 kDa, likusi dalis buvo 1–10 kDa. Tiriant baltymų izoliatų frakciją atlikti tyrimai kontroliniam mėginiui, kuris nebuvo hidrolizuotas, tačiau laikomas tokiose pačiose sąlygose, kaip ir baltymų hidrolizatai. Tokiame kontroliniame mėginyje sumažėjo >10 kDa baltymų frakcijos dalis (~30 %) bei padidėjo <1 kDa (~40 %), tam turėjo įtakos temperatūra, kurioje buvo laikomas mėginys, tai rodo, jog aukštesnė temperatūra daro įtaką baltymų sudėčiai. Po hidrolizės papainu ir mikrobinės kilmės fermentu, panašiu į papainą, baltymų frakcijos dalis >10 kDa sumažėjo iki ~15 %, o <1 kDa frakcija padidėjo iki beveik 60 % [13].

Nustatyta, jog bolivinės balandos sėklose yra ~17 % baltymų, iš kurių ~27 % sudaro vandenyje tirpūs – albuminai, ~24 % druskų tirpaluose tirpūs – globulinai, ~5% alkoholyje tirpūs – prolaminai, kiekiai gali skirtis priklausomai nuo augalo veislės [14].

Iš bolivinės balandos sėklų išskirtas bioaktyvūs peptidas IQAEGGLT (žr. priedai, Amino rūgštys), pasižymėjo dipeptidil-peptidazės slopinimu (fermentas susijęs su II tipo cukriniu diabetu), taip pat α -glukozidazės slopinimu, šio fermento slopinimu pasižymėjo ir DKDYPK (žr. priedai, Amino rūgštys) peptidas. Nustatyta, jog GEHGSDGNV (žr. priedai, Amino rūgštys) mažina α -amilazės ir α -glukozidazės aktyvumą, šie du fermentai neigiamai veikia cukriniu diabetu sergančių žmonių sveikatą [15].

1.3. Biotechnologinių priemonių taikymas bolivinės balandos ir kanapių sėklų produktų funkcionaliosios vertės padidinimui

1.3.1. Fermentinių preparatų panaudojimas sėklų baltymų funkcinėms savybėms gerinti

Pagrindinis kanapių sėklų baltymas prieš hidrolizę yra edestinas, kurio molekulinė masė ~30 kDa ir 15 kDa. Šis baltymas buvo hidrolizuojamas veikiant įvairius fermentus, jo bazinė dalis suardyta praėjus 2 valandoms nuo hidrolizės pradžios, o rūgštinė – 1 valandai. Netirpus edestinas buvo hidrolizuotas į mažos molekulinės masės tirpius peptidus, hidrolizę vykdant 4 valandas. Vertinant antioksidacinį aktyvumą, nustatyta, jog kanapių baltymų izoliatai pasižymėjo 11–14 % aktyvumu prieš hidrolizę, vykdant hidrolizę, antioksidacinis aktyvumas didėjo. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas rūgštyje tirpiems kanapių baltymų izoliatams, hidrolizuotiems 2 valandas su HT proteolitiniu koncentratu (Enzyme solutions, Australija) – 73,3 %. Antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo kanapių baltymų izoliato ekstrakcijos būdo, taip pat ir nuo naudojamo fermento – proteazės, kuo didesniu proteolitiniu aktyvumu pasižymi fermentas, tuo didesnis antioksidacinis aktyvumas gautas. Nustatyta, jog mažesnės molekulinės masės peptidų frakcija (<1 kDa) pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu (25 %), negu didesnės masės (5–10 kDa) peptidų frakcija (20 %), o nefrakcionuoti kanapių baltymų hidrolizatai, pasižymi mažesne nei 5 % DPPH radikalo sujungimo geba [17].

Tiriant smulkintų bolivinės balandos sėklų hidrolizavimo galimybes, buvo naudojami pepsinas, pankreatinas ir kiaulės tulžies ekstraktas. Nustatyta, jog po hidrolizės, bolivinės balandos baltymai pasižymėjo net iki 5,6 kartų didesne deguonies radikalo surišimo geba, lyginant su tirtais prieš hidrolizę, o baltymų frakcijos, kurių dydis buvo <5 kDa, pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu, lyginant su frakcijomis >5 kDa [18].

1.3.2. Fermentacijos panaudojimo galimybės sėklų baltymų funkcinėms savybėms gerinti

Jau daug amžių fermentacijos procesas yra naudojamas bei tobulinamas siekiant apsaugoti maisto produktus ir kovoti su tam tikrų medžiagų stygiu maiste. Daugelis fermentuotų maisto produktų tradiciškai yra gaminami fermentacijos būdu, kuomet į maisto produktą yra pridama dominuojančios mikroorganizmų kultūros. Žaliavoje esanti mikroflora arba starterinės kultūros, dedamos į maisto produktą, stimuliuoja probiotines funkcijas, mikro- ir makro maistinių medžiagų biologinį prieinamumą, antioksidantų, antimikrobinių junginių ir kitų funkcinį junginių gamybą fermentacijos metu.

Fermentuotas maistas praturtina žmonių mitybą net tik maistinėmis medžiagomis, bet taip pat ir kvapo ir aromato mišiniu bei priimtina tekstūra. Tradicinė fermentacija padidina bendrą amino rūgščių, vitaminų ir mineralų kiekį arba jų biologinį prieinamumą, taip pat pagerina terapeutinį potencialą, kuris turi tiesioginį teigiamą poveikį žmonių sveikatai [19]. Daugelis fermentuotų maisto produktų yra fermentuojami naudojant tiek funkcinis, tiek ir ne funkcinis mikroorganizmus, kurie yra randami žaliavoje ar aplinkoje. Šie mikroorganizmai pakeičia biocheminę žaliavos sudėtį, tokiu būdu yra pagerinamas kvapas, virškinamumas ir aromatas, taip pat mitybinė ir farmakologinė fermentuotų maisto produktų vertė. Yra nustatyta, jog fermentuojant sėklas, susidaro antidiabetiniu, antioksidaciniu poveikiu pasižymintys junginiai. Fermentuojant cukrus, susidaro pieno rūgštis, kuri skatina PRB augimą žmogaus virškinamajame trakte [20, 21]. Taip pat fermentacija pagerina virškinimą, pailgina produktų galiojimo laiką, pagerina sėklų aromatą bei skonį [20].

Probiotikais yra vadinami gyvi mikroorganizmai, kurių suvartojus tinkamą kiekį, pasireiškia teigiamas poveikis organizmui. Probiotikai teigiamą poveikį sukelia reguliuodami virškinimo funkcijas. Laktozės netoleravimo, skirtingų formų virškinimo ir urogenitalinių infekcijų rizikos, cholesterolio kiekio mažinimas, imuninės sistemos reguliavimas yra keletas funkcijų, kurias gali atlikti probiotikai. Jie gali mažinti vėžio riziką, ypač gaubtinės žarnos, padeda gydantis nuo maisto alergijos. Probiotikai pasireiškia patogenų skaičiaus bei jų metabolinio aktyvumo sumažinimo *in vitro* galimybėmis. *Lactobacillus* genčiai priklausančios bakterijos yra pagrindinis probiotikų šaltinis ir apibūdinamos kaip gramteigiamos bakterijos, labiau anaerobinės, tačiau gali gyventi ir aerobinėse sąlygose, pieno rūgštis yra pagrindinis jų išskiriamas metabolitas. Įvairios Laktobacilų rūšys ir štamai yra naudojami žmonių; *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus* [22].

PRB yra didelė bakterijų grupė priklausanti *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ir *Weissella* genčiai. Tradiciniuose fermentuotuose maisto produktuose fermentacija yra atliekama natūraliai žaliavoje esančių PRB, tačiau selektyvus starterinių kultūrų pridėjimas į žaliavą leidžia kontroliuoti visą fermentacijos procesą bei sumažina nesėkmių riziką, o taip pagerinama galutinio produkto kokybė. Kelios PRB funkcinės savybės yra ištirtos: antioksidacinis *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* aktyvumas [22], *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ir *Weissella* gebėjimas išskirti antimikrobinius junginius [23], *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. curvatus* sukeliama antimonybinių junginių degradavimas [24], *V. carniphilus*, *V. lutrae*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* ir *P. acidilactici* fibrinolitinis aktyvumas [25], *Lactococcus* sp. ir *Lactobacillus* sp. gebėjimas sudaryti peptidus [26], *L. delbrueckii* ir *L. bulgaricus* gebėjimas sudaryti polilaktinę rūgštį [27], probiotinis *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. fermentum*, *L.*

rhamnosus, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *St. thermophilus*, *B. lactis*, *B. longum* ir *B. breve* efektas [28]. Šios savybės yra labai svarbios pasirenkant starterinę kultūrą fermentuotų maisto produktų gamybai.

PRB jau nuo senų laikų yra naudojamos kaip natūralus, vartotojams ir gamtai draugiškas būdas apsaugoti maistą bei pašarus. Ne vienas tyrimas yra atliktas su antimikrobiniais PRB išskirtais junginiais. Keletas *L. plantarum* štamų buvo tirti dėl jų gebėjimo išskirti organines rūgštis ir/ar ciklinius dipeptidus [29].

Bolivinės balandos sėklų fermentacija PRB, pailgina kepinių laikymo trukmę dėl pagaminamų organinių rūgščių, taip pat padidina mitybinę maisto produktų vertę dėl susidariusių mažos molekulinės masės peptidų bei amino rūgščių, kurie yra geriau pasisavinami virškinamajame trakte [30]. Bolivinės balandos sėklų fermentacijos PRB metu dėl fermentų, esančių sėklose arba cheminių reakcijų, katalizuojamų PRB, išsiskiria fenoliniai junginiai, kurie pasižymi antioksidacinėmis, antimikrobinėmis savybėmis. Sėklų fermentacijos metu, fenolinės rūgštys – kafeino, *p*-kumaro, ferulo ir vanilino – išskiriamos dideliais kiekiais [31].

Rizzelo'as atliko bolivinės balandos sėklų fermentaciją PRB (*L. plantarum*, *L. rossiae* ir *Pediococcus pentosaceus* štamais). Nustatyta, jog fermentuotos sėklos visais tirtais atvejais pasižymėjo didesnius antioksidaciniu aktyvumu (DPPH laisvųjų radikalų surišimo geba), lyginant su nefermentuotomis sėklomis. Nefermentuotose sėklose antioksidacinis aktyvumas nustatytas 19,3 %, o fermentuotose nuo 32,7 % iki 84,3 %, kai teigiamai kontrolei (butilintam hidroksitolenui 1 mg/ml) – 84,8 %. Vertinant ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebą, fermentuotos bolivinės balandos sėklos pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu (0,27–0,29 mmol troloksio ekvivalento (TE)/l), negu nefermentuotos (0,045 mmol TE/l). Taip pat buvo vertinta linolo rūgšties autoksidacija, nustatyta, jog sėklų fermentacija *L. plantarum* štamais stipriai slopino šį procesą, kuris sukelia produktų gedimą. Tiriant bolivinės balandos sėklų fermentuotą su *L. plantarum* štamu antioksidacinių savybių turinčius peptidus, buvo nustatyta, jog šie junginiai yra mažesnės molekulinės masės nei 10 kDa [10].

Fermentuojant bolivinės balandos sėklas su *L. plantarum* štamu, pieno rūgšties kiekis po 24 valandų padidėjo 2,5 karto. Taip pat po fermentacijos padidėjo bendra laisvųjų amino rūgščių koncentracija – nuo 2,3 g/l iki 5 g/l, nustatyta, jog po fermentacijos visų amino rūgščių koncentracija padidėjo bent jau 2 kartus, išskyrus leuciną, kurio 2 kartus sumažėjo [30].

Fenilacto ir hidroksifenilacto rūgštys yra junginiai, pasižymintys priešgrybelinėmis savybėmis, kurie susidaro skylant fenilalaninui ir tirozinui, dėl to pailgėja produktų galiojimo trukmė. Prieš bolivinės balandos sėklų fermentaciją, hidroksifenilacto rūgšties buvo 35 mg/l, o fenilacto rūgšties nebuvo nustatyta. Po 24 valandų fermentacijos su *L. plantarum* štamu, hidroksifenilacto rūgšties susidarė 1,8 karto daugiau (63,9 mg/l), o fenilacto rūgšties 45,5 mg/l [30].

Vykdamas bolivinės balandos sėklų fermentaciją su *L. plantarum* ir *L. rossiae* štamais, nustatyta, jog fermentacija padidino pieno ir acto rūgšties, fenolinių junginių, bendrą amino rūgščių kiekius. Taip pat po fermentacijos padidėjo antioksidacinis, fitazinis aktyvumai [32].

Remiantis mokslininku Li, fermentuotose bolivinės balandos sėklose su *L. casei*, lyginant su nefermentuotomis sėklomis, nustatytas 1,2 karto didesnis kiekis baltymų, 11,3 karto daugiau laisvųjų

amino rūgščių, 1,6 karto daugiau tiamino (vitamino B₁), 2 kartais daugiau riboflavino (vitamino B₂) [33].

Fermentuojant smulkintas kanapių sėklas PRB (*L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides*), buvo pastebėtas acto (5 kartus) ir pieno (>100 kartų) rūgščių, taip pat laisvųjų amino rūgščių (3 kartus) kiekių padidėjimas, fitino rūgšties (3 kartus) sumažėjimas, t.y. fermentuotose kanapių sėklose pasireiškė fitazinis aktyvumas.

1.4. Antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų junginių poveikis sveikatai

Tyrimai rodo, jog mityba yra glaudžiai susijusi su lėtinėmis ligomis: širdies ir kraujagyslių ligos, vėžys, cukrinis diabetas, Alzheimerio liga. Vaisių, daržovių, taip pat ir grūdinių kultūrų vartojimas, turi įtaką mažinant riziką susirgti lėtinėmis ligomis. Buvo pateikta hipotezė, jog taip yra dėl to, jog šiuose maisto produktuose yra fitochemikalų, kurie kovoja su oksidaciniu stresu, organizme palaikydami balansą tarp oksidantų ir antioksidantų. Padidėjęs kiekis oksidantų, organizme gali sukelti oksidacinį stresą, todėl yra pakenkiama molekulėms – riebalams, baltymams, DNR. Oksidacinis molekulių ardymas padidina vėžinių ir širdies bei kraujagyslių ligų susirgimų riziką, todėl yra rekomenduojama valgyti maistą, kuriame yra didelis kiekis antioksidantų [34].

Riebalų oksidacija yra pagrindinė maisto produktų gedimo priežastis, dėl kurios atsiranda pašalinis aromatas, kvapas, trumpėja vartojimo laikas, keičiasi tekstūra ir blogėja maistinė vertė. Antioksidantai yra maisto priedai, kurie pailgina maisto produktų vartojimo laiką, nesukeldami neigiamų padarinių [35]. Antioksidantai esantys maiste prisijungia laisvuosius radikalus, taip nutraukdami grandines reakcijas, kurios gali pažeisti svarbias molekules. Antioksidantai (flavonodai, fenolinės rūgštys, taninai, vitaminas C, vitaminas E) turi ir kitų biologinių savybių, tokių kaip priešuždegiminis, priešvėžinis poveikiai, taip pat palaiko normalią virškinamojo trakto veiklą. Pagrindinės antioksidantų grupės yra: vitaminai (C ir E), karotenoidai (karotenai ir ksantofilai) ir polifenoliai (flavonodai, fenolinės rūgštys, lignanai ir stilbenai) [36], taip pat antioksidacinių savybių gali turėti ir bioaktyvieji peptidai [10].

Iš kanapių sėklų buvo išskirtas 10 kDa baltymas, kurį sudaro dvi polipeptidinės grandinės, viena sudaryta iš 27 amino rūgščių, kita iš 61. Šias dvi polipeptidines grandines, kurios yra sujungtos dviem disulfidiniais ryšiais, sudaro 18 % amino rūgščių, kurios turi sieros (cisteinas ir metioninas). Šis baltymas gali būti naudojamas praturtinant maistą, ypatingai kaip junginys, padidinantis antioksidantų kiekį žmogaus organizme. Taip yra dėl to, jog cisteinas yra svarbus glutationo, stipraus organizmų antioksidanto, komponentas [6].

Tiriant bolivinės balandos sėklų baltymus, buvo atlikta baltymų hidrolizato ultrafiltracija per skirtingo dydžio membranas (10 ir 5 kDa). Nustatyta, jog antioksidacinis aktyvumas buvo daug didesnis 5 kDa filtrato negu 10 kDa. Šie rezultatai rodo, jog mažos molekulinės masės peptidai, pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu negu didesnės [37].

Nongonierma ir kt. tyrė bolivinės balandos sėklų baltymų izoliatų bei hidrolizatų (papainu ir mikrobinės kilmės fermentu, panašiu į papainą) antioksidacinį aktyvumą, naudojant deguonies radikalo absorbcijos gebos metodą. Bolivinės balandos baltymų izoliatas pasižymėjo 264 μmol TE/g baltymų, po hidrolizės pepsinu 501 μmol TE/g baltymų, o po hidrolizės pepsinu ir mikrobinės

kilmės fermentu – 514 $\mu\text{mol TE/g}$ baltymų. Tai rodo, jog baltymų hidrolizė, antioksidacinį aktyvumą padina beveik du kartus [13].

1.5. Antimikrobiniu aktyvumu pasižyminčių bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų junginių poveikis sveikatai

Augalai sintetina daug aromatinių junginių, kurie yra išskiriami bei tyrinėjamos jų savybės. Daugeliu atveju šie antriniai metabolitai atlieka apsauginį vaidmenį, saugant augalą nuo mikroorganizmų, vabzdžių ir žolėdžių. Antimikrobiniai fitochemikalai yra suskirstyti į keletą kategorijų. Viena iš didžiausių grupių yra fenoliniai junginiai ir polifenoliai – fenolinės rūgštys (cinamono ir kavos) slopina bakterijų, grybų augimą, chinonai, pvz. antrachinonas yra bakteriostatinis *B. anthracis*, *C. pseudodiphthericum* ir *P. aeruginosa* bei bakteriocidinis *P. pseudomalliae*, flavonoidai, pvz. katechinas, taip pat turi antimikrobinių savybių. Šis junginys inaktyvuoja choleros toksiną, kurį išskiria *Vibrio* bakterijos. Terpenoidai ir eteriniai aliejai yra veiksmingi prieš bakterijas, grybus, virusus ir pirmuonis, gali kontroliuoti *L. monocytogenes* dauginimąsi. Alkaloidai yra heterocikliniai azoto junginiai, solamarginas ir kiti alkaloidai gali būti veiksmingi prieš ŽIV infekciją, berberinas neleidžia daugintis tripanosomoms ir plazmodijoms. Lektinai ir polipeptidai yra dar viena junginių grupė, pasižyminti antimikrobiniu aktyvumu, thioninai yra peptidai, sudaryti iš 47 amino rūgščių, kurie yra toksiški mielėms bei gramneigiamoms bakterijoms, fabatinas – 47 amino rūgščių peptidas – slopina *E. coli*, *P. aeruginosa*, ir *E. hirae* augimą [38].

Antimikrobinius junginius išskiria ir mikroorganizmai, tarp jų ir PRB. Fermentacijos metu PRB išskiria įvairius antimikrobinius metabolitus. Išskiriamos organinės rūgštys, pvz., pieno, acto ir propiono, terpę padaro rūgštine, kuri nėra tinkama daugeliui patogeninių mikroorganizmų. Nepaisant rūgščių, PRB gali išskirti ir kitus, antimikrobiniu poveikiu pasižyminčius, metabolitus – etanolį heterofermentaciniu keliu, vandenilio peroksidą augant aerobinėmis sąlygomis, diacetilą iš piruvato pertekliaus. PRB taip pat išskiria ir bakteriocidinius junginius, pvz., niziną, kuris slopina maistinės kilmės patogenų ir daugelio kitų gramteigiamų mikroorganizmų dauginimąsi. Reuterinas yra junginys, išskiriamas *L. reuteri* štamų ir pasižymintis antagonistiniu poveikiu. Reuterinas yra β -hidroksipropionaldehido monomerų, hidratuotų monomerų ir ciklinių dimerų mišinys. Šis mišinys turi platų spektrą savybių – slopina grybų, pirmuonių ir įvairių bakterijų, įskaitant gramteigiamas ir gramneigiamas, augimą [23].

Bolivinės balandos sėklų etanolinis ekstraktas slopina tiek gramteigiamų (*St. aureus*), tiek ir gramneigiamų (*E. coli*) bakterijų augimą [39]. Fenoliniai junginiai yra siejami su keletu teigiamų poveikių žmogaus sveikatai. Jie gali slopinti amilazės absorbciją, taip pat reguliuoja angliavandenių pasisavinimą, kuris tiesiogiai susijęs su cukriniu diabetu. Fenolinės rūgštys ir flavonoidai gali prisidėti prie geros sveikatos, mažindami metabolinio sindromo ir II tipo cukrinio diabeto komplikacijų riziką – širdies ir kraujagyslių ligas, neuropatiją, nefropatiją ir retinopatiją. Daug tyrimų parodė, jog fenoliniai junginiai pasižymi prieš senėjimo, priešuždegiminiu, antioksidaciniu poveikiais [40]. Nustatyta, jog bolivinės balandos sėklose yra fenolinių junginių, flavonoidų, saponinų, kurie yra svarbūs dėl savo antioksidacinių ir antimikrobinių savybių [39].

Iš bolivinės balandos sėklų yra išskirtas baltymas lektinas, kurį sudaro dvi 25 ir 35 kDa dalys. Nustatyta, jog šis junginys pasireiškia antimikrobinėmis savybėmis, slopina gramneigiamų bakterijų (*P. aeruginosa*, *E. coli* ir *S. enterica*) augimą [41].

2 lentelėje pateikta informacija apie kanapių antibakterinį aktyvumą.

2 lentelė. Antibakterinis kanapių augalo aktyvumas

| Ekstraktas | Aktyvumas | Šaltinis |
|--|---|----------|
| Penki pagrindiniai kanabinoidai (kanabidiolis (CDB), kanabichromenas, kanabigerolis, THC ir kanabinolis) | Slopina meticilinui atsparių <i>St. aureus</i> štamų augimą | [42] |
| Kanabinoidai (neapdorotas lapų acetoninis ekstraktas) | Slopina bakterijų <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Vibrio cholerae</i> ir grybų <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Candida albicans</i> augimą | [43] |
| 3"-hidroksi- $\Delta^{(4",5")}$ -CDB,4-acetoksi-2-geranil-5-hidroksi-3-n-pentilfenolis ir 8-hidroksikanabinolinė rūgštis | Slopina <i>St. aureus</i> , <i>Candida albicans</i> augimą | [44] |
| Neapdoroti alkaloidai | Teigiamai veikia burnos, odos, ausų mikroflorą | [45] |
| Sėklų aliejus | Stipriai slopina <i>B. subtilis</i> , <i>St. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , gerai slopina <i>E. coli</i> augimą | [46] |
| Viso augalo petroleterio ir metanolio ekstraktas | Slopina <i>B. subtilis</i> , <i>St. aureus</i> , <i>E. coli</i> augimą | [46] |
| Lapų etanolio ir petroleterio ekstraktas | Slopina <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>St. aureus</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Bordetella Bronchiseptica</i> augimą | [47] |
| Vandeninis-etanolinis stiebų ir lapų ekstraktas | Slopina <i>St. aureus</i> augimą | [48] |
| Eterinis aliejus | Stipriai slopina <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophiles</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> augimą Gerai slopina <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Bronchothrix thermospahta</i> , <i>E. coli</i> , <i>St. aureus</i> . | [49, 50] |

1.6. Pluoštinės kanapės ir bolivinės baltosios sėklose esantys bioaktyvieji peptidai

Baltymai, esantys maiste, yra ne tik maistinė medžiaga, bet ir suteikia teigiamą poveikį sveikatai. Daugelis fiziologinių baltymų savybių yra susiję su peptidais, esančiais baltymo molekulėje, kurie tampa aktyvūs, kai baltymas yra suardomas. Bioaktyvieji peptidai išlaisvinami fermentinės baltymų proteolizės metu (virškinant arba *in vitro* hidrolizės, naudojant fermentus, metu) arba apdorojant maistą (kepant, fermentuojant, nokinant). Gamta yra didžiausias bioaktyviųjų peptidų šaltinis, nes augalai, gyvūnai, grybai, mikroorganizmai ir jų produktai savo sudėtyje turi įvairių baltymų [51].

Populiariausi būdai bioaktyviesiems peptidams gauti yra maisto baltymų fermentinė hidrolizė arba maisto produktų fermentacija [52].

Fermentinės hidrolizės metu baltymai yra paveikiami fermentų tam tikroje temperatūroje ir pH. Fermentinė hidrolizė lyginant su fermentacija yra patrauklesnė dėl trumpos reakcijos trukmės ir lengvo nuspėjamumo. Daugiau negu vienas fermentas gali būti naudojamas baltymų hidrolizei, norint gauti hidrolizatą, kuriame būtų peptidų, tačiau fermentų naudojimas yra labai priklausomas nuo tam fermentui optimalių sąlygų – temperatūros bei pH. Taip pat yra svarbus fermento ir substrato santykis, nuo kurio priklauso hidrolizės laipsnis. Peptidų seka ir jų biologinis aktyvumas gali skirtis dėl naudojamo fermento. Yra nustatyta, jog mažos molekulinės masės peptidai (<10 kDa) turi didesnį antioksidacinį ir antihipertenzinį aktyvumą negu didesnės molekulinės masės peptidai [51].

Fermentacija mikroorganizmais apima bakterijų ar mielių auginimą substratuose, turinčiuose baltymų ir tų baltymų hidrolizę fermentais, išskiriamais augimo metu. Augantys mikroorganizmai į terpę išskiria proteolitinius fermentus, kurie išlaisvina peptidus iš baltymų struktūros. Fermentacijai pasirinktos bakterijos dažniausiai yra auginamos skystoje terpėje, joms optimalioje temperatūroje iki eksponentinės fazės, po to užaugintos bakterijų ląstelės yra įmaišomos į distiliuotą vandenį, tokiu būdu naudojamos kaip starterinė kultūra sterilaus baltymų substrato fermentacijai [53]. Hidrolizės laipsnis priklauso nuo naudojamo mikroorganizmų štamo, baltymų tipo bei fermentacijos trukmės. Yra nustatyta, kad gautų hidrolizatų funkcionalumas priklauso nuo naudojamo štamo, taip yra todėl, jog skirtingi mikroorganizmai turi skirtingas proteolitines sistemas [54].

Lunasinas yra neseniai atrastas bioaktyvusis peptidas, kurį sudaro 43 amino rūgštys (SKW QH QQD SCR KQL QGV NLT PCE KHI MEK IQG RDD DDD DDD DD (žr. priedai, Amino rūgštys)) ir kuris potencialiai gali turėti didelę teigiamą įtaką žmonių sveikatai. Yra nustatyta, jog šis bioaktyvusis peptidas pasireiškia priešvėžinėmis, priešūždegiminėmis, antioksidacinėmis savybėmis, ir pirmiausia buvo išskirtas iš sojos pupelių. Mokslininkas Ren`as ir kt. [55] nustatė, jog lunasino yra ir bolivinės balandos sėklose, o jo koncentracija priklauso nuo kultivaro, taip pat nustatė, jog šis bioaktyvusis peptidas pasireiškia silpnu antioksidaciniu aktyvumu, vertinant DPPH radikalo surišimo metodu, tačiau stipriai ABTS^{•+} surišimu.

Rizzelo`as su kolegomis [10] vykdė bolivinės balandos sėklų fermentaciją su *L. plantarum* štamu ir iš fermentuotų produktų išskyrė penkis bioaktyvius peptidus (IVLVQEG, TLFREPEN, VGFGL, FTLIIN, LENS GDKKY (žr. priedai, Amino rūgštys)), kuriuos sudarė nuo 5 iki 9 amino rūgščių. Anksčiau nebuvo nustatyta nė vieno iš šių peptidų antioksidacinio aktyvumo, tačiau buvo manoma, jog stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymi peptidų mišinys, o ne atskiri peptidai. Išskyrus, IVLVQEG peptidą, kiti savo struktūroje turi aromatinės amino rūgštis, kurios gali atiduoti protoną radikalams, kuriems trūksta elektrono. Tokia savybė stipriai pagerina radikalų surišimo gebą. 0,1 mg/ml koncentracijos peptidų frakcija parodė panašų antioksidacinį aktyvumą kaip ir 500 ir 1000 μM α-tokoferolis, kuris buvo naudotas kaip teigiama kontrolė, nes pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis.

Mokslininkas Girgih`as ir kt. [56] tyrė antioksidaciniu ir antihipertenziniu poveikius pasižyminčius peptidus, esančius kanapių sėklų baltymų hidrolizatuose. Tyrimo metu nustatyti keletas peptidų (WYT, SVYT, IPAGV (žr. priedai, Amino rūgštys)), kurie pasižymėjo dvigubu aktyvumu – slopino

angiotenziną konvertuojantį fermentą ir reniną (šie fermentai susiję su kraujo spaudimo didinimu), taip pat buvo išskirti peptidai (WVYY ir PSLPA (žr. priedai, Amino rūgštys)), slopinantys tik angiotenziną konvertuojantį fermentą. Iš kanapių sėklų išskirti du bioaktyvieji peptidai (NHAV ir HVRETALV (žr. priedai, Amino rūgštys)), kurie, esant 10 µg/ml koncentracijai, pasižymėjo apsauginėmis savybėmis prieš oksidacinį stresą ir ląstelių apoptozę [57].

1.7. Kanapių ir bolivinės balandos sėklų produktų įtaka kepiniams

Naujų produktų, kurie būtų naudingesni sveikatai, kūrimas tampa vis svarbesne užduotimi. Ieškoma būdų, kaip būtų galima pakeisti tradicinius kviečių miltus, kuriuose yra gliuteno. Bolivinės balandos sėklos yra viena iš alternatyvų. Bolivinės balandos miltus sudaro apie 16 % baltymų, kai kvietinius – 10 %, kukurūzų – 8,13 %, ryžių miltus – 8,75 %. Dėl šios priežasties, bolivinės balandos miltai gali būti naudojami kaip naudingas ingredientas, kepančioms didesnės maistinės vertės kepinims. Dėl to, jog bolivinės balandos sėklose nėra gliuteno, tokie miltai taip pat gali būti naudojami kuriant naujus kepinis, tinkančius celiakija sergantiems žmonėms. Vertinant šį aspektą, buvo sukurta duona be gliuteno, naudojant skirtingas grūdines kultūras. Taip pat buvo sukurta duona iš įvairių grūdinių kultūrų, įskaitant bolivinę balandą, mišinio, kuri pasižymėjo geromis juslinėmis savybėmis [30].

Miltų ir skaidulinių medžiagų fermentacija su starterinėmis kultūromis mielėmis ar PRB, gali pagerinti skonio bei apdorojimo savybes. Rūgštingumas ir fermentų aktyvumas, kurie yra grūduose, ypač tų, kurie skaido ksilaną, yra susiję su arabinoksilano tirpumu kepimo proceso metu. Miltuose esančių pentozanų tirpumas, o ypač vandenyje neekstrahuojamo arabinoksilano virtimas vandenyje ekstrahuojamu, yra susijęs su pagerėjusiu duonos savituoju tūriu bei tekstūra [58].

Reologinės savybės, tokios kaip rūgštingumas ir kvapo formavimasis, yra svarbūs parametrai kontroliuojant fermentacijos procesą. Fermentacijai naudojamų mikroorganizmų tipas, jų metabolinis aktyvumas, pH priklausomybė nuo fermentacijos trukmės turi įtakos galutinėms reologinėms produktų savybėms. Fermentuotų produktų pridėjimas, gaminant kvietinę duoną, sukelia nemažai tešlos pasikeitimų. Tešla, kurios pH mažesnis, yra ne tokia stabili maišymo metu, jos iškilimas ir želatinizacija yra mažesni. Pridėjus fermentuotų produktų, tešlos savybės pagerėja [59].

Rizzello'as ir kt. vykdė bolivinės balandos sėklų fermentaciją su *L. plantarum* ir *L. rossiae* štamais, fermentuotą bioproduktą (20 %) naudojo kvietinių miltų tešlos gamyboje bei duonos kepinimui (žr. 3 lentelę). Papildymas fermentuotomis bolivinės balandos sėklomis, lyginant su nefermentuotomis sėklomis, padidino tešlos bendrą laisvųjų amino rūgščių kiekį 2,5 karto, pieno ir acto rūgšties kiekį atitinkamai 46 ir 4,4 kartus, fitazinį aktyvumą 1,7 karto, fenolinių junginių kiekį 1,4 karto ir antioksidacinį aktyvumą 1,2 karto. Papildymas fermentuotomis bolivinės balandos sėklomis, lyginant su nefermentuotomis sėklomis, padidino duonoje esančių tirpių skaidulinių medžiagų ir sumažino cukrų kiekį. Lyginant kepinis, kuriuose buvo bolivinės balandos sėklų su tais, kurie buvo ruošti tik iš kvietinių miltų, pirmuose pastebėtas didesnis bendras skaidulinių medžiagų kiekis. Papildymas fermentuotomis bolivinės balandos sėklomis, kepinuose pagerino *in vivo* vertintą baltymų virškinamumą, padidino nepakeičiamų amino rūgščių ir biologinės vertės indeksus, kurie nurodo produkte esančių baltymų kokybę ir net 1,8 karto padidino maistinės vertės indeksą. Fermentuotos bolivinės balandos sėklos kepinuose sumažino glikemijos indeksą, kuris parodo kaip maistas veikia gliukozės kiekį kraujyje – kuo mažesnis glikemijos indeksas, tuo lėčiau maistas yra

virškinamas, absorbuojamas ir metabolizuojamas, tai sukelia mažesnę ir lėtesnę gliukozės kiekio padidėjimą, o taip pat ir insulino kiekį kraujyje [32].

Lorusso⁴ ir kt. vykdė bolivinės balandos sėklų fermentaciją su *L. plantarum* ir *L. rossiae* štamais, o ruošiant makaronus, 20 % fermentuotu bioproduktu pakeitė manų kruopas. Lyginant makaronus, kurie buvo ruošti tik iš manų kruopų, su tais, kuriuose buvo nefermentuotų bei fermentuotų bolivinės balandos sėklų, pastaruosiuose pastebėtas didesnis kiekis baltymų, riebalų, mažiau krakmolo, daugiau skaidulinių medžiagų (žr. 3 lentelę). Didesnis fenolinių junginių kiekis ir didesnis antioksidacinis aktyvumas pastebėtas makaronuose papildytuose bolivinės balandos sėklomis, ypač tuose, kuriuose buvo fermentuotų sėklų. Pridėjus bolivinės balandos sėklų, pasikeitė ir makaronų tekstūra [60].

3 lentelė. Tešlos ir kepinų savybės, vertinant bolivinės balandos sėklų įtaką. KM¹ – tešla ruošta iš kvietinių miltų, BBM¹ – papildyta 12,5 % bolivinės balandos miltų, FBBM¹ – papildyta 20 % fermentuotų bolivinės balandos miltų, KM² – tešla ruošta iš kietųjų kviečių manų kruopų, BBM² – papildyta 20 % bolivinės balandos miltų, FBBM² – papildyta 20 % fermentuotų bolivinės balandos miltų

| | KM ¹ | BBM ¹ | FBBM ¹ | KM ² | BBM ² | FBBM ² |
|--|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| Tešla | | | | | | |
| Bendrasis titruojamasis rūgštingumas (BTR) (°N) | 2,0 | 3,2 | 7,2 | n | n | n |
| Laisvosios amino rūgštys (mg/kg) | 522 | 1767 | 4556 | n | n | n |
| Pieno rūgštis (mmol/kg) | 0,2 | 0,8 | 37,5 | n | n | n |
| Acto rūgštis (mmol/kg) | 0,6 | 0,8 | 3,5 | n | n | n |
| Fitazinis aktyvumas (AV/ml) | 2,03 | 3,65 | 6,15 | n | n | n |
| Antioksidacinis aktyvumas (%) | 35 | 53 | 65 | n | n | n |
| Kepiniai | | | | | | |
| <i>Cheminės savybės</i> | | | | | | |
| Baltymai (%) | 10,2 | 11,1 | 11,3 | 10,27 | 12,4 | 12,3 |
| Riebalai (%) | 0,9 | 1,8 | 1,9 | 0,6 | 2,64 | 2,62 |
| Angliavandeniai (%) | 58 | 55 | 54 | n | n | n |
| Krakkolas (%) | n | n | n | 75,71 | 69,61 | 69,21 |
| Skaidulinės medžiagos (%) | 3,8 | 6,0 | 6,0 | n | n | n |
| Antioksidacinis aktyvumas (%) | n | n | n | 14 | 26 | 35 |
| <i>Fizikinės savybės</i> | | | | | | |
| Savitasis tūris (cm ³ /g) | 3,06 | 2,73 | 3,09 | n | n | n |
| Kietumas (g ¹ , N ²) | 9625 | 10111 | 7700 | 3,31 | 3,8 | 3,68 |
| Atsparumas | 0,77 | 0,85 | 0,65 | 0,28 | 0,22 | 0,27 |
| ¹ Remiantis Rizzello ⁴ ir kt. [32] | | | | | | |
| ² Remiantis Lorusso ⁴ ir kt. [60] | | | | | | |
| n – netirta | | | | | | |

Nefermentuotos sėklos padidino makaronų kietumą 15 %, fermentuotos – 11 %. Makaronų atsparumas deformacijai pasikeitė nežymiai su fermentuotų sėklų priedu, tačiau sumažėjo su

nefermentuotomis sėklomis. Taigi, bolivinės balandos sėklų miltai pagerino makaronų tvirtumo parametrus (kietumą ir lūžimo ribą), tam galėjo turėti įtakos padidėjęs baltymų kiekis. Fermentuoti bolivinės balandos sėklų miltai padidino elastingumą (atsparumą ir gebėjimą suformuoti vientisą formą), to priežastis yra baltymų modifikacijos dėl proteolizės, įvykusios fermentacijos metu [60].

Nionelli's ir kt. fermentavo kanapių miltus PRB (*L. plantarum*, *P. acidilactici* ir *L. mesenteroides*), fermentuotą produktą (10 %) naudojo kvietinių miltų tešlos gamyboje ir kepant duoną. Tešlos papildymas fermentuotais kanapių miltais, 3,2 karto padidino tešloje esančių laisvųjų amino rūgščių, pieno ir acto rūgšties kiekius, atitinkamai 134 ir 5 kartais, 3 kartus sumažino fitato rūgšties kiekį, t.y. pasireiškė fitazinis aktyvumas. Tešlos papildymas fermentuotais kanapių miltais, padidino duonoje esančių baltymų (1,2 karto), riebalų (1,7 karto), skaidulinių medžiagų (1,3 karto), šiek tiek sumažino angliavandenių kiekį, taip pat padidino savitąjį tūrį, kietumą bei kepinų atsparumą (žr. 4 lentelę).

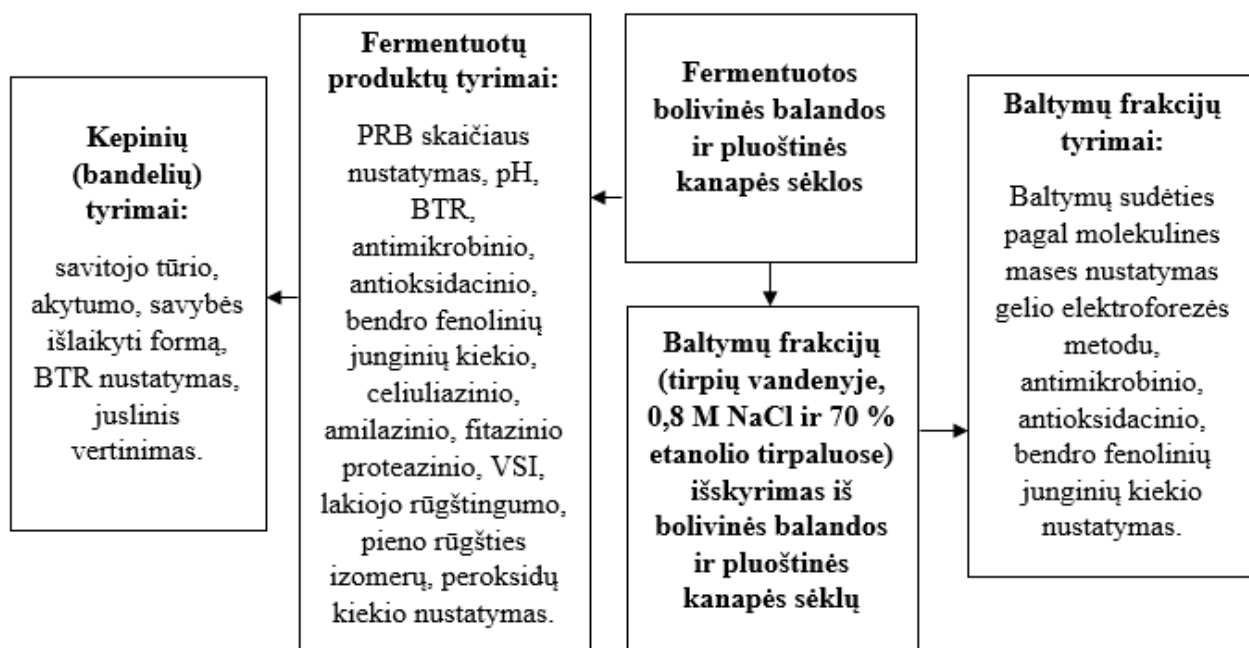
Korus'as ir kt. naudojo kanapių miltus, gaminant tešlą be gliuteno, sudarytą iš kukurūzų, bulvių krakmolo, iš tokios tešlos buvo kepama duona. Tešlos papildymas fermentuotais kanapių miltais, 1,8 karto padidino duonoje esančių baltymų, 1,2 karto riebalų, net 2 kartus skaidulinių medžiagų kiekius, taip pat 1,8 karto padidino kepinų kietumą (žr. 4 lentelę).

4 lentelė. Tešlos ir kepinų savybės, vertinant kanapių sėklų įtaką. KM¹ – tešla ruošta iš kvietinių miltų, FKM¹ – papildyta 10 % fermentuotų kanapių miltų, KM² – krakmolinė tešla be gliuteno, FKM² – papildyta 10 % fermentuotų kanapių miltų

| | KM ¹ | FKM ¹ | KM ² | FKM ² |
|---|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| Tešla | | | | |
| BTR (0,1 M NaOH, ml) | 4,1 | 43,4 | n | n |
| Laisvosios amino rūgštys (mg/kg) | 1382 | 4413 | n | n |
| Pieno rūgštis (mmol/kg) | 2,3 | 267,2 | n | n |
| Acto rūgštis (mmol/kg) | 10,1 | 51,6 | n | n |
| Fitatato rūgštis (g/kg) | 60,3 | 21 | n | n |
| Kepiniai | | | | |
| <i>Cheminės savybės</i> | | | | |
| Baltymai (% ¹ , g/kg ²) | 11,9 | 14,1 | 15,2 | 26,6 |
| Riebalai (% ¹ , g/kg ²) | 1,0 | 1,7 | 21,2 | 25,8 |
| Angliavandeniai (%) | 80,6 | 74,2 | n | n |
| Skaidulinės medžiagos (% ¹ , g/kg ²) | 6,0 | 8,5 | 29,3 | 59,2 |
| <i>Fizikinės savybės</i> | | | | |
| Savitasis tūris (cm ³ /g) | 1,96 | 2,16 | n | n |
| Kietumas (g ¹ , N ²) | 7934 | 7996 | 4,5 | 2,5 |
| Atsparumas | 0,74 | 0,76 | n | n |
| ¹ Remiantis Nionelli'ų [4] ² Remiantis Korus'ų [61] n – netirta | | | | |

2. TYRIMŲ METODAI

2.1. Pagrindinės tyrimų kryptys



2.2. Tyrimų objektai

Tyrimų objektai – fermentuoti produktai, ruošti iš bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų bei PRB: *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26 ir *L. acidophilus* DSM 20079.

L. plantarum MR24 ir *L. brevis* R26 buvo anksčiau išskirtos iš ruginių duonos raugų [62]. *L. acidophilus* DSM 20079 įsigyta iš Leibniz–Institut DSMZ (Vokietija). Bolivinės balandos (UAB EKO PIRK) ir kanapių sėklos (UAB Du Medu) įsigytos vietiniame prekybos centre. Sėklų sudėtis pateikta 5 lentelėje.

5 lentelė. Bolivinės balandos ir kanapių sėklų sudėtis

| 100 g produkto maistinė vertė: | Bolivinės balandos sėklos | Kanapių sėklos |
|----------------------------------|---------------------------|----------------|
| riebalai: | 6,7 g | 31,7 g |
| iš kurių sočiųjų riebalų rūgščių | 0,7 g | 0 g |
| angliavandeniai: | 64,16 g | 0,5 g |
| iš kurių cukrų | 0 g | 0 g |
| baltymai | 14,12 g | 21,2 g |
| druska | 0,12 g | 0 g |

PRB augintos De Man, Rogosa ir Sharpe (MRS) mitybiniame sultinyje (Liofilchem, Italija) 24 val. 30 °C temperatūroje (*L. plantarum* MR24 ir *L. brevis* R26) ir 37 °C temperatūroje (*L. acidophilus* DSM 20079). MRS sudėtyje yra 10 g/l peptono, 10 g/l jautienos ekstrakto, 5 g/l mielių ekstrakto, 20 g/l gliukozės, 2 g/l K₂HPO₄, 5 g/l natrio acetato, 2 g/l amonio citrato, 0,2 g/l MgSO₄, 0,05 g/l MnSO₄, 1 ml Tween 80. Po 24 val. auginimo PRB naudotos fermentuotiems produktams ruošti.

Ruošti įvairaus drėgno fermentuoti produktai iš smulkintų bolivinės balandos arba kanapių sėklų, kurios po smulkinimo buvo sterilizuotos 121 °C temperatūroje, 15 min. Sterilizuotos sėklos sumaišytos su atitinkamu kiekiu sterilaus vandens, kad būtų gautos 50, 55, 60, 65 ir 70 % drėgno bolivinės balandos sėklų terpės ir 30, 40, 45, 50 ir 60 % drėgno kanapių sėklų terpės. Nustatytas šių terpių vandens aktyvumas (a_w).

Įvertinus terpių a_w ir konsistenciją, tolimesniems tyrimams buvo ruošti 50 ir 65 % drėgno bolivinės balandos ir 30 ir 50 % drėgno kanapių sėklų terpės, kurios fermentuotos PRB. Tam 0,2 % šviežių PRB ląstelių (augintų 24 val. MRS terpėje) buvo sumaišyta su steriliomis sėklomis bei steriliu vandeniu. Sėklų fermentacija vykdta 30 °C temperatūroje su *L. plantarum* MR24 ir *L. brevis* R26 bakterijomis, 37 °C temperatūroje su *L. acidophilus* DSM 20079 bakterija 72 val. laikotarpyje.

2.3. Vandens aktyvumo nustatymas

Susmulkintos bolivinės balandos ir kanapių sėklos buvo sumaišytos su vandeniu, tokiu būdu gaunant skirtingo drėgno sėklų terpes, kurių a_w matuotas HygroLab C1 – ROTRONIC aparatu. Smulkintų bolivinės balandos sėklų terpės ruoštos 50, 55, 60, 65 ir 70 % drėgno, o smulkintų kanapių sėklų terpės ruoštos 30, 40, 45, 50 ir 60 % drėgno. Taip pat a_w buvo nustatytas nefermentuotų smulkintų ir sveikų bolivinės balandos ir kanapių sėklų.

2.4. Pieno rūgšties bakterijų skaičius nustatymas

Įvertinus terpės konsistenciją, tolimesniems tyrimų etapams buvo pasirinkti du drėgniai – bolivinės balandos sėkloms – 50 ir 65 %, kanapių sėkloms – 30 ir 50 %. Tirtas PRB skaičiaus pokytis fermentacijos metu (po 24, 48 ir 72 val.) fermentuojant sėklas su *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26 ir *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis. 200 μ l bakterijų suspensijos pasėta į 100 g smulkintų sėklų ir vandens mišinio, kuris prieš tai buvo sterilizuotas autoklave (121 °C temperatūroje, 15 min.) tam, kad pašaliniai mikroorganizmai esantys sėklose, būtų pašalinti, fermentacija vykdta 30 °C temperatūroje su *L. plantarum* MR24 ir *L. brevis* R26 bakterijomis, 37 °C temperatūroje su *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis.

Vertinant PRB skaičių, pradžioje buvo padarytas pirmas kiekvieno bandinio skiedimas – į 90 ml skiediklio (0,9 % NaCl vandeninis tirpalas) įdėta 10 g fermentuotų sėklų, mišinys sumaišytas. Tolimesni dešimtkarčiai skiediniai daryti 9 ml skiediklio sumaišant su 1 ml pradinės suspensijos. Parinkti skiediniai (6-asis, 7-asis ir 8-asis) sėti į Petri lėkšteles po 1 ml suspensijos sumaišant su 12–15 ml MRS agaru. Maišant lėkštelės, jos buvo stumdomos penkis kartus vertikaliai, penkis horizontaliai ir po penkis kartus sukant pagal ir prieš laikrodžio rodyklę. Sustingus terpei, lėkštelės apverstos ir laikytos 5 paras (*L. plantarum* MR24 ir *L. brevis* R26 – 30 °C temperatūroje, *L. acidophilus* DSM 20079 – 37 °C temperatūroje). Po to skaičiuotos lėkštelėse užaugusios bakterijų kolonijos.

PRB skaičius išreikštas kolonijų sudarančių vienetų (KSV) skaičiumi 1 g produkto. KSV/g produkto buvo apskaičiuotas pagal (1) formulę [63]:

$$N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d}; \quad (1)$$

čia: ΣC – kolonijų suma, kurios buvo suskaičiuotos lėkštelėse; V – skiedinio tūris lėkštelėje, ml; n_1 – pirmojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius; n_2 – antrojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius; d – pirmojo vertinamo skiedinio skiedimo koeficientas ($d=1$, kai tiriamasis skystas produktas yra neskiestas).

2.5. Fermentuotų produktų aktyviojo ir bendrojo titruojamojo rūgštingumo nustatymas

Tyrimo metu nustatytas tiriamų bioproduktų aktyvusis rūgštingumas – pH vertės. Naudotas pH metras, matuota 22 °C temperatūroje.

Rūgštingumui nustatyti, techninėmis svarstyklėmis atsverta ~5 g mėginio, sumaišyta su 50 ml distiliuoto vandens, gautas mišinys gerai sumaišytas, nusistovėjęs tirpalas nupiltas į sausą kolbą. Pridėjus 4 lašus 1 % fenolftaleino, nutitruota 0,1 N NaOH tirpalu iki rausvos spalvos, kuri neišnyko 1 min. BTR apskaičiuotas pagal (2) formulę:

$$x_p = 2 * a * k; \quad (2)$$

x_p – mėginio titruojamasis rūgštingumas, °N; a – 0,1 N NaOH tirpalo kiekis sunaudotas mėginio titravimui, ml; k – NaOH tirpalo titro pataisos koeficientas ($k=1$).

BTR išreikštas Neimano laipsniais (°N), t.y. 0,1 N šarmo tirpalo kiekis (ml), reikalingas nutitruoti rūgštis, esančias 100 g produkto.

2.6. Fermentuotų sėklų produktų antimikrobinio aktyvumo nustatymas

Fermentuotų produktų antimikrobiniam aktyvumui nustatyti naudotos 5 indikatorinės bakterijos priklausančios *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* rūšims ir 5 indikatoriniai mikroskopinių grybų kamienai priklausantys *Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium cyclopium*, *Aspergillus terreus* rūšims ir *Penicillium* sp. genčiai.

Bakterijos ir mikroskopiniai grybai antimikrobinio aktyvumo tyrimui kultivuoti atitinkamai ant Plate Count (Liofilchem, Italija), kuris sudarytas iš 5 g/l triptono, 1 g/l gliukozės, 2,5 g/l mielių ekstrakto, 15 g/l agarų, ir Potato dextrose (Liofilchem, Italija), sudaryto iš 200 g/l bulvių, 20 g/l dekstrozės, 17 g/l nuožulnaus agarų 25 °C temperatūroje 3 paras. Po kultivavimo mikroorganizmai perkelti į mėgintuvėlius su steriliu vandeniu, mėgintuvėliuose mikroorganizmų kiekis gautas apie $1,5 \cdot 10^8$ KSV/ml (lyginant su McFarland'o 0,5 standartu, kuris atitinka $1,5 \cdot 10^8$ KSV/ml). Po 1,33 ml bakterijų suspensijos ir po 2 ml mikroskopinių grybų suspensijos perkelta į 200 ml sterilios 50 °C temperatūros terpės (Plate Count agaras – bakterijoms, Potato dextrose agaras – grybams).

Vertinant fermentuotų sėklų antimikrobinį aktyvumą, terpė su mikroorganizmų suspensija buvo užpilta ant fermentuotų sėklų, kurios įdėtos į Petri lėkštelės vidurį. Lėkštelės su bakterijomis laikytos 30 °C temperatūroje 24 val., su mikroskopiniais grybais 25 °C temperatūroje 48 val. Fermentuotų produktų antimikrobinis poveikis vertintas išmatavus skaidrią inhibicijos zoną keliose skirtingose vietose ir pateiktas taip:

- 0 – nėra skaidrios zonos aplink fermentuotą mėginį;
- +/- – iki 1mm skaidri inhibicijos zona aplink fermentuotą mėginį;
- + – 1–3 mm skaidri inhibicijos zona aplink fermentuotą mėginį;

++ –>3 mm skaidri inhibicijos zona aplink fermentuotą mėginį.

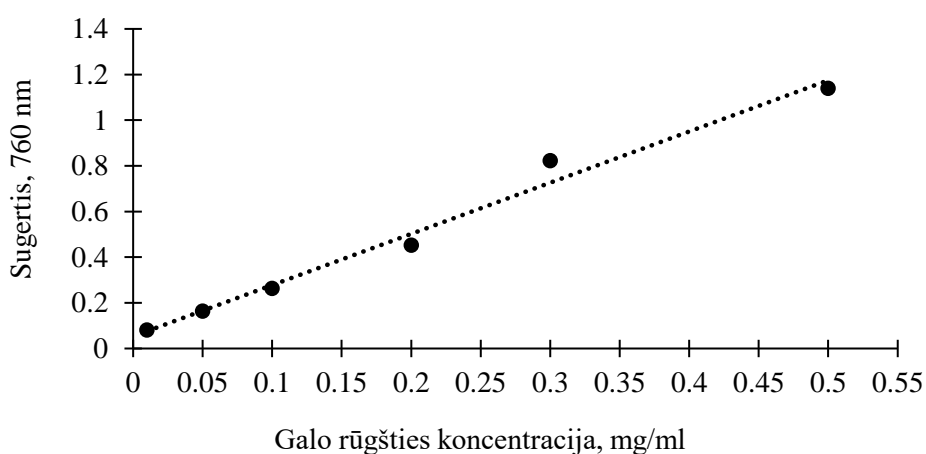
2.7. Fermentuotų sėklų produktų mėginių paruošimas bendram fenolinių junginių kiekio ir antioksidacinio aktyvumo, vertinant DPPH ir ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu, nustatymui

Fermentuotos sėklos buvo sumaišytos su distiliuotu vandeniu santykiu 1:2, mišinys nucentrifuguotas (8000 aps./min., 10 min.), centrifugatai naudoti bendro fenolinių junginių kiekiui ir antioksidacinio aktyvumo nustatymams.

2.8. Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas

Bendras fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas, naudojant Folin-Ciocalteu reagentą pagal Juodeikienę ir kt. [64]. 100 μ l mėginio sumaišyta su 3000 μ l Na_2CO_3 (3,3 %) vandeniniu tirpalu ir 100 μ l Folin-Ciocalteu reagentu. Mišinys inkubuotas 30 min. kambario temperatūroje, spektrofotometru matuota 760 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamuoju tirpalu.

Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymui sudaryta standartinė galo rūgšties tiesė (žr. 3 pav.), iš kurios skaičiuota tiriamo mėginio galo rūgšties ekvivalento (GRE) vertė. Skirtingų koncentracijų (0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 1 mg/ml) 100 μ l galo rūgšties tirpalai sumaišyti su 3000 μ l Na_2CO_3 (3,3 %) vandeniniu tirpalu ir 100 μ l Folin-Ciocalteu reagentu. Mišinys inkubuotas 30 min. kambario temperatūroje, spektrofotometru matuota 760 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais.



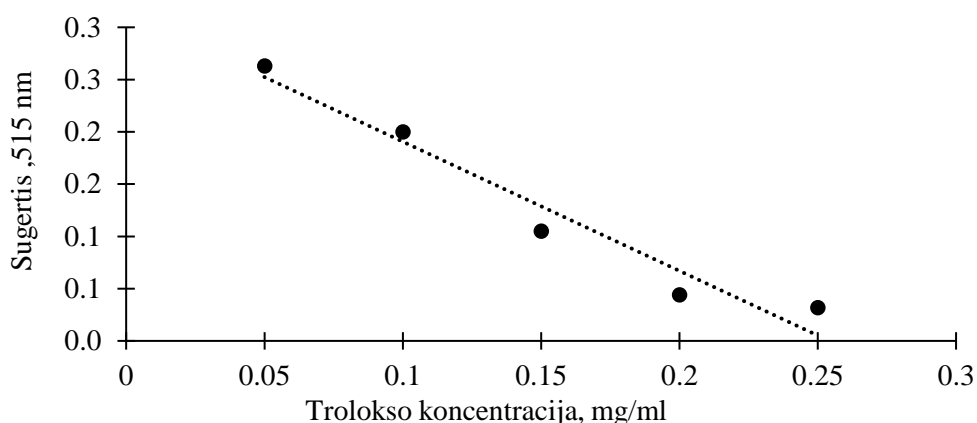
3 pav. Galo rūgšties kalibracinė tiesė

2.9. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu

Antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas, naudojant 2,2-difenilpikrilhidrazilo (DPPH) radikalą [64]. Buvo paruoštas 0,1 mM DPPH metanolinis tirpalas ir 100 mM natrio acetato buferis (pH=5,5). Lygiais kiekiais sumaišytas DPPH radikalo tirpalas su natrio acetato buferiu. 77 μ l mėginio sumaišyta su 3000 μ l DPPH tirpalo. Mišinys inkubuotas 15 min. kambario temperatūroje tamsoje, spektrofotometru matuota 515 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais.

Antioksidacinio aktyvumo nustatymui, sudaryta standartinė trolokso tiesė (žr. 4 pav.), iš kurios skaičiuota tiriamo mėginio TE vertė. Skirtingų koncentracijų (0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 mg/ml) 77 μ l trolokso tirpalo sumaišyti su 3000 μ l DPPH tirpalo. Mišinys inkubuotas 15 min. kambario

temperatūroje tamsoje, spektrofotometru matuota 515 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais.

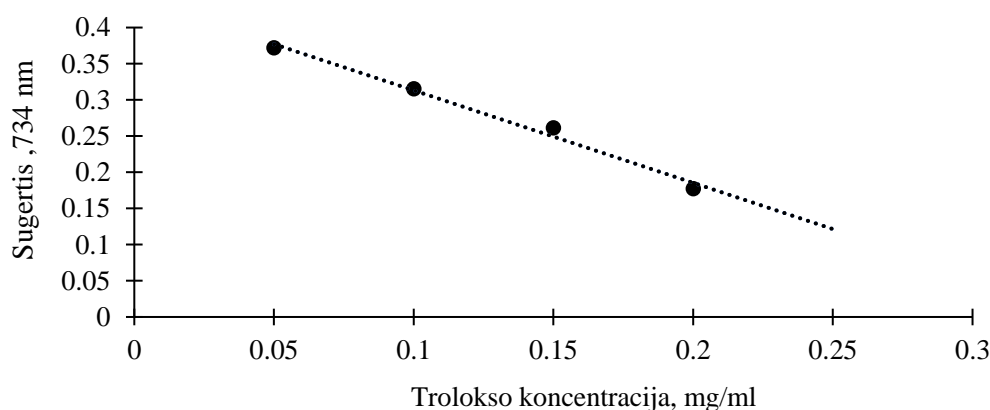


4 pav. Troloksio kalibracinė tiesė

2.10. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS radikalų surišimo gebos metodu

Laisvų radikalų sujungimo geba buvo tirta, naudojant 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfoninę rūgštį), dar vadinamą ABTS [65]. $ABTS^{•+}$ buvo gautas vykdant reakciją tarp 7 mM ABTS vandeninio tirpalo ir 2,45 mM kalio persulfato (santykiu 1:1) 16 val. kambario temperatūroje tamsoje. Gautas $ABTS^{•+}$ tirpalas praskiestas su metanoliumi kol 734 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis gauta 0,700. 50 μ l mėginio sumaišyta su 3950 μ l praskiesto $ABTS^{•+}$ tirpalo. Mišinys 30 min. maišytas ir spektrofotometru matuota 734 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais.

Antioksidacinio aktyvumo nustatymui, sudaryta standartinė troloksio tiesė (žr. 5 pav.), iš kurios skaičiuota tiriamo mėginio TE vertė. Skirtingų koncentracijų (0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 1 mg/ml) 50 μ l troloksio tirpalo sumaišyti su 3950 μ l praskiesto $ABTS^{•+}$ tirpalo. Mišinys 30 min. maišytas, spektrofotometru matuota 734 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais.



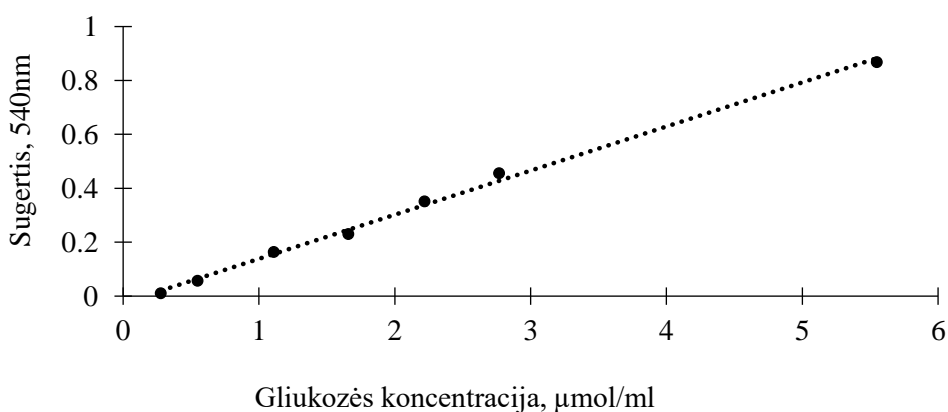
5 pav. Troloksio kalibracinė tiesė

2.11. Fermentinių aktyvumų nustatymas

2.11.1. Celiuliazinis aktyvumas

Celiuliazinis aktyvumas nustatytas, naudojant 3,5-dinitrosalicilo rūgšties (DNS) reagentą, kuris paruoštas $1 \pm 0,01$ g DNS ir $30 \pm 0,1$ g natrio-kalio tartrato ištirpinta 100 ml 0,4 M NaOH tirpale [66]. Į tiriamuosius mėgintuvėlius įpilta po 0,9 ml 0,05 M citratinio buferio (pH 4,8) ir įdėta celiuliozės filtro popieriaus juostelė ($1,0 \cdot 6,0$ cm²) susukta į rulonėlį. Mėgintuvėliai pamerkti į 50 °C temperatūros vandens vonią ir išlaikyti 5 min. Po to įpilta po 0,1 ml centrifugato, gauto fermentuotas sėklas sumaišius su distiliuotu vandeniu santykiu 1:4 ir nucentrifugavus (8000 aps./min., 10 min.). Taip pat atliktas tyrimas su tiriamais tirpalais, tačiau be celiuliozės filtro popieriaus (kontrolė). Reakcija vykdyta 50 °C temperatūros vandens vonioje 30 min. Po to mėgintuvėliai staigiai atvėsinti, į juos įpilta 1 ml DNS reagento ir kaitinti verdančio vandens vonioje 5 min., tuomet staigiai atvėsinti, įpilta 6 ml distiliuoto vandens, turinys gerai sumaišytas ir spektrofotometru matuota 540 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais.

Sudaryta standartinė gliukozės (0,278, 0,55, 1,11, 1,66, 2,22, 2,77, 5,55 μmol/ml) tiesė (žr. 6 pav.), iš kurios skaičiuota tiriamo mėginio gliukozės ekvivalento vertė. Iš gliukozės kalibracinės tiesės, apskaičiuotas celiuliazijų aktyvumas, kuris išreikštas aktyvumo vienetais grame fermentuotų sėklų (AV/g). Vienas fermento aktyvumo vienetas gali išskirti 1 μmol gliukozės ekvivalento iš celiuliozės filtro popieriaus per 1 min. 50 °C temperatūroje, esant pH vertei 4,8.

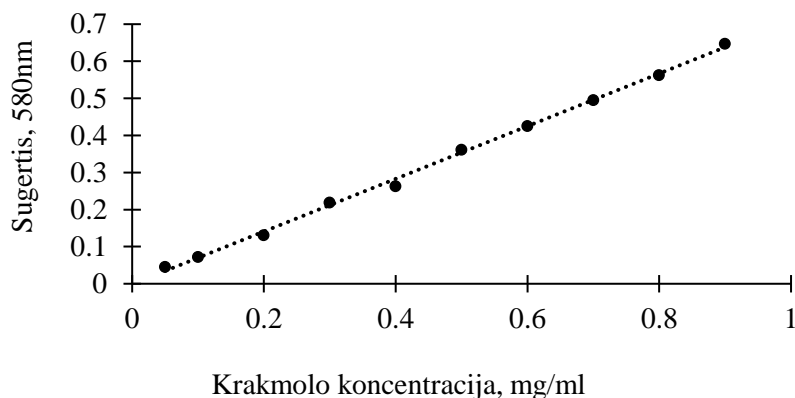


6 pav. Gliukozės kalibracinė tiesė

2.11.2. Amilazinis aktyvumas

Į tiriamuosius mėgintuvėlius įpilta po 1 ml centrifugato, gauto fermentuotas sėklas sumaišius su distiliuotu vandeniu santykiu 1:4 ir nucentrifugavus (8000 aps./min., 10 min.). Mėgintuvėliai pamerkti į 30 °C temperatūros vandens vonią ir išlaikyti 5 min. Po to į mėgintuvėlius įpilta po 1 ml substrato (1,0 mg/ml krakmolo tirpalo). Taip pat atliktas tyrimas su tiriamais tirpalais, tačiau be krakmolo tirpalo, vietoje jo naudojant fosfatinį buferį (kontrolė). Mėgintuvėlių turinys gerai sumaišytas ir mėgintuvėliai pamerkti į 30 °C temperatūros vandens vonią 30 min. Po šildymo, fermentinei reakcijai sustabdyti, į kiekvieną mėgintuvėlį įpilta po 0,5 ml 1 M HCl ir mišinys gerai sumaišytas. Tada į kiekvieną mėgintuvėlį įpilta po 2,5 ml jodo tirpalo, turinys gerai sumaišytas ir spektrofotometru matuota 580 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais [67].

Sudaryta standartinė krakmolo (1,00, 0,90, 0,80, 0,70, 0,60, 0,50, 0,40, 0,30, 0,20, 0,10, 0,05 $\mu\text{mol/ml}$) tiesė (žr. 7 pav.), iš kurios skaičiuota tiriamo mėginio krakmolo ekvivalento vertė. Iš kalibracinės krakmolo tiesės, apskaičiuotas amilazių aktyvumas, kuris išreikštas AV/g. Vienas fermento aktyvumo vienetas gali katalizuoti 1 mg tirpaus krakmolo hidrolizę iki dekstrinų per 1 min. 30 °C temperatūroje esant pH vertei 7,0.

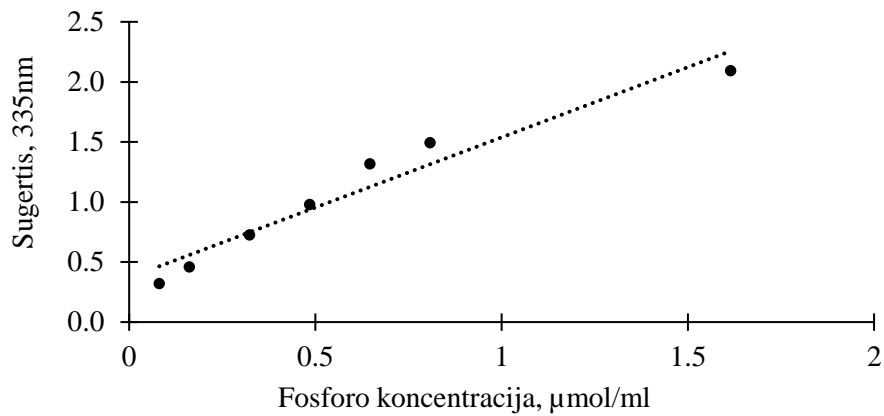


7 pav. Krakmolo kalibracinė tiesė

2.11.3. Fitazinis aktyvumas

Fitazinis aktyvumas tirtas, naudojant spalvinės reakcijos reagentą, kuris buvo paruoštas sumaišant 10 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,5 M H_2SO_4 ir acetono, atitinkamai santykiu 1:1:2. Į tiriamuosius mėgintuvėlius įpilta 0,8 ml 3 mM kalio fitato tirpalo [68]. Mėgintuvėliai pamerkti į 30 °C temperatūros vandens vonią ir išlaikyti 5 min. Po to įpilta po 0,2 ml centrifugato, gauto fermentuotas sėklas sumaišius su distiliuotu vandeniu santykiu 1:4 ir nucentrifugavus (8000 aps./min., 10 min.). Taip pat atliktas tyrimas su tiriamais mėginiais, tačiau be substrato – kalio fitato, vietoje jo naudotas 0,2 M natrio acetato tirpalas (kontrolė). Reakcija vykdyta 30 °C temperatūros vandens vonioje 60 min. Po to mėgintuvėliai ištraukti, į juos įpilta 1 ml 10 % trichloracto rūgšties, tokiu būdu sustabdžius reakciją, iš kiekvieno mėgintuvėlio buvo paimta 0,2 ml reakcijos mišinio ir įpilta į kitus mėgintuvėlius. Paskui reakcijos mišinys sumaišytas su 1,6 ml spalvinės reakcijos reagentu. Reakcija vykdytas kambario temperatūroje 20 min. ir spektrofotometru matuota 335 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais.

Sudaryta standartinė fosforo (0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,02, 0,015, 0,01, 0,005, 0,0025 mg/ml) tiesė (žr. 8 pav.), iš kurios skaičiuota tiriamo mėginio fosforo ekvivalento vertė. Iš fosforo kalibracinės tiesės, surasta fosforo ekvivalento, išlaisvinto iš kalio fitato, vertė, kuri naudota AV/g apskaičiuoti. Vienas fermento fitazių aktyvumo vienetas reikalingas išlaisvinti 1 μmol neorganinio fosforo iš 3 mM kalio fitato druskos per 1 min. 30 °C temperatūroje, esant terpės pH vertei 5,5.

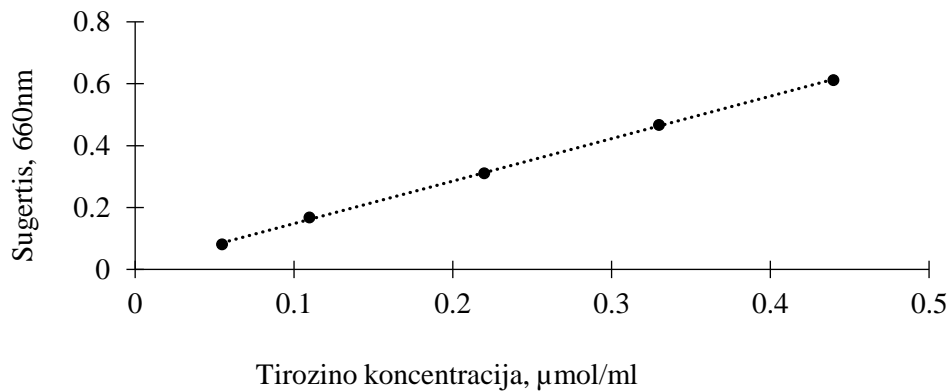


8 pav. Fosforo kalibracinė tiesė

2.11.4. Proteazinis aktyvumas

Proteazinis aktyvumas tirtas, naudojant Folin-Ciocalteu reagento tirpalą, kuris paruoštas Folin-Ciocalteu reagentą sumaišius su vandeniu santykiu 1:4. Į visus mėgintuvėlius įpilta po 5 ml kazeino tirpalo. Mėgintuvėliai pamerkti į 37 °C temperatūros vandens vonią ir išlaikyti 5 min. Po to tik į tiriamuosius mėgintuvėlius įpilta po 1 ml centrifugato, gauto fermentuotas sėklas sumaišius su distiliuotu vandeniu santykiu 1:2 ir nucentrifugavus (8000 aps./min., 10 min.), turinys gerai sumaišytas ir mėgintuvėliai vėl pamerkti į 37 °C temperatūros vandens vonią ir išlaikyti 10 min. Po to į visus mėgintuvėlius įpilta 5 ml 110 mM trichloracto rūgšties, turinį gerai sumaišius, į „tuščius“ mėgintuvėlius įpilta 1 ml centrifugato. Mėgintuvėlių turinį gerai sumaišius, jie vėl buvo pamerkti į 37 °C temperatūros vandens vonią ir išlaikyti 30 min. Po kaitinimo mėgintuvėlių turinys filtruotas per filtro popierių, 2 ml gauto filtrato perpilti į sausus mėgintuvėlius, paskui į juos įpilta 5 ml 500 mM natrio karbonato tirpalo ir 1 ml Folin-Ciocalteu reagento tirpalo. Turinys gerai sumaišytas ir mėgintuvėliai pamerkti į 37 °C temperatūros vandens vonią ir išlaikyti 30 min. Atvėsinus iki kambario temperatūros, mėgintuvėlių turinys filtruotas per filtro popierių ir spektrofotometru matuota 660 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais.

Sudaryta standartinė tirozino (0,055, 0,11, 0,22, 0,33, 0,44 $\mu\text{mol/ml}$) tiesė (žr. 9 pav.), iš kurios skaičiuota tiriamo mėginio tirozino ekvivalento vertė. Iš tirozino kalibracinės tiesės, surasta tirozino ekvivalento, išlaisvinto iš kazeino substrato, vertė, kuri naudota AV/g apskaičiuoti. Vienas fermento aktyvumo vienetas gali išskirti 1,0 μmol tirozino ekvivalentą iš substrato per 1 min., esant terpės pH 7,5 ir 37 °C temperatūrai.



9 pav. Tirozino kalibracinė tiesė

2.12. Vandens sugerties indekso nustatymas

Vandens sugerties indeksas (VSI) nustatytas paruošus fermentuotų sėklų ir vandens suspensiją, santykiu 1:6. Suspensija gerai sumaišyta ir palikta 30 °C temperatūros vandens vonioje 30 min. Po to centrifuguota 20 min., esant 4000 aps./min. VSI apskaičiuotas pagal (3) formulę, kaip likusios po centrifugavimo kietosios fazės masės ($m_{\text{nuosėdų}}$) ir pradinės masės ($m_{\text{mėginio}}$) santykis %.

$$\text{VSI} = \frac{m_{\text{nuosėdų}}}{m_{\text{mėginio}}} \times 100 \% ; \quad (3)$$

čia: VSI – vandens sugerties indeksas; $m_{\text{nuosėdų}}$ – kietosios fazės masė, likusi po centrifugavimo; $m_{\text{mėginio}}$ – pradinė masė.

2.13. Lakiojo rūgštingumo nustatymas

Nustatant lakujį rūgštingumą buvo pasverta 25 g fermentuotų sėklų, kurios sumaišytos su 7,5 ml 2 % sieros rūgšties ir distiliuotu vandeniu praskiestos iki 100 ml. Gautas mišinys nufiltruotas ir vykdyta distiliacija vandens garais (Behr S4 distiliacijos įrenginys (UK), naudota distiliacijos programa, kurios galimumas buvo 80 %, 500 sek.). Gautas distiliatas titruotas 0,1 M NaOH tirpalu, naudojant fenolftaleiną kaip indikatorius.

2.14. Pieno rūgšties izomerų koncentracijos nustatymas

Pieno rūgšties ir jos izomerų kiekis nustatytas su fermentiniais testais K-DLATE 08/11 (Megazyme International Ireland Limited) pagal gamintojų nurodymus. Pieno rūgšties izomerų koncentracija išreikšta g/kg fermentuotų sėklų.

2.15. Peroksidų nustatymas fermentuotų sėklų ilgalaikio saugojimo metu

Peroksidų kiekis nurodo riebalų oksidacijos laipsnį ir šviežumą. Fermentuotos ir nefermentuotos sėklos buvo saugomos šaldymo kameroje –18 °C temperatūroje. Kas mėnesį, šešių mėnesių laikotarpyje buvo nustatomas susidariusių peroksidų kiekis. Peroksidų kiekio nustatymui buvo naudoti riebalai, išgauti iš fermentuotų ir nefermentuotų sėklų, vykdant ekstrakciją Soksleto aparatu. Naudotas tirpiklis – heksanas, ekstrakcija vykdyta 4 val. Po ekstrakcijos likęs tirpiklis nugarintas rotaciniame garintuve. Į 250 ml kūginę kolbą atsverta 1 g riebalų, kurie ištirpinti 10 ml chloroformo. Į gautą mišinį įpilta 10 ml ledinės acto rūgšties ir 0,5 ml sotaus KI tirpalo (1 g KI ištirpinta 3 ml distiliuoto vandens). Kolba užkimšta kamščiu, gerai suplakta ir palikta 10 min.

tamsioje vietoje. Po to įpilta 100 ml distiliuoto vandens ir 1 ml 1 % krakmolo tirpalo. Išsiskyręs jodas titruotas 0,1 N natrio tiosulfato tirpalu iki mėlynos spalvos išnykimo.

2.16. Baltymų frakcijų išskyrimas

Bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų ir jų produktų nuriebinimas

Remiantis Teh'ū, kanapių sėklų nuriebinimas, baltymų išeią padidino 1,5 karto [69], todėl šiame darbe fermentuotos sėklos, o taip pat ir nefermentuotos (kontrolė) buvo nuriebinamos. Bolivinės balandos sėklos nuriebinamos, naudojant chloroformo:metanolio (2:1) mišinį santykiu 1:5 [70]. Nuriebinimas vykdytas 2 val. purtant. Chloroformo:metanolio mišinys nupiltas, likusi dalis išgarinta termostate 35 °C temperatūroje. Smulkintų kanapių sėklų nuriebinimui naudotas heksanas, kuris buvo sumaišytas su sėklų miltais santykiu 1:3, mišinys purtytas 1,5 val. purtytuve (IKA KS 130), ekstrakcija vykdyta tris kartus [71]. Kiekvieną kartą heksanas su ištirpusiais riebalais nupiltas ir užpilta nauja porcija. Po paskutinės ekstrakcijos heksanas nupiltas, o likusi jo dalis išgarinta termostate 35 °C temperatūroje.

Gautos nuriebinamos sėklos buvo naudojamos baltymų frakcijų, pagal tirpumą skirtinguose tirpikliuose, išskyrimui. Visi sėklų mėginiai, iš viso 8 (po 3 fermentuotus smulkintų bolivinės balandos ir kanapių sėklų mėginius ir nefermentuotas smulkintas bolivinės balandos ir kanapių sėklos), buvo padalinti į tris dalis ir ruoštos baltymų frakcijos pagal Osborne'ą, veikiant žaliavą skirtingais tirpikliais: distiliuotu vandeniu, 0,8 M NaCl tirpalu ir 70 % etanolio tirpalu. Buvo išskirtos trys baltymų frakcijos: baltymai tirpūs vandenyje; baltymai tirpūs 0,8 M NaCl tirpale; baltymai tirpūs 70 % etanolio tirpale.

Vandenyje tirpių baltymų frakcijos išskyrimas

Smulkintos sėklos sumaišytos su distiliuotu vandeniu santykiu 1:20, pH sureguliuotas iki 10, gautas mišinys maišytas 1,5 val., vėliau nucentrifuguotas (6000 aps./min., 15 min., 4 °C), gautas tirpalas naudotas baltymams išsodinti [70]. Tam maišant buvo lašinama 1 M HCl, kol tirpalo pH pasiekė 4,5, esant tokiam pH baltymai buvę tirpale buvo išsodinti [72]. Nucentrifugavus (8000 aps./min., 30 min., 4 °C) buvo surinktos nuosėdos, kurios užšaldytos –18 °C temperatūroje ir liofilizuotos (ZIRBUS Sublimator 3x4x5, Vokietija).

0,8 M NaCl tirpale tirpių baltymų frakcijos išskyrimas

Smulkintos sėklos sumaišytos su 0,8 M NaCl tirpalu santykiu 1:10, gautas mišinys maišytas 2 val. [71], vėliau nucentrifuguotas (6000 aps./min., 10 min., 4 °C) naudojant 10 kDa membranas (Amicon Ultra, Merck Millipore). Gautos nuosėdos buvo plautos distiliuotu vandeniu 2 kartus ir pakartotinai centrifuguojant surinktos, užšaldytos –18 °C temperatūroje ir liofilizuotos.

Etanolyje tirpių baltymų frakcijos išskyrimas

Smulkintos sėklos sumaišytos su 70 % etanolio tirpalu [72] santykiu 1:5, baltymai išsodinti lašinant 1 M HCl, kol tirpalo pH pasiekė 4,5. Gautas mišinys purtytas 48 val., vėliau tirpiklis nugarintas, naudojant IKA RV 10 rotacinį garintuvą (170 aps./min., 40 °C). Gautos nuosėdos buvo surinktos, užšaldytos –18 °C temperatūroje ir liofilizuotos.

Baltymų hidrolizė pepsinu

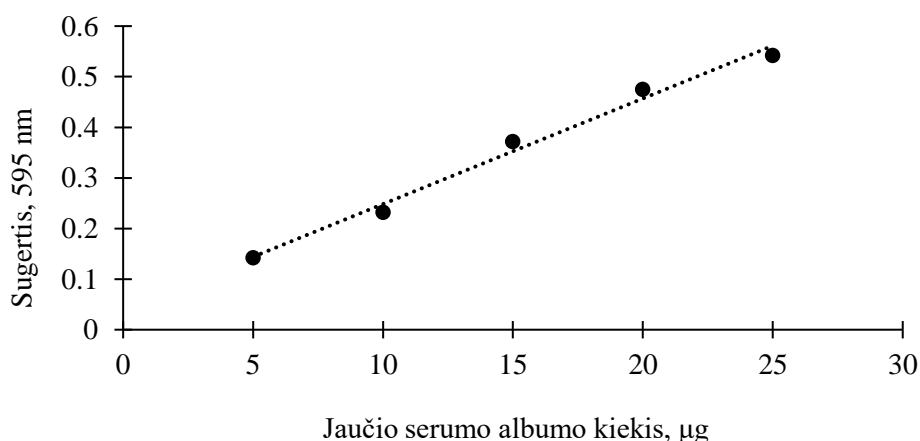
Atlikta baltymų frakcijų hidrolizė pepsinu (Sigma-Aldrich, JAV) [73]. Prieš hidrolizę liofilizuoti mėginiai buvo sumaišyti su vandeniu (santykiu 1:10), mišinio pH sureguliuotas iki 2, naudojant 1 M HCl. Hidrolizei buvo naudotas 10 mg/ml koncentracijos pepsino tirpalas, kuris sumaišytas su baltymų mišiniu santykiu 1:100. Hidrolizė vykdyta 3 val. 37 °C temperatūroje, pepsinas inaktyvuotas mėginius pakaitinus 95 °C temperatūroje 15 min. vandens vonioje, po to atvėsinta ir tirpalo pH sureguliuotas iki 7.

Gauti baltymų frakcijų mėginiai ir hidrolizuoti šių frakcijų baltymų mėginiai naudoti antimikrobinio, antioksidacinio aktyvumo, bendro fenolinių junginių kiekio nustatymo tyrimams, taip pat baltymų frakcijų sudėties pagal molekulinės mases pokyčių vertinimui gelio elektroforezės metodu.

2.17. Baltymų kiekio nustatymas

Baltymų kiekis buvo nustatytas, naudojant Bradford'o reagentą, kurį sudaro Coomassie mėlynasis dažas, 95 % etanolio tirpalas ir 85 % fosforo rūgštis. Baltymų frakcijos – supernatantai (10–50 µl), gauti ištirpinus baltymus skirtinguose tirpikliuose ir atskyrus nuosėdas, buvo sumaišyti su 1,5 ml Bradford'o reagento. Mišinys sumaišytas ir inkubuotas kambario temperatūroje 10 min., spektrofotometru matuota 595 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamais tirpalais.

Baltymų kiekio apskaičiavimui, sudaryta standartinė jaučio serumo albumino tiesė (žr. 10 pav.), iš kurios skaičiuotas baltymų kiekis tiriamuose mėginiuose. Paruošus 0,5 mg/ml koncentracijos jaučio serumo albumino tirpalą, skirtingi tirpalo kiekiai (10, 20, 30, 40, 50 µl) sumaišyti su 1,5 ml Bradford'o reagento. Mišinys sumaišytas ir inkubuotas kambario temperatūroje 10 min., spektrofotometru matuota 595 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamais tirpalais.



10 pav. Jaučio serumo albumino kalibracinė tiesė

2.18. Baltymų sudėties pagal molekulinės mases nustatymas gelio elektroforezės metodu

Baltymų sudėtis pagal molekulinės mases nustatyta vertikaliosios elektroforezės sistema (Clever Scientific, omniPAGE mini vertical). Metodas pagrįstas įkrautų molekulių judėjimu elektriniame lauke. Elektroforezės skiriamasis poliakrilamido gelis buvo ruoštas 12 % galutinės akrilamido koncentracijos: 6 ml 30 % akrilamido/0,8 % metilenbisakrilamido tirpalo, 3,75 ml 4x TRIS·HCl/NDS (0,5 M TRIS·HCl, 0,4 % natrio dodecil-sulfato) buferio pH 8,8, 5,25 ml H₂O, 0,1

ml 10 % amonio persulfato, 0,02 ml TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilen-1,2-diaminas). Elektroforezės koncentruojamasis gelis buvo ruoštas taip: 1,7 ml 30 % akrilamido/0,8 % metilenbisakrilamido tirpalo, 2,5 ml 4x TRIS·HCl/NDS buferio pH 6,8, 5,7 ml H₂O, 0,15 ml 10 % amonio peroksosulfato, 0,01 ml TEMED, įpylus gelį, įstatytos „šukos“, kurios, sustingus geliui, išimtos, į susidariusius šulinėlius įpilta po 20 μl tiriamų mėginių, o į kraštinių poliakrilamido gelio šulinėlį įpilta 5 μl žinomos molekulinės masės baltymų mišinio – standarto (Sigma–Aldrich, S8445–1VL). Elektroforezė vykdyta 60 min. prie 230 V įtampos ir 40 mA srovės stiprio. Po elektroforezės gelis laikytas baltymų tvirtinimo tirpale (25 % izopropilo alkoholio, 10 % acto rūgšties, 65 % vandens) 60 min. purtant, po to dažytas Coomassie mėliu (10 % acto rūgšties, 0,006 % Coomassie mėlio G–250, 90 % vandens) 4 val., po dažymo plautas 10 % acto rūgšties tirpalu 24 val.

2.19. Baltymų antimikrobinio aktyvumo nustatymas

Išskirtų baltymų, tiek nehidrolizuotų, tiek ir hidrolizuotų baltymų frakcijų antimikrobiniam aktyvumui nustatyti naudotos 5 indikatorinės bakterijos priklausančios *St. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. typhimurium*.

Bakterijos antimikrobinio aktyvumo tyrimui kultivuotos atitinkamai ant Plate Count nuožulnaus agaro (Liofilchem, Italija), sudaryto iš 5 g/l triptono, 1 g/l gliukozės, 2,5 g/l mielių ekstrakto, 15 g/l, 25 °C temperatūroje 3 paras. Po kultivavimo bakterijos perkeltos į mėgintuvėlius su steriliu vandeniu, mėgintuvėliuose mikroorganizmų kiekis gautas apie $1,5 \cdot 10^8$ KSV/ml (lyginant su McFarland'o 0,5 standartu, kuris atitinka $1,5 \cdot 10^8$ KSV/ml). Po 1,33 ml bakterijų suspensijos perkelta į 200 ml sterilios 50 °C temperatūros Plate Count agaro terpės.

Vertinant nehidrolizuotų ir hidrolizuotų baltymų frakcijų antimikrobinį aktyvumą, terpė su bakterijų suspensija buvo išpilstyta į Petri lėkšteles. Sustingus terpei, padaryti „šulinėliai“, į kuriuos įpilta po 70 μl tiriamos baltymų frakcijos. Lėkštelės laikytos 30 °C temperatūroje 24 val. Išskirtų baltymų frakcijų antimikrobinis poveikis vertintas išmatavus skaidrią inhibicijos zoną aplink „šulinėlį“ keliose skirtingose vietose ir pateiktas taip:

- 0 – nėra skaidrios zonos aplink „šulinėlį“;
- +/- – iki 1 mm skaidri inhibicijos zona aplink „šulinėlį“;
- + – 1–3 mm skaidri inhibicijos zona aplink „šulinėlį“;
- ++ – 3–5 mm skaidri inhibicijos zona aplink „šulinėlį“;
- +++ – >5 mm skaidri inhibicijos zona aplink „šulinėlį“.

2.20. Baltymų mėginių paruošimas bendram fenolinių junginių kiekio nustatymui ir antioksidacinio aktyvumo, vertinant DPPH ir ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu

Baltymų frakcijos – supernatantai, gauti ištirpinus baltymus skirtinguose tirpikliuose ir atskyrus nuosėdas, buvo naudoti bendro fenolinių junginių kiekiui ir antioksidacinio aktyvumo nustatymams.

Bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas pagal 2.8. skyrelyje pateiktą metodą, antioksidacinis aktyvumas DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu ir ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu vertinti atitinkamai pagal 2.9. ir 2.10. skyreliuose pateiktus metodus.

2.21. Bandelių su fermentuotomis ir nefermentuotomis sėklomis gamyba ir tyrimai

Keptos bandelės su fermentuotais sėklų produktais. Bandelės keptos 47 % drėgnio vienam kilogramui miltų (550 D) naudojant: 2,5 % presuotų mielių, 1,5 % druskos, 3 % riebalų, 10 % cukraus, vanduo naudotas pagal apskaičiavimus. Keptos skirtingų rūšių bandelės: su smulkintomis bolivinės balandos ir kanapių sėklomis fermentuotomis *L. brevis* R26, į tešlą dedant 5 % ir 10 % fermentuotų sėklų, taip pat su nefermentuotomis maltomis bolivinės balandos ir kanapių sėklomis (5 %) ir su nemaltomis bolivinės balandos ir kanapių sėklomis (5 %). Kiekvienu atveju tešla rauginta 30 min. 35 °C temperatūroje, esant 85 % santykiniam oro drėgniui, kildinimo kameroje (MIWA, Vokietija). Ruošiniai kildinti 45 min. ir bandelės keptos 20 min. 200 °C temperatūroje kepimo krosnyje (MIWA, Vokietija). Bandelės aušintos aplinkos temperatūroje 4 val. Vėliau tirti bandelių kokybės rodikliai (savitasis tūris, akytumas, kepinio formos išlaikymo rodiklis, rūgštingumas), ištirtos bandelių juslinės savybės.

Savitasis tūris nustatytas pagal tūrio ir masės santykį (cm³/g). Tūris nustatytas pagal išstumto sorų kruopų tūrį, kuris lygus kepinio tūriui.

Akytumas nustatytas naudojantis Žuravliovo prietaisu, kurio pagalba išpjauti minkštimo mėginiai, pasverti ir apskaičiuotas akytumas (%). Tam Žuravliovo prietaisu išpjauti trys cilindriniai 27 cm³ (vidinis cilindro diametras 3 cm, ilgis – 3,8 cm) minkštimo mėginiai, pasverti ir apskaičiuoti jų akytumai procentais pagal LST 1442:1996. Bandelių akytumas (X) apskaičiuotas pagal (4) formulę:

$$X = \frac{V - \frac{G}{d}}{V} \cdot 100 \% ; \quad (4)$$

čia: X – akytumas, %; V – bendras išpjovų tūris, cm³; G – bendras išpjovų svoris, g; d – beporinio minkštimo santykinis tankis, kuris priimamas – 1,21.

Kepinio formos išlaikymo rodiklis apskaičiuotas kepinį perpjovus pusiau, liniuote 0,1 cm tikslumu išmatavus pjovos aukštį (h) ir skersmenį (d). Apskaičiuotas aukščio ir skersmens santykis (h/d).

BTR nustatytas pasvėrus 5 g kepinio minkštimo, homogenizavus su 50 ml vandens ir titruojant 1 N NaOH tirpalu. Rūgštingumas išreikštas Neimano laipsniais (°N), t.y. 1 N NaOH kiekiu (ml), kuris reikalingas rūgštims, esančioms 100 g kepinio, neutralizuoti.

Juslinės savybės nustatytos respondentams vertinant bandelių kvapo intensyvumą, pašalinį kvapą, trupumą, sausumą, skonio intensyvumą, priimtinumą bei pašalinį skonį. Kvapo intensyvumas buvo vertinamas nuo 1 iki 7, kur: 1 – silpnas kvapas, 7 – stiprus. Pašalinis kvapas – tai kvapas, nebūdingas tipiškam duonos, grūdų kvapui, buvo vertinimas nuo 1 iki 7, kur: 1 – silpnas kvapas, 7 – stiprus. Pašalinis skonis – tai skonis, nebūdingas tipiškam kvietinės duonos skoniui, buvo vertinimas nuo 1 iki 7, kur: 1 – silpnas kvapas, 7 – stiprus. Kepinių trupumas buvo vertinimas nuo 1 iki 7, kur: 1 – mažas, 7 – didelis. Kepinių sausumas – sausas, jeigu norint nuryti mėginį, jį reikia gerai sudrėkinti seilėmis, buvo vertinimas nuo 1 iki 7, kur: 1 – drėgnas, 7 – sausas. Skonio intensyvumas – skonio, būdingo kvietinei duonai, intensyvumas, buvo vertinimas nuo 1 iki 7, kur: 1 – silpnas, 7 – stiprus. Bendras priimtumas buvo vertinimas nuo 1 iki 7, kur: 1 – mažas, 7 – didelis. Kepinių juslines savybes vertino 10 respondentų, kuriems buvo išdalintos apklausos anketos (žr. priedai, Apklausos anketa), rezultatai pateikti suskaičiavus visų respondentų atsakymų vidurkius.

2.22. Statistinė analizė

Eksperimentai kartoti tris kartus, iš gautų rezultatų išvesti vidurkiai, apskaičiuoti standartiniai nuokrypiai, naudojant „Excel“ programinę įrangą. Duomenų statistiniam įvertinimui naudota „Excel“ programinės įrangos funkcija „t.test“, palyginimas atliktas tarp rezultatų, taikant 0,05 tikimybės lygį.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe atlikta bolivinės balandos ir pluoštinės kanapės sėklų fermentacija PRB, iširtos sėklų technologinės ir funkcinės savybės bei šių produktų panaudojimo galimybės kepinių juslinėms savybėms ir kokybei gerinti.

3.1. Terpės drėgnio įtaka vandens aktyvumui

Skirtingų drėgnių bolivinės balandos ir kanapių sėklų terpių a_w rezultatai pateikti 6 lentelėje. Didžiausiu a_w pasižymėjo didžiausio drėgnio bolivinės balandos ir kanapių sėklos, atitinkamai – 0,938 ir 0,944, mažiausias a_w nustatytas nemaltų bolivinės balandos ir kanapių sėklų, atitinkamai – 0,550 ir 0,527, tuo tarpu sumaltų sėklų a_w buvo didesnis lyginant su nemaltomis sėklomis. a_w daro įtaką mikroorganizmų dauginimosi galimybėms, kadangi a_w tiek 30 %, tiek ir 70 % drėgnio terpėse skyrėsi nežymiai, todėl tolimesniems tyrimams pasirinkta ruošti 50 % ir 65 % drėgnio bolivinės balandos bei 30 % ir 50 % drėgnio kanapių sėklų terpes, kurios buvo fermentuotos PRB.

6 lentelė. Bolivinės balandos ir kanapių sėklų terpes drėgnio įtaka a_w

| Produktas | a_w | Produktas | a_w |
|---|-------------|----------------------------|--------------|
| Nemaltos bolivinės balandos sėklos | 0,550±0,002 | Nemaltos kanapių sėklos | 0,527±0,004 |
| Sumaltos bolivinės balandos sėklos | 0,636±0,001 | Sumaltos kanapių sėklos | 0,692±0,007 |
| 50 % drėgnio bolivinės balandos sėklų terpė | 0,932±0,002 | 30 % drėgnio kanapių terpė | 0,936±0,002 |
| 55 % drėgnio bolivinės balandos sėklų terpė | 0,935±0,001 | 40 % drėgnio kanapių terpė | 0,941± 0,002 |
| 60 % drėgnio bolivinės balandos sėklų terpė | 0,936±0,002 | 45 % drėgnio kanapių terpė | 0,941±0,001 |
| 65 % drėgnio bolivinės balandos sėklų terpė | 0,937±0,001 | 50 % drėgnio kanapių terpė | 0,942±0,002 |
| 70 % drėgnio bolivinės balandos sėklų terpė | 0,938±0,001 | 60 % drėgnio kanapių terpė | 0,944±0,001 |

3.2. Bolivinės balandos ir kanapių sėklų terpes įtaka pieno rūgšties bakterijų gyvybingumui

PRB skaičius nustatytas fermentuojant bolivinės balandos smulkintas sėklas (50 % ir 65 % drėgnio terpė) su *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis po 24, 48 ir 72 val. fermentacijos (žr. 7 lentelę). Didžiausias mikroorganizmų skaičius nustatytas bolivinės balandos sėklas (50 % drėgnio) fermentuojant 72 val., ir gautas 10^9 KSV/g su *L. plantarum* MR24 ir *L. brevis* R26 bei 10^{10} KSV/g su *L. acidophilus* DSM 20079, kai kuriais kitais atvejais mikroorganizmų skaičius buvo 10^8 KSV/g, todėl tolimesniems tyrimams bolivinės balandos buvo ruošiamos 50 % drėgnio ir fermentuojamos 72 val.

Ayyash'as ir kt. fermentavo bolivinės balandos sėklas su *L. plantarum* štamu, po 72 val. fermentacijos, bakterijų skaičius išaugo iki $7,9 \cdot 10^8$ KSV/g [74]. Šie rezultatai yra panašūs su gautais šiame darbe, kuomet po 24 val. ir 72 val. fermentacijos, PRB skaičius siekė 10^9 KSV/g.

Mikroorganizmų skaičius nustatytas fermentuojant kanapių sėklas (30 % ir 50 % drėgnio) *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis po 24, 48 ir 72 val. fermentacijos (žr. 8 lentelę).

7 lentelė. PRB skaičius po 24, 48 ir 72 val. smulkintų bolivinės balandos sėklų (50 % ir 65 % drėgniai) fermentavimo *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis

| Terpės drėgnis | PRB skaičius, KSV/g | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | 50 % | | | 65 % | | |
| Fermentacijos trukmė, val. | 24 | 48 | 72 | 24 | 48 | 72 |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | $(3,35 \pm 0,3) \cdot 10^9$ | $(4,6 \pm 0,1) \cdot 10^9$ | $(3,9 \pm 0,3) \cdot 10^9$ | $(2,6 \pm 0,2) \cdot 10^9$ | $(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^9$ | $(2,29 \pm 0,1) \cdot 10^9$ |
| <i>L. brevis</i> R26 | $(7,9 \pm 0,2) \cdot 10^8$ | $(2,07 \pm 0,1) \cdot 10^9$ | $(8,05 \pm 0,1) \cdot 10^9$ | $(7,4 \pm 0,2) \cdot 10^8$ | $(7,4 \pm 0,1) \cdot 10^8$ | $(1,69 \pm 0,1) \cdot 10^9$ |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | $(4,45 \pm 0,1) \cdot 10^9$ | $(3,24 \pm 0,3) \cdot 10^9$ | $(3,2 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$ | $(1,96 \pm 0,2) \cdot 10^9$ | $(5,3 \pm 0,1) \cdot 10^9$ | $(1,32 \pm 0,2) \cdot 10^9$ |

Didžiausias mikroorganizmų skaičius (10^9 KSV/g) nustatytas kanapių sėklas (30 % drėgnio) fermentuojant 48 val., kai kuriais kitais atvejais skaičius buvo tik 10^8 KSV/g, todėl tolimesniems tyrimams kanapių sėklos buvo ruošiamos 30 % drėgnio ir fermentuojamos 48 val.

Nionelli's ir kt. fermentavo kanapių sėklas, po 24 val. bendras PRB skaičius padidėjo nuo $(2,5 \pm 0,1) \cdot 10^3$ KSV/g iki $(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^8$ KSV/g [4]. Bartkienė ir kt. fermentavo kanapių sėklas *L. casei*, po 24 val. bakterijų skaičius pasiekė $(6,0 \pm 0,14) \cdot 10^8$ KSV/g [59]. Kitų mokslininkų rezultatai yra panašūs su gautais šiame darbe, kuomet po 24 val. fermentacijos, PRB skaičius siekė 10^8 – 10^9 KSV/g.

8 lentelė. PRB skaičius po 24, 48 ir 72 val. kanapių sėklų (30 ir 50 % drėgniai) fermentavimo *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis

| Terpės drėgnis | PRB skaičius, KSV/g | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | 30 % | | | 50% | | |
| Fermentacijos trukmė, val. | 24 | 48 | 72 | 24 | 48 | 72 |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | $(6,1 \pm 0,2) \cdot 10^9$ | $(7,9 \pm 0,1) \cdot 10^9$ | $(9 \pm 0,1) \cdot 10^8$ | $(3,15 \pm 0,1) \cdot 10^9$ | $(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^9$ | $(1,15 \pm 0,2) \cdot 10^9$ |
| <i>L. brevis</i> R26 | $(3,25 \pm 0,2) \cdot 10^9$ | $(3,3 \pm 0,1) \cdot 10^9$ | $(8,5 \pm 0,3) \cdot 10^8$ | $(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^9$ | $(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^9$ | $(1,65 \pm 0,1) \cdot 10^9$ |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | $(8,86 \pm 0,3) \cdot 10^8$ | $(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^9$ | $(1,55 \pm 0,2) \cdot 10^9$ | $(1,42 \pm 0,1) \cdot 10^9$ | $(2,8 \pm 0,1) \cdot 10^9$ | $(1,95 \pm 0,2) \cdot 10^9$ |

3.3. Fermentacijos trukmės įtaka produktų aktyviajam ir bendram titruojamam rūgštingumui

pH ir BTR buvo nustatyti fermentuojant smulkintas kanapių (30 % drėgnio) ir bolivinės balandos sėklas (50 % drėgnio) *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis po 24, 48 ir 72 val. fermentacijos (žr. 9 lentelę). Vykstant fermentacijai, pH visais atvejais mažėjo, o BTR didėjo.

Mokslininkė Chis ir kt. fermentavo smulkintas bolivinės balandos sėklas *L. plantarum* štamų. Praėjus 24 val. po fermentacijos pradžios, pH buvo 3,7, o kontroliniame nefermentuotame mėginyje

5,3, taip pat buvo tirtas BTR, kuris fermentuotame mėginyje padidėjo 2,4 karto, lyginant su kontroliniu [75]. Ayysh'as ir kt. fermentavo bolivinės balandos sėklas *L. plantarum* štamą, po 72 val. fermentacijos pH nuo 6,7 sumažėjo iki 3,3 [74]. Šie rezultatai yra panašūs su šiame darbe gautais, kuomet fermentuojant bolivinės balandos sėklas 24 val., pH sumažėjo nuo 6,33 (fermentacijos pradžioje) iki 4,39, praėjus 72 val. nuo fermentacijos pradžios pH buvo 4,3, o BTR padidėjo 3,1 karto, nedideli skirtumai tarp rezultatų gali būti dėl naudoto skirtingo *L. plantarum* štamo ar skirtingos bolivinės balandos sėklų veislės.

9 lentelė. pH ir BTR po 24, 48 ir 72 val. kanapių (30 % drėgnio) ir bolivinės balandos sėklų (50 % drėgnio) fermentavimo *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis

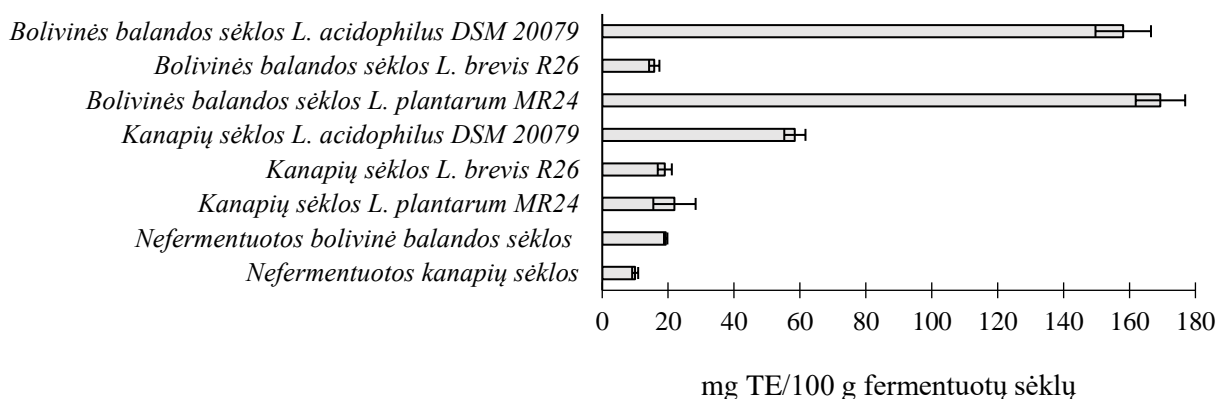
| Fermentacijos trukmė, val. | Kanapių sėklos (30 % drėgnio) | | | | Bolivinės balandos sėklos (50 % drėgnio) | | | |
|--|-------------------------------|------|------|------|--|------|------|------|
| | 0 | 24 | 48 | 72 | 0 | 24 | 48 | 72 |
| Kanapių ir bolivinės balandos sėklų fermentacijai naudotos PRB | | | | | | | | |
| | pH | | | | | | | |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | 6,65 | 4,75 | 4,72 | 4,53 | 6,33 | 4,39 | 4,16 | 4,3 |
| <i>L. brevis</i> R26 | 6,65 | 5,92 | 5,52 | 5,3 | 6,33 | 5,81 | 5,70 | 5,63 |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | 6,65 | 5,01 | 4,92 | 4,77 | 6,33 | | | |
| | BTR | | | | | | | |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | 2,6 | 5,4 | 6,1 | 6,6 | 2,9 | 9 | 10,1 | 9,2 |
| <i>L. brevis</i> R26 | 2,6 | 2,1 | 3,4 | 4,3 | 2,9 | 4,3 | 4,6 | 5,5 |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | 2,6 | 2,8 | 4,6 | 8,0 | 2,9 | | | |

3.4. Fermentuotų sėklų produktų antioksidacinis aktyvumas

Fermentuotose bolivinės balandos (72 val.) (50 % drėgnio) ir kanapių sėklose (48 val.) (30 % drėgnio), taip pat ir nefermentuotose tų pačių drėgnių sėklose nustatytas antioksidacinis aktyvumas. Antioksidacinis aktyvumas tirtas naudojant DPPH reagentą ir išreikštas kaip TE (mg) esantis 100 g fermentuotų sėklų (žr. 11 pav.).

Didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas bolivinės balandos sėklose fermentuotose *L. plantarum* MR24 – 169,4 mg TE/100 g fermentuotų sėklų. Taip pat didelis antioksidacinis aktyvumas nustatytas bolivinės balandos sėklose fermentuotose *L. acidophilus* DSM 20079 – 158,1 mg TE/100 g fermentuotų sėklų. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas nefermentuotose kanapių sėklose – 9,9 mg TE/100 g fermentuotų sėklų. Taip pat maži antioksidaciniai aktyvumai nustatyti kanapių ir bolivinės balandos sėklose fermentuotose *L. brevis* R26, atitinkamai – 18,9 ir 15,8 mg TE/100 g fermentuotų sėklų ir nefermentuotose bolivinės balandos sėklose – 19,3 mg TE/100 g fermentuotų sėklų.

Mokslininkas Rizzello'as ir kt. [10] tyrė fermentuotų bolivinės balandos miltų *Lactobacillus* padermėmis antioksidacines savybes ir nustatė, jog fermentacija *L. plantarum* bakterijomis, padidina sėklų antioksidacinį aktyvumą. Mokslininkas Yoon'as ir kt. [76] vykdė kanapių sėklų fermentaciją PRB štamais (*L. plantarum*, *L. brevis* ir *L. paracasei*) ir tyrė gautų fermentuotų produktų antioksidacinį aktyvumą. Buvo nustatyta, jog fermentuotos kanapių sėklos pasižymi iki 4 kartų didesniu antioksidaciniu aktyvumu, lyginant su nefermentuotomis. Krunglevičiūtė ir kt. atliko lubinų sėklų fermentaciją PRB (*L. sakei*, *Pediococcus acidilactici* ir *Pediococcus pentosaceus*) bei tyrė nefermentuotų ir fermentuotų sėklų antioksidacinį aktyvumą. Antioksidacinis aktyvumas gautas didesnis (1,3–1,4 karto) po lubinų sėklų fermentacijos PRB [77]. Kitų mokslininkų gauti rezultatai atitinka ir šio tyrimo rezultatus, kai fermentacijai naudojant PRB, sėklų antioksidacinis aktyvumas gautas didesnis.



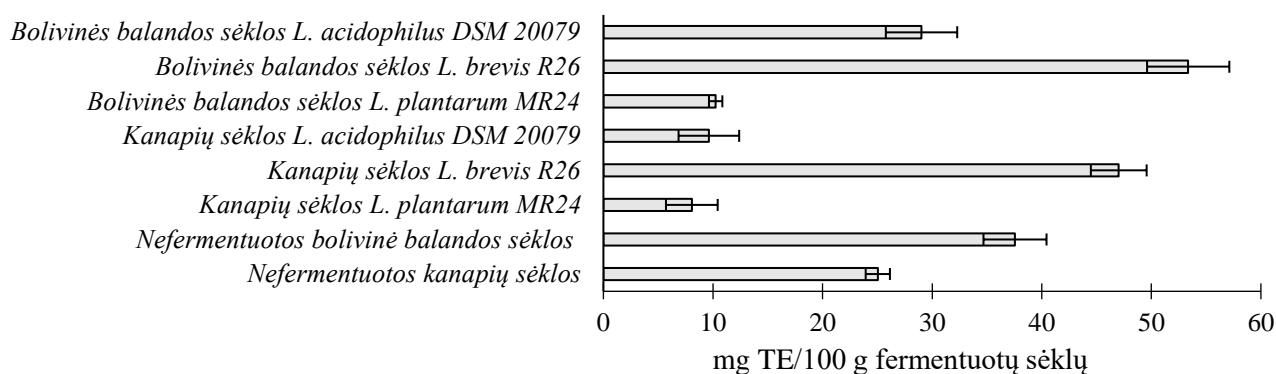
11 pav. Antioksidacinis aktyvumas, vertinant DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu (išreikštas mg TE/100 g fermentuotų sėklų), nustatytas nefermentuotose ir fermentuotose kanapių ir bolivinės balandos sėklose *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis

Pastebėtas vidutinio dydžio koreliacinis ryšys tarp antioksidacinio aktyvumo ir BTR ($R^2=0,689$).

Antioksidacinis aktyvumas, vertinant ABTS^{•+} sujungimo gebą, nustatytas bolivinės balandos sėklose (50 % drėgnio) fermentuotose 72 val. ir kanapių sėklose (30 % drėgnio) fermentuotose 48 val., taip pat ir nefermentuotose tų pačių drėgnių sėklose (žr. 12 pav.). Didžiausia ABTS^{•+} sujungimo geba pasižymėjo bolivinės balandos sėklos fermentuotos *L. brevis* R26 – 53,4 mg TE/100 g fermentuotų sėklų, taip pat didelė ABTS^{•+} sujungimo geba nustatyta kanapių sėklose fermentuotose *L. brevis* R26 – 47 mg TE/100 g fermentuotų sėklų. Mažiausia ABTS^{•+} sujungimo geba pasižymėjo kanapių sėklos fermentuotos *L. plantarum* MR24 – 8,1 mg TE/100 g fermentuotų sėklų, kanapių sėklos fermentuotos *L. acidophilus* DSM 20079 – 9,6 mg TE/100 g fermentuotų sėklų ir bolivinės balandos sėklos fermentuotos *L. plantarum* MR24 – 10,2 mg TE/100 g fermentuotų sėklų.

Rizzello'as ir kt. tyrė bolivinės balandos sėklų fermentuotų PRB antioksidacinį aktyvumą. Fermentacijai naudojant *L. plantarum* štamus, ABTS^{•+} sujungimo geba gauta didesnė, lyginant su nefermentuotomis sėklomis [10]. Ayyash'as ir kt. fermentavo bolivinės balandos sėklas *L. plantarum* štamu. ABTS^{•+} sujungimo geba po 72 val. bolivinės balandos sėklų fermentacijos padidėjo 2,5 karto, lyginant su kontroliniais mėginiais [74]. Šiame darbe gauti rezultatai rodo, jog bolivinės balandos ir kanapių sėklų fermentacija *L. plantarum* MR24, ABTS^{•+} sujungimo gebą

sumažino, tačiau fermentacija *L. brevis* R26 šį rodiklį padidino. Skirtumai tarp kitų mokslininkų ir šiame darbe gautų rezultatų, gali būti dėl naudotų skirtingų bakterijų štamų.

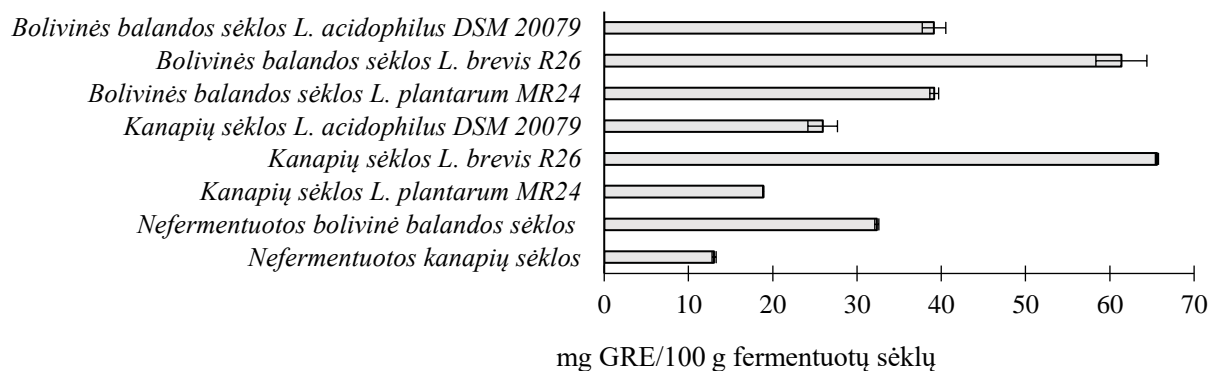


12 pav. Antioksidacinis aktyvumas, vertinant ABTS^{•+} surišimo gebos metodu (išreikštas mg TE/100 g fermentuotų sėklų), nustatytas nefermentuotose ir fermentuotose kanapių ir bolivinės balandos sėklose *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis

3.5. Bendras fenolinių junginių kiekis fermentuotuose sėklų produktuose

Yra nustatyta, jog fenoliniai junginiai pasižymi antioksidaciniu, antihipertenziniu, antidiabetiniu ir antimikrobiniu aktyvumais [51]. Bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas bolivinės balandos sėklose (50 % drėgnio) fermentuotose 72 val. ir kanapių sėklose (30 % drėgnio) fermentuotose 48 val., taip pat ir nefermentuotose tų pačių drėgnių sėklose. Bendras fenolinių junginių kiekis išreikštas kaip GRE (mg) esantis 100 g fermentuotų sėklų (žr. 13 pav.).

Bendru didžiausiu fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo bolivinės balandos ir kanapių sėklos fermentuotos *L. brevis* R26 atitinkamai – 61,4 ir 65,6 mg GRE/100 g fermentuotų sėklų. Mažiausiu bendru fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo nefermentuotos kanapių sėklos – 13 mg GRE/100 g fermentuotų sėklų.



13 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis (išreikštas mg GRE/100 g fermentuotų sėklų), nustatytas nefermentuotose ir fermentuotose kanapių ir bolivinės balandos sėklose *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis

Mokslininkas Yoon'as ir kt. vykdė kanapių sėklų fermentaciją PRB štamais (*L. plantarum*, *L. brevis* ir *L. paracasei*) ir tyrė polifenolių kiekį. Buvo nustatyta, jog fermentuotos kanapių sėklos pasižymi didesniu polifenolinių junginių kiekiu, lyginant su nefermentuotomis [76]. Ayyash'as ir kt. fermentavo bolivinės balandos sėklas *L. plantarum* štamu. Bendras fenolinių junginių kiekis po 72

val. fermentacijos padidėjo nuo 12 mg GRE/g (kontrolė) iki 26 mg GRE/g [74]. Krunglevičiūtė ir kt. atliko lubinų sėklų fermentaciją PRB (*L. sakei*, *Pediococcus acidilactici* ir *Pediococcus pentosaceus*) bei tyrė bendrą fenolinių junginių kiekį nefermentuotose ir fermentuotose sėklose. Bendras fenolinių junginių kiekis buvo gautas didesnis (8–12 %) po lubinų sėklų fermentacijos PRB [77]. Kitų mokslininkų gauti rezultatai atitinka ir šio tyrimo rezultatus, kai sėklų fermentacija, naudojant PRB, padidino bendrą fenolinių junginių kiekį.

3.6. Fermentuotų sėklų produktų antimikrobinis poveikis

Fermentuotose bolivinės balandos (72 val.) (50 % drėgnio) ir kanapių sėklose (48 val.) (30 % drėgnio), nustatytas antimikrobinis aktyvumas. Antimikrobinis fermentuotų bolivinės balandos sėklų ir kanapių sėklų produktų poveikis indikatoriniams mikroorganizmams pateiktas atitinkamai 10 ir 11 lentelėse.

Didžiausiu antimikrobinio aktyvumu pasižymėjo bolivinės balandos sėklos fermentuotos *L. acidophilus* DSM 20079, kurios slopino *B. cereus* bakterijų augimą, kanapių sėklos fermentuotos *L. plantarum* MR24 slopino *St. aureus* ir *B. cereus* bakterijų augimą, kanapių sėklos fermentuotos *L. acidophilus* DSM 20079 slopino *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. typhimurium* bakterijų augimą.

10 lentelė. Antimikrobinis fermentuotų (72 val.) bolivinės balandos sėklų (50 % drėgnio) poveikis indikatoriniams mikroorganizmams

| Bolivinės balandos fermentuotas produktas (drėgnis 50%) | | | |
|---|----------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| Indikatoriniai mikroorganizmai | Sėklų fermentacijai naudotos PRB | | |
| Mikroskopiniai grybai | <i>L. plantarum</i> MR24 | <i>L. brevis</i> R26 | <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 |
| <i>A. versicolor</i> | +/- | 0 | 0 |
| <i>P. chrysogenum</i> | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. cyclopium</i> | 0 | + | 0 |
| <i>A. terreus</i> | 0 | 0 | 0 |
| <i>Penicillium</i> sp. | +/- | 0 | 0 |
| Bakterijos | | | |
| <i>St. aureus</i> | 0 | 0 | 0 |
| <i>B. subtilis</i> | 0 | 0 | 0 |
| <i>B. cereus</i> | 0 | 0 | ++ |
| <i>E. coli</i> | 0 | 0 | +/- |
| <i>S. typhimurium</i> | +/- | 0 | 0 |

Antimikrobinio aktyvumo vertinimas: „0“ – nėra skaidrios zonos aplink fermentuotą mėginį; „+/-“ – iki 1mm skaidri inhibicijos zona aplink fermentuotą mėginį; „+“ – 1–3 mm skaidri inhibicijos zona aplink fermentuotą mėginį; „++“ – >3 mm skaidri inhibicijos zona aplink fermentuotą mėginį.

Mokslininkas Yoon'as ir kt. vykdė kanapių sėklų fermentaciją PRB štamais (*L. plantarum*, *L. brevis* ir *L. paracasei*) ir tyrė antimikrobinį aktyvumą prieš *S. aureus*, *B. cereus* ir *S. typhimurium*. Buvo nustatyta, jog nefermentuotos sėklos prieš *B. cereus* ir *S. typhimurium* nepasižymėjo aktyvumu, o prieš *S. aureus* pasižymėjo mažiausia vertinta inhibicine zona [76]. Fermentuotos kanapių sėklos *L. plantarum* štamais slopino visų indikatorinių mikroorganizmų, išskyrus sėklos fermentuotos *L. plantarum* KCTC 3107 neslopino *S. typhimurium* augimo. Fermentacijai naudojant

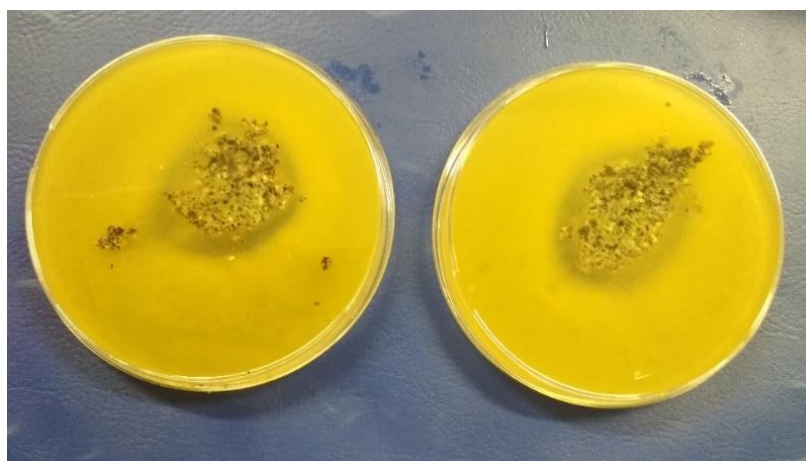
L. brevis, kanapių sėklos slopino *S. aureus* ir *B. cereus* augimą, o sėklos fermentuotos *L. paracasei* slopino visų trijų tirtų indikatorinių mikroorganizmų augimą. Gauti rezultatai atitinka ir šio tyrimo rezultatus, kai kanapių sėklų fermentacija padidino antimikrobinį aktyvumą prieš kai kuriuos indikatorinius mikroorganizmus.

11 lentelė. Antimikrobinis fermentuotų (48 val.) kanapių sėklų (30 % drėgnio) poveikis indikatoriniams mikroorganizmams

| Kanapių sėklų fermentuotas produktas (drėgnis 30 %) | | | |
|---|----------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| Indikatoriniai mikroorganizmai | Sėklų fermentacijai naudotos PRB | | |
| Mikroskopiniai grybai | <i>L. plantarum</i> MR24 | <i>L. brevis</i> R26 | <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 |
| <i>A. versicolor</i> | ++ | 0 | 0 |
| <i>P. chrysogenum</i> | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. cyclopium</i> | 0 | 0 | 0 |
| <i>A. terreus</i> | +/- | 0 | 0 |
| <i>Penicillium</i> sp. | + | + | + |
| Bakterijos | | | |
| <i>St. aureus</i> | + | +/- | +/- |
| <i>B. subtilis</i> | + | 0 | ++ |
| <i>B. cereus</i> | ++ | 0 | ++ |
| <i>E. coli</i> | + | 0 | ++ |
| <i>S. typhimurium</i> | + | + | ++ |

Antimikrobinio aktyvumo vertinimas: „0“ – nėra skaidrios zonos aplink fermentuotą mėginį; „+/-“ – iki 1mm skaidri inhibicijos zona aplink fermentuotą mėginį; „+“ – 1–3 mm skaidri inhibicijos zona aplink fermentuotą mėginį; „++“ – >3 mm skaidri inhibicijos zona aplink fermentuotą mėginį.

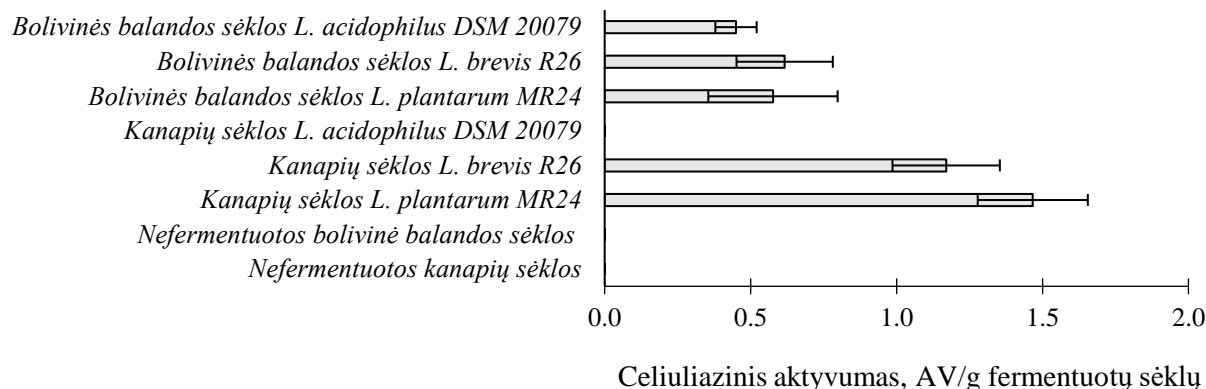
Fermentuotų kanapių sėklų su *L. acidophilus* DSM 20079 bakterija antimikrobinis poveikis *S. typhimurium* augimui pateiktas 14 paveiksle.



14 pav. Matoma skaidri inhibicijos zona (*S. typhimurium* augimo slopinimas) aplink fermentuotas kanapių su *L. acidophilus* DSM 20079 sėklas

3.7. Fermentuotų sėklų produktų fermentiniai aktyvumai

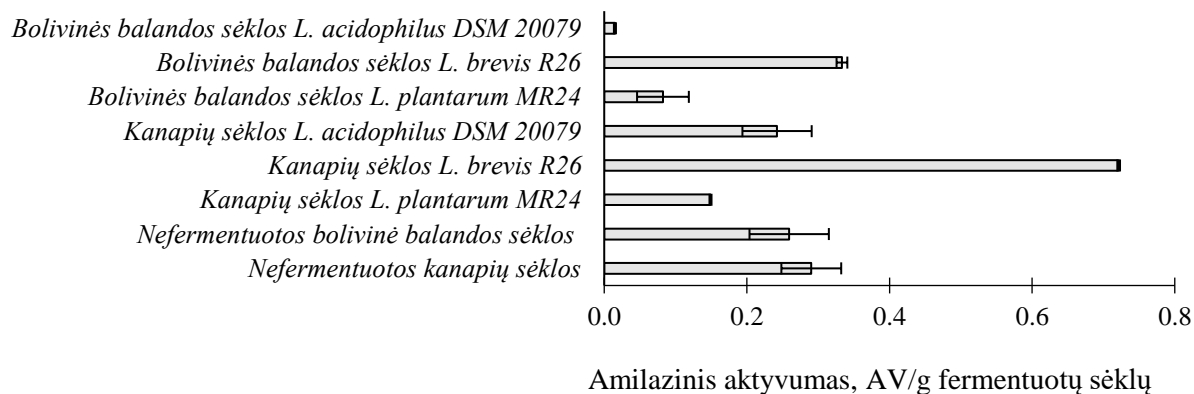
Fermentuotose bolivinės balandos (72 val.) (50 % drėgnio) ir kanapių sėklose (48 val.) (30 % drėgnio), taip pat ir nefermentuotose tų pačių drėgnių sėklose nustatytas celiuliazinis aktyvumas (žr. 15 pav.). Didžiausiu celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjo kanapių sėklos fermentuotos *L. plantarum* MR24 – 1,47 AV/g fermentuotų sėklų, celiuliaziniu aktyvumu nepasižymėjo nefermentuotos sėklos bei kanapių sėklos fermentuotos *L. acidophilus* DSM 20079.



15 pav. Celiuliazinis aktyvumas nefermentuotų ir fermentuotų PRB (*L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079) kanapių ir bolivinės balandos sėklų

Fermentuotose bolivinės balandos (72 val.) (50 % drėgnio) ir kanapių sėklose (48 val.) (30 % drėgnio), taip pat ir nefermentuotose tų pačių drėgnių sėklose nustatytas amilazinis aktyvumas (žr. 16 pav.). Didžiausiu amilaziniu aktyvumu pasižymėjo kanapių sėklos fermentuotos *L. brevis* R26 – 0,72 AV/g fermentuotų sėklų, mažiausiu amilaziniu aktyvumu pasižymėjo bolivinės balandos sėklos fermentuotos *L. acidophilus* DSM 20079 – 0,015 AV/g fermentuotų sėklų.

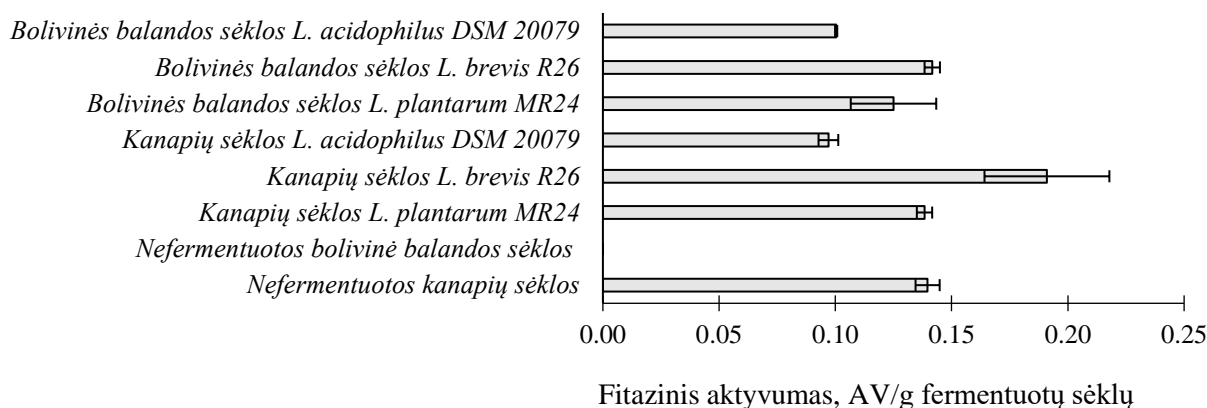
Songre-Quattara ir kt. tyrė 30-ies skirtingų PRB štamų fermentinius aktyvumus, iš visų tirtų štamų, didžiausiu amilaziniu aktyvumu pasižymėjo du štamai, priklausantys *L. plantarum* rūšiai. Amilazinio aktyvumo tyrime buvo naudotas taip pat *L. plantarum* A6 štamai (0,42 AV/ml) [78]. Taigi, Songre-Quattara ir bendraautorių tyrimas parodo, jog PRB pasižymi amilaziniu aktyvumu, ypatingai *L. plantarum* štamai.



16 pav. Amilazinis aktyvumas nefermentuotų ir fermentuotų PRB (*L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079) kanapių ir bolivinės balandos sėklų

Grūduose yra daug žmogaus sveikatai naudingų mineralų – P, Mg, Fe, Cu, Zn, tačiau didelė jų dalis yra surišta kompleksuose su fitino rūgštimi – fitatuose, o tai mažina mineralų biologinį prieinamumą. Fitazė yra fermentas, kuris skaldo fitatus, taip padidindamas mineralų įsisavinimą, ir yra nustatyta, jog mikroorganizmai – mielės ir PRB – gamina šiuos fermentus [79].

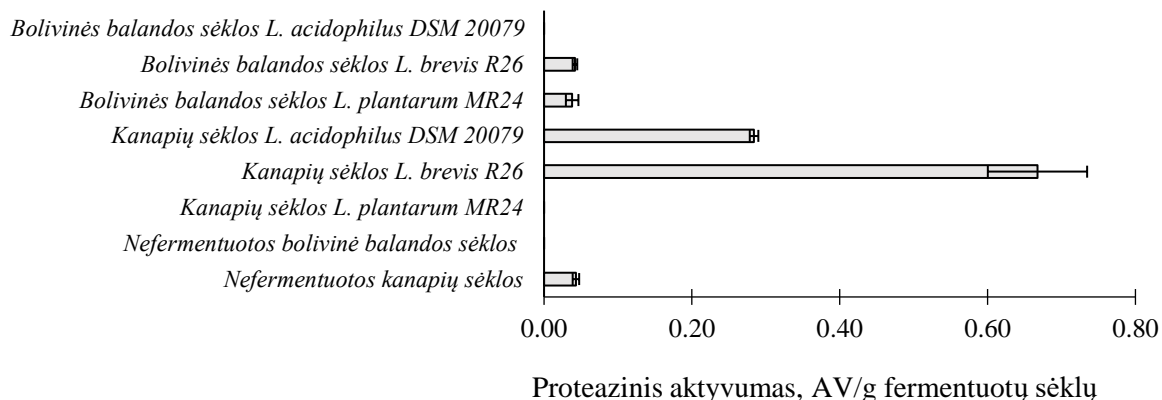
Fermentuotose bolivinės balandos (72 val.) (50 % drėgnio) ir kanapių sėklose (48 val.) (30 % drėgnio), taip pat ir nefermentuotose tų pačių drėgnių sėklose nustatytas fitazinis aktyvumas (žr. 17 pav.). Didžiausiu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo kanapių sėklos fermentuotos *L. brevis* R26 – 0,19 AV/g fermentuotų sėklų, fitaziniu aktyvumu nepasižymėjo nefermentuotos bolivinės balandos sėklos. Nuobarienė ir kt. [79] tyrė fitatų skilimą tešlos fermentacijos metu, naudojant *L. fermentum*, *L. panis*, ir nustatė, jog fermentacijos PRB metu fitatų kiekis mažėjo, lyginant su tešla, kurioje nebuvo pridėta PRB. Šie rezultatai atitinka ir šiame tyrime gautus rezultatus, kuomet fermentacija padidino fitazinį aktyvumą.



17 pav. Fitazinis aktyvumas nefermentuotų ir fermentuotų PRB (*L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079) kanapių ir bolivinės balandos sėklų

Fermentuotose bolivinės balandos (72 val.) (50 % drėgnio) ir kanapių sėklose (48 val.) (30 % drėgnio), nustatytas proteazinis aktyvumas (žr. 18 pav.). Didžiausiu proteaziniu aktyvumu pasižymėjo kanapių sėklos fermentuotos *L. brevis* R26 – 0,67 AV/g fermentuotų sėklų, proteaziniu aktyvumu nepasižymėjo bolivinės balandos sėklos fermentuotos *L. acidophilus* DSM 20079, kanapių sėklos fermentuotos *L. plantarum* MR24 bei nefermentuotos bolivinės balandos sėklos.

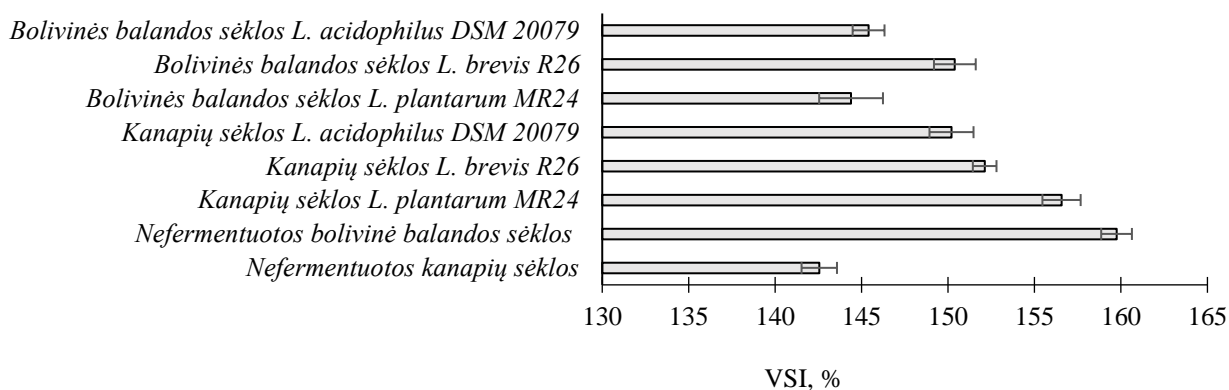
PRB pasižymi kompleksine proteolitine sistema, kurią daugiausiai sudaro ląstelių sienelėse esančios proteinazės ir tarpląstelinės peptidazės, skaidančios peptidus į amino rūgštis. Yra nustatyta, jog *L. plantarum* bakterijos nepasižymi ląstelių sienelėse esančiomis proteinazėmis, todėl manoma, kad pirmas bolivinės balandos sėklų baltymų skaidymo etapas vyksta dėl proteazių, esančių grūduose [30]. Šie fermentai tampa aktyvūs esant žemam terpės pH, taigi fermentacija taip prisideda prie baltymų skaidymo. Fermentuotų bolivinės balandos sėklų proteazinį aktyvumą įrodo ir baltymų masės skirtumai, atlikus elektroforezę, kuomet po fermentacijos, padaugėja mažesnės molekulinės masės baltymų ir nelieta didesnės. Dallagnol'as ir kt. atliko bolivinės balandos sėklų fermentaciją *L. plantarum* CRL 778 štamu, ir nustatė, jog po 24 val. neliko 38 kDa baltymų, susidarė 22 kDa baltymų, kurių nebuvo prieš fermentaciją [30]. Suardžius *L. brevis* ir *L. plantarum* štamų ląsteles, jų ekstraktuose nustatyta įvairių, baltymus skaidančių, fermentų – proteazių, endopeptidazių, aminopeptidazių, dipeptidazių [80].



18 pav. Proteazinis aktyvumas nefermentuotų ir fermentuotų PRB (*L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079) kanapių ir bolivinės balandos sėklų

3.8. Fermentacijos įtaka bolivinės balandos ir kanapių bioproduktų vandens įgėrimui

Nuo VSI priklauso tešlos technologinės savybės – tūsumas, kuo mažesnis VSI, tuo tešla – skystesnė. Fermentuotose bolivinės balandos (72 val.) (50 % drėgnio) ir kanapių sėklose (48 val.) (30 % drėgnio), taip pat ir nefermentuotose tų pačių drėgnių sėklose nustatytas VSI (žr. 19 pav.). Didžiausias VSI nustatytas nefermentuotose bolivinės balandos sėklose – 159 %, taip pat didelis VSI nustatytas kanapių sėklose fermentuotose su *L. plantarum* MR24 – 156 %, mažiausias VSI nustatytas nefermentuotose kanapių sėklose – 142 %. Fermentacija sumažino bolivinės balandos produktų VSI, tuo tarpu nefermentuotų kanapių sėklų VSI buvo nedidelis, o fermentacija jį padidino.



19 pav. VSI (%), nustatytas nefermentuotoms ir fermentuotoms kanapių ir bolivinės balandos sėkloms *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis

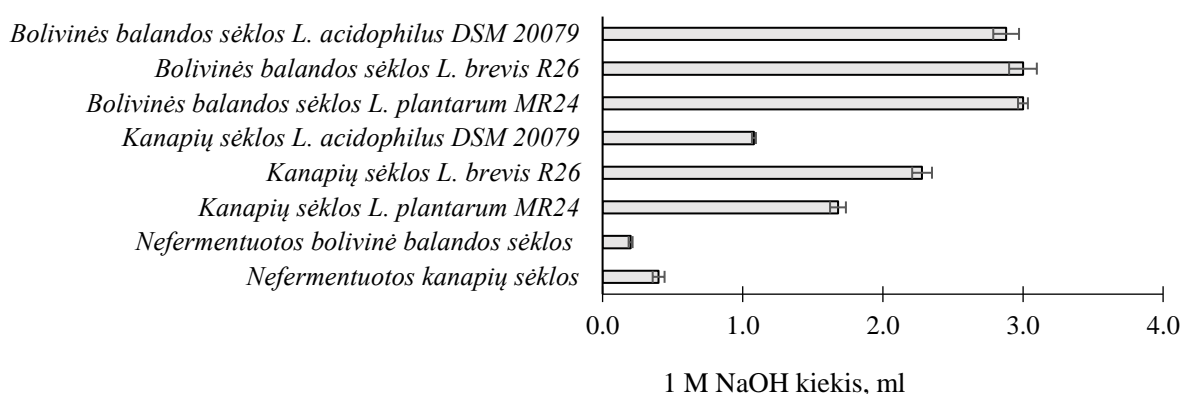
3.9. Fermentacijos įtaka bolivinės balandos ir kanapių bioproduktų lakiajam rūgštingumui

Fermentuotose bolivinės balandos (72 val.) (50 % drėgnio) ir kanapių sėklose (48 val.) (30 % drėgnio), taip pat ir nefermentuotose tų pačių drėgnių sėklose nustatytas lakusis rūgštingumas (žr. 20 pav.). Lakusis rūgštingumas išreikštas 1 M NaOH (ml), kurio reikia 100 g produkto esančioms lakiosioms rūgštims neutralizuoti.

Didžiausias lakusis rūgštingumas nustatytas fermentuotose bolivinės balandos sėklose su *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26 ir *L. acidophilus* DSM 20079, atitinkamai – 3, 3 ir 2,8 ml 1 M

NaOH. Mažiausias lakusis rūgštingumas nustatytas nefermentuotose bolivinės balandos ir kanapių sėklose, atitinkamai – 0,2 ir 0,4 ml 1 M NaOH.

Remiantis mokslininku Li ir bendraautoriais, fermentuotose bolivinės balandos sėklose *L. casei* bakterija, acto rūgšties kiekis padidėjo 5,5 karto, lyginant su nefermentuotomis sėklomis [33]. Šio tyrimo metu fermentuotose bolivinės balandos sėklose nustatyta iki 15 kartų didesnis, o fermentuotose kanapių sėklose iki 5,7 karto didesnis lakusis rūgštingumas, lyginant su nefermentuotomis sėklomis.



20 pav. Lakusis rūgštingumas kanapių ir bolivinės balandos sėklų fermentuotų *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 ir nefermentuotų sėklų

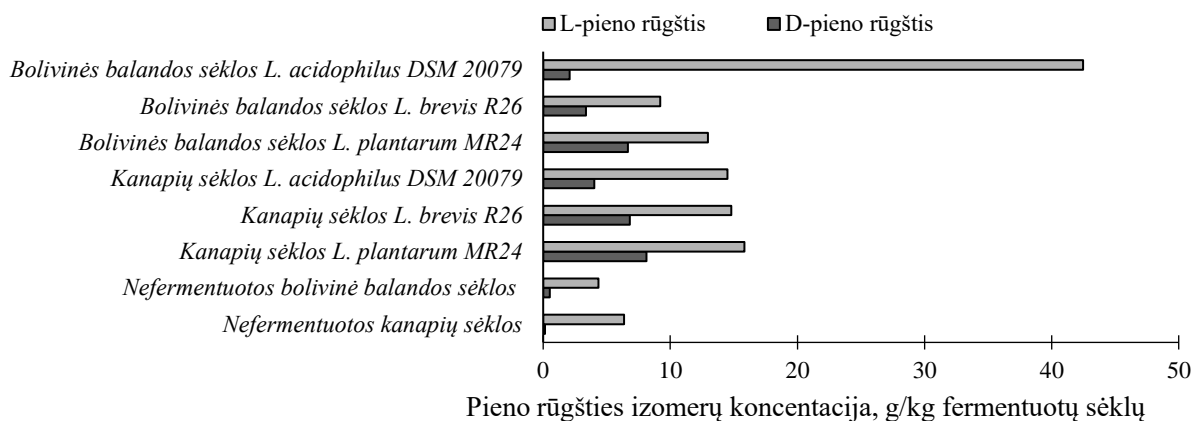
Pastebėtas silpnas koreliacinis ryšys tarp antioksidacinio aktyvumo ir lakiojo rūgštingumi ($R^2=0,217$).

3.10. Fermentacijos įtaka pieno rūgšties izomerų susidarymui bolivinės balandos ir kanapių bioproduktuose

Fermentuotose bolivinės balandos (72 val.) (50 % drėgnio) ir kanapių sėklose (48 val.) (30 % drėgnio), taip pat ir nefermentuotose tų pačių drėgnių sėklose nustatytas pieno rūgšties kiekis (žr. 21 pav.). Visais tirtais atvejais nustatyta didesnė L-pieno rūgšties koncentracija nei D-izomero. Didžiausia L-pieno rūgšties koncentracija siekė fermentuotose bolivinės balandos sėklose su *L. acidophilus* DSM 20079 – 42,5 g/kg fermentuotų sėklų. Mažiausia L-pieno rūgšties koncentracija gauta nefermentuotose bolivinės balandos ir kanapių sėklose – 4,3 ir 6,4 g/kg fermentuotų sėklų. Didžiausia D-pieno rūgšties koncentracija gauta kanapių sėklose fermentuotose su *L. plantarum* MR24 – 8,1 g/kg fermentuotų sėklų, o mažiausia – nefermentuotose kanapių sėklose – 0,2 g/kg fermentuotų sėklų. Visais atvejais fermentacija padidino L-pieno rūgšties koncentraciją. Fermentuotose bolivinės balandos sėklose su *L. acidophilus* DSM 20079, L-pieno rūgšties koncentracija nustatyta 20,2 karto didesnė už D-pieno rūgšties izomero koncentraciją.

Mokslininkas Dallagnol'as ir kt. [30] tyrė bolivinės balandos sėklas fermentuotas *L. plantarum* štamu ir nustatė, jog pieno rūgšties kiekis fermentacijos pabaigoje (po 24 val.) siekė 23 mmol/l, kai nefermentuotose sėklose L-pieno rūgšties kiekis nustatytas tik 9 mmol/l, t.y. 2,5 karto daugiau. Šiame darbe nefermentuotose sėklose pieno rūgšties kiekis buvo mažesnis lyginant su fermentuotomis, o didžiausias pieno rūgšties kiekis buvo 42,5 g/kg fermentuotų sėklų gautas bolivinės balandos sėklas fermentuojant *L. acidophilus* DSM 20079, o tai yra 9,8 karto daugiau, lyginant su nefermentuotomis. Gauti rezultatai patvirtina Dallagnol'o ir bendraautorių tyrimo

rezultatus, rezultatų skirtumas tarp šio tyrimo ir Dallagnol'o ir kt. fermentacijos su *L. plantarum*, galėjo atsirasti dėl naudoto skirtingo PRB štamo.



21 pav. D ir L-pieno rūgšties izomerų koncentracija (g/kg) nefermentuotose ir fermentuotose su *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 kanapių ir bolivinės balandos sėklose

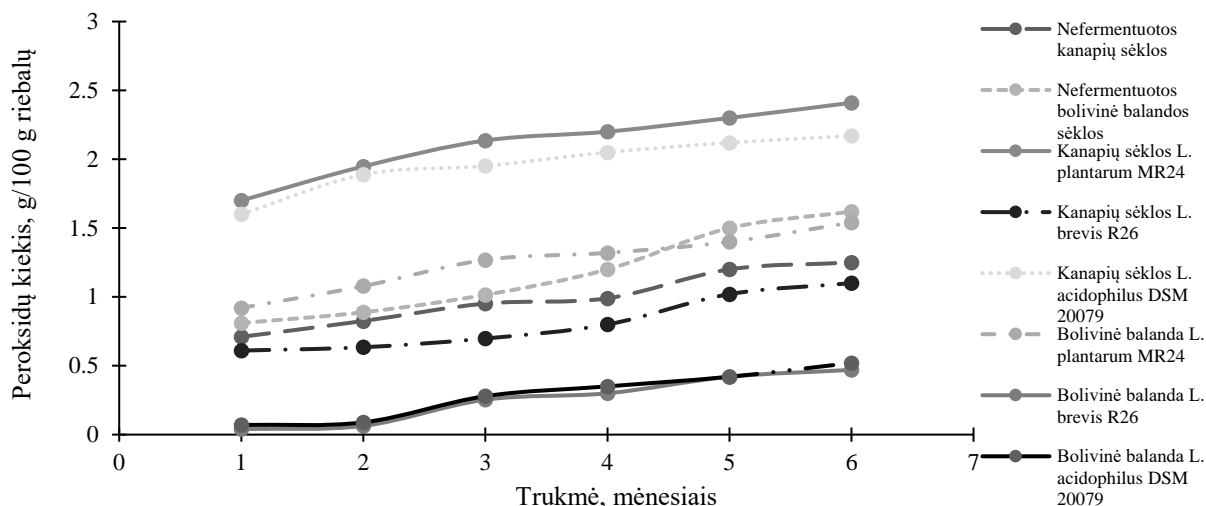
Pastebėtas labai silpno dydžio koreliacinis ryšys tarp antioksidacinio aktyvumo ir L-pieno rūgšties izomero kiekio ($R^2=0,091$).

3.11. Peroksidų pokyčiai fermentuotų sėklų ilgalaikio saugojimo metu

Fermentuotų bolivinės balandos (72 val.) (50 % drėgnio) ir kanapių sėklų (48 val.) (30 % drėgnio), taip pat ir nefermentuotose tų pačių drėgnių sėklose nustatytas peroksidų kiekis. Mėginiai buvo saugomi šaldymo kameroje $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, peroksidų skaičius tirtas kas mėnesį, gauti rezultatai pateikti 22 paveiksle.

Saugojimo metu peroksidų skaičius augo, t.y. riebalai, esantys sėklose, oksidavosi. Didžiausi peroksidų kiekiai nustatyti nefermentuotose kanapių sėklose ir fermentuotose kanapių sėklose su *L. plantarum* MR24. Tuo tarpu kanapių sėklose fermentuotose su *L. acidophilus* DSM 20079 ir *L. brevis* R26 peroksidų kiekis nustatytas mažesnis. Tarp bolivinės balandos produktų didžiausi peroksidų kiekiai buvo nefermentuotose bolivinės balandos sėklose ir fermentuotose su *L. plantarum* MR24 bolivinės balandos sėklose, o bolivinės balandos sėklose fermentuotose su *L. acidophilus* DSM 20079 ir *L. brevis* R26 peroksidų kiekis nustatytas mažesnis.

Po 6 mėnesių saugojimo, peroksidų kiekis fermentuotose bolivinės balandos sėklose su *L. brevis* R26 ir *L. acidophilus* DSM 20079, nustatytas atitinkamai 3,4 ir 3,1 karto mažesnis lyginant su peroksidų kiekiu nefermentuotose sėklose. Fermentacijos metu galėjo susidaryti antioksidaciniai junginiai, pvz. bioaktyvieji peptidai [51], kurie lėtino fermentuotų produktų oksidacijos procesą saugojimo metu. Nustatyta, jog peptidai, sudaryti iš 4–16 amino rūgščių, gali slopinti linolo rūgšties oksidaciją, todėl kanapių sėklose esantys NHAV ir HVRETALV peptidai [57], galėjo turėti įtakos mažesniai peroksidų kiekiui susidarymui. Kanapių sėklos pasižymi dideliu kiekiu fenolinių junginių, bolivinės balandos sėklose nustatyta daugiau nei 20 fenolinių junginių [3, 11], o fenoliniai junginiai turi savybę neutralizuoti laisvuosius radikalus, tokiu būdu slopinamas riebalų peroksidacijos procesas [81].



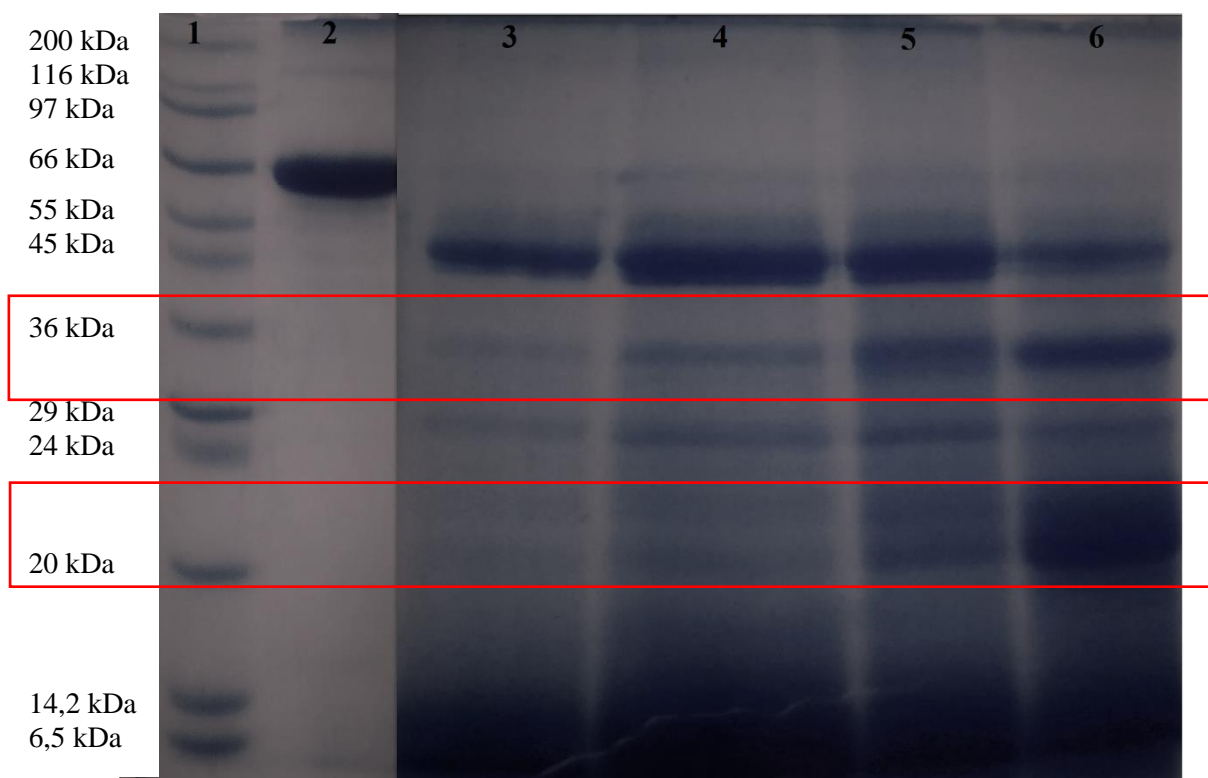
22 pav. Peroksidų kiekis (g/100 g riebalų) nefermentuotose ir fermentuotose su *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis kanapių ir bolivinės balandos sėklose, jas saugant šaldymo kameroje -18°C temperatūroje iki 6 mėnesių laikotarpyje

3.12. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų sudėčiai pagal molekulinės mases

Atlikus baltymų frakcijų, tirpių vandenyje ir druskų tirpaluose (0,8 M NaCl), elektroforezę, pastebėta, kad baltymų frakcijose, kurios buvo hidrolizuotos pepsinu, neliko didesnės (45 kDa) molekulinės masės baltymų, lyginant su frakcijomis prieš hidrolizę. Po hidrolizės pepsinu daugiausiai buvo mažesnės (nuo 6,5 iki 24 kDa) molekulinės masės baltymai.

Vertinant PRB padermės poveikį fermentuotų sėklų baltymų frakcijoms pastebėta, kad nefermentuotų kanapių sėklų druskos tirpale tirpių baltymų frakcijoje yra ~20 kDa dydžio baltymų, kurių nebeliko po fermentacijos *L. plantarum* MR24, taip pat jų sumažėja po fermentacijos *L. brevis* R26. Be to, po fermentacijos *L. plantarum* MR24 ir *L. brevis* R26 ~36 kDa baltymų juostelės akrilamido gelyje yra mažiau matomos, reiškia ir šio dydžio baltymų yra mažiau lyginant su nefermentuotų kanapių sėklų druskos tirpale tirpių baltymų frakcija bei kanapių sėklų fermentuotų *L. acidophilus* DSM 20079 druskos tirpale tirpių baltymų frakcija (žr. 23 pav.).

Baltymų frakcijose, išskirtose iš bolivinės balandos sėklų, kurios buvo fermentuotos PRB, nustatyta daugiau 45 kDa molekulinės masės baltymų negu nefermentuotų sėklų frakcijose, tačiau nefermentuotų sėklų frakcijose galima pastebėti daugiau baltymų, kurių molekulinė masė nuo 20 kDa iki 36 kDa. Tiek fermentuotų, tiek ir nefermentuotų sėklų baltymų frakcijose yra mažesnės (nuo 6,5 kD iki 20 kDa) molekulinės masės baltymų.

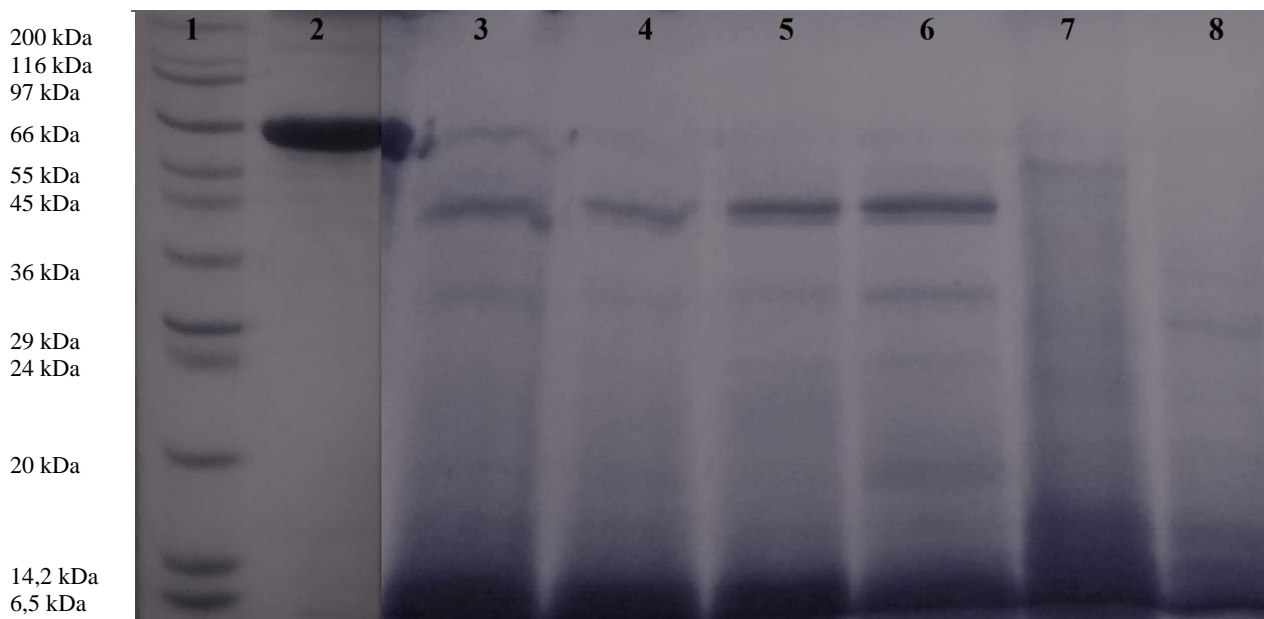


23 pav. Baltymų juostelės poliakrilamido gelyje po elektroforezės: 1 – žinomų baltymų markeris (S8445); 2 – jaučio serumo albuminas (kontrolė); 3 – kanapių sėklų fermentuotų *L. plantarum* MR24 druskos tirpale tirpių baltymų frakcija; 4 – kanapių sėklų fermentuotų *L. brevis* R26 druskos tirpale tirpių baltymų frakcija; 5 – kanapių sėklų fermentuotų *L. acidophilus* DSM 20079 druskos tirpale tirpių baltymų frakcija; 6 – nefermentuotų kanapių sėklų druskos tirpale tirpių baltymų frakcija

Baltymų frakcijose, tirpiose 0,8 M NaCl tirpale, matoma daugiau baltymų, kurių molekulinė masė ~55 kDa, kai tuo tarpu frakcijose, tirpiose vandenyje, daug baltymų yra, kurių molekulinė masė 45 kDa (žr. 24 pav.).

Tang‘as ir kt. tyrė kanapių sėklų baltymų izoliatus, juos hidrolizavo fermentais. Nustatyta, jog prieš hidrolizę daugiausiai buvo 45 ir 20 kDa molekulinės masės baltymų [82]. Šie rezultatai patvirtina ir šiame tyrime gautus, kai nefermentuotų kanapių sėklų baltymų, tirpių vandenyje, frakcijoje, nustatyta daug 45 kDa molekulinės masės baltymų, taip matoma ir 20 kDa molekulinės masės baltymų.

Etanolyje tirpių baltymų frakcijų mėginiai elektroforezės būdu neišsiskirstė (taikant literatūroje aprašytą metodą), todėl darome prielaidą, kad juose yra junginių, trukdančių vyksti elektroforezei. Reikėtų etanolyje tirpius baltymus prieš liofilizavimą papildomai išvalyti, pavyzdžiui, taikant dializę.



24 pav. Baltymų juostelės poliakrilamido gelyje po elektroforezės. 1 – žinomų baltymų markeris (S8445); 2 – jaučio serumo albuminas (kontrolė); 3 – kanapių sėklų fermentuotų *L. plantarum* MR24 vandenyje tirpių baltymų frakcija; 4 – kanapių sėklų fermentuotų *L. brevis* R26 vandenyje tirpių baltymų frakcija; 5 – kanapių sėklų fermentuotų *L. acidophilus* DSM 20079 vandenyje tirpių baltymų frakcija; 6 – nefermentuotų kanapių sėklų vandenyje tirpių baltymų frakcija; 7 – bolivinės balandos sėklų fermentuotų *L. plantarum* MR24 vandenyje tirpių baltymų frakcija; 8 – bolivinės balandos sėklų fermentuotų *L. brevis* R26 vandenyje tirpių baltymų frakcija

3.13. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų antimikrobinėms savybėms

Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų antimikrobinėms savybėms pateikta atitinkamai 12 ir 13 lentelėse. Nefermentuotų kanapių sėklų baltymų frakcijos: vandenyje tirpių baltymų, 0,8 M NaCl tirpale ir 70 % etanolio tirpale tirpių baltymų, antimikrobinio aktyvumu tirtiems mikroorganizmams (*E. coli*, *St. aureus*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *B. cereus*) nepasižymėjo. Tačiau pasireiškė pepsinu hidrolizuotų šių baltymų frakcijų antimikrobinės savybės, kurios priklausė nuo baltymų frakcijos fermentacijai naudotos PRB padermės ir indikatorinio mikroorganizmo.

Išryškėjo fermentuotų PRB etanolyje tirpių kanapių sėklų baltymų frakcijų antimikrobinės savybės. Fermentuotų PRB, etanolyje tirpių, kanapių sėklų baltymų frakcijos slopino *E. coli*, *St. aureus*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *B. cereus* bakterijų augimą, tačiau nefermentuotų sėklų etanolyje tirpi baltymų frakcija antimikrobinio poveikiu nepasireiškė. Stipriausias antimikrobinis etanolinių frakcijų aktyvumas buvo kanapių sėklų mėginių fermentuotų *L. acidophilus* DSM 20079.

Kanapių baltymų mėginių frakcijos, tirpios 0,8 M NaCl tirpale ir vandenyje, nepasižymėjo antimikrobinio aktyvumu, tačiau pasireiškė antimikrobinis aktyvumas hidrolizuotų pepsinu kanapių baltymų frakcijų. Stipriausias antimikrobinis frakcijų, tirpių 0,8 M NaCl tirpale, aktyvumas buvo nustatytas hidrolizuotų kanapių sėklų mėginių fermentuotų *L. brevis* R26, šie mėginiai slopino *St. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus* augimą.

Stipriausias antimikrobinis frakcijų tirpių vandenyje aktyvumas nustatytas hidrolizuotų kanapių sėklų mėginių fermentuotų *L. plantarum* MR24 ir *L. acidophilus* DSM 20079, šie mėginiai gerai

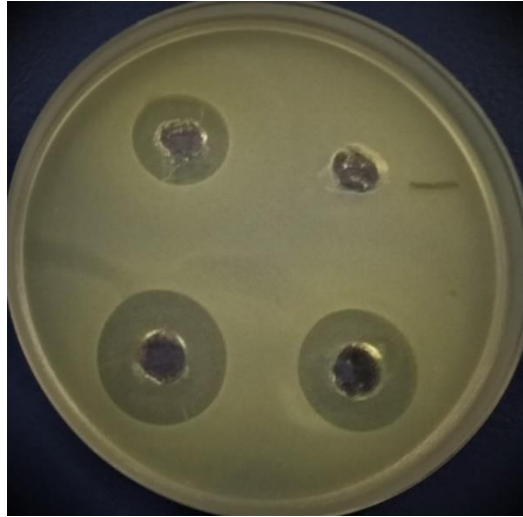
slopino atitinkamai *S. typhimurium* ir *E. coli* bakterijų augimą. Hidrolizuoti kanapių sėklų mėginiai fermentuoti su *L. plantarum* MR24 taip pat slopino *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* bakterijų augimą. Hidrolizuoti kanapių sėklų mėginiai fermentuoti *L. acidophilus* DSM 20079 slopino *St. aureus*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *B. cereus* bakterijų augimą.

Norint ištirti etanolio likučių galimą poveikį antimikrobiniam aktyvumui, papildomai buvo atlikti kontroliniai tyrimai su 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ir 80 % etanolio tirpalais. 1–3 mm skaidri inhibicijos zona buvo pastebėta tik 70 % etanolio tirpalo prieš *B. cereus*, kitų koncentracijų etanolio tirpalai antimikrobinio poveikio nepasižymėjo nei vienam tyrime naudotam mikroorganizmui. Todėl galime teigti, jog etanolio likučiai neturėjo įtakos mėginių antimikrobiniam aktyvumui.

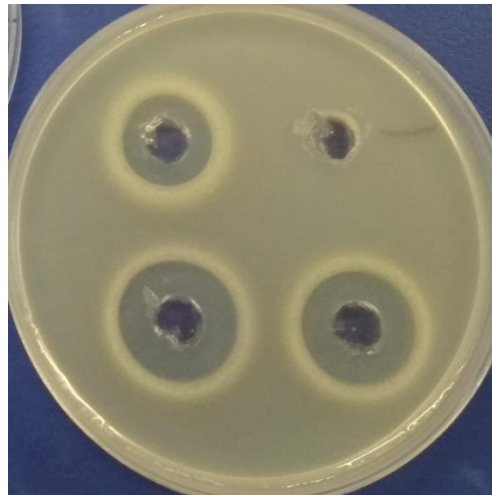
12 lentelė. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka kanapių sėklų baltymų frakcijų antimikrobinėms savybėms

| | Sėklų fermentacijai naudotos PRB | | | | | | Nefermentuotos sėklos | |
|--|--|-----------------------------------|----------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| | <i>L. plantarum</i> MR24 | | <i>L. brevis</i> R26 | | <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | | | |
| Indikatorinės bakterijos | Nehidro- lizuoti | Hidroli- zuoti | Nehidro- lizuoti | Hidro- lizuoti | Nehidro- lizuoti | Hidro- lizuoti | Nehidro- lizuoti | Hidro- lizuoti |
| | | Vandenyje tirpių baltymų frakcija | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | 0 | + | 0 | + | 0 | ++ | 0 | +/- |
| <i>St. aureus</i> | 0 | +/- | 0 | + | 0 | + | 0 | 0 |
| <i>S. typhimurium</i> | 0 | ++ | 0 | + | 0 | + | 0 | +/- |
| <i>B. subtilis</i> | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + |
| <i>B. cereus</i> | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | +/- |
| | Druskų tirpaluose (0,8 M NaCl) tirpių baltymų frakcija | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | 0 | 0 | 0 | +/- | 0 | 0 | 0 | +/- |
| <i>St. aureus</i> | 0 | 0 | 0 | + | 0 | +/- | 0 | + |
| <i>S. typhimurium</i> | 0 | +/- | 0 | +/- | 0 | +/- | 0 | 0 |
| <i>B. subtilis</i> | 0 | +/- | 0 | + | 0 | 0 | 0 | + |
| <i>B. cereus</i> | 0 | +/- | 0 | + | 0 | 0 | 0 | +/- |
| | 70 % etanolyje tirpių baltymų frakcija | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | 0 | 0 |
| <i>St. aureus</i> | + | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | 0 | 0 |
| <i>S. typhimurium</i> | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | 0 | + |
| <i>B. subtilis</i> | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | 0 | + |
| <i>B. cereus</i> | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | 0 | +/- |
| Antimikrobinio aktyvumo vertinimas: „0“ – nėra skaidrios zonos aplink mėginį; „+/-“ – iki 1mm skaidri inhibicijos zona aplink mėginį; „+“ – 1–3 mm skaidri inhibicijos zona aplink mėginį; „++“ – 3–5 mm skaidri inhibicijos zona aplink mėginį; „+++“ – >5 mm skaidri inhibicijos zona aplink mėginį. | | | | | | | | |

Fermentuotų kanapių sėklų su *L. plantarum* MR24 ir *L. brevis* R26 nehidrolizuotų ir hidrolizuotų baltymų frakcijų tirpių 70 % etanolyje antimikrobinis poveikis *B. cereus* ir *B. subtilis* augimui pateiktas 25 ir 26 paveiksluose.



25 pav. Fermentuotų su *L. plantarum* MR24 kanapių sėklų baltymų frakcijų, tirpių 70 % etanolyje, antimikrobinis poveikis *B. cereus* augimui. Skaidri inhibicijos zona aplink „šulinėlį“ parodo *B. cereus* augimo slopinimą. Viršuje: nehidrolizuotų baltymų poveikis (kairėje) ir kontrolė – tuščias mėginys (dešinėje), apačioje: du mėginiai hidrolizuotų baltymų frakcijų poveikis



26 pav. Fermentuotų su *L. brevis* R26 kanapių sėklų baltymų frakcijų, tirpių 70 % etanolyje, antimikrobinis poveikis *B. subtilis* augimui. Skaidri inhibicijos zona aplink „šulinėlį“ parodo *B. subtilis* augimo slopinimą. Viršuje: nehidrolizuotų baltymų poveikis (kairėje) ir kontrolė – tuščias mėginys (dešinėje), apačioje: du mėginiai hidrolizuotų baltymų frakcijų poveikis

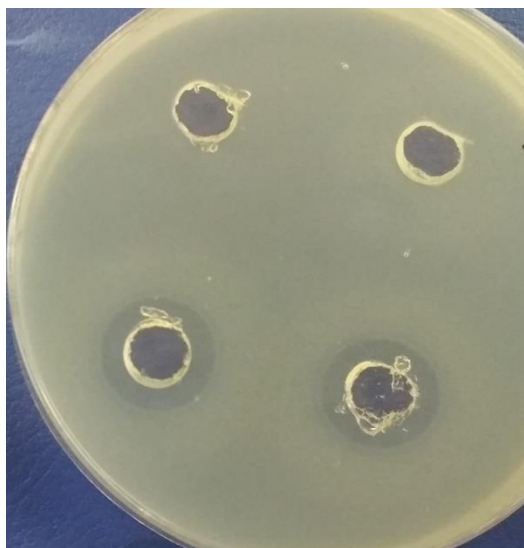
Nefermentuotų bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijos: vandenyje tirpių baltymų, 0,8 M NaCl tirpale tirpių baltymų ir 70 % etanolio tirpale tirpių baltymų, antimikrobinis aktyvumas tirtiems mikroorganizmams (*E. coli*, *St. aureus*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *B. cereus*) nepasižymėjo. Tačiau pasireiškė pepsinu hidrolizuotų baltymų frakcijų antimikrobinės savybės, kurios priklausė nuo baltymų frakcijos fermentacijai naudotos PRB padermės ir indikatorinio mikroorganizmo.

Išryškėjo fermentuotų PRB, etanolyje tirpių, bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų hidrolizuotų pepsinu antimikrobinės savybės. Fermentuotų PRB, etanolyje tirpių, bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijos hidrolizuotos pepsinu slopino *E. coli*, *St. aureus*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *B. cereus* bakterijų augimą. Fermentuotų bolivinės balandos sėklų su *L. plantarum* MR24 nehidrolizuotų ir hidrolizuotų baltymų frakcijų, tirpių vandenyje, antimikrobinis poveikis *E. coli* augimui pateiktas 27 paveiksle.

Dėl baltymų frakcijų pasireiškusio antimikrobinio poveikio po hidrolizės pepsinu, galime teigti, jog hidrolizės metu buvo gauti bioaktyvieji peptidai, turintys antimikrobinį poveikį. Mokslininkas Yekta's ir kt. [83] tyrė antimikrobinį bolivinės balandos sėklų aktyvumą ir nustatė, kad mikrobiologinis užterštumas (*St. aureus* skaičius) mėsos produktuose buvo mažesnis naudojant bolivinės balandos peptidus. Mokslininkas Mudgil'as [84] taip pat tyrė bolivinės balandos sėklų peptidus bei jų antimikrobines savybes ir nustatė, jog inhibicinė zona prieš skirtingas bakterijas (*S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *E. aerogenes*) buvo didesnė po fermentinės hidrolizės. Taip pat bolivinės balandos sėklų fermentacijos metu su *L. plantarum* štamu, susidaro junginiai – fenilacto ir hidroksifenilacto rūgštys, pasižymintys antimikrobinium poveikiu [85].

13 lentelė. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų antimikrobinėms savybėms

| | Sėklų fermentacijai naudotos PRB | | | | | | Nefermentuotos sėklos | |
|--|--|-----------------------------------|----------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| | <i>L. plantarum</i> MR24 | | <i>L. brevis</i> R26 | | <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | | | |
| Indikatorinės bakterijos | Nehidro- lizuoti | Hidroli- zuoti | Nehidro- lizuoti | Hidro- lizuoti | Nehidro- lizuoti | Hidro- lizuoti | Nehidro- lizuoti | Hidro- lizuoti |
| | | Vandenyje tirpių baltymų frakcija | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | 0 | ++ | 0 | +/- | 0 | +/- | 0 | + |
| <i>St. aureus</i> | 0 | + | 0 | 0 | 0 | +/- | 0 | 0 |
| <i>S. typhimurium</i> | 0 | + | 0 | +/- | 0 | +/- | 0 | + |
| <i>B. subtilis</i> | 0 | ++ | 0 | + | 0 | + | 0 | ++ |
| <i>B. cereus</i> | 0 | + | 0 | 0 | 0 | +/- | 0 | + |
| | Druskų tirpaluose (0,8 M NaCl) tirpių baltymų frakcija | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | 0 | 0 | 0 | +/- | 0 | +/- | 0 | 0 |
| <i>St. aureus</i> | 0 | +/- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. typhimurium</i> | 0 | +/- | 0 | +/- | 0 | +/- | 0 | 0 |
| <i>B. subtilis</i> | 0 | +/- | 0 | + | +/- | + | 0 | + |
| <i>B. cereus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +/- | +/- | +/- |
| | 70 % etanolyje tirpių baltymų frakcija | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | 0 | ++ | 0 | + | + | ++ | 0 | +/- |
| <i>St. aureus</i> | +/- | ++ | +/- | + | + | ++ | 0 | + |
| <i>S. typhimurium</i> | ++ | ++ | + | ++ | + | ++ | 0 | + |
| <i>B. subtilis</i> | + | +++ | + | ++ | + | ++ | +/- | + |
| <i>B. cereus</i> | + | ++ | + | ++ | + | ++ | 0 | +/- |
| Antimikrobinio aktyvumo vertinimas: „0“ – nėra skaidrios zonos aplink mėginį; „+/-“ – iki 1mm skaidri inhibicijos zona aplink mėginį; „+“ – 1–3 mm skaidri inhibicijos zona aplink mėginį; „++“ – 3–5 mm skaidri inhibicijos zona aplink mėginį; „+++“ – >5 mm skaidri inhibicijos zona aplink mėginį. | | | | | | | | |



27 pav. Fermentuotų su *L. plantarum* MR24 bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų, tirpių vandenyje, antimikrobinis poveikis *E. coli* augimui. Skaidri inhibicijos zona aplink „šulinėlį“ parodo *E. coli* augimo slopinimą. Viršuje: nehidrolizuotų, apačioje: du mėginiai pepsinu hidrolizuotų baltymų frakcijų

3.14. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų antioksidaciniam aktyvumui

Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų antioksidaciniam aktyvumui, vertinant DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu, pateikta 14 lentelėje. Antioksidacinis aktyvumas nustatytas nehidrolizuotų ir hidrolizuotų baltymų frakcijų, kurios buvo gautos iš nefermentuotų bei fermentuotų (su *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079) kanapių ir bolivinės balandos sėklų, taip pat baltymų frakcijų hidrolizuotų pepsinu.

Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo nehidrolizuota bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. acidophilus* DSM 20079 baltymų frakcija, gauta tirpinant 70 % etanolio tirpale (7716 mg TE/100 g baltymų). Taip pat didelis antioksidacinis aktyvumas nustatytas 70 % etanolyje tirpios bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. brevis* R26 baltymų frakcijoje (2957 mg TE/100 g baltymų) ir nefermentuotų bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijoje (3023 mg TE/100 g baltymų). Fermentacija su *L. acidophilus* DSM 20079 padidino bolivinės balandos sėklų 70 % etanolyje tirpios baltymų frakcijos antioksidacinį aktyvumą 2,8 karto lyginant su nefermentuotais bolivinės balandos sėklų mėginiais (vertinant DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu).

Lyginant skirtingas baltymų frakcijas, didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo 70 % etanolyje tirpios baltymų frakcijos. Vandenyje tirpios baltymų frakcijos nepasižymėjo antioksidaciniu aktyvumu.

Kanapių sėklų fermentacija *L. acidophilus* DSM 20079 ir *L. brevis* R26 baltymų frakcijų antioksidaciniam aktyvumui turėjo teigiamą įtaką. Tiriant 0,8 M NaCl tirpale tirprias baltymų frakcijas, antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo tik nehidrolizuotos bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. plantarum* MR24 (83 mg TE/100 g baltymų) ir *L. acidophilus* DSM 20079 (207 mg TE/100 g baltymų) baltymų frakcijos.

Nehidrolizuotos bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijos tirpios 70 % etanolyje, didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo, kai sėklos buvo fermentuotos *L. acidophilus* DSM 20079 (7716 mg TE/100 g baltymų) ir *L. brevis* R26 (2957 mg TE/100 g baltymų). Hidrolizuotos pepsinu bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijos tirpios 70 % etanolyje, didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo tada, kai sėklos nebuvo fermentuotos (2304 mg TE/100 g baltymų).

14 lentelė. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka bolivinės balandos ir kanapių sėklų baltymų frakcijų antioksidacinėms savybėms, vertinant DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu (išreikštas mg TE/100 g baltymų)

| Kanapių ir bolivinės balandos sėklų fermentacijai naudotos PRB | mg TE/100 g baltymų | | | |
|--|--|------------------------|--|------------------------|
| | Kanapių sėklų baltymų frakcijos | | Bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijos | |
| | nehidrolizuota | po hidrolizės pepsinu | nehidrolizuota | po hidrolizės pepsinu |
| | <i>Vandenyje tirpių baltymų frakcijos</i> | | | |
| Nefermentuotos sėklos | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>L. brevis</i> R26 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>0,8 M NaCl tirpale tirpių baltymų frakcijos</i> | | | |
| Nefermentuotos sėklos | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | 0 | 0 | 83±15 ^a | 0 |
| <i>L. brevis</i> R26 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | 0 | 0 | 207±39 ^b | 0 |
| | <i>70 % etanolyje tirpių baltymų frakcijos</i> | | | |
| Nefermentuotos sėklos | 1253±173 ^{abcA} | 227±93 ^{dB} | 3023±333 ^{dC} | 2304±173 ^{dD} |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | 130 ±23 ^{aA} | 868±60 ^{aB} | 2114±314 ^{aB} | 947±87 ^{aA} |
| <i>L. brevis</i> R26 | 1327±51 ^{bA} | 1118±122 ^{bB} | 2957±467 ^{bC} | 2127±237 ^{bD} |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | 1792±128 ^{cA} | 1037±125 ^{cB} | 7716±762 ^{cC} | 1449±242 ^{cD} |

Pastaba: tarp vidurkių, pažymėtų skirtinga raide, skirtumai yra esminiai, P<0,05. Mažosiomis raidėmis lyginami rezultatai tarp eilučių, didžiosiomis tarp stulpelių.

Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų antioksidaciniam aktyvumui, vertinant ABTS⁺ surišimo gebos metodu, pateikta 15 lentelėje. Antioksidacinis aktyvumas šiuo metodu nustatytas nehidrolizuotų ir hidrolizuotų baltymų frakcijų, kurios buvo gautos iš nefermentuotų bei fermentuotų (su *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079) kanapių ir bolivinės balandos sėklų, taip pat frakcijų hidrolizuotų pepsinu.

Lyginant skirtingas baltymų frakcijas, didžiausia ABTS⁺ sujungimo geba pasižymėjo etanolyje tirpios baltymų frakcijos. Visais atvejais hidrolizė pepsinu sumažino ABTS⁺ sujungimo gebą, kaip ir vertinant antioksidacinį aktyvumą DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu.

Sėklų fermentacija su *L. acidophilus* DSM 20079 visais atvejais didino baltymų frakcijų ABTS⁺ sujungimo gebą, lyginant su nefermentuotų sėklų baltymų frakcija. Fermentacija su *L. acidophilus* DSM 20079 padidino bolivinės balandos sėklų, 70 % etanolyje tirpios baltymų frakcijos, antioksidacinį aktyvumą 2,9 karto lyginant su nefermentuotais bolivinės balandos sėklų mėginiais. Didžiausia ABTS⁺ sujungimo geba pasižymėjo nehidrolizuotos bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. acidophilus* DSM 20079 baltymų frakcija, tirpi 70 % etanolio tirpale (3261,2 mg TE/100 g baltymų). Taip pat didelė ABTS⁺ sujungimo geba nustatyta baltymų frakcijos, tirpios 70 % etanolio tirpale, gautos iš bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. brevis* R26 (881,6 mg TE/100 g baltymų) ir nefermentuotų bolivinės balandos sėklų 70 % etanolyje tirpi baltymų frakcija (1108,7 mg TE/100 g baltymų).

Hidrolizuotos pepsinu baltymų frakcijos, gautos tirpinant baltymus 0,8 M NaCl tirpale ir vandenyje, ABTS⁺ sujungimo geba nepasižymėjo. Be to, hidrolizė pepsinu baltymų frakcijos, tirpios 70 % etanolio tirpale ABTS⁺ sujungimo gebą reikšmingai mažino visais tyrimo atvejais.

15 lentelė. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka bolivinės balandos ir kanapių sėklų baltymų frakcijų antioksidacinėms savybėms, vertinant ABTS⁺ surišimo gebos metodu

| Kanapių ir bolivinės balandos sėklų fermentacijai naudotos PRB | mg TE/100 g baltymų | | | |
|--|--|------------------------|--|--------------------------|
| | Kanapių sėklų baltymų frakcijos | | Bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijos | |
| | nehidrolizuota | po hidrolizės pepsinu | nehidrolizuota | po hidrolizės pepsinu |
| | <i>Vandenyje tirpių baltymų frakcijos</i> | | | |
| Nefermentuotos sėklos | 11,8±2,5 ^{dA} | 0 | 34,8±5,3 ^{dB} | 0 |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | 58,2±8,4 ^{aA} | 0 | 64,1±6,7 ^{aC} | 0 |
| <i>L. brevis</i> R26 | 35,1±4,5 ^{bA} | 0 | 22,1±4,1 ^{bC} | 0 |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | 23,4±3,9 ^{cA} | 0 | 52,2±12,5 ^{cC} | 0 |
| | <i>0,8 M NaCl tirpale tirpių baltymų frakcijos</i> | | | |
| Nefermentuotos sėklos | 18,6±3,8 ^{aA} | 0 | 27,5±6,4 ^{aB} | 0 |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | 14,8±3,9 ^{aA} | 0 | 21,5±3,6 ^{aB} | 0 |
| <i>L. brevis</i> R26 | 18,2±2,1 ^{aA} | 0 | 26,1±4,5 ^{aB} | 0 |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | 24,6±4,2 ^{bA} | 0 | 35,3±6,5 ^{bB} | 0 |
| | <i>70 % etanolyje tirpių baltymų frakcijos</i> | | | |
| Nefermentuotos sėklos | 77,6±8,7 ^{cA} | 0 | 1108,7 ±140,6 ^{dC} | 139,5±21,6 ^{dC} |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | 46,9±9,1 ^{aA} | 26,8±3,2 ^{aB} | 69,3±16,5 ^{aA} | 9,1±1,2 ^{aD} |
| <i>L. brevis</i> R26 | 68,9±11,2 ^{bA} | 16,1±2,5 ^{bB} | 881,6±95,8 ^{bB} | 24,8±9,7 ^{bD} |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | 91,1±14,2 ^{bcA} | 39,1±6,1 ^{cB} | 3261,2±168,9 ^{cB} | 76,2±14,3 ^{cA} |

Pastaba: tarp vidurkių, pažymėtų skirtinga raide, skirtumai yra esminiai, P<0,05. Mažosiomis raidėmis lyginami rezultatai tarp eilučių, didžiosiomis tarp stulpelių.

Mokslininkas Vilcacundo‘as ir kt. tyrė bolivinės balandos sėklų baltymų frakciją tirpią vandenyje (pH 8) ir nustatė, kad deguonies radikalo sugertis 5,6 karto buvo didesnė po hidrolizės pepsinu ir pankreatinu [18]. Girgih‘as ir bendraautoriai tyrė kanapių sėklų baltymų izoliatus, juos hidrolizavo

pepsinu ir pankreatinu bei vertino gautų hidrolizatų antioksidacinį aktyvumą, vertinant DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu. Gauti rezultatai parodė, jog kanapių sėklų baltymų frakcijos po hidrolizavimo pasižymėjo iki 6 kartų didesniu antioksidaciniu aktyvumu, priklausomai nuo hidrolizuotų baltymų frakcijos. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo mažiausios molekulinės masės baltymų frakcija (<1 kDa) [86].

3.15. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijų fenolinių junginių kiekiui

Dėl gebėjimo mažinti vėžio ir kitų lėtinių ligų riziką, fenoliniai junginiai daro teigiamą įtaką žmonių sveikatai, o taip yra dėl šių junginių savybės surišti laisvuosius radikalus [3]. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka fenolinių junginių kiekiui kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijose pateikta 16 lentelėje.

Bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas nehidrolizuotų ir hidrolizuotų baltymų frakcijų, kurios buvo gautos iš nefermentuotų bei fermentuotų (su *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26, *L. acidophilus* DSM 20079) kanapių ir bolivinės balandos sėklų, taip pat frakcijų hidrolizuotų pepsinu.

Lyginant skirtingas baltymų frakcijas, didžiausiu bendru fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo etanolyje tirpios baltymų frakcijos.

Didžiausiu bendru fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo nehidrolizuota bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. acidophilus* DSM 20079 baltymų frakcija, gauta 70 % etanolio tirpale (186,1 mg GRE/100 g baltymų). Taip pat didelis bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas baltymų frakcijų, gautų tirpinant 70 % etanolio tirpale: nehidrolizuotų bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. brevis* R26 (68 mg GRE/100 g baltymų) ir nehidrolizuotų bei nefermentuotų PRB bolivinės balandos sėklų (50,1 mg GRE/100 g baltymų). Mažiausiu bendru fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo nehidrolizuota pepsinu bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. brevis* R26 vandenyje tirpių baltymų frakcija, (0,27 mg GRE/100 g baltymų), nehidrolizuota kanapių sėklų fermentuotų su *L. brevis* R26 vandenyje tirpių baltymų frakcija (2,9 mg GRE/100 g baltymų) ir nehidrolizuota kanapių sėklų fermentuotų su *L. acidophilus* DSM 20079 vandenyje tirpių baltymų frakcija (0,29 mg GRE/100 g baltymų) bei nehidrolizuota vandeninė baltymų frakcija, gauta iš nefermentuotų kanapių sėklų mėginio.

Mokslininkė Garcia-Mora ir kt. iš dėmėtųjų pupelių išskyrė baltymus, kuriuos hidrolizavo alkalazės ir savinazės fermentais. Po 120 min. hidrolizės alkalaze ir savinaze, bendras fenolinių junginių kiekis padidėjo atitinkamai 2 ir 2,3 kartus. Toks rezultatas gautas dėl hidrolizės metu susidariusio didesnio kiekio bioaktyviųjų peptidų, kurie sudaryti iš trumpų amino rūgščių grandinių [87]. Chanput'as ir kt. tyrė baltymų frakcijas, išskirtas iš ryžių sėlenų, ir nustatė, kad bendras fenolinių junginių kiekis po fermentinės hidrolizės sumažėjo [88]. Taip galėjo nutikti dėl fenolinių junginių suardymo hidrolizės metu, taip pat dėl naudotos aukštos temperatūros (95 °C temperatūra 15 min) inaktyvuojant pepsiną.

16 lentelė. Fermentacijos ir fermentinės hidrolizės įtaka bolivinės balandos ir kanapių sėklų baltymų frakcijų bendram fenolinių junginių kiekiui (išreikšta mg GRE/100 g baltymų)

| Kanapių ir bolivinės balandos sėklų fermentacijai naudotos PRB | Kanapių sėklų baltymų frakcijos | | Bolivinės balandos sėklų baltymų frakcijos | |
|--|--|-------------------------------|--|-------------------------------|
| | nehidrolizuota | po hidrolizės pepsinu | nehidrolizuota | po hidrolizės pepsinu |
| | <i>Vandenyje tirpių baltymų frakcijos</i> | | | |
| Nefermentuotos sėklos | 0,157 ± 0,013 ^{cA} | 1,309 ± 0,010 ^{dB} | 0,468 ± 0,021 ^{bC} | 1,922 ± 0,030 ^{bD} |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | 0,716 ± 0,036 ^{aA} | 0,160 ± 0,008 ^{aB} | 0,796 ± 0,015 ^{aC} | 0,331 ± 0,072 ^{aABC} |
| <i>L. brevis</i> R26 | 0,286 ± 0,013 ^{bA} | 0,466 ± 0,012 ^{bB} | 0,268 ± 0,028 ^{bC} | 0,448 ± 0,041 ^{aABC} |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | 0,293 ± 0,007 ^{bA} | 0,809 ± 0,052 ^{cB} | 0,860 ± 0,018 ^{aB} | 0,584 ± 0,113 ^{aAB} |
| | <i>0,8 M NaCl tirpale tirpių baltymų frakcijos</i> | | | |
| Nefermentuotos sėklos | 0,580 ± 0,011 ^{aA} | 1,020 ± 0,016 ^{bB} | 0,875 ± 0,035 ^{aBC} | 0,656 ± 0,033 ^{aAC} |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | 0,676 ± 0,025 ^{aA} | 0,514 ± 0,036 ^{aA} | 0,898 ± 0,024 ^{aB} | 0,660 ± 0,017 ^{aA} |
| <i>L. brevis</i> R26 | 0,665 ± 0,009 ^{aA} | 0,787 ± 0,052 ^{abAB} | 0,982 ± 0,011 ^{aB} | 0,656 ± 0,016 ^{aA} |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | 0,955 ± 0,024 ^{bA} | 0,532 ± 0,018 ^{aB} | 1,369 ± 0,042 ^{bC} | 0,642 ± 0,014 ^{aB} |
| | <i>70 % etanolyje tirpių baltymų frakcijos</i> | | | |
| Nefermentuotos sėklos | 2,322 ± 0,062 ^{bA} | 1,161 ± 0,020 ^{bB} | 50,113 ± 0,447 ^{bC} | 18,518 ± 0,383 ^{dD} |
| <i>L. plantarum</i> MR24 | 1,217 ± 0,035 ^{aA} | 4,370 ± 0,277 ^{aB} | 4,634 ± 0,206 ^{aB} | 3,428 ± 0,073 ^{aB} |
| <i>L. brevis</i> R26 | 2,603 ± 0,095 ^{bA} | 3,382 ± 0,090 ^{aA} | 68,038 ± 4,160 ^{bB} | 11,175 ± 0,020 ^{bC} |
| <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 | 3,099 ± 0,223 ^{bA} | 4,249 ± 0,135 ^{aA} | 186,062 ± 9,807 ^{cB} | 10,494 ± 0,030 ^{cC} |

Pastaba: tarp vidurkių, pažymėtų skirtinga raide, skirtumai yra esminiai, P<0,05. Mažosiomis raidėmis lyginami rezultatai tarp eilučių, didžiosiomis tarp stulpelių.

3.16. Sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka pagerintų bandelių, kokybei ir juslinėms savybėms

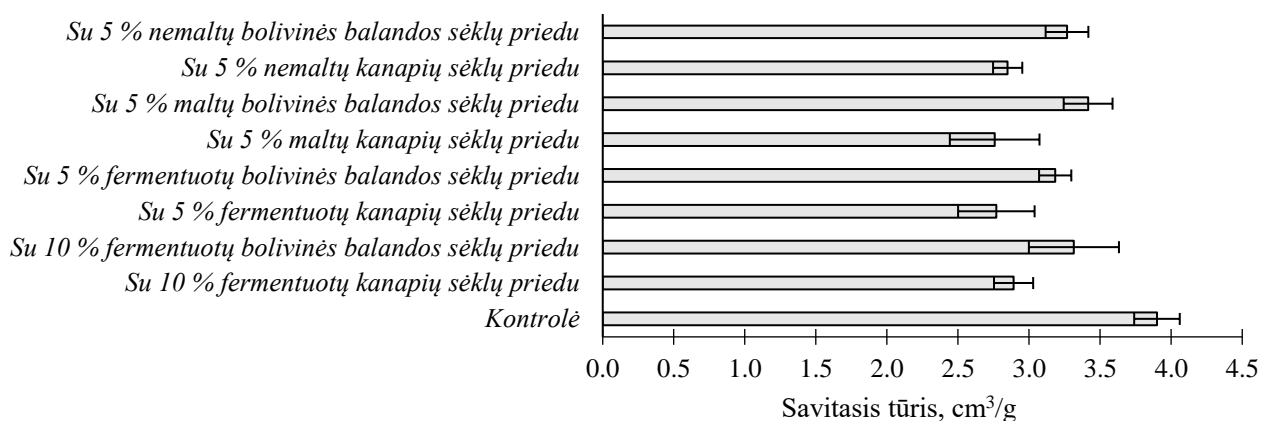
Keptos pagerintos bandelės su kanapių ir bolivinės balandos sėklomis fermentuotomis su *L. brevis* R26 bakterija, su nefermentuotomis maltomis ir nemaltomis kanapių ir bolivinės balandos sėklomis, taip pat keptos bandelės be sėklų priedų (kontroliniai kepiniai). Nustatyta kanapių ir bolivinės balandos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių savitajam tūriui, minkštimo akytumui, BTR, kepinio formos išlaikymo rodikliui, o taip pat juslinėms savybėms ir priimtinumui.

3.16.1. Kanapių ir bolivinės balandos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių savitajam tūriui

Didžiausiu savituoju tūriu pasižymėjo kontroliniai mėginiai – 3,9 cm³/g (žr. 28 pav.). Kanapių ir bolivinės balandos sėklų priedas visais atvejais mažino kepinų savitąjį tūrį, lyginant su kontroliniu kepiniumi, kuris buvo ruoštas be sėklų priedo. Lyginant su kontroliniais kepiniais, savitasis tūris sumažėjo: bandelių su 10 % fermentuotų kanapių sėklų priedu – 25,9 %, su 10 % fermentuotų

bolivinės balandos sėklų priedu – 14,9 %, su 5 % fermentuotų kanapių sėklų priedu – 28,9 %, su 5 % fermentuotų bolivinės balandos sėklų priedu – 18,4 %, su 5 % nefermentuotų maltų kanapių sėklų priedu – 29,3 %, su 5 % nefermentuotų maltų bolivinės balandos sėklų priedu – 12,4 %, su 5 % nefermentuotų nemaltų kanapių sėklų priedu – 26,9 %, su 5 % nefermentuotų nemaltų bolivinės balandos sėklų priedu – 16,2 %. Kanapių sėklų priedai bandelių savitąjį tūrį sumažino labiau nei tokio pat apdorojimo ir kiekio bolivinės balandos sėklų priedai.

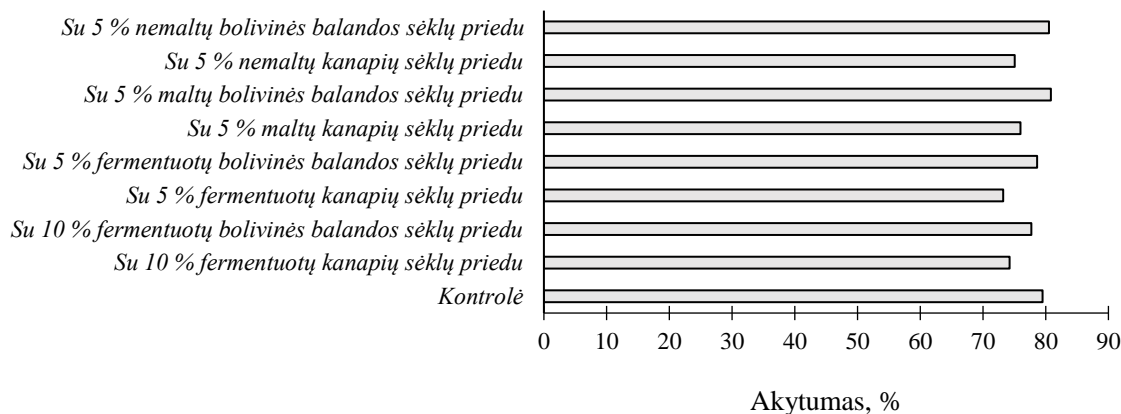
Rizzello‘as ir kt. vykdė bolivinės balandos sėklų fermentaciją su *L. plantarum* ir *L. rossiae* štamais, fermentuotą bioproduktą (20 %) naudojo kvietinių miltų tešlos gamyboje bei duonos kepiniai. Nustatyta, jog nefermentuotų bolivinės balandos sėklų priedas, sumažino kepinų savitąjį tūrį 11 %, o fermentuotų sėklų produktas kepinų savitajam tūriui įtakos neturėjo [32].



28 pav. Kanapių ir bolivinės balandos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių savitajam tūriui

3.16.2. Kanapių ir bolivinės balandos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių akytumui

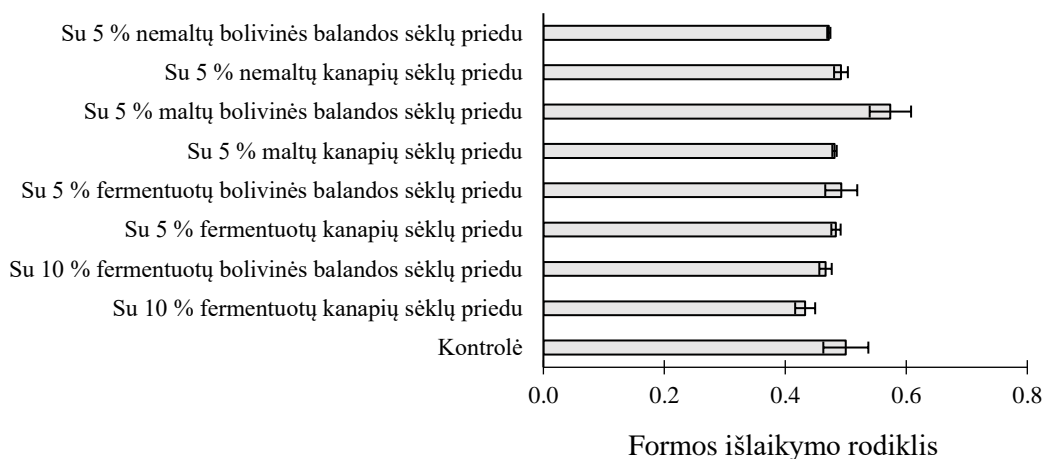
Kontroliniai kepiniai, kepti be priedo, pasižymėjo 79,5 % akytumu (žr. 29 pav.). Lyginant su kontrolinių kepinų akytumu, bandelių akytumas padidėjo: su 5 % nefermentuotų maltų bolivinės balandos sėklų priedu – 1,7 %, su 5 % nefermentuotų nemaltų bolivinės balandos sėklų priedu – 1,3 %. Likę kepiniai pasižymėjo mažesniu akytumu lyginant su kontroliniais kepiniais: su 10 % fermentuotų kanapių sėklų priedu – 6,6 %, su 10 % fermentuotų bolivinės balandos sėklų priedu – 2,2 %, su 5 % fermentuotų kanapių sėklų priedu – 7,9 %, su 5 % fermentuotų bolivinės balandos sėklų priedu – 1,1 %, su 5 % nefermentuotų maltų kanapių sėklų priedu – 4,5 %, su 5 % nefermentuotų nemaltų kanapių sėklų priedu – 5,6 %. Kanapių sėklų priedai bandelių akytumą sumažino labiau nei tokio pat apdorojimo ir kiekio bolivinės balandos sėklų priedai.



29 pav. Kanapių ir bolivinės baltos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių akytumui

3.16.3. Kanapių ir bolivinės baltos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių formos išlaikymo rodikliui

Kontroliniai kepiniai, kepti be priedo, pasižymėjo formos išlaikymo rodikliu – 0,5 (žr. 30 pav.). Lyginant su kontroliniais kepiniais, formos išlaikymo rodiklis padidėjo tik kepinuose su 5 % nefermentuotų maltų bolivinės baltos sėklų priedu – 14,7 %. Likę kepiniai pasižymėjo mažesniu formos išlaikymo rodikliu, lyginant su kontroliniais kepiniais: su 10 % fermentuotų kanapių sėklų priedu – 13,5 %, su 10 % fermentuotų bolivinės baltos sėklų priedu – 6,7 %, su 5 % fermentuotų kanapių sėklų priedu – 3,3 %, su 5 % fermentuotų bolivinės baltos sėklų priedu – 1,5 %, su 5 % nefermentuotų maltų kanapių sėklų priedu – 3,7 %, su 5 % nefermentuotų nemaltų kanapių sėklų priedu – 1,6 %, su 5 % nefermentuotų nemaltų bolivinės baltos sėklų priedu – 5,6 %.

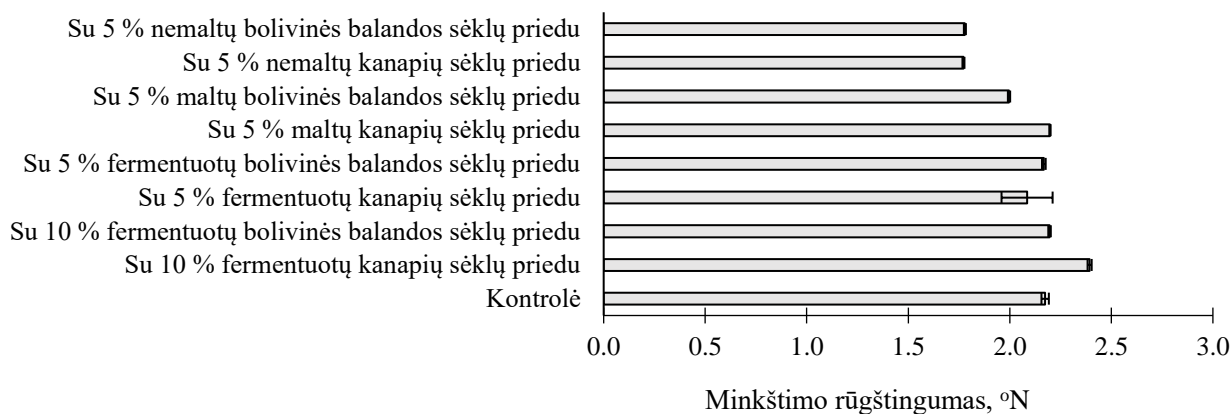


30 pav. Kanapių ir bolivinės baltos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka kepinio formos išlaikymo rodikliui

3.16.4. Kanapių ir bolivinės baltos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių rūgštingumui

Didžiausiu rūgštingumu pasižymėjo bandelės su 10 % fermentuotų kanapių sėklų produktu – 2,4 °N (žr. 31 pav.). Mažiausiu rūgštingumu pasižymėjo bandelės su 5 % nefermentuotų nemaltų kanapių ir bolivinės baltos sėklų priedais, atitinkamai – 1,8 ir 1,8 °N. Kontroliniai kepiniai, kepti be priedo, pasižymėjo 2,2 °N, lyginant su jais, kepinų su 5 % fermentuotų kanapių sėklų priedu; su 5

% fermentuotų bolivinės balandos sėklų priedu; su 5 % nefermentuotų maltų bolivinės balandos sėklų priedu; su 5 % nefermentuotų nemaltų kanapių sėklų priedu; su 5 % nefermentuotų nemaltų bolivinės balandos sėklų priedu, rūgštingumas atitinkamai sumažėjo – 4,1, 0,3, 8,1, 18,5, 18,1 %. Likę kepiniai: su 10 % fermentuotų kanapių sėklų priedu, su 10 % fermentuotų bolivinės balandos sėklų priedu ir su 5 % nefermentuotų maltų kanapių sėklų priedu, pasižymėjo didesniu rūgštingumu nei kontroliniai kepiniai, atitinkamai – 10,1, 0,9, 1,1 %.

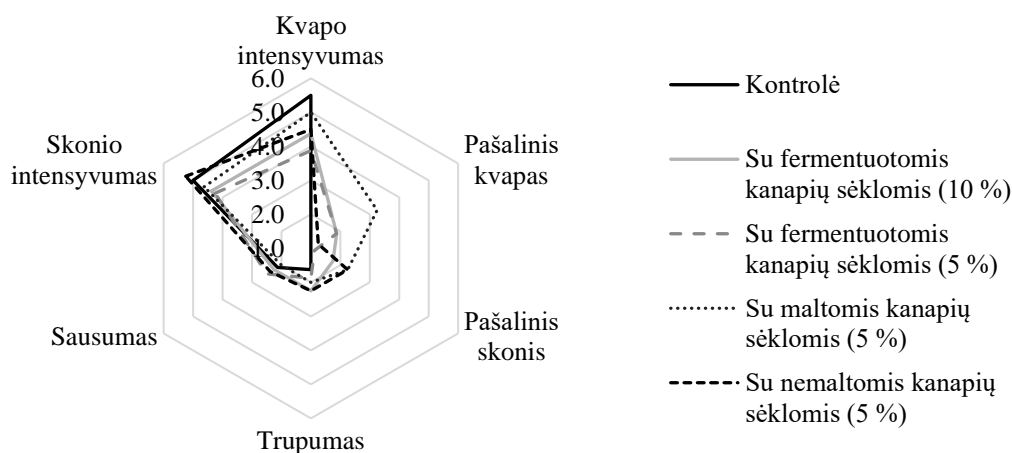


31 pav. Kanapių ir bolivinės balandos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių rūgštingumui

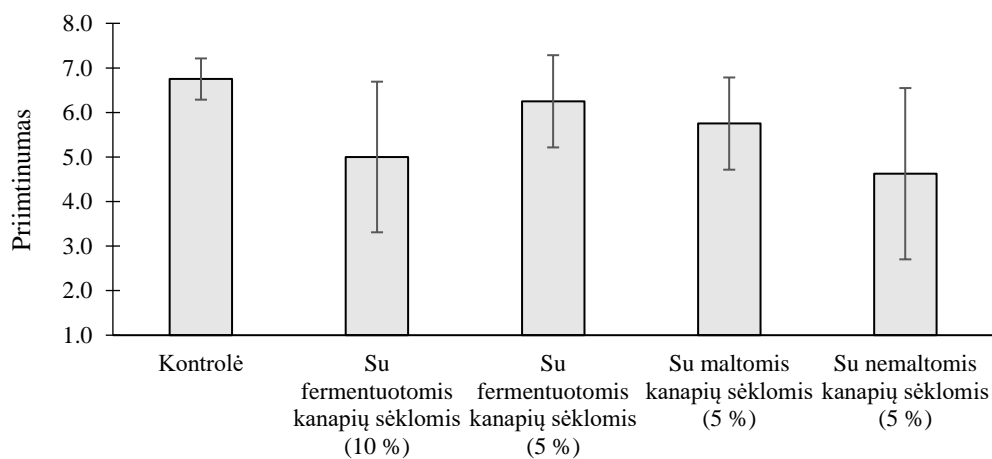
3.16.5. Kanapių ir bolivinės balandos sėklų ir fermentuotų jų produktų įtaka bandelių juslinėms savybėms ir bendram priimtinumui

Kepinių su kanapių sėklomis juslinių savybių ir priimtumo rezultatai pateikti 32 ir 33 paveiksluose. Didžiausiu kvapo intensyvumu pasižymėjo kontroliniai kepiniai (5,5 balo). Stipriausiu pašaliniu kvapu (3,3 balo) ir pašaliniu skoniu (2,3 balo) pasižymėjo kepiniai su 5 % nefermentuotų maltų kanapių sėklų priedu. Didžiausiu trupumu pasižymėjo kepiniai su 10 % fermentuotų kanapių sėklų priedu ir 5 % nefermentuotų nemaltų kanapių sėklų priedu (2,3 balo). Sausiausi kepiniai buvo kepti su 5 % fermentuotų kanapių sėklų priedu (2,5 balo). Stipriausiu skonio intensyvumu pasižymėjo kepiniai su 5 % nemaltų kanapių sėklų priedu (5,3 balo).

Priimtinausi buvo kontroliniai kepiniai (6,8 balo), kiti kepiniai pasižymėjo mažesniu priimtumu: su 10 % fermentuotų kanapių sėklų priedu – 26,5 %, su 5 % fermentuotų kanapių sėklų priedu – 8,1 %, su 5 % nefermentuotų maltų kanapių sėklų priedu – 15,4 %, su 5 % nefermentuotų nemaltų kanapių sėklų priedu – 32 %.



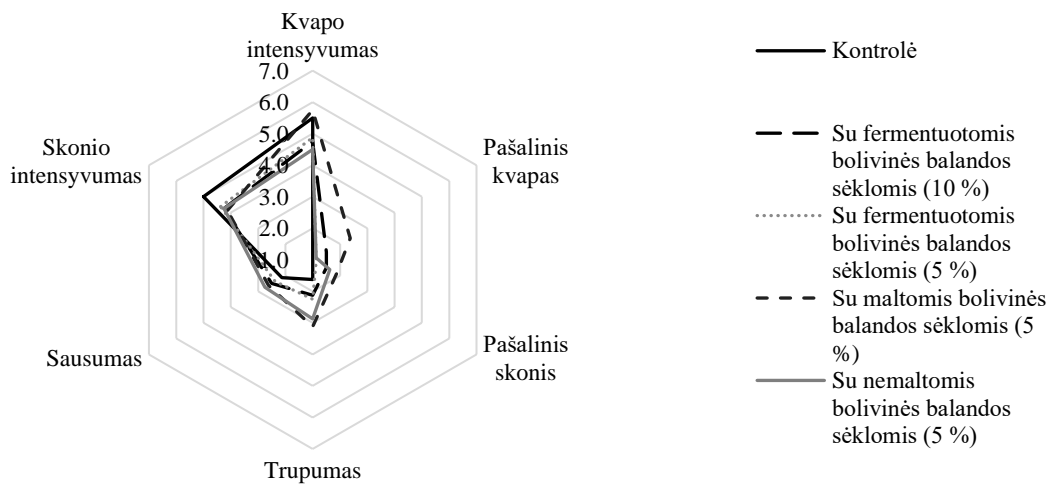
32 pav. Kepinių su kanapių sėklomis juslinių savybių įvertinimas



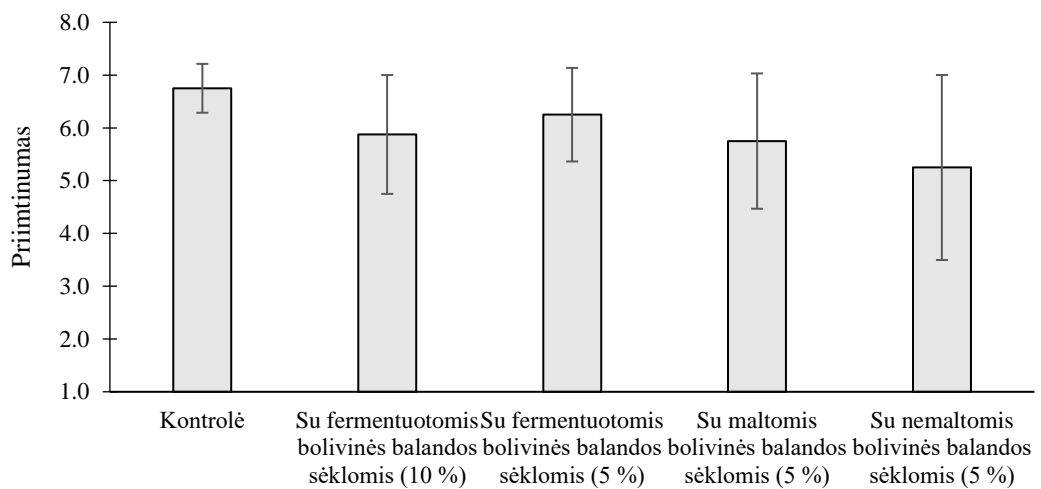
33 pav. Kepinių su kanapių sėklomis priimtumo įvertinimas

Kepinių su bolivinės balandos sėklomis juslinių savybių ir priimtumo rezultatai pateikti 34 ir 35 paveiksluose. Didžiausiu kvapo intensyvumu pasižymėjo kepiniai su 5 % nefermentuotų maltų bolivinės balandos sėklų priedu (5,8 balo). Stipriausiu pašaliniu kvapu (2,4 balo) ir pašaliniu skoniu (1,9 balo) pasižymėjo kepiniai su 5 % nefermentuotų maltų bolivinės balandos sėklų priedu. Didžiausiu trupumu taip pat pasižymėjo kepiniai su 5 % nefermentuotų maltų bolivinės balandos sėklų priedu (3,1 balo). Sausiausi kepiniai buvo kepti su 5 % nefermentuotų nemaltų bolivinės balandos sėklų priedu (2,8 balo). Stipriausiu skonio intensyvumu pasižymėjo kontroliniai kepiniai (5 balai).

Priimtinausi buvo kontroliniai kepiniai (6,8 balo), kiti kepiniai pasižymėjo mažesniu priimtumu: su 10 % fermentuotų bolivinės balandos sėklų priedu – 13,6 %, su 5 % fermentuotų bolivinės balandos sėklų priedu – 8,1 %, su 5 % nefermentuotų maltų bolivinės balandos sėklų priedu – 15,4 %, su 5 % nefermentuotų nemaltų bolivinės balandos sėklų priedu – 22,8 %.



34 pav. Kepinių su bolivinės balandos sėklomis jausinių savybių įvertinimas



35 pav. Kepinių su bolivinės balandos sėklomis priimtimumo įvertinimas

IŠVADOS

1. Pieno rūgšties bakterijos *Lactobacillus plantarum* MR24, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 ir *Lactobacillus brevis* R26 gerai dauginimosi smulkintų bolivinės balandos ir kanapių sėklų terpėse. Didžiausias mikroorganizmų kiekis nustatytas bolivinės balandos sėklų terpėje po 72 valandų – nuo $2,29 \cdot 10^9$ iki $3,2 \cdot 10^{10}$ KSV/g, o kanapių sėklų terpėje po 48 valandų – nuo $7,9 \cdot 10^9$ iki $1,3 \cdot 10^9$ KSV/g. Vertinant antimikrobines ir antioksidacines fermentuotų produktų savybes, didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo bolivinės balandos sėklos fermentuotos su *L. plantarum* MR24 – 169,4 mg troloksio ekvivalento (TE)/100 g fermentuotų sėklų. Didžiausiu antimikrobiniu aktyvumu pasižymėjo bolivinės balandos sėklos fermentuotos su *L. acidophilus* DSM 20079, kurios slopino *Bacillus cereus* augimą, kanapių sėklos fermentuotos su *L. plantarum* MR24 slopino *Staphylococcus aureus* ir *Bacillus cereus* augimą, kanapių sėklos fermentuotos su *L. acidophilus* DSM 20079 slopino *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* bakterijų augimą. Bendru didžiausiu fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo bolivinės balandos ir kanapių sėklos fermentuotos su *L. brevis* R26, atitinkamai – 61,4 ir 65,6 mg galo rūgšties ekvivalento (GRE)/100 g fermentuotų sėklų.
2. Didžiausias vandens įgėrimas nustatytas nefermentuotose bolivinės balandos sėklose (159 %) ir kanapių sėklose fermentuotose su *L. plantarum* MR24 (156 %). Didžiausiu celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjo kanapių sėklos fermentuotos su *L. plantarum* MR24 (1,47 AV/g fermentuotų sėklų), didžiausiu amilaziniu, fitaziniu ir proteaziniu aktyvumais pasižymėjo kanapių sėklos fermentuotos su *L. brevis* R26, atitinkamai – 0,72, 0,19 ir 0,67 AV/g fermentuotų sėklų. Didžiausia L-pieno rūgšties izomero koncentracija nustatyta fermentuotose bolivinės balandos sėklose su *L. acidophilus* DSM 20079 (42,5 g/kg fermentuotų sėklų). Didžiausias lakusis rūgštingumas nustatytas fermentuotuose bolivinės balandos sėklose su *L. plantarum* MR24, *L. brevis* R26 ir *L. acidophilus* DSM 20079 (atitinkamai – 3, 3 ir 2,8 °N). Bolivinės balandos sėklų fermentacija su *L. brevis* R26 ir *L. acidophilus* DSM 20079 lėtino produktų oksidacinį gedimą, juos saugant šaldymo kameroje –18 °C temperatūroje.
3. Baltymų frakcijose, kurios buvo hidrolizuotos pepsinu, neliko didesnės (45 kDa) molekulinės masės baltymų lyginant su frakcijomis prieš hidrolizę, po hidrolizės pepsinu daugiausiai buvo mažesnės (nuo 6,5 iki 24 kDa) molekulinės masės baltymai. Nustatyta, kad ir pieno rūgšties bakterijų fermentacija, ir fermentinė hidrolizė pepsinu, daro įtaką baltymų frakcijų sudėčiai.
4. Vertinant antioksidacines išskirtų baltymų frakcijų savybes ir bendrą fenolinių junginių kiekį, 70 % etanolyje tirpios baltymų frakcijos pasižymėjo didesniu aktyvumu bei fenolinių junginių kiekiu nei tirpios 0,8 M NaCl tirpale ar vandenyje. Baltymų frakcijų hidrolizė pepsinu, ABTS ir DPPH laisvųjų radikalų sujungimo gebą sumažino, lyginant su nehidrolizuotomis frakcijomis. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo nehidrolizuota bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. acidophilus* DSM 20079 baltymų frakcija, tirpina 70 % etanolio tirpale, įvertinus DPPH ir ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodais – atitinkamai 7716 ir 3261 mg TE/100 g baltymų. Bendru didžiausiu fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo nehidrolizuota bolivinės balandos sėklų fermentuotų su *L. acidophilus* DSM 20079 baltymų frakcija, tirpinta 70 % etanolio tirpale (186 mg GRE/100 g baltymų). Kanapių baltymų mėginių frakcijos tirpios 0,8 M NaCl tirpale ir vandenyje, pasižymėjo antimikrobiniu aktyvumu tik po hidrolizės pepsinu. Didžiausiu antimikrobiniu aktyvumu pasižymėjo 70 % etanolyje tirpių baltymų hidrolizuotos pepsinu frakcijos, lyginant su frakcijomis tirpiomis 0,8 M NaCl tirpale ir vandenyje.
5. Kepinių savitasis tūris ir akytumas beveik visais atvejais nustatytas mažesnis kepiniuose su fermentuotų sėklų priedu, lyginant su kontroliniais mėginiais ruoštais be sėklų priedu.

Didžiausiu formos išlaikymo rodikliu pasižymėjo bandelės su 5 % nefermentuotų maltų bolivinės balandos sėklų priedu (0,57). Didžiausiu rūgštingumu pasižymėjo bandelės su 10 % fermentuotų kanapių sėklų priedu (2,4 °N). Priimtinausi kepiniai buvo kontroliniai, su sėklų priedais priimtimumas buvo mažesnis nuo 8,1 % iki 32 %.

LITERATŪROS ŠARĀŠAS

1. ORIO, L. P., SPERANZA, G. New ACE-Inhibitory Peptides from Hemp Seed (*Cannabis Sativa* L.) Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, 65(48), 10482-10488. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi: [10.1021/acs.jafc.7b04522](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04522).
2. SACILIK, K., ÖZTÜRK, R., KESKIN, R. Some Physical Properties of Hemp Seed. 2003,86,191-198. ISBN 1537-5110. Prieiga per: doi: [https://doi.org/10.1016/S1537-5110\(03\)00130-2](https://doi.org/10.1016/S1537-5110(03)00130-2).
3. IRAKLI, M., COOK, C. M. Effect Omicronf Genotype and Growing Year on the Nutritional, Phytochemical, and Antioxidant Properties of Industrial Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Seeds. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2019, 8(10). ISSN 2076-3921. Prieiga per: doi: [10.3390/antiox8100491](https://doi.org/10.3390/antiox8100491).
4. NIONELLI, L., MONTEMURRO, M., PONTONIO, E., VERNI, M., GOBBETTI, M., RIZZELLO, C. G. 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. 2018, 279, 14-25. ISBN 0168-1605. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.036>.
5. WANG, Q., XIONG, Y. Processing, Nutrition, and Functionality of Hempseed Protein: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019, Prieiga per: doi: [10.1111/1541-4337.12450](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12450).
6. ALUKO, R., 2017 *Hemp Seed (Cannabis Sativa L.) Proteins*. 121-132. ISBN 9780128027783. Prieiga per: doi: [10.1016/B978-0-12-802778-3.00007-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00007-X).
7. SHAN, L., WANG, X. Yunma 1 Hemp Seeds: Compositional and Nutritional Analyses. *Airitis Library*. 2008, 24(3), 100-104.
8. WANG, X., YANG, X., GAO, W. Characterization, Amino Acid Composition and in Vitro Digestibility of Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Proteins. *Food Chemistry*. 2008, 10(7), 11-18. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodchem.2007.06.064](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.064).
9. ODANI, S., ODANI, S. Isolation and Primary Structure of a Methionine- and Cystine-Rich Seed Protein of *Cannabis Sativa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1998, 62(4), 650-654. ISSN 0916-8451. Prieiga per: doi: [10.1271/bbb.62.650](https://doi.org/10.1271/bbb.62.650).
10. RIZZELLO, C.G., GOBBETTI, M. Improving the Antioxidant Properties of Quinoa Flour through Fermentation with Selected Autochthonous Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2017, 24(1), 252-261. ISSN 1879-3460. Prieiga per: doi: [S0168-1605\(16\)30581-5](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.005).
11. VILCACUNDO, R., HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Nutritional and Biological Value of Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.). *Current opinion in food science*. 2017, 14, 1-6. ISBN 2214-7993. Prieiga per: doi: [10.1016/j.cofs.2016.11.007](https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.11.007).
12. FARAJZADEH Z., SHAKERIAN, A., RAHIMI, E., BAGHERI, M. Chemical, Antioxidant, Total Phenolic and Flavonoid Components and Antimicrobial Effects of Different Species of

Quinoa Seeds. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*. 2020, 51(1), 43-54. ISSN 1110-0222. Prieiga per: doi: [10.21608/ejvs.2019.17122.1098](https://doi.org/10.21608/ejvs.2019.17122.1098).

13. NONGONIERMA, A. B., LE MAUX, S., DUBRULLE, C., BARRE, C., FITZGERALD, R. J. Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) Protein Hydrolysates with In vitro Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory and Antioxidant Properties. *Journal of cereal science*. 2015, 65, 112-118. ISBN 0733-5210. Prieiga per: doi: [10.1016/j.jcs.2015.07.004](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.004).

14. MUFARI, J., MIRANDA, P., BERGESSE, A., CERVILLA, N., CALANDRI, E. Physico-Chemical Analysis and Protein Fraction Compositions of Different Quinoa Cultivars. *Acta alimentaria*. 2018, 47, 462-469. Prieiga per: doi: [10.1556/066.2018.47.4.9](https://doi.org/10.1556/066.2018.47.4.9).

15. VILCACUNDO, R., MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C., HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Release of Dipeptidyl Peptidase IV, A-Amylase and A-Glucosidase Inhibitory Peptides from Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) during in Vitro Simulated Gastrointestinal Digestion. *Journal of functional foods*. 2017, 35, 531-539. ISBN 1756-4646. Prieiga per: doi: [10.1016/j.jff.2017.06.024](https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.024).

16. GORISSEN, S., WITARD, O. Characterising the Muscle Anabolic Potential of Dairy, Meat and Plant-Based Protein Sources in Older Adults. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2017, 77(1), 20-31. Prieiga per: doi: [10.1017/S002966511700194X](https://doi.org/10.1017/S002966511700194X).

17. TEH, S., BEKHIT, A. E. A., CARNE, A., BIRCH, J. Antioxidant and ACE-Inhibitory Activities of Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Protein Hydrolysates Produced by the Proteases AFP, HT, Pro-G, Actinidin and Zingibain. *Food chemistry*. 2016, 203, 199-206. ISBN 0308-8146. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodchem.2016.02.057](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.057).

18. VILCACUNDO, R., MIRALLES, B., CARRILLO, W., HERNANDEZ-LEDESMA, B. In Vitro Chemopreventive Properties of Peptides Released from Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) Protein Under Simulated Gastrointestinal Digestion. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*. 2018, 105, 403-411. ISSN 1873-7145. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodres.2017.11.036](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.036).

19. KAVITAKE, D., KANDASAMY, S., DEVI, P.B., SHETTY, P.H. Recent Developments on Encapsulation of Lactic Acid Bacteria as Potential Starter Culture in Fermented Foods – A Review. *Food bioscience*. 2018, 21, 34-44. ISBN 2212-4292. Prieiga per: doi: [10.1016/j.fbio.2017.11.003](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.003).

20. LEE, M., LEE, Y., KIM, S., HONG, H., KIM, K. Quality and Antioxidant Activity of Ginseng Seed Processed by Fermentation Strains. *Journal of ginseng research*. 2015, 39, 178-182. ISBN 1226-8453. Prieiga per: doi: [10.1016/j.jgr.2014.10.007](https://doi.org/10.1016/j.jgr.2014.10.007).

21. OLOYEDE, O. O., AKPA, V. E. Effects of Fermentation Time on the Functional and Pasting Properties of Defatted Moringa Oleifera Seed Flour. *Food Science & Nutrition*. 2016, 4(1), 89-95. ISSN 2048-7177. Prieiga per: doi: [10.1002/fsn3.262](https://doi.org/10.1002/fsn3.262).

22. MISHRA, V., PRAJAPATI, J. Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, 63(14), 3615-3626. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi: [10.1021/jf506326t](https://doi.org/10.1021/jf506326t).

23. RATTANACHAIKUNSOPON, P., PHUMKHACHORN, P. Lactic Acid Bacteria: Their Antimicrobial Compounds and their Uses in Food Production. *Annals of Biological Research*. 2010,1(4)., 218-228.
24. REALE, A., COPPOLA, R. Phytate Degradation by Lactic Acid Bacteria and Yeasts during the Wholemeal Dough Fermentation: A 31P NMR Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52(20), 6300-6305. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi: [10.1021/jf049551](https://doi.org/10.1021/jf049551).
25. SINGH, T. A., DEVI, K. R., AHMED, G., JEYARAM, K. Microbial and Endogenous Origin of Fibrinolytic Activity in Traditional Fermented Foods of Northeast India. *Food research international*. 2014, 55, 356-362. ISBN 0963-9969. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodres.2013.11.028](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.028).
26. BROWN, L., HEBERT, E. M. Lactic Acid Bacteria as Cell Factories for the Generation of Bioactive Peptides. *Protein and Peptide Letters*. 2017, 24(2), 146-155. ISSN 1875-5305. Prieiga per: doi: [10.2174/0929866524666161123111333](https://doi.org/10.2174/0929866524666161123111333).
27. GHAFAR, T., IRSHAD, M., ANWAR, Z., AQIL, T., ZULIFQAR, Z., TARIQ, A., KAMRAN, M., EHSAN, N., MEHMOOD, S. Recent Trends in Lactic Acid Biotechnology: A Brief Review on Production to Purification. *Journal of radiation research and applied science*. 2014, 7(2), 222-229. ISBN 1687-8507. Prieiga per: doi: [10.1016/j.jrras.2014.03.002](https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.03.002).
28. QUINTO, E., GIRBES, T. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*. 2014, 5, 1765-1775. Prieiga per: doi: [10.4236/fns.2014.518190](https://doi.org/10.4236/fns.2014.518190).
29. MOORE, M., BELLO, F., 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, 226(6), 1309-1316. Prieiga per: doi: [10.1007/s00217-007-0659-z](https://doi.org/10.1007/s00217-007-0659-z).
30. DALLAGNOL, A.M., PESCUA, M., DE VALDEZ, G.F., ROLLÁN, G. Fermentation of Quinoa and Wheat Slurries by Lactobacillus Plantarum CRL 778: Proteolytic Activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97(7), 3129-3140. ISSN 1432-0614. Prieiga per: doi: [10.1007/s00253-012-4520-3](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4520-3).
31. AXEL, C., BROSANAN, B., ZANNINI, E., FUREY, A., COFFEY, A., ARENDT, E.K. Antifungal Sourdough Lactic Acid Bacteria as Biopreservation Tool in Quinoa and Rice Bread. *International journal of food microbiology*. 2016, 239, 86-94. ISBN 0168-1605. Prieiga per: doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.006](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.006).
32. RIZZELLO, C., LORUSSO, A., MONTEMURRO, M., 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*. 2015, 56, 1-13. Prieiga per: doi: [10.1016/j.fm.2015.11.018](https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.018).
33. LI, S., CHEN, C., JI, Y., LIN, J., CHEN, X., QI, B. Improvement of Nutritional Value, Bioactivity and Volatile Constituents of Quinoa Seeds by Fermentation with Lactobacillus Casei. *Journal of cereal science*. 2018, 84, 83-89. ISBN 0733-5210. Prieiga per: doi: [10.1016/j.jcs.2018.10.008](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.10.008).

34. ADOM, K. K., LIU, R. H. Antioxidant Activity of Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50(21), 6182-6187. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi: [10.1021/jf0205099](https://doi.org/10.1021/jf0205099).
35. SHAHIDI, F., AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and Polyphenolics in Foods, Beverages and Spices: Antioxidant Activity and Health Effects – A Review. *Journal of functional food*. 2015, 18, 820-897. ISBN 1756-4646. Prieiga per: doi: [10.1016/j.jff.2015.06.018](https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018).
36. OROIAN, M., ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, Natural Sources, Extraction and Analysis. *Food research international*. 2015, 74, 10-36. ISBN 0963-9969. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodres.2015.04.018](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018).
37. ALUKO, R., MONU, E. Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolysates. *Journal of Food Science*. 2006, 68, 1254-1258. Prieiga per: doi: [10.1111/j.1365-2621.2003.tb09635.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09635.x).
38. COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, 12(4), 564-582. Prieiga per: doi: [10.1128/CMR.12.4.564](https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564).
39. HERRERA, D.MARTÍNEZ, E. Antimicrobial Potential and Phytochemical Content of Six Diverse Sources of Quinoa Seeds (*Chenopodium Quinoa* Willd.). *Agricultural Sciences*. 2014, 5, 1015-1024. Prieiga per: doi: [10.4236/as.2014.511110](https://doi.org/10.4236/as.2014.511110).
40. LIN, D., CHEN, S. An Overview of Plant Phenolic Compounds and their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules*. 2016, 21(10), 1374. Prieiga per: doi: [10.3390/molecules21101374](https://doi.org/10.3390/molecules21101374).
41. POMPEU, D., GRANJEIRO, P. Purification, Partial Characterization and Antimicrobial Activity of Lectin from *Chenopodium Quinoa* Seeds. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2015, 35(4). Prieiga per: doi: [10.1590/1678-457X.6823](https://doi.org/10.1590/1678-457X.6823).
42. APPENDINO, G., RAHMAN, M. Antibacterial Cannabinoids from *Cannabis Sativa*: A Structure-Activity Study. *Journal of Natural Products*. 2008, 71, 1427-1430. Prieiga per: doi: [10.1021/np8002673](https://doi.org/10.1021/np8002673).
43. KHAN, B., WARNER, P., WANG, H. Antibacterial Properties of Hemp and Other Natural Fibre Plants: A Review. *BioResources*. 2014, 9(2), 3642–3659. Prieiga per: doi: [10.15376/biores.9.2.3642-3659](https://doi.org/10.15376/biores.9.2.3642-3659).
44. RADWAN, M., ROSS, S. Biologically Active Cannabinoids from High-Potency *Cannabis Sativa*. *Journal of Natural Products*. 2009,72(5), 906-911. Prieiga per: doi: [10.1021/np900067k](https://doi.org/10.1021/np900067k).
45. B, D. Antibacterial Analysis of Crude Extracts from the Leaves of *Tagetes Erecta* and *Cannabis Sativa*. *International Journal of Environmental Sciences*. 2012,2(3), 1605-1608. Prieiga per: doi: [10.6088/ijes.00202030045](https://doi.org/10.6088/ijes.00202030045).
46. ALI, E. Antimicrobial Activity of *Cannabis Sativa* L. *Chinese Medicine*. 2012, 3, 61-64. Prieiga per: doi: [10.4236/cm.2012.31010](https://doi.org/10.4236/cm.2012.31010).
47. WASIM, K., HAQ, I., ASHRAF, M. Antimicrobial Studies of the Leaf of *Cannabis Sativa* L. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1995, 8(1), 29-38. ISSN 1011-601X.

48. BORCHARDT, J., BEY, R. Antimicrobial Activity of Native and Naturalized Plants of Minnesota and Wisconsin. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2008, 298-110.
49. NISSEN, L., MONTI, A. Characterization and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Industrial Hemp Varieties (*Cannabis Sativa* L.). *Fitoterapia*. 2010, 81(5), 413-419. ISSN 1873-6971. Prieiga per: doi: [10.1016/j.fitote.2009.11.010](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.11.010).
50. NOVAK, J., ZITTERL-EGLESEER, K., DEANS, S., FRANZ, C. Essential Oils of Different Cultivars of *Cannabis Sativa* L. and their Antimicrobial Activity. *Flavour and Fragrance Journal*. 2001, 16, 259-262. Prieiga per: doi: [10.1002/ffj.993](https://doi.org/10.1002/ffj.993).
51. DALIRI, E. B., OH, D. H., LEE, B. H. Bioactive Peptides. *Foods (Basel, Switzerland)*. 2017, 6(5), 32. ISSN 2304-8158. Prieiga per: doi: [10.3390/foods6050032](https://doi.org/10.3390/foods6050032).
52. LEE, S. Y., HUR, S. J. Antihypertensive Peptides from Animal Products, Marine Organisms, and Plants. *Food chemistry*. 2017, 228, 506-517. ISBN 0308-8146. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodchem.2017.02.039](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.039).
53. AGUILAR-TOALÁ, J. E., HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. Assessment of Multifunctional Activity of Bioactive Peptides Derived from Fermented Milk by Specific *Lactobacillus Plantarum* Strains. *Journal of Dairy Science*. 2017, 100(1), 65-75. ISSN 0022-0302. Prieiga per: doi: [10.3168/jds.2016-11846](https://doi.org/10.3168/jds.2016-11846).
54. DALIRI, E. B., LEE, B. H., OH, D. H. Current Perspectives on Antihypertensive Probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2017, 9(2), 91-101. ISSN 1867-1314. Prieiga per: doi: [10.1007/s12602-016-9241-y](https://doi.org/10.1007/s12602-016-9241-y).
55. REN, G., ZHU, Y., SHI, Z., LI, J. Detection of Lunasin in Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) and the in Vitro Evaluation of its Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017, 97(12), 4110-4116. ISSN 1097-0010. Prieiga per: doi: [10.1002/jsfa.8278](https://doi.org/10.1002/jsfa.8278).
56. GIRGIH, A.T., HE, R., MALOMO, S., OFFENGENDEN, M., WU, J., ALUKO, R.E. Structural and Functional Characterization of Hemp Seed (*Cannabis Sativa* L.) Protein-Derived Antioxidant and Antihypertensive Peptides. *Journal of functional food*. 2014, 6, 384-394. ISBN 1756-4646. Prieiga per: doi: [10.1016/j.jff.2013.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.005).
57. LU, R., QIAN, P., SUN, Z., ZHOU, X., CHEN, T., HE, J., ZHANG, H., WU, J. Hempseed Protein Derived Antioxidative Peptides: Purification, Identification and Protection from Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in PC12 Cells. *Food chemistry*. 2010, 123, 1210-1218. ISBN 0308-8146. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodchem.2010.05.089](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.089).
58. HABIBI NAJAFI, M. B., HADDAD KHODAPARAST, M. H. Development of Sourdough Fermented Date Seed for Improving the Quality and Shelf Life of Flat Bread: Study with Univariate and Multivariate Analyses. *Journal of Food Science and Technology*. 2016, 53(1), 209-220. ISSN 0975-8402. Prieiga per: doi: [10.1007/s13197-015-1956-3](https://doi.org/10.1007/s13197-015-1956-3).
59. BARTKIENE, E., SCHLEINING, G., KRUNGLEVICIUTE, V., ZADEIKE, D., ZAVISTANAVICIUTE, P., DIMAITE, I., KUZMAITE, I., RISKEVICIENE, V., JUODEIKIENE, G. Development and Quality Evaluation of Lacto-Fermented Product Based on Hulled and Not

- Hulled Hempseed (*Cannabis Sativa* L.). *Food science and technology*. 2016, 72, 544-551. ISBN 0023-6438. Prieiga per: doi: [10.1016/j.lwt.2016.05.027](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.027).
60. LORUSSO, A., RIZZELLO, C. Use of Fermented Quinoa Flour for Pasta Making and Evaluation of the Technological and Nutritional Features. *LWT - Food Science and Technology*. 2016, 78, 215-221. Prieiga per: doi: [10.1016/j.lwt.2016.12.046](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.046).
61. KORUS, J., WITCZAK, M., ZIOBRO, R., 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 - Food Science and Technology*. 2017, 84, 143-150. ISBN 0023-6438. Prieiga per: doi: [10.1016/j.lwt.2017.05.046](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.046).
62. ČIŽEIKIENĖ Dalia. Bakteriocinus gaminančių pieno rūgšties bakterijų bioproduktai, jų antimikrobinis ir fitazinis aktyvumas bei taikymas. Daktaro disertacija. KTU. 2015.
63. ŠARKINAS Antanas. *Bendrosios Mikrobiologijos Laboratoriniai Darbai: Mokomoji Knyga*. Kaunas: Technologija, 2013. ISBN 978-9955-25-212-2.
64. GRAŽINA, J., PETRAUSKAS, A. Solid-State Fermentation of *Silybum Marianum* L. Seeds used as Additive to Increase the Nutritional Value of Wheat Bread. *Food Technology and Biotechnology*. 2013, 51, 528-538.
65. RAJURKAR, N., HANDE, S. Estimation of Phytochemical Content and Antioxidant Activity of some Selected Traditional Indian Medicinal Plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011, 731, 46-51. Prieiga per: doi: [10.4103/0250-474X.91574](https://doi.org/10.4103/0250-474X.91574).
66. ČIŽEIKIENĖ Dalia, MICKEVIČIUS Vytautas. *Enzimologijos Laboratoriniai Darbai: Mokomoji Knyga*. Kaunas: Technologija, 2017. ISBN 978-609-02-1418-3.
67. XIAO, Z., STORMS, R., TSANG, A. A Quantitative Starch-Iodine Method for Measuring Alpha-Amylase and Glucoamylase Activities. *Analytical Biochemistry*. 2006, 351(1), 146-148. ISSN 0003-2697. Prieiga per: doi: [10.1016/j.ab.2006.01.036](https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.036).
68. ČIŽEIKIENĖ, D., PASKEVICIUS, A. 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*. 2015, 66(7), 736-742. ISSN 1465-3478. Prieiga per: doi: [10.3109/09637486.2015.1088939](https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1088939) [doi].
69. TEH, S. Effect of the Defatting Process, Acid and Alkali Extraction on the Physicochemical and Functional Properties of Hemp, Flax and Canola Seed Cake Protein Isolates. *Journal of Food Measurement & Characterization*. 2014, 8(2), 92-104. Prieiga per: doi: [10.1007/s11694-013-9168-x](https://doi.org/10.1007/s11694-013-9168-x).
70. ELSOHAIFY, S. A., REFAAY, T. M., ZAYTOUN, M. A. M. Physicochemical and Functional Properties of Quinoa Protein Isolate. *Annals of Agricultural Sciences*. 2015, 60(2), 297-305.
71. HADNAĐEV, M., DAPČEVIĆ-HADNAĐEV, T., LAZARIDOU, A., MOSCHAKIS, T., MICHAELIDOU, A.-M., POPOVIĆ, S., BILIADERIS, C.G. Hempseed Meal Protein Isolates Prepared by Different Isolation Techniques. Part I. Physicochemical Properties. *Food*

hydrocolloids. 2018, 79, 526-533. ISBN 0268-005X. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodhyd.2017.12.015](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.015).

72. LINDEBOOM Nienke. Studies on the Characterization, Biosynthesis and Isolation of Starch and Protein from Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd. *University of Saskatchewan*. 2005.

73. SIDDEEG, A., XU, Y., JIANG, Q., XIA, W. In Vitro Antioxidant Activity of Protein Fractions Extracted from Seinat (*Cucumis Melo* Var. Tibish) Seeds. *CyTA - Journal of Food*. 2015, 13(3), 472-481. Prieiga per: doi: [10.1080/19476337.2014.1003199](https://doi.org/10.1080/19476337.2014.1003199).

74. AYYASH, M., JOHNSON, S.K., LIU, S., MESMARI, N., DAHMANI, S., AL DHAHERI, A.S., KIZHAKKAYIL, J. In Vitro Investigation of Bioactivities of Solid-State Fermented Lupin, Quinoa and Wheat using *Lactobacillus* Spp. *Food chemistry*. 2019, 275, 50-58. ISBN 0308-8146. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodchem.2018.09.031](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.031).

75. MARIA S., C., MUSTE, S. *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014 in Quinoa Sourdough Adaptability and Antioxidant Potential. *Romanian Biotechnological Letters*. 2018, 23, 13581-13591.

76. YOON, Y., LEE, J. Verification of biological activities and tyrosinase inhibition of ethanol extracts from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) fermented with lactic acid bacteria. *Journal of life science*. 2018, 28(6), 688-696. Prieiga per: doi: [10.5352/JLS.2018.28.6.688](https://doi.org/10.5352/JLS.2018.28.6.688).

77. KRUNGLEVICIUTE, V., MAKNICKIENE, Z. Design of Lupin Seeds Lactic Acid Fermentation - Changes of Digestibility, Amino Acid Profile and Antioxidant Activity. *Veterinary medicine and zootechnics*. 2016, 73, 47-53. ISSN 1392-2130.

78. SONGRÉ-OUATTARA, L. T., MOUQUET-RIVIER, C., ICARD-VERNIÈRE, C., HUMBLLOT, C., DIAWARA, B., GUYOT, J. P. Enzyme Activities of Lactic Acid Bacteria from a Pearl Millet Fermented Gruel (*Ben-Saalga*) of Functional Interest in Nutrition. *International journal of food microbiology*. 2008, 128, 395-400. ISBN 0168-1605. Prieiga per: doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.004](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.004).

79. NUOBARIENE, L., CIZEIKIENE, D., GRADZEVICIUTE, E., HANSEN, ÅS., RASMUSSEN, S. K., JUODEIKIENE, G., VOGENSEN, F. K. Phytase-Active Lactic Acid Bacteria from Sourdoughs: Isolation and Identification. *LWT-Food science technology*. 2015, 63, 766-772. ISBN 0023-6438. Prieiga per: doi: [10.1016/j.lwt.2015.03.018](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.018).

80. MATTHEWS, A., JIRANEK, V. Lactic Acid Bacteria as a Potential Source of Enzymes for use in Vinification. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, 70(10), 5715-5731. Prieiga per: doi: [10.1128/AEM.70.10.5715-5731.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5715-5731.2004).

81. ZEOULA, L., MACHADO, E., CARRARO, J., AGUIAR, S., YOSHIMURA, E.H., AGUSTINHO, B., SANTOS, F., WORUBY SANTOS, N. Antioxidant Action in Diets with Ground Soybeans on Ruminant Microbial Production, Digestion, and Fermentation in Buffaloes. *Zootechnics*. 2019, 48. Prieiga per: doi: [10.1590/rbz4820180167](https://doi.org/10.1590/rbz4820180167).

82. TANG, C., WANG, X., YANG, X. Enzymatic Hydrolysis of Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Protein Isolate by various Proteases and Antioxidant Properties of the Resulting Hydrolysates. *Food*

chemistry. 2009, 114, 1484-1490. ISBN 0308-8146. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodchem.2008.11.049](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.049).

83. YEKTA, M., MOUSAVI KHANEGHAH, A. The Antimicrobial and Antioxidant Properties of Produced Burgers with Quinoa Peptide-Loaded Nanoliposomes. *Journal of Food Safety*. 2019, 40(2). Prieiga per: doi: [10.1111/jfs.12753](https://doi.org/10.1111/jfs.12753).

84. MUDGIL, P. Multi-Functional Bioactive Properties of Intact and Enzymatically Hydrolysed Quinoa and Amaranth Proteins. *Lebensmittel-Wissenschaft + i.E.Und] Technologie*. 2019, 110(6), 207-213. Prieiga per: doi: [10.1016/j.lwt.2019.04.084](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.084).

85. DALLAGNOL, A. M., PESCUA, M., ROLLAN, G., TORINO, M.I., DE VALDEZ, G. F. Optimization of Lactic Ferment with Quinoa Flour as Bio-Preservative Alternative for Packed Bread. *Applied microbiology and biotechnology* .2015, 99, 3839-3849. ISBN 1432-0614. Prieiga per: doi: [10.1007/s00253-015-6473-9](https://doi.org/10.1007/s00253-015-6473-9).

86. GIRGIH, A. T., UDENIGWE, C. C., ALUKO, R. E. In Vitro Antioxidant Properties of Hemp Seed (*Cannabis Sativa L.*) Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2011, 88(3), 381-389. ISSN 0003-021X. Prieiga per: doi: [10.1007/s11746-010-1686-7](https://doi.org/10.1007/s11746-010-1686-7).

87. GARCIA-MORA, P., FRIAS, J., PEÑAS, E., ZIELIŃSKI, H., GIMÉNEZ-BASTIDA, J. A., WICZKOWSKI, W., ZIELIŃSKA, D., MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. Simultaneous Release of Peptides and Phenolics with Antioxidant, ACE-Inhibitory and Anti-Inflammatory Activities from Pinto Bean (*Phaseolus Vulgaris L. Var. Pinto*) Proteins by Subtilisins. *Journal of functional foods*. 2015, 18, 319-332. ISBN 1756-4646. Prieiga per: doi: [10.1016/j.jff.2015.07.010](https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.010).

88. CHANPUT, W., THEERAKULKAIT, C., NAKAI, S. Antioxidative Properties of Partially Purified Barley Hordein, Rice Bran Protein Fractions and their Hydrolysates. *Journal of cereal science*. 2009, 49, 422-428. ISBN 0733-5210. Prieiga per: doi: [10.1016/j.jcs.2009.02.001](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.02.001).

MAGISTRO DARBO REZULTATŲ VIEŠINIMAS

Publikacijos

Gaidė, Ieva; Čižeikienė, Dalia. Pieno rūgšties bakterijomis fermentuotų bolivinės balandos ir kanapių sėklų tyrimai // Žmogaus ir gamtos sauga 2020: mokslo straipsnių rinkinys = Human and nature safety 2020: selected papers / Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademija. Kaunas Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademija. ISSN 1822-1823. eISSN 2538-9122. 2020, p. 22-25.: Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademija. ISSN 1822-1823. eISSN 2538-9122. 2020, p. 22-25.

Dalyvavimas konferencijose

Gaidė, Ieva; Čižeikienė, Dalia. Fermentuotų bolivinės balandos ir kanapių sėklų tyrimai bei panaudojimas kepiniams // Dvidešimt šeštoji tarptautinė mokslinė-praktinė konferencija "Žmogaus ir gamtos sauga 2020", 2020 m. gegužės 6-7 d. = 26th International scientific-practical conference "Human and nature safety 2020", 6-7 May 2020 / Vytauto Didžiojo universitetas, Lietuvos mokslų akademija. Kaunas : Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademija. 2020, p. 1-3.

DALYVAVIMAS PROJEKTUOSE

- Nuo 2018 metų spalio 1 dienos iki 2019 balandžio 30 dienos dalyvavimas projekte „Fermentuotų bolivinės balandos ir kanapių sėklų tyrimai bei panaudojimas kepiniams“ (Nr. 09.3.3.-LMT-K-712-10-0089) pagal poveiklę „Studentų gebėjimų ugdymas vykdant tyrimus semestrų metu“ Nr. 0.9.3.3-LMT-712-03 (vadovė – doc. dr. Dalia Čižeikienė).
- Nuo 2019 metų liepos 1 dienos iki 2019 rugpjūčio 31 dienos dalyvavimas projekte „Fermentuotų kanapių ir bolivinės balandos sėklų baltymų išskyrimas ir jų savybių tyrimai“ (Nr. 09.3.3.-LMT-K712-15-0070) pagal poveiklę „Studentų gebėjimų ugdymas dalyvaujant mokslinėse vasaros praktikose“ Nr. 9.3.3-LMT-K-712 (vadovė – doc. dr. Dalia Čižeikienė).

PRIEDAI

1 priedas. Amino rūgštys

| Pavadinimas | Trumpinys | | Molekulinė masė | Formulė |
|------------------|-----------|---|-----------------|---|
| Alaninas | Ala | A | 89.10 | C ₃ H ₇ NO ₂ |
| Argininas | Arg | R | 174.20 | C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ |
| Asparaginas | Asn | N | 132.12 | C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ |
| Asparto rūgštis | Asp | D | 133.11 | C ₄ H ₇ NO ₄ |
| Cisteinas | Cys | C | 121.16 | C ₃ H ₇ NO ₂ S |
| Glutamo rūgštis | Glu | E | 147.13 | C ₅ H ₉ NO ₄ |
| Glutaminas | Gln | Q | 146.15 | C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ |
| Glicinas | Gly | G | 75.07 | C ₂ H ₅ NO ₂ |
| Histidinas | His | H | 155.16 | C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ |
| Hidroksiprolinas | Hyp | O | 131.13 | C ₅ H ₉ NO ₃ |
| Izoleucinas | Ile | I | 131.18 | C ₆ H ₁₃ NO ₂ |
| Leucinas | Leu | L | 131.18 | C ₆ H ₁₃ NO ₂ |
| Lizinas | Lys | K | 146.19 | C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ |
| Metioninas | Met | M | 149.21 | C ₅ H ₁₁ NO ₂ S |
| Fenilalaninas | Phe | F | 165.19 | C ₉ H ₁₁ NO ₂ |
| Prolinas | Pro | P | 115.13 | C ₅ H ₉ NO ₂ |
| Serinas | Ser | S | 105.09 | C ₃ H ₇ NO ₃ |
| Treoninas | Thr | T | 119.12 | C ₄ H ₉ NO ₃ |
| Triptofanas | Trp | W | 204.23 | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ |
| Tirozinas | Tyr | Y | 181.19 | C ₉ H ₁₁ NO ₃ |
| Valinas | Val | V | 117.15 | C ₅ H ₁₁ NO ₂ |

2 priedas. Apklauso anketa

Kvapo intensyvumas – 1 silpnas – 7 stiprus

Pašalinis kvapas – kvapas, nebūdingas tipiškam duonos, grūdų kvapui. 1 silpnas – 7 stiprus

Pašalininis skonis – skonis, nebūdingas tipiškam kvietinės duonos skoniu. 1 silpnas – 7 stiprus

Trupumas - 1 mažas – 7 didelis

Sausumas – sausas, jeigu norint nuryti mėginį, jį reikia gerai sudrėkinti seilėmis. 1 drėgnas – 7 sausas

Skonio intensyvumas – skonio, būdingo kvietinei duonai, intensyvumas. 1 silpnas – 7 stiprus

Priimtinumumas. 1 mažas – 7 didelis

| Nr 1. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Kvapo intensyvumas | | | | | | | |
| Pašalinis kvapas | | | | | | | |
| Pašalininis skonis | | | | | | | |
| Trupumas | | | | | | | |
| Sausumas | | | | | | | |
| Skonio intensyvumas | | | | | | | |
| Priimtinumumas | | | | | | | |

| Nr 2. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Kvapo intensyvumas | | | | | | | |
| Pašalinis kvapas | | | | | | | |
| Pašalininis skonis | | | | | | | |
| Trupumas | | | | | | | |
| Sausumas | | | | | | | |
| Skonio intensyvumas | | | | | | | |
| Priimtinumumas | | | | | | | |

| Nr 3. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Kvapo intensyvumas | | | | | | | |
| Pašalinis kvapas | | | | | | | |
| Pašalininis skonis | | | | | | | |
| Trupumas | | | | | | | |
| Sausumas | | | | | | | |
| Skonio intensyvumas | | | | | | | |
| Priimtinumumas | | | | | | | |

| Nr 4. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Kvapo intensyvumas | | | | | | | |
| Pašalinis kvapas | | | | | | | |
| Pašalininis skonis | | | | | | | |
| Trupumas | | | | | | | |
| Sausumas | | | | | | | |
| Skonio intensyvumas | | | | | | | |
| Priimtinumumas | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr 5. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Kvapo intensyvumas | | | | | | | |
| Pašalinis kvapas | | | | | | | |
| Pašalininis skonis | | | | | | | |
| Trupumas | | | | | | | |
| Sausumas | | | | | | | |
| Skonio intensyvumas | | | | | | | |
| Priimtinumumas | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr 6. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Kvapo intensyvumas | | | | | | | |
| Pašalinis kvapas | | | | | | | |
| Pašalininis skonis | | | | | | | |
| Trupumas | | | | | | | |
| Sausumas | | | | | | | |
| Skonio intensyvumas | | | | | | | |
| Priimtinumumas | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr 7. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Kvapo intensyvumas | | | | | | | |
| Pašalinis kvapas | | | | | | | |
| Pašalininis skonis | | | | | | | |
| Trupumas | | | | | | | |
| Sausumas | | | | | | | |
| Skonio intensyvumas | | | | | | | |
| Priimtinumumas | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr 8. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Kvapo intensyvumas | | | | | | | |
| Pašalinis kvapas | | | | | | | |
| Pašalininis skonis | | | | | | | |
| Trupumas | | | | | | | |
| Sausumas | | | | | | | |
| Skonio intensyvumas | | | | | | | |
| Priimtinumumas | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr 9. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Kvapo intensyvumas | | | | | | | |
| Pašalinis kvapas | | | | | | | |
| Pašalininis skonis | | | | | | | |
| Trupumas | | | | | | | |
| Sausumas | | | | | | | |
| Skonio intensyvumas | | | | | | | |
| Priimtinumumas | | | | | | | |