



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

**Imobilizavimo sistemos iš ryžių sėlenų ir bruknių išspaudų
antimikrobinių mikroorganizmų stabilumo užtikrinimui
kūrimas ir įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas

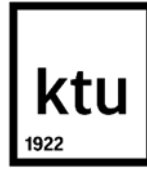
Žydrūnė Gaižauskaitė

Projekto autorė

Dr. Daiva Žadeikė

Vadovė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

**Imobilizavimo sistemos iš ryžių sėlenų ir bruknių išspaudų
antimikrobinių mikroorganizmų stabilumo užtikrinimui
kūrimas ir įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Žydrūnė Gaižauskaitė

Projekto autorė

Dr. Daiva Žadeikė

Vadovė

Doc. dr. Joana Solovjova

Recenzentė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Žydrūnė Gaižauskaitė

Imobilizavimo sistemos iš ryžių sėlenų ir bruknių išspaudų antimikrobinių mikroorganizmų stabilumo užtikrinimui kūrimas ir įvertinimas

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Žydrūnės Gaižauskaitės, baigiamasis projektas tema „Imobilizavimo sistemos iš ryžių sėlenų ir bruknių išspaudų antimikrobinių mikroorganizmų stabilumo užtikrinimui kūrimas ir įvertinimas“ 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.

Žydrūnė Gaižauskaitė

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

_____ (parašas)

Gaižauskaitė, Žydrūnė. Imobilizavimo sistemos iš ryžių sėlenų ir bruknių išspaudų antimikrobinių mikroorganizmų stabilumo užtikrinimui kūrimas ir įvertinimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovė dr. Daiva Žadeikė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės Technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: imobilizavimas, sėlenos, uogų išspaudos, ultragarsas, gelio tipo produktas.

Kaunas, 2020. 54 p.

Santrauka

Bioaktyvios imobilizavimo sistemos yra nauja technologijos koncepcija, padedanti funkcinių maisto produktų gamyboje, kuriuose bioaktyvūs komponentai yra imobilizavimo medžiagoje arba yra imobilizuojami, norint sukurti saugų ir pasižymintį konkrečiomis savybėmis maisto produktą. Projekto tikslas buvo ištirti pieno rūgšties bakterijų (PRB) imobilizavimo galimybes ryžių sėlenų ir bruknių uogų išspaudų matricoje, užtikrinant didžiausią mikroorganizmų stabilumą ir antimikrobinį aktyvumą laikymo metu ir atsipalaidavimą imituotomis virškinimo sąlygomis. Darbo uždaviniai buvo nustatyti ryžių sėlenų (RS) apdorojimo ultragarsu sąlygas efektyviam virškinimui atsparaus krakmolo (VAK) susidarymui, įvertinti apdorojimo ultragarsu (UG), bruknių išspaudų (BR) priedo ir stabilizatorių įtaką atrinktų antimikrobinių PRB gyvybingumui ir antimikrobiniam aktyvumui, įvertinti RS-BR gelio tipo matricų ir PRB stabilumą laikant ir imobilizuotų PRB atsipalaidavimą imituotomis virškinimo sąlygomis. Nustatyta, kad optimalios apdorojimo UG (850 kHz) sąlygos efektyviam VAK susidarymui ryžių sėlenose yra: galia 2 W/cm²; trukmė 20 min, temperatūra 40 °C. Šiomis sąlygomis galima gauti 11,79 mg/100 g VAK. Ryžių sėlenų apdorojimas UG ir BR 10–50 % priedas 11% padidino tirtų PRB ląstelių skaičių ir lėtino jo mažėjimą žūties fazėje. Tyrimai parodė, kad didžiausiu antimikrobiniu aktyvumu prieš penkis indikatorinius mikroorganizmus pasižymėjo *L. brevis* LUHS173 (slopinti 5 patogenai) ir *P. pentosaceus* LUHS100 (slopinti 4 patogenai) metabolitai. Stabiliausia RS-BR gelio tekstūra gauta, naudojant natrio alginatą (kietumo ir konsistencijos vertės, atitinkamai 5,2 N ir 27,8 N·s), lyginant su agaru ir ksantano guma (atitinkamai 3 N ir 13,9 N·s). Nustatyta, kad RS-BR gelių stabilumui ir imobilizuotų PRB ląstelių gyvybingumui laikant reikšmingą įtaką ($p < 0,05$) turėjo temperatūra ir stabilizatoriaus rūšis. Didžiausias ląstelių skaičiaus sumažėjimas laikymo periodo pabaigoje nustatytas RS-BR gelyje su ksantanu (2,46 log KSV/g), o stabiliausiai PRB ląstelės išsilaikė, imobilizavus gelyje su alginatu (pokytis 0,76 log KSV/g). Imobilizuotų PRB stabilumui imituotomis virškinimo sąlygomis reikšmingą įtaką turėjo terpė ir naudotas stabilizatorius. Mažiausiu stabilumu šioje terpėje pasižymėjo geliai su agaru (išsiskyręs iš gelio ląstelių skaičius vidutiniškai 7,35 log KVS/ml, o didžiausiu – geliai su alginatu (išsiskyrusių ląstelių skaičius terpėje 4,03 log KVS/ml). Žarnyno aplinką imituojančioje terpėje (pH 7,5), išsiskyrusių gyvybingų ląstelių skaičius sudarė papildomai vidutiniškai 9 %. Mažiausiu stabilumas šioje terpėje nustatytas gelių su ksantanu (vidutiniškai 4,38 log KVS/ml). Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad rudųjų ryžių sėlenų su didesniu atsparus virškinimui krakmolo kiekiu ir bruknių uogų išspaudų matrica gali užtikrinti imobilizuotų mikroorganizmų ląstelių stabilumą, apsaugant nuo aplinkos poveikio laikymo metu (likusių ląstelių skaičius gelyje sudarė vidutiniškai 6,01 log KVS/g) ir nuo greito suirimo virškinimo sąlygomis, taip užtikrinant tolygų jų išsiskyrimą t.y. turintis potencialų teigiamą poveikį sveikatai.

Gaižauskaitė, Žydrūnė. Development of Immobilization System Based on Rice bran and Lingonberry Press-Cake for Preservation of Antimicrobial Microorganisms. Master's Final Degree Project / supervisor dr. Daiva Žadeikė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: immobilization, brans, berry press cake, ultrasonication, gel-type product.

Kaunas, 2020. 54 p.

Summary

Bioactive immobilization systems are a new technology concept that aids in the production of functional foods in which bioactive components are present in the immobilizing material or are immobilized to create a safe food product with specific properties.

The aim of the project was to immobilize lactic acid bacteria with antimicrobial properties in the matrix of rice bran and lingonberry press cake, ensuring the highest bioactivity and stability of microorganisms during storage and release under simulated digestive conditions. The objectives of the project - to determine the conditions of ultrasound treatment (US) of rice bran (RB) for efficient production of resistant starch (RS), and evaluate the influence of US, lingonberry press cake (BR) additive and stabilizers on the viability and antimicrobial activity of selected antimicrobial PRBs. Also, the evaluation of the stability of RB-BR gel-type matrices and immobilized PRB during storage and their release under simulated digestive conditions was carried out. Results showed that the optimal conditions for US treatment (850 kHz) for efficient RS formation in rice bran were as follows: power 2 W/cm²; duration 20 min., temperature 40 °C. Under these conditions, a quantity of 11,79 mg/100 g of RS can be obtained. US treatment of RB and the addition of BR of 10–50 % increased the number of tested LAB on average by 11%, and improved their antimicrobial activity. The metabolites of *L. brevis* LUHS173 and *P. pentosaceus* LUHS100 (5 and 4 inhibited pathogens from 5 in total) had the highest antimicrobial activity against the five tested indicator microorganisms. The most stable RS-BR gel texture was obtained using sodium alginate (hardness and consistency values, 5.2 N and 27.8 N·s, respectively) compared to agar and xanthan gum (3 N and 13.9 N·s, respectively). It was found that the storage time and temperature, and type of stabilizer had a significant effect ($p < 0.05$) on the stability of RS-BR gels and the viability of immobilized LAB. The largest decrease in cell number at the end of the storage period was observed in the RS-BR gel with xanthan gum (2.46 log CFU/g), and the most stable cells were maintained after immobilization in the alginate gel (change of 0.76 log CFU/g). The stability of immobilized LABs under simulated digestive conditions was significantly affected by the medium and the stabilizer used. Gels with agar had the lowest stability in this medium (average number of cells released from the gel was 7.35 log CFU/ml, and gels with alginate were of the highest stability (number of cells released in the medium was 4.03 log CFU/ml). medium (pH 7.5), the number of viable cells released averaged 9%, and the lowest stability in this medium was found in gels with xanthan (average 4.38 log CFU/ml). In summary, it can be concluded that brown rice bran with a higher content of resistant starch and a lingonberry pulp matrix can ensure the stability of immobilized LAB, protecting against environmental influences during storage (the number of remaining cells in the gel averaged 6.01 log CFU/g) and rapid degradation under digestive conditions, thus ensuring their uniform release, having a potential positive effect on health.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	8
Įvadas.....	9
1. Literatūros apžvalga	11
1.1. Agro-pramoniniai atliekų srautai ir jų panaudojimo galimybės	11
1.2. Ryžių malimo atliekų funkciniai komponentai ir jų panaudojimas	12
1.3. Bruknių uogų veiklieji komponentai ir jų funkcinės savybės.....	16
1.4. Probiotiniai mikroorganizmai ir jų įtaka maisto saugai	18
1.5. Ultragarso taikymas maisto pramonėje.....	19
1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas.....	21
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	22
2.1. Medžiagos ir mikroorganizmai	22
2.2. Metodai.....	22
2.2.1. Drėgmės kiekio nustatymas.....	22
2.2.2. Tirpių sacharidų nustatymas	22
2.2.3. Kiekybinis pektino nustatymas	22
2.2.4. Bendro fenolinių junginių (BFJ) kiekio ir antioksidacinio aktyvumo nustatymas BR išspaudose.....	23
2.2.5. VAK gamyba, taikant ultragarso	23
2.2.6. Atsparaus virškinimui krakmolo nustatymas.....	24
2.2.7. Imobilizavimo sistemų struktūros modeliavimas	24
2.2.8. Gelių tekstūros analizė.....	24
2.2.9. Žaliavos fermentavimas	25
2.2.10. Bendro mikroorganizmų skaičiaus nustatymas	25
2.2.11. pH ir bendro titruojamojo rūgštingumo nustatymas	25
2.2.12. Pieno ir acto rūgščių kokybinė ir kiekybinė analizė	26
2.2.13. PRB antimikrobinio aktyvumo nustatymas	26
2.2.14. PRB ląstelių imobilizavimo į RS-BR modelinę sistemą procedūra.....	26
2.2.15. Gelio stabilumo tyrimo laikymo metu procedūra	27
2.2.16. Gelių stabilumo imituotoms virškinimo trakto sąlygoms tyrimas.....	27
2.2.17. Duomenų matematinis statistinis apdorojimas	27
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	28
3.1. Pagrindiniai ryžių sėlenų ir bruknių išspaudų sudėties komponentai	28
3.2. Virškinimui atsparaus krakmolo gamybos ryžių sėlenose optimizavimas	29
3.3. Pieno rūgšties bakterijų antibakterinio aktyvumo įvertinimas ir aktyviausių mikroorganizmų parinkimas	30
3.4. Bruknių išspaudų priedo įtaka rūgštingumo ir bioaktyvumo pokyčiams ryžių malimo šalutinių produktų fermentacijos terpėje	32
3.4.1. Rūgštingumo pokyčiai RS-BR terpėje, fermentuojant atrinktomis PRB	32

3.4.2. Apdorotų ultragarsu (UG) ryžių sėlenų (RS) ir bruknių išspaudų (BR) priedo įtaka atrinktų PRB antimikrobinėms savybėms.....	34
3.5. Stabilizatorių įtakos ryžių sėlenų (RS) ir bruknių išspaudų (BR) modelinės sistemos stabilumui įvertinimas	38
3.6. RS-BR gelių stabilumo ir imobilizuotų pieno rūgšties bakterijų bioaktyvumo tyrimai laikymo metu	40
3.7. RS-BR gelių stabilumo imituotomis virškinimo <i>in vitro</i> sąlygomis tyrimai	41
4. Rekomendacijų dalis.....	44
Išvados	46
Literatūros sąrašas	48

Santrumpų ir terminų sąrašas

V/U – vaisiai/uogos

VAK – virškinimui atsparus krakmolas

VK – virškinamas krakmolas

FOS – fruktooligosacharidai

MRS – De Man, Rogosa ir Sharpe (mitybinė terpė)

PRB – pieno rūgšties bakterijos

RS – ryžių sėlenos

BR – bruknių išspaudos

AA – antioksidacinis aktyvumas

BMS – bendras mikroorganizmų skaičius

BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis

UG – ultragarsas

R200 – ryžių sėlenų frakcija 200 μm

R500 – ryžių sėlenų frakcija 500 μm

Įvadas

Bioaktyvios imobilizavimo sistemos yra nauja technologijos koncepcija, padedanti funkcinių maisto produktų gamyboje, kuriuose bioaktyvūs komponentai yra imobilizavimo medžiagoje arba yra imobilizuojami, norint sukurti saugų ir pasižymintį konkrečiomis savybėmis maisto produktą. Turtingos vertingais antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčiais junginiais (pvz. epikatechinas, kvercetas, chlorogeninė rūgštis, protokatecho rūgštis, ferulo rūgštis, florizinas, ir pan.) [1,2] vaisių/uogų (V/U) išspaudos galėtų būti panaudotos funkcionaliųjų produktų gamybai, tai ne tik sumažintų tokių atliekų srautus, bet ir prisidėtų prie taršos pramoninėmis atliekomis mažinimo problemos sprendimo.

Augalų biologiškai veikliųjų medžiagų junginiai turi platų teigiamą poveikį žmogaus organizmui, veikdami kaip skirtingo tipo antioksidantai, fermentų veiklos modulatoriai. Taip pat, moksliniais tyrimais įrodyta [3], kad pektinas yra potencialus prebiotikas, didinantis naudingų bakterijų augimą žarnyne – vertingas šalutinis produktas, kurį galima gauti iš V/U atliekų. Be to, V/U veikliųjų junginių bei antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių mikroorganizmų simbiotinių ryšių derinimas, kuriant naujas maisto technologijas, būtų pažangi priemonė, kuri padėtų užtikrinti maisto saugą, ir būtų pritaikoma su tuo susijusių rizikų valdymui.

Probiotiniai mikroorganizmai turi didelę įtaką normaliai organizmo veiklai. Tyrimai rodo, jog mikrofloroje veikiantys probiotikai yra siejami su sklandžia visos virškinimo sistemos veikla bei normalios mikrobiotos palaikymu, turi didelę įtaką imunitetui, infekcinėmis ligomis ir maisto alergijų prevencijai, žarnyno ligų simptomų palengvinimui [4,5]. Probiotikų poveikis siejamas ir su cholesterolio kiekio mažinimu kraujyje [6]. Moksliniais tyrimais nustatyta, jog probiotiniai mikroorganizmai dalyvauja vitamino K, B grupės vitaminų – biotino (B7), kobalamino (B12), folio rūgšties (B9), niacino (B3), pantoteno rūgšties (B5), piroksidino (B6), riboflavino (B2) ir tiamino (B1) sintezėje žmogaus organizme [7].

Sukurtos imobilizavimo sistemos užtikrintų mikroorganizmų funkcionalumą ir stabilumą, išlaikant antimikrobines savybes produkte. Tačiau produktų, turtingų augalų polisacharidais, gamybą riboja nepakankama sudėtinių komponentų (baltymų, polisacharidų) dispersija dėl mažo tirpumo. Ultragarso kavitacija yra viena iš inovatyvių priemonių, pastaruoju metu taikomų įvairių augalinių substratų stabilizavimui, mikroorganizmų fermentinių sistemų aktyvinimui ir vertingų ingredientų efektyvesniam išgavimui. Ultragarso taikymas baltymų ir polisacharidų dispersijos apdorojimui galėtų būti inovatyvi strategija, pagerinanti tokių sistemų struktūrą.

Darbo tikslas – ištirti pieno rūgšties bakterijų (PRB) imobilizavimo galimybes ryžių sėlenų ir bruknių uogų išspaudų matricoje, užtikrinant didžiausią mikroorganizmų stabilumą ir antimikrobinį aktyvumą

Darbo uždaviniai:

1. ryžių sėlenų (RS) apdorojimo ultragarsu sąlygų nustatymas efektyviam virškinimui atsparaus krakmolo (VAK) susidarymui.
2. įvertinti tiriamų pieno rūgšties bakterijų (PRB) gyvybingumą ir antibakterinį aktyvumą RS terpėje, parenkant aktyviausius mikroorganizmus.
3. bruknių išspaudų (BR) priedo įtakos atrinktų PRB gyvybingumui ir antimikrobiniam aktyvumui įvertinimas ir optimalaus komponentų santykio parinkimas RS – BR matricoje.

4. PRB imobilizavimas gelio tipo RS-BR matricoje, įvertinant RS – BR gelio tipų matricų ir PRB stabilumą laikant ir imobilizuotų PRB atsipalaidavimą imituotomis virškinimo sąlygomis.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Agro-pramoniniai atliekų srautai ir jų panaudojimo galimybės

Šiuo metu visuomenė susiduria su naujais iššūkiais, vienas iš jų – didelis maisto gamybos atliekų kiekis, kuris kelia vis didesnį susirūpinimą, todėl ieškoma būdų sušvelninti neigiamą ekologinį ir socialinį ekonominį poveikį [8]. Augalinės kilmės atliekose, kurios sudaro didesnę pramonėje susidarančių maisto perdirbimo atliekų dalį (63%), yra vertingų funkcinėmis savybėmis pasižyminčių medžiagų, tokių kaip flavonoidai, vaškai, biopolimerai ar riebalų rūgštys. Susidariusios antrinės maisto medžiagos gali būti naudojamos biokuro ar biopolimerų gamybai, taip pat cheminių ir biologiškai aktyvių medžiagų išskyrimui ir gryninimui [9]. Įrodyta, kad biomasės atliekų perdirbimas ir pagrindinių cheminių junginių išskyrimas būtų 7,5 karto pelningesni, nei jų perdirbimas į gyvūnų pašarus ar kurą [10]. Tačiau, naudojant šią žaliavą elektros energijai (per anaerobinį skaidymą) ar kurui (celiuliozinę biomasę paverčiant bioetanoliu) gaminti arba panaudojant pašarų gamybai, naudingos antrinių maisto žaliavų funkcijos prarandamos arba, geriausiu atveju, nepakankamai panaudojamos.

Pramonės atliekų valorizacijos būdai biorafinavimo grandinėse apima aukštos mitybinės vertės komponentų, jau esančių žaliavose, ekstrahavimą ir gryninimą, polimerinių medžiagų išskyrimą, naudojant cheminius ar biologinius procesus, ir jų panaudojimą kitų produktų praturtinimui ar farmacijos pramonėje. Dėl šių priežasčių biologinio perdirbimo grandinėms reikalingi dideli agrarinių ir pramoninių atliekų srautai, kur, norint išgauti ar gaminti konkrečius produktus, reikalinga užtikrinti substrato vienodumą ir tiekimo stabilumą [8]. Tinkamai tvarkant maisto pramonės ir žemės ūkio sektoriaus atliekas, gali būti įgyvendinta daugybė sprendimų, ne tik mažinant atliekų neigiamą poveikį, bet ir kuriant pridėtinės vertės turinčius produktus. Funkcionalaus maisto poreikis auga visame pasaulyje dėl vartotojų domėjimosi sveika mityba, kuri yra svarbus veiksnys, užtikrinant populiacijos sveikos gyvensenos poreikius bei valdant įvairių susirgimų rizikas.

Padidėjęs vartotojų supratimas apie maistingos dietos ir sveikatos bei gerovės santykį yra viena iš naujų maisto produktų, turinčių vertingų maistinių savybių, populiarumo priežasčių, ir tai paskatino naujų technologijų ir ingredientų paiešką. Bioaktyvios imobilizavimo sistemos yra nauja technologijos koncepcija funkcionalių maisto produktų gamyboje, kai bioaktyvūs komponentai yra imobilizavimo medžiagoje arba yra imobilizuojami, norint sukurti saugų ir pasižymintį konkrečiomis savybėmis maisto produktą. Vaisių/uogų (V/U) išspaudos, turtingos antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčiais junginiais, tokiais kaip, pvz. epikatechinas, kvercetas, chlorogeninė rūgštis, protokatecho rūgštis, ferulo rūgštis, florizinas, ir pan.), galėtų būti panaudotos funkcionaliųjų produktų gamybai, tai ne tik sumažintų V/U perdirbimo atliekų srautus, bet ir prisidėtų prie taršos pramoninėmis atliekomis mažinimo problemos sprendimo [1,2]. Taip pat, moksliniais tyrimais įrodyta [3], kad pektinas yra potencialus prebiotikas, didinantis naudingų bakterijų augimą žarnyne – vertingas šalutinis produktas, kurį galima gauti iš V/U atliekų.

Augalų biologiškai veikliųjų medžiagų junginiai turi platų teigiamą poveikį žmogaus sveikatai, veikdami kaip antioksidantai ar/ir fermentų veiklos modulatoriai. Be to, V/U veikliųjų junginių bei antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių mikroorganizmų simbiotinių ryšių derinimas, kuriant naujas maisto technologijas, būtų pažangi priemonė, kuri padėtų užtikrinti maisto saugą, ir būtų pritaikoma su tuo susijusių rizikų valdymui.

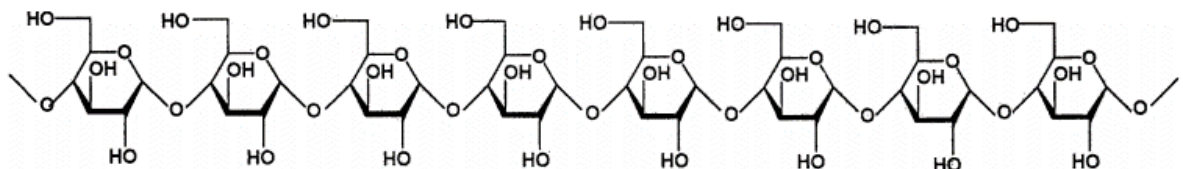
1.2. Ryžių malimo atliekų funkciniai komponentai ir jų panaudojimas

Pastaraisiais metais ryžių sėlenos sulaukia vis didesnio dėmesio, nes yra plačiai prieinamos, pigios ir turtingos maistinėmis medžiagomis, tokiomis kaip baltymai, riebalai, angliavandeniai, ir maistinės skaidulos. Ryžių sėlenų cheminė sudėtis priklauso nuo ryžių genotipo, auginimo sąlygų ir perdirbimo būdo. Ryžių sėlenos – išorinis ryžių grūdų sluoksniu – sudaro 8–10% viso grūdo svorio, tačiau jame yra dauguma maistinių medžiagų: angliavandenių (34–62%), lipidų (15–20%), baltymų (11–15%), ląstelienos (7–11%) ir mineralinių medžiagų (7–10%). Pagal literatūrą, ryžių lipidai ir bioaktyvūs komponentai yra sukonzentruoti ryžių sėlenose [11, 12]. Ryžių sėlenose vyrauja tokios riebalų rūgštys, kaip palmitino (21–26%), linoleno (31–33%) ir oleino (37–42%). Be to, dėl didelio polinesočiųjų riebalų rūgščių kiekio, ryžių sėlenos laikomos sveiku maistu [12]. Ryžių sėlenose nustatyta nemažai bioaktyvių junginių, tokių kaip γ -orizanolis, tokotrienolis, tokoferolis ir α -sitosterolis, taip pat maistinių skaidulų, tokių kaip α -gliukanas, pektinas ir derva [13], iš kurių γ -orizanolis, pagrindinis antioksidantas esantis ryžių sėlenose, turi 10 kartų didesnę antioksidacinę aktyvumą (AA), o tokotrienolis turi 40–60 kartų didesnę AA, nei tokoferolis. Tačiau šių fitochemikalų proporcijos skiriasi, priklausomai nuo ryžių veislės [14]. Be to, ryžių sėlenose yra 4-hidroksi-3-metoksicinaminės rūgšties (FA), turinčios toksinus slopinantį ir antioksidacinį poveikį [14, 15].

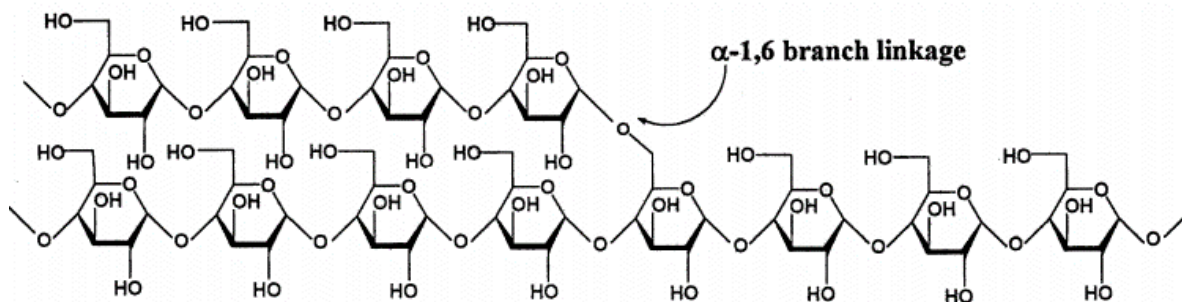
Ryžių sėlenos dažnai perdirbamos, stabilizuojant, frakcionuojant, hidrolizuojant fermentais arba fermentuojant. Tokiais būdais apdorotos ryžių sėlenos vadinamos funkcinėmis sėlenomis. Ryžių sėlenose esančių bioaktyviųjų komponentų identifikavimas sustiprina jų, kaip funkcionalaus maisto, statusą. Eksperimentai parodė, kad fermentais apdorotos ryžių sėlenos pagerina kraujospūdį, lipidų profilį ir gliukozės metabolizmą. Be to, papildant maistą adenzinu, aktyviu funkcinėmis sėlenų komponentu, sumažinama insulto rizika [16], o ferulinės rūgšties priedas normalizuoja kraujospūdį ir lipidų profilį [15].

1.2.1. Virškinimui atsparus krakmolas (VAK), jo savybės ir panaudojimas

Krakmolas – natūralus polimeras plačiai randamas gamtoje, maistui naudojamuose augaluose, bei vienas pagrindinių angliavandenių žmonių kasdienėje mityboje (kiti – cukrus ir maitinės skaidulios). Tai grūdėliai sudarytos iš dviejų polisacharidų – amilozės, linijinio polimero sudaryto iš α -D-gliukopiranozių sujungtų α -1,4-gliukozidinais ryšiais, ir amilopektino, šakotos struktūros polimero, kurio α -D-gliukopiranozių monomerai jungiasi α -1,4-gliukozidinais ryšiais ir šoninės grandinės prijungtos α -1,6-glikozidinais ryšiais.



1.1 pav. Amilozės molekulinis segmentas



1.2 pav. Amilopektino molekulės segmentas.

Vienas iš ryžių sėlenų funkcionaliųjų komponentų galėtų būti virškinimui atsparus krakmolas, kuris plačiai naudojamas kaip funkcinis ingredientas, ypač maisto produktuose, kuriuose yra didelis maistinių skaidulų kiekis.

Virškinimui atsparus krakmolas (VAK) – tai dalis mitybai suvartojamo krakmolo, kuri nėra skaidoma virškinamojo trakto fermentų plonajame žarnyne ir pasiekia storąjį žarnyną, kur gali būti sufermentuotas žarnyno mikrofloros [17]. Pagal savo struktūrą ir savybes VAK yra skirstomas į 5 tipus:

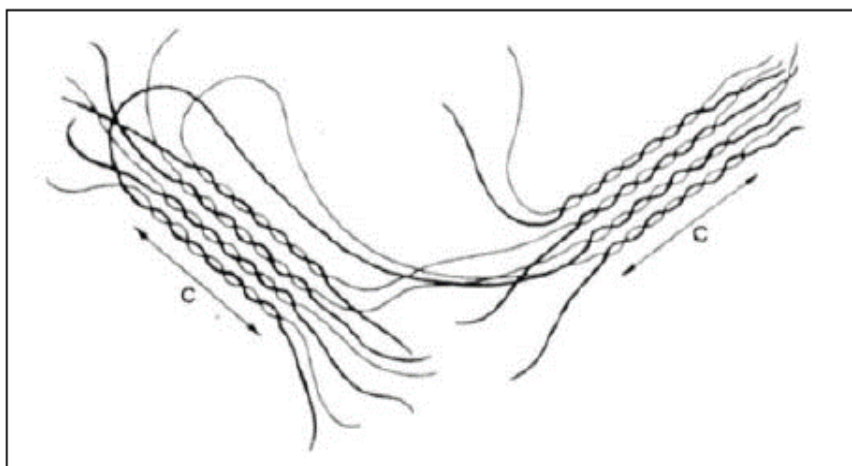
- VAK1 – neprieinamas krakmolas, esantis pluoštiniame apvalkale (pvz.: sveikų ar nepilnai sumaltų javų grūduose);
- VAK2 – kai kurių augalų (kukurūzų, nevirtų bulvių, nesunokusių bananų) termiškai nepadoroto krakmolo granulės, turinčios didelį kiekį amilozės;
- VAK3 – retrogradavęs krakmolas. Dėl retrogradacijos daugiau termostabilių struktūrų sudaro amilozė, o ne amilopektinas. Tokiu būdu pagaminto atsparaus krakmolo kiekis padidėja kartu su padidėjusiu amilozės kiekiu krakmole.
- VAK4 – chemiškai modifikuotas krakmolas [18];
- VAK5 – amilozės – lipidų kompleksai [19].

VAK1 rūšies atsparus krakmolas, esantis augalų ląstelėse, kurių sienelė nesuardyta mechaninėmis jėgomis (pvz.: nepilnai sumaltų grūdų). Toks krakmolas yra nesuskaidomas amilolitinių virškinimo fermentų, nes žmogaus virškinimo sistema neturi fermentų, skaidančių augalinių ląstelių sienelių komponentus – ligniną, celiuliozę, hemiceliuliozę ir kt. [20].

VAK2 rūšies atsparus krakmolas – tai kai kurių rūšių augalų neapdoroto termiškai krakmolo granulės. Neapdoroto krakmolo atsparumas amilolitiniams fermentams dar nėra pilnai ištirtas. Žalio bulvių krakmolo atsparumas siejamas su didžiulėmis granulėmis, taigi ir ribotu jų prieinamumu fermentams. Vis dėlto, smulkių granuliuotų kukurūzų krakmolas, turintis didelį amilozės kiekį, rodo tą patį atsparumą fermentų poveikiui. Bulvių krakmolas turi gana didelį amilopektino kiekį ir didelį kristalizacijos laipsnį. Amilolitiniai fermentai pirmiausia paveikia amorfinius regionus, taigi krakmolo granuliuotumas yra pagrindinė jų atsparumo fermentams priežastis. Padidinus krakmolo suspensijos temperatūrą, padidėja vandens išsiskverbimas į granuliuotą vidų, padidėja granuliuotų dydis. Vandeningieji ryšiai suardomi, o vandens dalelės jungiasi prie išlaisvintų hidroksilo grupių. Esant žemesnei nei krakmolo kleisterizacija temperatūrai, ji nepažeidžia granuliuotų, bet keičia jų savybes. Gautus pokyčius lemia botaninė krakmolo kilmė, kaitinimo temperatūra ir trukmė, taip pat krakmolo koncentracija

vandeninėje suspensijoje. Skirtingų augalų rūšių krakmolo kaitinimas padidina kristališkumo laipsnį ir granulių kristalinių formų stiprumą, krakmolo grandinių išsidėstymą tiek kristaliniame, tiek amorfiniame sluoksnyje. Šie krakmolo granulių struktūros pokyčiai skatina krakmolo kleisterizacijos temperatūros padidėjimą ir padidina šio proceso entalpiją. Dėl šių pokyčių sumažėja krakmolo tirpumas ir brinkimas, padidėja granulių atsparumas amilolitinių fermentų aktyvumui [18].

VAK3 rūšies virškinimui atsparus krakmolas yra gaunamas krakmolo gelio retrogradacijos procese. VAK3 formuojantis krakmolo grūdelis yra pilnai hidratuotas. Amilozė išsilaisvina iš grūdelio vidaus į tirpalą kaip atskiri polimerai. Tirpalui vėstant, šie pavieniai polimerai tankėja, susisuka į spirales, kurias stabilizuoja susidarantys vandeniliniai ryšiai. Vykstant tolesnei retrogradacijai, pavienės spirales asocijuojasi tarpusavyje ir gali sudaryti šešiakampes struktūras [21].



1.3 pav. VAK3 krakmolas vandeniniame tirpale.

VAK4 gaunamas, chemiškai modifikuojant krakmolą. Dažniausiai vykdoma esterifikacija arba prijungiamos papildomos cheminės grupės. Šie pakitimai neleidžia virškinamojo trakto amilazėms hidrolizuoti susidariusių polimerų [22].

VAK5 gaunamas, krakmolo amilozei ir ilgoms amilopektino atšakoms sąveikaujant su riebalų rūgštimis ir formuojant spiralinius kompleksus. Šie susidarę kompleksai trukdo prisijungti fermentui, taip neleidžiama vykti fermentinei hidrolizei. Taip pat šie kompleksai mažina krakmolo grūdelių brinkimą ir didina kleisterizacijos temperatūrą [19].

VAK funkcinės savybės.

Didėjantis vartotojų informuotumas apie naudingą maistinių skaidulų vaidmenį sveikatai, padidino skaidulomis praturtintų grūdinių ir negrūdinių produktų paklausą ir gamybą. Pastaraisiais metais yra didelis susidomėjimas VAK kaip maisto priedu, nes jo fiziologinis poveikis yra panašus į maistinių skaidulų. Lyginant su tradicinėmis netirpiomis maistinėmis skaidulomis, tokiomis kaip grūdinės sėlenos, VAK turi didelį pranašumą, nes mažiau paveikia produkto juslines savybes, tekstūrą, bendrą išvaizdą, tai dažnai būna labiau priimtina vartotojams [23].

Krakmolingų maisto produktų glikemijos indeksas (GI) gali priklausyti nuo įvairių veiksnių, tokių kaip amilozės ir amilopektino santykis, natūrali krakmolo granulės kilmė, krakmolo kleisterizacijos

temperatūra, vandens kiekis ir maisto produkto perdirbimo technologija. Veiksniai, turintys įtakos GI vertei, taip pat turi įtakos ir VAK susidarymui. VAK turi lėtą glikeminį atsaką, todėl kaip maisto produkto sudėtinė dalis jis sumažina viso produkto GI, ypač jei VAK pakeičiama produkto angliavandenių dalis. Ši atsparaus krakmolo savybė pradėta taikyti maisto perdirbėjų, gaminančių produktus su dideliu kiekiu greitai pasisavinamų angliavandenių (duonos ir konditerijos pramonėje). Taigi maisto produktai, kurių sudėtyje yra VAK, lėčiau virškinami (turi mažesnę GI). Žemas GI nulemia mažesnę insulino atsaką ir ilgesnę sotumą. [24]

VAK prebiotinės savybės.

Žmogaus žarnyno mikrobiota turi įtakos bendrai savijautai. Šiuo metu didėja problema dėl blogėjančios žarnyno mikrofloros sudėties, sukeltos per didelio perdirbto maisto vartojimo populiarumo. Prebiotikai – neskaidomi viršutiniame virškinimo trakte maisto ingredientai, kurie naudingai veikia vartotojo sveikatą, selektyviai stimuliuojant storosios žarnos bakterijų augimą ir aktyvumą. Prebiotikų suvartojimas gali turėti reikšmingos įtakos gaubtinės žarnos mikrobiotai, padidinant specifinių bakterijų skaičių [25]. Prebiotikai yra nevirškinami oligosacharidai, ypač fruktooligosacharidai, jie skatina endogeninių bifidobakterijų augimą, kurios po trumpo maitinimosi prebiotikais laikotarpio išsivysto žmonių išmatose [25].

VAK nepasisavinamas plonajame žarnyne, todėl aprūpina gerąsias bakterijas skaidomais angliavandeniais. Nustatyta, kad skaidant VAK, pasigamina didesnis kiekis sviesto rūgšties, nei skaidant kitus nevirškinamus angliavandenius. Butiratas yra vienas pagrindinių epitelinių ląstelių energijos šaltinių, susijęs su gaubtinės žarnos normalia veikla, ir dalyvauja, reguliuojant imuninę sistemą, kai sergama uždegiminėmis žarnyno ligomis [26, 27].

Trumpų grandinių fruktooligosacharidai (FOS) ir VAK gali veikti sinergetiškai, padidinant laktobakterijų ir bifidobakterijų skaičių storosios žarnos turinyje. Galima išskirti keletą prebiotinių skaidulų tipų, atsižvelgiant į jų fermentavimo greitį. *In vitro* tyrimuose nustatyta, kad fermentavimo greitis priklauso nuo angliavandenių grandinės ilgio. FOS virškinimo sistemoje greitai fermentuojami dėl trumpų grandinių, o VAK skaidomas lėtai. Todėl pagal prebiotikų skaidymo kinetiką galima nustatyti žarnyno sritį, kurioje poveikis bus aiškesnis. Taigi, FOS aktyviai veiktų pirmosiose storosios žarnos dalyse, o VAK pasiekia distalinę gaubtinės žarnos dalį [28]. Tokiu būdu, funkciniai maisto produktai, kurių sudėtyje yra skirtingų tipų maisto skaidulų, storoje žarnoje gali sukelti stipresnį poveikį, reikšmingai padidinantį probiotikų kiekį, dėl ko tokia įvairiapusė sveika mityba gali duoti papildomą naudą.

VAK panaudojimas probiotinių mikroorganizmų stabilizavimui.

Vartotojai pereina nuo nesubalansuotos dietos prie sveikesnių maisto produktų ir funkcinių gėrimų, kurie teikia teigiamą naudą sveikatai, vartojimo. Didėjantis funkcionalių maisto produktų populiarumas tarp jaunimo ir vidutinio amžiaus gyventojų yra vienas pagrindinių veiksnių, lemiančių tokių produktų gamybos ir rinkos augimą.

Tarp skirtingų VAK fiziologinių vaidmenų, jo prebiotinis poveikis kelia didelį susidomėjimą. VAK kaip prebiotikas gali būti naudojamas funkciniuose maisto produktuose i) kaip fermentuojamas substratas probiotinių mikrobiotų, ypač laktobakterijų ir bifidobakterijų, augimui skatinti, ii) kaip maisto produktas, skatinantis teigiamą fiziologinį poveikį, iii) probiotikų įkapsuliavimui, siekiant pagerinti jų stabilumą [29]. VAK naudojimas mikrokapsuliavimo procesų leido išspręsti tokias

problemas, kaip terminis atsparumas, virškinimo proceso sukeliamas kontroliuojamas atpalaidavimas ir ilgas jautrių junginių tinkamumo laikas [30].

Mikroorganizmų įkapsuliavimui paprastai naudojamas 1–2% VAK ir hidrokoloido tirpalas, siekiant stabilizuoti probiotikus [31, 32]. Sultana ir kt. [32] duomenimis, komercinio VAK naudojimas bakterijų *Lactobacillus acidophilus* ir *Bifidobacterium* spp. įkapsulivimui, pagerino jų gyvybingumą jogurte, palyginti su įkapsulavimu be VAK. Iyeris ir Kailasapathy [31] naudojo kukurūzų VAK priedą imobilizavimo sistemoje, kuris užtikrino maksimalų *Lactobacillus* spp. stabilumą 3 valandų laikotarpiu, laikant pH 2,0 sąlygomis, palyginti su prebiotikais Raftiline1 ir Raftilose1. Pagal Homayouni ir kt. [33] tyrimus, įkapsulavimas, naudojant 1% VAK, reikšmingai padidino probiotinių bakterijų *Lactobacillus casei* (Lc-01) ir *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) išgyvenamumą leduose, ilgai laikant šaltyje. Be to, įkapsuliuotų probiotikų pridėjimas neturėjo reikšmingo poveikio ledų, kuriuose VAK buvo naudojamas kaip prebiotinis substratas, juslinėms savybėms. Pagal kitų mokslininkų tyrimus, analizuojant *Lactobacillus casei* ląstelių gyvybingumą jogurte 20 dienų laikymo 4 °C metu, nustatyta, kad įkapsulavimas natrio alginato su 2% VAK, padidino bakterijų skaičių jogurte 1,05 log, lyginant su neimobilizuotomis ląstelėmis [34].

Taip pat, moksliniai tyrimai rodo, kad bakterijų mikrokapsuliavimui naudojant VAK priedą, galima reikšmingai padidinti probiotikų stabilumą laikant arba reguliuoti jų atsipalaidavimą pageidaujamose virškinimo trakto vietose. Įkapsulavimas *Lactobacillus acidophilus* su 1% VAK alginto mikrokapsulėse leido išsaugoti ląstelių skaičių, suteikiantį probiotinį poveikį (< 7 log CFU/g), mažiausiai 30 dienų džiovintoje formoje, laikant kambario temperatūroje (25 °C) [35]. Ištyrus laisvų ir įkapsuliuotų *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 alginato ir VAK kapsulėse išgyvenamumą virškinimo trakte, nustatyta, kad įkapsuliuotus bakterijas (1%) į natrio alginato (2%) ir VAK (2%) mišinį, patekusių į storąją žarną gyvybingą ląstelių skaičius atitinkamai 6,48 ir 7,23 log KSV/ml, tuo tarpu laisvų bakterijų iki storosios žarnos pateko 4,6 log KSV/ml, toks kiekis nepakankamas probiotinei funkcijai atlikti [36].

1.3. Bruknių uogų veiklieji komponentai ir jų funkcinės savybės

Pasaulio sveikatos organizacija (PSO) pabrėžia fenolinių junginių antioksidacinio aktyvumo svarbą sveikatos problemų, tokių kaip širdies ir kraujagyslių ligos, diabetas, vėžys ir nutukimas prevencijai [37]. Be organizme gaminamų antioksidantų, šių vertingų junginių galima gauti iš išorinių šaltinių – uogų ir vaisių. Pastaraisiais metais atliekama eilė mokslinių tyrimų, siekiant iširti uogų bioaktyvius junginius, jų teikiamą naudą žmogaus sveikatai ir panaudojimą funkcinių maisto produktų gamybai.



1.4 pav. Bruknių (lot. *Vaccinium vitis-idaea*) uogos.

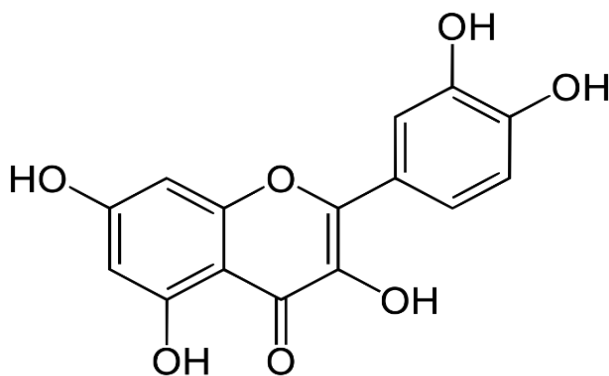
Maistiniai fenoliniai junginiai skirstomi į [38]:

- fenolines rūgštis (hidroksibenzoinės rūgštys tokios kaip galio rūgštis ir hidroksicinaminės rūgštys – ferulo, kumaro rūgštys);
- flavonoidus:
 - a) antocianinai, glikozilinti antocianidino dariniai, esantys spalvotuose vaisiuose;
 - b) antoksaninai, bespalvių junginių grupė, suskirstyti į keletą kategorijų, įskaitant flavonus, flavanus, flavonolius, flavanolius, izoflavonus ir jų glikozidus;
- taninus, vandenyje tirpius polifenolius, kurių molekulinis svoris yra nuo 500 iki 3000 Da. Jie skirstomi į kondensuotus ir hidrolizuojamus taninus ir dažnai randami kompleksuose kartu su alkaloidais, polisacharidais ir baltymais. Remiantis struktūros savybėmis, išskiriamos dvi hidrolizuojamų taninų grupės – galotaninai ir elagitaninai;
- stilbenai – tai yra 1,2-difeniletileno branduolys, turintis hidroksilo pakaitus ant aromatinių žiedų, aptinkami monomerų ar oligomerų pavidalu. Žinomiausias junginys yra trans-resveratrolis, turintis trihidroksistilbeno struktūrą.

Fenoliniai junginiai prisideda, formuojant daugelio vaisių spalvą (pvz. antocianinai) ir skonį (pvz. taninai), jų gausu įvairiose uogose, tačiau polifenolių kiekis priklauso nuo įvairių veiksnių [39].

Uogose gausu įvairių bioaktyvių junginių, tokių kaip flavonoidai, fenoliai, antocianinai, fenolio rūgštys ir taninai, taip pat maistinių junginių, tokių kaip cukrus, eteriniai aliejai, karotenoidai, vitaminai ir mineralai. Uogų bioaktyvūs junginiai turi stiprų tiek in vitro, tiek in vivo antioksidacinį, priešvėžinį, antimutageninį, antimikrobinį, priešūždegiminį ir antineurodegeneracinį poveikį [40,41].

Bruknė (*lot.* *Vaccinium vitis-idaea*, *angl.* *lingonberry*, *vok.* *Preiselbeere*) – erikinių šeimos (*Ericaceae*) augalas. Šiauriniuose kraštuose plačiai paplitusiose bruknėse (randama daug bioaktyvių junginių, tokių kaip polifenoliai, lignanai, vitaminas C, inozitoliai, triacilgliceroliai, glicerofosfolipidai, riebalų rūgštys, tokoferoliai, fitosteroliai [42]. Bruknių uogose išskiriama 28 skirtingi fenoliniai junginiai [43]. Daugiausia bruknių uogose randama antocianinų, taip pat proanthocianinų ir kvercetino turintys flavonoliai [42].



1.5 pav. Kvertecinas

Uogų fenoliai taip pat gali veikti kaip antimikrobinės medžiagos, kurios gali padėti kontroliuoti užsikrėtimus patogenais, įvertinant pastarojo meto problemas, susijusias su atsparumu antibiotikams. Antioksidantų trūkumas susijęs su lėtiniais sveikatos sutrikimais, tokiais kaip širdies ir kraujagyslių ligos, lėtiniai uždegimai, diabetas ir kitos patologijos, todėl pastarųjų vartojimo padidėjimas yra nepaprastai svarbus.

Didžioji dalis uogų bioaktyviųjų junginių antioksidacinio aktyvumo tyrimų buvo atlikta, naudojant in vitro tyrimus. Atsižvelgiant į tai, daugiau dėmesio skiriama polifenolių biologinio prieinamumo ir taip pat galimo toksiškumo tyrimams [44]. Antioksidantai sulaiko oksidacijos reakcijas organizme, pašalindami laisvuosius radikalus kaip tarpinius produktus, ir slopina kitas oksidacijos reakcijas, patys oksiduodamiesi. Polifenoliai gali veikti kaip antioksidantai. Mažas antioksidantų kiekis sukelia oksidacinį stresą ir gali pažeisti arba sunaikinti ląsteles. Manoma, kad oksidacinis stresas prisideda prie įvairių ligų, tokių kaip Parkinsono ir Alzheimerio, vystymosi. Oksidacinio streso metu, mažo tankio lipoproteinų (MTL) oksidacija suaktyvina arterogenezės procesą, kuris sukelia aterosklerozę ir galiausiai širdies ir kraujagyslių ligas [45].

Analizuojant uogų bioaktyvius junginius, nustatyta, jog fenoliniai junginiai pasižymi antimikrobinėmis poveikiu prieš patogenines bakterijas. Uogų ekstraktai daugiausia slopina gramneigiamų bakterijų augimą, tačiau neturi poveikio prieš gramteigiamas bakterijas. Bruknėse esantys fenoliniai (šviežioje bruknėse polifenolių randama 652 mg/g, flavonoidų – 74 mg/g, antocianinų – 77 mg/g) junginiai aktyviai veikia prieš gramneigiamus *E. coli* ir *P. vulgaris* [46]. Žinoma, kad šį aktyvumą lemia glikozidai arbutinas ir metilarbutinas. Bruknėse taip pat gausu benzoinės rūgšties, maisto produktuose naudojamos kaip antimikrobinė medžiaga [47]. Epidemiologiniais tyrimais nustatytas teigiamas ryšys tarp dietos, turtingos fenoliniais junginiais, ir širdies bei kraujagyslių ligų bei plaučių vėžio rizikos sumažinimo [48]. Manoma, kad polifenoliai, kurie, kaip įtariama, yra antikancerogeniniai, sulaiko tokių ląstelių augimą, sukeldami jų senėjimą arba mirtį, ir jų diferencinė redokso būklė gali selektyviai paveikti vėžines ląsteles [49].

Pagal atliktus epidemiologinius tyrimus su gyvūnais ir žmonėmis, antocianinai siejami su 2 tipo diabeto prevencija ir jo valdymu. Veikimo mechanizmai skiriasi tarp skirtingų polifenolinių junginių, tačiau iš principo apima kasos ląstelių apsaugą nuo oksidacijos, priešuždegiminį ir antioksidacinį poveikį, taip pat lėtesnį krakmolo virškinimą dėl fermentų aktyvumo slopinimo [50].

1.4. Probiotiniai mikroorganizmai ir jų įtaka maisto saugai

Viena aktualiausių maisto pramonės ir mitybos kryptių yra maisto produktų, kuriuose yra probiotinių mikroorganizmų, vystymas. Kad bakterijos būtų traktuojamos kaip probiotinės, jos turi gebėti teigiamai veikti šeimininko sveikatą; būti nepatogeniškos ir netoksiškos; išlikti gyvybingos virškinamajame trakte ar/ir maisto produktų gamybos ir laikymo metu [51, 52]. Dažniausiai naudojamos bakterijos yra pieno rūgšties bakterijos, tokios kaip *Lactobacillus* spp. ir *Bifidobacterium* spp. Taip pat dažnai naudojamos yra *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* gentys ir kt. Dauguma šių mikroorganizmų randami fermentuotuose pieno produktuose [53].

Probiotikai yra pageidautina natūrali priemonė, palaikanti sveiką žmogaus žarnyno mikrofloros pusiausvyrą. Nuolat atrandamos naujos ir specifiskesnės probiotinių bakterijų rūšys. Tačiau prieš dedant probiotines kultūras į produktus, reikia atidžiai įvertinti jų efektyvumą. Pirmiausia, probiotikų padermės privalo būti saugios žmonėms vartoti. Atrenkant naujus kamienus, pageidautina savybė yra stabilumas, veikiant rūgštims ir tulžies druskoms. Taip pat, kuriant probiotikų kompozicijas,

pageidaujami antimikrobiniu poveikiu bei atsparumu antibiotikams pasižymintys probiotikų štamai. Adhezija prie žarnyno sienelių ir kolonizacija yra reikalingos savybės, kurios yra artimai susijusios su imuniniu mikrofloros poveikiu žmogaus organizmui [54].

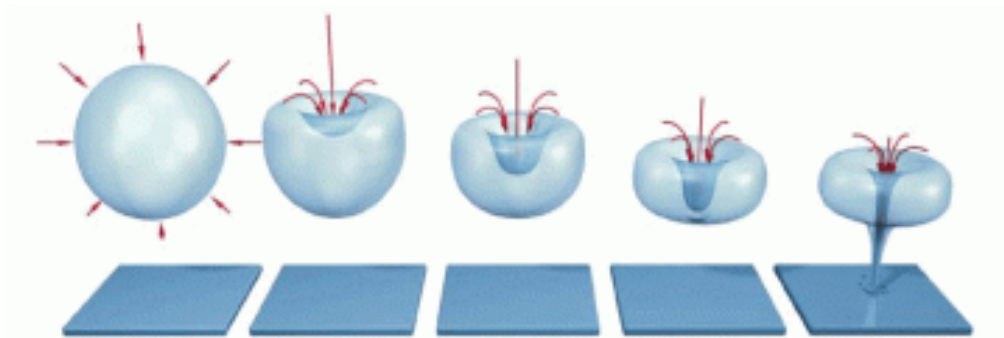
Siekiant išlaikyti sveiką žmogaus žarnyno mikroflorą, svarbus probiotinių padermių antagonistinis poveikis prieš žarnyno patogenines bakterijas, taip pat bakterijų gaminami bakteriocinai ir antriniai metabolitai, turintys inhibicinį poveikį prieš patogenus. Nors probiotiniai štamai gali gaminti bakteriocinus, jų vaidmuo patogeninių bakterijų slopinime *in vivo* gali būti ribotas, tačiau mažos molekulinės masės metabolitai (tokie kaip vandenilio peroksidas, pieno ir acto rūgštis bei kiti aromatiniai junginiai) ir antriniai metabolitai gali būti svarbesni, nes jie sudaro nepalankias sąlygas daugelio kenksmingų organizmų, tokių kaip *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium* ir *Helicobacter*, vystymuisi [55, 56].

Pastarajame dešimtmetyje reikšmingai išsiplėtė probiotikų taikymo sritys – gyvūnų auginimo, buitinės chemijos, burnos sveikatos priežiūros, kosmetikos ir asmeninės higienos srityse [57]. Maisto pramonėje probiotikai nuo seno naudojami kaip fermentuojančios kultūros bei kaip biokonservantai. Nustatyta, kad pieno rūgšties bakterijos ir jų metabolitai vaidina svarbų vaidmenį, gerinant maisto produktų mikrobiologinę būklę bei ilginant jų tinkamumo vartoti laiką [58, 59]. Todėl kuriami ir patentuojami nauji probiotikų vartojimo būdai, pavyzdžiui, probiotikų inkapsuliavimas [60, 61]. Mikrokapsuliuoti mikroorganizmai išlieka gyvybingi ilgiau, apsaugomi nuo deguonies ar drėgmės neigiamo poveikio, inkapsuliuojami kartu su prebiotinėmis medžiagomis išlaiko stabilumą transportavimo metu, taip pat gali būti naudojami siekiant užtikrinti sėkmingą žarnyno mikrofloros kolonizavimą [62].

1.5. Ultragarso taikymas maisto pramonėje

Griežtinant maisto bei aplinkos apsaugos reikalavimus, tradiciniai maisto perdirbimo būdai nebetenkina keliamų reikalavimų, todėl ieškoma ir taikoma naujos perdirbimo technologijos. Ultragarso yra viena iš greitų, plačias panaudojimo galimybes turinčių ekologiškų technologijų, pastaraisiais metais naudojamų maisto pramonėje [63]. Apdorojimas ultragarsu naudojamas įvairiose maisto technologijų srityse kristalizavimui, užšaldymui, balinimui, degazavimui, ekstrahavimui, džiovimui, filtravimui, emulsijų sudarymui, sterilizavimui, ir kt. Ultragarso kavitacija yra viena iš inovatyvių priemonių, taikomų įvairių augalinių substratų stabilizavimui, struktūrizavimui, mikroorganizmų fermentinių sistemų aktyvinimui ir vertingų ingredientų efektyvesniam išgavimui [64].

Platus ultragarso technologijos, kaip neterminio apdorojimo technologijos, pritaikomumas karščiui jautrių maisto produktų gamyboje, išlaikant gaminio juslines, maistines ir funkcines savybes, prailgina tinkamumo vartojimui laiką ir sumažina mikrobiologinę taršą [65], tuo pačiu skatina bioaktyvių sudedamųjų dalių ekstrakciją ir jų įsisavinamumą. Teigiamas ultragarso poveikis apima maisto konservavimo optimizavimą, atliekant terminį apdorojimą, pagerina masės pernešimą ekstrakcijos metu, prisideda struktūrizuojant produktus.



1.6 pav. Ultragarso poveikis membraninėms struktūroms.

Ultragarso panaudojimas galimas trimis skirtingais būdais [66]:

- tiesioginis poveikis produktui.
- sujungimas su kitais įrenginiais
- panardinimas ultragarso vonioje.

Augalų komponentų ekstrahavimas ultragarsu, esant žemesnei darbinei temperatūrai, apsaugo nuo termolabilių komponentų skilimo ir ekstrahuojamos medžiagos praradimo proceso metu. Ultragarso taikymas polifenolių ekstrakcijai plačiai naudojamas, analizuojant fenolio junginius įvairiose augalų matricose dėl greitesnio ekstrahavimo efektyvumo ir mažesnio tirpiklio sunaudojimo ekstrakcijos metu. Nustatyta, kad nargenino, elago rūgšties, naringino, rutino, kvercetino ir kaempferolio efektyviai ekstrakcijai iš braškių bei spanguolių užtenka mažiau nei 1,5 val., palyginti su 16 h tradiciniais hidrolizės metodais [67].

Ultragarsinis apdorojimas taip pat taikomas homogenizavimui ir emulsijų gamyboje. Kavitacijos metu susidariusiam burbului subliūkstant šalia dviejų nesimaišančių skysčių fazinio ribinio sluoksnio paviršiaus, susidaranti smūgio banga gali užtikrinti labai efektyvų dviejų sluoksnių maišymąsi. Santykinai mažomis energijos sąnaudomis gali susidaryti smulkios ir labai stabilios emulsijos. Toks apdorojimas naudojamas naftos chemijos, polimerų, chemijos, tekstilės, kosmetikos ir farmacijos ir maisto pramonėje [68].

Ultragarsas maisto pramonėje gali būti naudojamas ne tik apdorojant žaliavas perdirbimo metu, bet ir siekiant išlaikyti maisto gaminių kokybę. Nustatytas padidėjęs mikroorganizmų jautrumas ultragarsui, esant aukštesnei nei 50°C temperatūrai [69]. Didesnė temperatūra susilpnina bakterijų membraną, o tai sustiprina ultragarso kavitacijos poveikį. Mikroorganizmų inaktyvavimas ultragarsu gali padėti išlaikyti daugelio maisto produktų kokybę, atsižvelgiant į jų fizikines ir chemines savybes, spalvą ir skonį, palyginti su įprastais pasterizacijos metodais, esant daug aukštesnei temperatūrai.

Kuriant funkcionalių produktus su imobilizuotais probiotiniais mikroorganizmais, svarbu užtikrinti jų stabilumą ir išlaikyti antimikrobines savybes produkte. Tačiau produktų, turtingų augalų polisacharidais, gamybą riboja nepakankama sudėtinių komponentų (baltymų, polisacharidų) dispersija dėl mažo tirpumo. Ultragarso kavitacija yra viena iš inovatyvių priemonių, pastaruoju metu taikomų įvairių augalinių substratų stabilizavimui, mikroorganizmų fermentinių sistemų aktyvinimui ir vertingų ingredientų efektyvesniam išgavimui. Ultragarso taikymas baltymų ir polisacharidų dispersijos apdorojimui galėtų būti inovatyvi strategija, pagerinanti tokių sistemų struktūrą.

1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Pastaruoju metu, siekiant racionaliai išnaudoti resursus ir mažinti pramonėje susidarančių atliekų kiekį, ieškoma naujų būdų pridėtinės vertės gaminiams kurti. Augalinėse atliekose esančių vertingų funkcinėmis savybėmis pasižyminčių junginių panaudojimas, kuriant bioaktyvias imobilizavimo sistemas, yra vienas iš sprendimų atliekų kiekius mažinti. Tokios maisto imobilizavimo sistemos užtikrintų imobilizuotų mikroorganizmų funkcionalumą ir stabilumą, išlaikant antimikrobines savybes produkte. Tačiau produktų, turtingų augalų polisacharidais, gamybą riboja nepakankama sudėtinių komponentų (baltymų, polisacharidų) dispersija dėl mažo tirpumo. Ultragarso kavitacija yra viena iš inovatyvių priemonių, pastaruoju metu taikomų įvairių augalinių substratų stabilizavimui, mikroorganizmų fermentinių sistemų aktyvinimui ir vertingų ingredientų efektyvesniam išgavimui. Ultragarso taikymas baltymų ir polisacharidų dispersijos apdorojimui galėtų būti inovatyvi strategija, pagerinanti tokių sistemų struktūrą. Bioaktyvios imobilizavimo sistemos yra nauja technologijos koncepcija funkcionalių maisto produktų gamyboje, todėl ir toliau prasminga tęsti naujų pridėtinės vertės produktų kūrimą, valorizuojant biologiškai aktyviais junginiais turtingas augalines atliekas.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Medžiagos ir mikroorganizmai

Medžiagos. Eksperimentui naudoti rudųjų ryžių malimo šalutiniai produktai (sėlenos), gauti iš UAB „Ustukių malūnas“ (Pasvalys). Ryžių sėlenos (RS) laboratoriniu sijotuvu (EFL 300, Endcotts Ltd., JK) išfrakcionuotos į tris frakcijas pagal dalelių dydį, naudojant sietus (akučių diametras 200 µm, 315 µm ir 500 µm). Bruknių išspaudų milteliai gauti iš Lietuvos AMMC Sodininkystės ir daržininkystės instituto (Dotnuva, Lietuva).

Mikroorganizmai. Ryžių sėlenų fermentacijai naudotos pieno rūgšties bakterijos (PRB): *Pediococcus pentosaceus* LUHS100, *Lactobacillus brevis* LUHS173, *Pediococcus acidilactici* LUHS236, *Lactobacillus paracasei* LUHS244, atrinktos pagal gyvybingumą ryžių sėlenų terpėje (Jukonytė ir kt., 2018). Indikatoriniai mikroorganizmai *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* naudoti PRB antimikrobiniam aktyvumui įvertinti, gauti iš Maisto mokslo ir technologijos katedros kolekcijos.

Mikroorganizmų paruošimas. PRB kultūros, laikytos –70°C temperatūros šaldiklyje, atgaivintos, inkubuojant sterilizuotoje *MRS terpėje* (Biolife, Italija) 24 h 35°C temperatūroje anaerobinėmis sąlygomis. Indikatoriniai mikroorganizmai ruošti iš šaldytų kultūrų steriliai jas pernešus ant susitingusio nuožulnaus Nutrient agar (Liofilchem srl, Italija) ir inkubuojant 24 h 35°C temperatūroje. Užaugusios mikroorganizmų kolonijos toliau naudotos inokuliatų paruošimui tolesniems tyrimams. Po inkubacijos mėginiai laikyti 4 °C temperatūroje.

2.2. Metodai

2.2.1. Drėgmės kiekio nustatymas

Drėgmės kiekis mėginiuose nustatytas pagal LST EN ISO 712:2010 [70]. Mėginys džiovintas 130±2°C temperatūroje 45 minutes. Drėgmės kiekis išreikštas mėginio masės prieš džiovinimą ir po džiovinimo skirtumu procentais.

2.2.2. Tirpių sacharidų nustatymas

Tirpūs sacharidai žaliavoje nustatyti kolorimetriniu metodu, naudojant 3,5-dinitrosalicilo rūgšties reagentą (DNS) [71]. Mėginys (5 g) sumaišytas su 30 ml distiliuoto vandens, gautas tirpalas filtruotas per popierinį filtrą. 500 µl filtrato sumaišyta su 500 µl DNS reagento ir mišinys kaitintas 5 min. 100 °C verdančio vandens vonioje, po to atvėsintas ir praskiestas atitinkamu kiekiu dist. vandens (1:4). Gauto tirpalo absorbcija matuota spektrofotometru Genesys 10 UV-Vis (Thermo Scientific, Vokietija), esant $\lambda=540$ nm bangos ilgiui. Redukuojančių sacharidų kiekis apskaičiuotas iš gliukozės kalibracinės tiesės lygties: $y = 0,644x - 0,0096$ ($R^2 = 0,9957$) (kur: y – gliukozės koncentracija, mg/ml; x – ją atitinkanti vidutinė absorbcijos vertė) ir išreikštas mg/100 g žaliavos.

2.2.3. Kiekybinis pektino nustatymas

Metodas pagrįstas pektino ekstrakcija iš mėginių, naudojant citrinos rūgštį [72]. Tyrimui atlikti 5 ± 0,001 g mėginio sumaišyta su 125 ml dist. vandens ir pH sureguliuotas iki 2,0, naudojant 0,5 N citrinos rūgštį. Mėginys išlaikytas 70 °C temperatūroje 75 min., po to atvėsintas ir laikytas 24 h kambario temperatūroje. Pektinas išgautas, mėginį centrifuguojant (6000 aps/min, 10 min.) (Microcen, Ispanija), ir ant gauto centrifugato užpylus dvigubą kiekį 95 % etanolio, išlaikytas tamsoje (24 val., 25 °C). Mėginys filtruotas ir plautas du kartus 70 % koncentracijos etanolio tirpalu. Įlašinus

acetono, nuosėdos džiovintos 65 °C temperatūroje džiovinimo krosnyje iki pastovios masės. Pektino išeiga išreikšta procentais ir apskaičiuota pagal formulę:

$$\text{Pektino išeiga (\%)} = \frac{p_m}{i_m} \cdot 100 \%; \quad (2.1)$$

Čia: p_m – išdžiovinto pektino masė, g; i_m – išspaudų miltelių masė, g.

2.2.4. Bendro fenolinių junginių (BFJ) kiekio ir antioksidacinio aktyvumo nustatymas BR išspaudose

Mėginių ekstraktai ruošti, sumaišius 1 g mėginio su 10 ml metanolio (70 %) ir 30 min. maišyti magnetine maišykle. Gauti ekstraktai filtruoti per popierinį filtrą, filtratas naudotas tyrimui.

Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymui, 150 μ l filtrato sumaišyta su 150 μ l (0,5 N) Folin-Ciocalteu's tirpalu ir po 2 min. įpilta 2400 μ l (5 %) Na_2CO_3 tirpalo. Kontroliniai bandiniai ruošti analogiškai, vietoj ekstrakto naudojant metanolio 80 % tirpalą. Mėginiai išlaikyti 1 h tamsoje ir absorbcija matuota, esant 760 nm. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) išreikštas galo rūgšties ekvivalentu (GRE, mg galo rūgšties/g bandinio). Galo rūgšties kalibracinei tiesei sudaryti naudoti skirtingų koncentracijų (0–120 μ g/ml) standartinio galo rūgšties tirpalai. Galo rūgšties kiekis apskaičiuotas iš tiesės lygties: $y = 0,299x - 0,278$ ($R^2 = 0,990$) (kur: x – galo rūgšties koncentracija, mg/ml; y – ją atitinkanti vidutinė absorbcijos vertė), pagal kurią apskaičiuotas GRE.

Antioksidacinis aktyvumas mėginiuose nustatytas, naudojant fotometrinių DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikalų surišimo metodą. Šio metodo esmė – spektrofotometrinis reakcijos tirpalo spalvos pokyčio matavimas, redukuojantis DPPH* radikalui (t. y. reaguojant su antioksidantais, galinčiais atiduoti protoną). Gauta reakcijos tirpalo absorbcija proporcinga likusiai DPPH* koncentracijai. Antioksidaciniam aktyvumui (AA) nustatyti, 40 μ l mėginio ekstrakto sumaišyta su 1460 μ l metanolinio DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) tirpalo. Kontroliniai bandiniai ruošti, vietoj mėginio ekstrakto, naudojant 40 μ l metanolio (80 %). Po 1 h išlaikymo išmatuota tiriamųjų ir kontrolinių tirpalų absorbcija, esant 515 nm bangos ilgiui. Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{AA (\%)} = \frac{\text{Abs}_K - \text{Abs}_M}{\text{Abs}_K} \cdot 100 \quad (2.2)$$

čia Abs_K – kontrolinio tirpalo optinis tankis; Abs_M – mėginio optinis tankis.

2.2.5. VAK gamyba, taikant ultragarsą

Virškinimui atsparaus krakmolo (VAK) gamybai iš ryžių sėlenų (RS) taikytas apdorojimas aukšto dažnio (850 kHz) ultragarsu (UG) 40°C temperatūroje, keičiant apdorojimo trukmę (15–30 min.) ir UG intensyvumą (1,3 ir 2,0 W/cm²). Ultragarsinis prietaisas sudarytas iš didelio galingumo 5/1575 termostatuojamo stiklo cilindro su aukštos kokybės ultragarsinių bangų siųstuvu (Meinhardt Ultraschalltechnik, Leipziger, Vokietija). Eksperimentui atlikti, RS mėginys (10 g) sumaišytas su vandeniu santykiu 1:4 plastikiniame inde (skersmuo 30 mm, aukštis 40 mm). Sureguliuavus terpės pH iki 3,2 su 0,1 N HCl), mėginiai apdoroti ultragarsu. Po apdorojimo ultragarsu masė atvėsinta ir laikyta 24 h 4 °C temperatūroje. Po išlaikymo, nustatytas VAK kiekis, taikant *Megazyme* metodą.

2.2.6. Atsparaus virškinimui krakmolo nustatymas

Virškinimui atsparaus krakmolo (VAK) nustatymas ryžių žaliavoje atliktas, naudojant standartinį *Megazyme* testą (angl. *Resistant starch Assay procedure*). Į mėgintuvėlį su tiriamu mėginiu (500 mg) įpilama 4 ml kasos α -amilazės (10 mg/ml) ir amilogliukosidazės mišinio. Krakmolo hidrolizė atlikta, mėginius išlaikant 16 h 37°C vandens vonioje, purtant horizontaliai (200 aps/min). Po išlaikymo, į kiekvieną mėgintuvėlį įpilta po 4 ml 99% etanolio, sumaišyta magnetine maišykle ir centrifuguota (3000 aps/min; 10 min). Gautas centrifugatas nupiltas, o nuosėdos užpiltos 2 ml 50 % etanolio, ir sumaišius, užpilta dar 6 ml etanolio. Mėginiai centrifuguoti (3000 aps/min; 10 min) ir, nupylus centrifugatą, AVK nusodinimo procesas kartotas dar kartą.

AVK tyrimui, gautos I etape nuosėdos užpiltos 2 ml 2M KOH. Mėgintuvėliai maišyti magnetine maišykle ledo vonioje 20 min. Po 20 min pridėta po 8 ml 1,2 M natrio acetato buferio (pH 3,8) ir iškart įpilta 0,1 ml amilogliukozidazės ir laikyta 30 min 50°C vandens vonioje. Gautas tirpalo 0,1 ml sumaišyta su 3 ml GOPOD reagento ir šildyta 50°C vandens vonioje 20 min. Paruoštas D-gliukozės standartinis tirpalas (0,1 ml D-gliukozės (1 mg/ml) ir 3 ml GOPOD reagento) ir tuščias mėginys (0,1 ml 0,1 M natrio acetato buferio (pH 4,5) ir 3 ml GOPOD reagento).

Greitai virškinamas krakmolas (VK) nustatytas, sumaišant I ir II etape gautus centrifugatus ir praskiedus juos iki 100 ml 0,1M natrio acetato buferiu (pH 4,5). Gautas tirpalo 0,1 ml sumaišytas su 10 μ l amilogliukozidazės tirpalo (300 U/ml) ir laikytas 20 min 50°C vandens vonioje, po to įpylus 3 ml GOPOD reagento, kaitintas 20 min 50 °C vandens vonioje. Gautų tiriamųjų ir standartinių tirpalų absorbcija išmatuota, esant $\lambda=510$ nm. Virškinimui atsparaus krakmolo kiekis (VAK) ir virškinamo krakmolo (VK) kiekis apskaičiuotas pagal formulę:

$$VAK = \Delta E \times \frac{F}{W} \times 90; \quad g/100g \text{ s.m.} \quad (2.3)$$

Čia: ΔE – mėginio absorbcija; F – absorbcijos konversijos į mikrogramus koeficientas, $F = 100/D$ – gliukozės standarto absorbcijos; W – mėginio sausų medžiagų kiekis, g.

2.2.7. Imobilizavimo sistemų struktūros modeliavimas

Sudaryta modelinė sistema iš ryžių sėlenų (RS) (frakcija 200 μ m) ir bruknių uogų (BR) išspaudų miltelių, kur RS/BR santykis 1:1, pridėjus dist. vandens santykiu 1:3 (vandens temperatūra 40°C). Eksperimentui atlikti, mėginiai ruošti plastikiniame indelyje (skersmuo 50 mm; mėginio sluoksnio storis 15 mm) ir homogenizuoti 1 min. (9500 aps/min; ~1 min) (ULTRA-TURRAX, Vokietija) iki homogeniškos masės. Modelinių sistemų struktūrizavimui taikytas 20 min apdorėjimas ultragarsu 40 °C temperatūroje (dažnis 850 kHz, intensyvumas 2,0 W/cm²) (optimaliomis VAK susidarymui sąlygomis).

2.2.8. Gelių tekstūros analizė

Struktūrizuotų imobilizavimo sistemų tekstūra vertinta tekstūros analizatoriumi TA.XT2i (Stable Micro Systems, Godalmingas, JK), naudojant 10 mm skersmens cilindrinį plunžerį (penetracijos greitis 1 mm/s, penetracijos gylis 6 mm). Gelio kietumas nustatytas kaip didžiausios suspaudimo jėgos smailė. Klampumo indeksas įvertintas kaip neigiamos jėgos smailės plotas. Kohezija nustatyta kaip didžiausia neigiama jėga atitinkanti darbą, reikalingą darbiniam kūnui ištraukti iš gelio.

Imobilizavimo sistemų morfologija tirta mikroskopuojant optiniu mikroskopu „Motic BA310“ („Motic® China Group Co., Ltd.“, Kinija) ir naudojant „Motic® Images Plus“ programinę įrangą. Po vienos dienos laikymo šaldytuve (4°C) labai plonas kiekvieno mėginio sluoksnis buvo dedamas tiesiai ant optinio stiklelio. Mikrografijos buvo padarytos didinant $\times 40$.

2.2.9. Žaliavos fermentavimas

Sėlenos sterilizuotos autoklave 15 min. 121 °C temperatūroje, ir atvėsinus iki 30°C, ir 10 g mėginys sumaišytas su steriliu distiliuotu vandeniu santykiu 1:3. Vertinant bruknių priedo įtaką PRB gyvybingumui, į ryžių sėlenas (RS) pridėta skirtingi bruknių išspaudų (BR) kiekiai (10, 20, 30, 40, ir 50 % nuo bendros sausųjų medžiagų masės). Masė apdorota UG optimaliomis sąlygomis (40°C; 20 min; 2 W/cm²). Po apdorojimo UG, į masę įmaišyta 2 % (w/v) grynų PRB bakterijų suspensijos. Eksperimentui atlikti naudotos didžiausiu antimikrobinium aktyvumu pasižyminčios PRB padermės: *P. pentosaceus* LUHS100 ir *L. brevis* LUHS173. PRB imobilizavimas vykdytas 60 h periodu, laikant mėginius 35°C temperatūroje anaerobinėmis sąlygomis. Prieš fermentaciją ir po 6, 12, 24, 36, 48 ir 60 h imti mėginiai pH, BTR įvertinti ir PRB skaičiui nustatyti. Kiekvienas mėginys analizuotas du kartus.

2.2.10. Bendro mikroorganizmų skaičiaus nustatymas

Bendras mikroorganizmų skaičius mėginiuose nustatytas pagal LST EN ISO 6887-1:2017 [73]. Bendram mikroorganizmų skaičiui nustatyti į sterilų homogenizavimo maišelį pasverta 10 g mėginio, užpilta 90 ml sterilaus fiziologinio tirpalo ir homogenizuota 2 min homogenizatoriuje. Paruošiama speciali PCA terpė (Plate Count Agar, Liofilchem Srl, Italija) ir autoklavuojama 121 °C temperatūroje 15 min. Iš gautos mėginio suspensijos paruošiami atitinkamai nuo 10⁻² iki 10⁻⁷ skiediniai. Atrinkti 10⁻⁴–10⁻⁷ skiediniai pilti į dvi Petri lėkšteles po 1 ml, kur sumaišyti su 12–15 ml atvėsintos iki 45°C temperatūros terpės. Lėkštelė maišoma sukamaisiais judesiais ir paliekama sustingti ant horizontalaus paviršiaus. Sustingus terpei, apverstos lėkštelės laikytos 72 h 30°C termostate aerobinėmis sąlygomis. Vertinimui atrenktos lėkštelės, kuriose mikroorganizmų kolonijų skaičius nuo 10 iki 300 vnt. Kolonijas sudarančių vienetų skaičius (KSV) 1 ml (arba g) produkto apskaičiuotas pagal formulę:

$$N = \frac{\sum c}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d}; \quad (2.4)$$

Čia: $\sum C$ – kolonijų suma, suskaičiuotų visose neatmestose lėkštelėse iš dviejų vienas po kito einančių vertinamų skiedimų; V – užsėto skiedinio tūris lėkštelėje, ml; n_1 – pirmojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius; n_2 – antrojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius; d – pirmojo vertinamo skiedinio skiedimo koeficientas.

2.2.11. pH ir bendro titruojamojo rūgštingumo nustatymas

Tyrimui pasverta 5 g žaliavos ir užpilta 50 ml vandens, gautas mišinys buvo intensyviai maišomas 20 min magnetine maišykle. Gauta masė nufiltruota per kaproninį filtrą ir gauto filtrato pH matuotas tiesiogiai pH-metru. Filtratas naudotas BTR nustatymui.

Mėginių bendras titruojamasis rūgštingumas (BTR) nustatytas pagal LST 1553:1998 [74]. Du lygiagretūs mėginiai po 50 ml titruoti 0,1 N NaOH tirpalu, kaip indikatorių naudojant 1 % fenolftaleiną. Rūgštingumas išreikštas Neimano laipsniais (°N), t. y. 1 N šarmo tirpalo ml skaičiumi, reikalingu nutitruoti rūgštis, esančias 100 g produkto.

2.2.12. Pieno ir acto rūgščių kokybinė ir kiekybinė analizė

Pieno ir acto rūgščių kokybinei ir kiekybinei analizei taikyta didelio efektyvumo skysčių chromatografija (*angl.* UHPLC), naudojant Shimadzu LC-20AD chromatografinę sistemą su diodų matricos detektoriumi ir Lab Solutions programine įranga (Shimadzu Corp., Japonija), organinių rūgščių išskyrimui naudota atvirksčių fazių Hydrosphere C18 (150 × 4.6 I.D.) 5 μm kolonėlė (YMC Co., Ltd., Japonija), kurios judančioji fazė – 20 mM Na₂HPO₄ buferis (pH 2.5, pH reguliuotas su H₃PO₄), eliuento tėkmės greitis 1,0 mL/min, temperatūra 40 °C, injekcijos tūris 5 μl. UV detekcijai naudotas bangos ilgis 210 nm, analizės trukmė 30 min, minimali aptikimo riba 2 mg/l, standartinis nuokrypis < 5 %.

Analizei atlikti, 10 g mėginio ir 40 mL distiliuoto vandens homogenizuota 2 min (9500 aps/min) ir centrifuguota (4500 aps/min; 20 min). Gauti supernatantai atskirti ir filtruoti per membraninį PVDF 0,22 μm porų filtrą. Surinkti filtratai naudoti chromatografiniai analizei. Etalonu naudoti standartiniai rūgščių tirpalai, paruošti ištirpinus atitinkamos rūgšties standartą (Sigma-Aldrich, Vokietija) distiliuotame vandenyje (L-pieno rūgšties – 3,307 g/L; acto rūgšties – 2,136 g/L).

2.2.13. PRB antimikrobinio aktyvumo nustatymas

Pieno rūgšties bakterijų metabolizmo produktų antimikrobinis aktyvumas prieš patogeninius mikroorganizmus vertintas difuzijos į agarą metodu [76]. Tiriama mėginiai po fermentacijos centrifuguoti (12000g, 10 min, 4 °C), gauti supernatantai padalinti į dvi dalis. Viena dalis neutralizuota steriliu 2M NaOH tirpalu iki pH 6,4. Indikatoriniai mikroorganizmai nuo agarą surinkti į fiziologinį tirpalą (Biolife, Italija). Bakterijų suspensija ruošta pagal 0,5 McFarland'o standarto suspensijos tankį. Tyrimui, į Petri lėkšteles supilta po 20 ml terpės (Nutrient agar, Liofilchem srl, Italija), atvėsintos iki 45°C, ir laikytos kol sustings. Ant mitybinės terpės paviršiaus tolygiai paskleista 100 μl indikatorinių mikroorganizmų suspensijos ir išpjauti 6 mm skersmens šulinėliai, iš kurių agaras pašalinamas. Į gautus šulinėlius pilama 60 μl PRB supernatanto. Petri lėkštelės su pašėliu inkubuotos termostate 30°C temperatūroje, tinkamoje indikatoriniams mikroorganizmams. PRB metabolizmo produktų antimikrobinis aktyvumas vertintas po 24 ir 48 valandų, matuojant susidariusių slopinimo zonų diametrą (mm).

2.2.14. PRB ląstelių imobilizavimo į RS-BR modelinę sistemą procedūra

Pagal tekstūros analizės ir PRB gyvybingumo RS-BR sistemose tyrimo rezultatus atrinktas optimalus RS/BR komponentų santykis, kuris naudotas PRB imobilizavimui. Iš RS ir BR (komponentų santykis 50/50) ruošti gelio tipo mėginiai (10 g), sumaišant su steriliu vandeniu (santykis 1:3), ir apdorojant UG optimaliomis AVK susidarymui sąlygomis (850 kHz; 2 W/cm²; 40 °C; 20 min). Po to, į 30 °C masę įmaišyta MRS terpėje padaugintų atrinktų PRB ląstelių suspensija (ląstelių kiekis vidutiniškai 10⁹ KSV/ml), kad sistemoje bakterijų ląstelių kiekis sudarytų 10⁸ KSV/g. Sistemų struktūros stabilizavimui naudoti stingdikliai: agaras (10 %), Na alginatas (10 %), ksantano guma (5 %), Na alginatas ir ir ksantano guma santykiu 1:1 (5 %), kurie buvo įmaišyti atitinkamu kiekiu, intensyviai maišant. Mėginiai struktūrizuoti, laikant 4°C temperatūroje 24 h.

2.2.15. Gelio stabilumo tyrimo laikymo metu procedūra

Vertinant gelių stabilumą ir PRB gyvybingumą, gelio mėginiai (skersmuo 20 mm, storis 9 mm) uždarytose plastikinėse pakuotėse laikyti skirtingose temperatūrose (4°C ir 20°C) 56 dienas, kas 7 dienos nustatant gyvybingų ląstelių kiekį ir įvertinant masės pokyčius procentais.

2.2.16. Gelių stabilumo imituotoms virškinimo trakto sąlygoms tyrimas

RS-BR gelių stabilumas imituotomis virškinimo sąlygoms buvo vertintas pagal literatūroje pateiktą metodiką [77]. Imituotos skrandžio sultys buvo ruoštos, ištirpinus pepsiną 0,1 N HCl tirpale, sureguliuojant pH iki 1,9. Imituotos kasos sultys buvo paruoštos, ištirpinus pankreatiną steriliame natrio fosfato buferyje (0,05 M), o pH buvo sureguliuotas iki 7,5 naudojant 1 N NaOH. Tulžies druskų 0,3 % koncentracijos tirpalas ruoštas distiliuotame vandenyje. Visi tirpalai prieš eksperimentą filtruoti per sterilius membraninius 0,22 µm filtrus.

Tyrimo eiga: ant 5 g gelio užpilta 50 ml sterilaus distiliuoto vandens, pH sureguliuotas iki 1,9, naudojant 1 N HCl, ir tūris praskiestas iki 60 ml distiliuotu vandeniu; po to buvo pridėta 20 ml pepsino tirpalo ir inkubuota 2 valandas 37 °C temperatūroje, imituojant virškinimą skrandžio aplinkoje. Kas 30 min. imti terpės mėginiai gyvybingų ląstelių skaičiui nustatyti. Išlaikius 2 val., reakcija sustabdyta, pH sureguliuotas iki 7,5, pridėdant 1 N NaOH tirpalo. Imituojant virškinimą žarnyne, į mėginį pripilta 5 ml 0,1 M natrio fosfato buferio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 7,5 pH) tirpalo ir 2 ml tulžies druskos tirpalo. Terpės pH sureguliuotas iki 7,5 1 N NaOH tirpalu ir praskiesta distiliuotu vandeniu iki 90 ml; po to pridėta 10 ml kasos tirpalo ir inkubuota 2 valandas 37°C temperatūroje. Kas 30 min. imti terpės mėginiai gyvybingų ląstelių skaičiui nustatyti.

2.2.17. Duomenų matematinis statistinis apdorojimas

Tirtųjų rodiklių vidutinės vertės ir standartinio nuokrypio vertės nustatytos, naudojant MS Excel programinį paketą bei grafinį vaizdavimą. Dispersinė analizė (ANOVA) naudota reikšmingų skirtumų tarp reikšmių vidurkių įvertinimui naudojant statistinę programą SPSS (ver. 25; IBM SPSS (JAV)). Patikimumo vertinimui nustatytas reikšmingumo lygmuo 95 %.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Pagrindiniai ryžių sėlenų ir bruknių išspaudų sudėties komponentai

Ryžių sėlenų (RS) frakcijos skyrėsi analizuotų komponentų kiekybine sudėtimi (3.1–3.2 lentelės). Nustatyta, kad mažėjant dalelių dydžiui, krakmolo ir VAK kiekis didėja (200 µm frakcijoje, atitinkamai 77,64 ir 8,56 g/100 g), o mažiausias krakmolo ir VAK kiekiai (atitinkamai 31,36 ir 6,0 g/100 g) nustatyti stambiausioje RS frakcijoje (500 µm) (3.1 lentelė). Ištyrus bruknių išspaudas, nustatyta, jog didesniu bendru fenolinių junginių kiekiu ir antioksidaciniu aktyvumu (AA) pasižymėjo smulkiausia BR frakcija (200 µm), atitinkamai 51,72 mg GRE/g ir 89,6 % (3.2 lentelė).

Chromatografinės analizės (3.2 lentelė) rezultatai parodė, kad pagrindiniai junginiai, esantys bruknių išspaudų milteliuose, yra flavonoidai: kvercetas (43,8%), kvercitrinas (28,2%), hiperosidas (16,8%) ir kumaro rūgštis (11,2%). Metanolinių ekstraktų atveju mažiausio dalelių dydžio (200 µm) BR išspaudų mėginys parodė žymiai ($p < 0,05$) didesnes bendrų fenolinių junginių ir antioksidacinio aktyvumo (AA) vertes, palyginti su ekstraktais, gautais iš nefrakcionuoto mėginio. Kaip parodė ankstesni tyrimai [78]. Augalinės medžiagos dalijimas prieš tinkamą naudojimą gali padėti padidinti bioaktyviųjų junginių ar tiekiamų komponentų kiekį žaliavoje. Kaip matyti iš 1 lentelės, flavanolių ir fenolio rūgšties kiekis vidutiniškai padidėja iki 55%, jei yra mažų dalelių (200 µm) LPC frakcija, palyginti su nefrakcionuotu mėginio. Remiantis literatūra, kvercetino ir kumaro rūgšties galima aptikti ir ryžių sėlenose [79].

Siekiant padidinti bioaktyviųjų junginių kiekį bruknių žaliavoje, modeliųjų gelių sudarymui naudota 200 µm dalelių dydžio BR frakcija.

3.1 lentelė. Pagrindiniai ryžių sėlenų cheminės sudėties komponentai

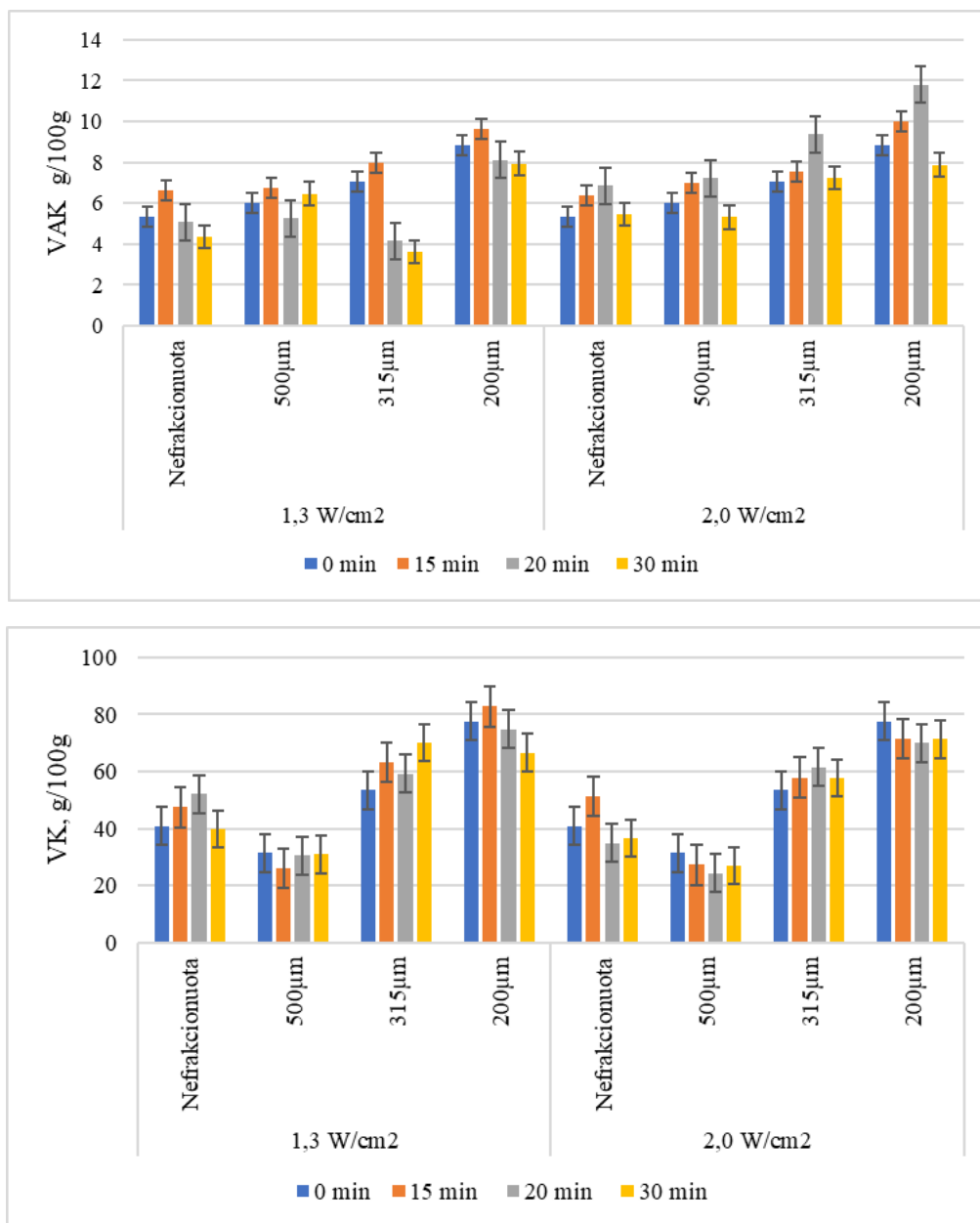
Frakcija	Drėgnis, g/100 g	Tirpūs sacharidai, mg/100 g s.m.	Baltymai, g/100 g s.m.	VAK, g/100 g s.m.	VK, g/100 g s.m.	Riebalai, g/100 g s.m.	BMS, KSV log	BFJ kiekis, mg GRE /100 g s.m.
RS	12,05±0,15	53,23±1,13	18,52±0,51	5,322±0,66	40,97±0,93	7,52±0,48	1,4 x 10 ⁵	1,2±0,2
Ryžių sėlenų frakcijos:								
200 nm	13,53±0,09	14,58 ± 0,24	12,2 ± 0,39	8,82 ± 0,39	77,64± 1,27	2,51±0,47	-	-
315 nm	12,81±0,16	23,80 ± 0,42	15,0 ± 0,42	7,07 ± 0,21	53,40±1,32	5,38±0,77	-	-
500 nm	11,7±0,25	68,32 ± 1,12	25,6 ± 0,69	6,00 ± 0,03	31,36±2,5	8,15± 0,17	-	-
RS – ryžių sėlenos; VAK – virškinimui atsparus krakmolas; VK – greitai virškinamas krakmolas; BMS – bendras mikroorganizmų skaičius								

3.2 lentelė. Pektino, fenolinių junginių kiekiai ir antioksidacinis aktyvumas bruknių išspaudose (BR)

BR mėginiai	Drėgnis, g/100 g	Pektinas, g/100 g s.m.	BFJ kiekis, mg GRE /100 g s.m.	AA, %
BR _{NF}	5,12 ± 0,06	1,4	49,12±0,87	89,1±1,06
BR _{F500}	-	-	45,78±0,69	78,4± 0,89
BR _{F200}	-	-	51,76±0,56	81,9±0,51
BFJ – bendras fenolinių junginių kiekis; AA – antioksidacinis aktyvumas (DPPH metodas); BR _{NF} – nefrakcionuotas BR mėginys; F200, F500 – BR frakcijos (atitinkamai 200 ir 500 µm dalelių dydžio)				

3.2. Virškinimui atsparaus krakmolo gamybos ryžių sėlenose optimizavimas

Virškinimui atsparaus krakmolo (VAK) gamybos ryžių sėlenose, naudojant aukšto dažnio ultragarsą (UG), tyrimo rezultatai pateikti 3.1 paveiksle. Rezultatai rodo, kad UG intensyvumas ir apdorojimo trukmė reikšmingai ($p < 0,05$) paveikė VAK susidarymą ir virškinamo krakmolo (VK) pokyčius ryžių sėlenose (RS).



3.1 pav. Virškinimui atsparaus (VAK) krakmolo susidarymas ir greitai virškinamo krakmolo (VK) pokyčiai, veikiant ryžių sėlenas skirtingo intensyvumo (1,3 ir 2,0 W/cm²) ultragarsu 40 °C temperatūroje.

Naudojant 2 W/cm² intensyvumo UG, susidarė vidutiniškai 16 % daugiau VAK, nei paveikus 1,3 W/cm² intensyvumo UG (vidutiniškai 5,65 mg/100 g). Naudojant 1,3 W/cm² intensyvumo UG, RS mėginiuose VAK didžiausi pokyčiai (padidėjo 14,8% vidutiniškai) nustatyti po 15 min apdorojimo.

Ilginant apdorojimo trukmę, RS mėginiuose VAK mažėjo, nepriklausomai nuo UG intensyvumo. Reikšmingų skirtumų VAK susidarymui, naudojant 1,3 ir 2 W/cm² UG, veikiant 15-20 min, nenustatyta (p>0,05).

Reikšmingą įtaką VAK susidarymui turėjo RS frakcijos dalelių dydis. Mažiausias VAK kiekis susidarė R500 (500 μm) RS frakcijoje (vidutiniškai 6,34 mg/100 g SM), o didžiausi kiekiai – R200 (200 μm) RS frakcijoje (vidutiniškai 9,23 mg/100 g SM).

Didžiausi VAK kiekiai, atitinkamai 9,65 mg/100 g ir 11,79 mg/100 g, susidarė smulkiausioje RS frakcijoje (R200), apdorojant 20 min 40°C temperatūroje, atitinkamai 1,3 ir 2 W/cm² intensyvumo UG.

Greitai virškinamo krakmolo (VK) kiekiui turėjo įtaka dalelių dydis. Didžiausias VK kiekis nustatytas smulkiausioje ryžių sėlenų frakcijoje R200 (vidutiniškai 74 mg/100g SM), mažiausias kiekis nustatytas stambiausioje frakcijoje R500 (vidutiniškai 28,6 mg/100g SM).

Greitai virškinamo krakmolo kiekis kito veikiamas UG. Paveikus UG R500 ir R200 frakcijoje VK vidutiniškai sumažėja 12% ir 6,6% atitinkamai. Didžiausias VK sumažėjimas nustatytas R500 frakcijoje kuris buvo paveiktas 2 W/cm² UG 20 min (sumažėjo nuo 31,35 mg/100g iki 24,37mg/100g SM).

Pagal literatūrą, vykstanti ultragarso kavitacija sukelia medžiagos molekulių judėjimą, kuris daro įtaką ryžių krakmolo matricos dalinį suskaidymą, esant krakmolo kleisterizacijos temperatūrai (55–79 °C) [80]. Krakmolo apdorojimas žemiau kleisterizacijos temperatūros paveikia molekulių persiskirstymą ar naujų jungčių susidarymą tarp krakmolo molekulių [81]. Ryžių krakmolo granulės yra mažesnės nei kitų rūšių javų krakmolo, taip pat skiriasi amilozės kiekiu: beveik neturinčių amilozės (~3 %), iki maždaug 35% amilozės ilgo grūdo ryžių krakmolo. Įrodyta, kad amilozės kiekis yra pagrindinis veiksnys, įtakojantis beveik visas fizikines ir chemines ryžių krakmolo savybes, gelio sudarymo ir kleisterizacijos, retrogradacijos, sinerezės ir kitas funkcines savybes [82]. Vienas iš VAK tipų – tai retrogradavęs krakmolas, kuris yra savaime arba dirbtinai susidaręs iš krakmolo kleisterio, susidarantis vandenyje netirpių pusiau kristalinių struktūrų pavidalu. Dėl retrogradacijos susidaro daugiau stabilios struktūros amilozės, o ne amilopektino. Tokiu būdu VAK kiekis didėja, padidėjusio kristalinės struktūros amilozės kiekio krakmole sąskaita [83].

3.3. Pieno rūgšties bakterijų antibakterinio aktyvumo įvertinimas ir aktyviausių mikroorganizmų parinkimas

Vertintas atrinktų pieno rūgšties bakterijų *P. pentosaceus* LUHS100 (LUHS100), *L. brevis* LUHS173 (LUHS173), *P. acidilactici* LUHS236 (LUHS236), *L. paracasei* LUHS244 (LUHS244), kurios geriausiai dauginasi ryžių sėlenų terpėje [83], metabolitų antimikrobinis aktyvumas po 24 ir 48 h inkubacijos mitybinėje MRS terpėje prieš penkis indikatorinius mikroorganizmus: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* ir *Staphylococcus aureus* (atitinkamai 3.3 ir 3.4 lentelės).

Tyrimai parodė, kad MRS terpėje didžiausias mikrobinės biomasės kiekis (9,35 log₁₀ KVS/ml) susidarė po 48 h inkubacijos LUHS236 paderme, mažesni, 0,53; 0,82 ir 0,9 log KVS/ml, kiekiai nustatyti, atitinkamai LUHS100, LUHS244 ir LUHS173 padermėms.

Antimikrobinio aktyvumo susidarymo RS terpėje rezultatai rodo, kad po 24 h inkubacijos (3.3 lentelė) vidutinio stiprumo inhibiciniu poveikiu (++) prieš tirtas indikatorines bakterijas pasižymėjo LUHS173 (slopinti 5 patogenai) ir LUHS100 (slopinti 4 patogenai). Silpnėsiu slopinančiu poveikiu (+) pasižymėjo LUHS236 (slopinti 5 patogenai, o mažiausias antimikrobinis aktyvumas (+) nustatytas LUHS244 mėginiuose (slopinti 4 patogenai). Prieš *Bacillus cereus* buvo aktyvūs tik LUHS173 ir LUHS236 supernatantai, o neutralizuoti visų PRB supernatantai nerodė antimikrobinio poveikio nė prieš vieną tirtą patogeną.

Po 48 h inkubacijos didžiausiu antimikrobinio aktyvumu pasižymėjo LUHS100 ir LUHS173, o mažiausiu – LUHS244 padermės (3.4 lentelė). Ilgesnė fermentacija lėmė didesnę kai kurių PRB supernatantų antimikrobinį aktyvumą: LUHS100, LUHS236, taip pat LUHS173 metabolitai pasižymėjo vidutinio stiprumo (++) antimikrobinio poveikiu prieš *B. cereus*, o LUHS236 neutralizuotas supernatantas parodė poveikį (+) prieš *B. cereus* bei *P. aeruginosa*.

3.3 lentelė. PRB supernatantų (S) ir neutralizuotų (SN) (pH 6,4) supernatantų antimikrobinis aktyvumas po 24 h inkubacijos MRS terpėje

Mikroorganizmai	<i>P. pentosaceus</i> LUHS100		<i>L. brevis</i> LUHS173		<i>P. acidilactici</i> LUHS236		<i>L. paracasei</i> LUHS244	
	S	SN	S	SN	S	SN	S	SN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	-	++	-	+	-	++	-
<i>Escherichia coli</i>	++	-	+	-	++	-	+	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	++	-	+	-	+	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	++	-	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	++	-	+	-	+	-

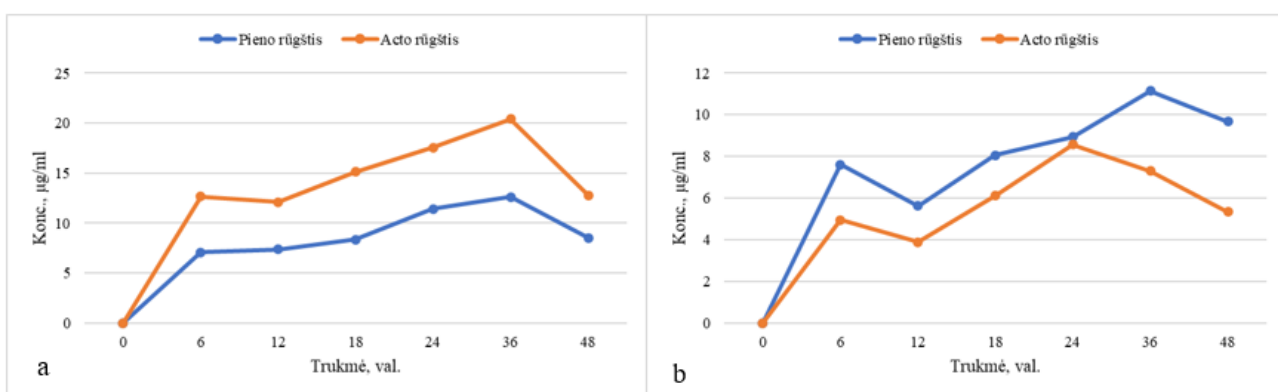
Slopinimo zonos: + = maža/silpno slopinimo zona (6-9 mm); ++ = vidutinė/stipri slopinimo zona (10-14 mm); +++ = labai stipri slopinimo zona (15-18 mm); - = nėra slopinimo zonos.

3.4 lentelė. PRB supernatantų (S) ir neutralizuotų (SN) (pH 6.4) supernatantų antimikrobinis aktyvumas po 48 h dauginimosi MRS terpėje.

Mikroorganizmai	<i>P. pentosaceus</i> LUHS100		<i>L. brevis</i> LUHS173		<i>P. acidilactici</i> LUHS236		<i>L. paracasei</i> LUHS244	
	S	SN	S	SN	S	SN	S	SN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	-	++	-	+	+	++	-
<i>Escherichia coli</i>	++	-	+	-	++	-	+	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	++	-	+	-	+	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	++	+	++	+	++	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	++	-	+	-	+	-

Slopinimo zonos: + = maža/silpno slopinimo zona (6-9 mm); ++ = vidutinė/stipri slopinimo zona (10-14 mm); +++ = labai stipri slopinimo zona (15-18 mm); - = nėra slopinimo zonos.

Antimikrobinio aktyvumo skirtumai tarp PRB supernatantų gali būti paaiškinti skirtingu organinių rūgščių, pasižyminčių skirtingu antibakteriniu poveikiu, susidarymu terpėje. Kiekybinė ir kokybinė organinių rūgščių analizė atrinktų *L. brevis* LUHS173 ir *P. pentosaceus* LUHS100 padermių, pasižyminčių vidutinio stiprumo antimikrobinio poveikiu prieš tirtus patogenus, taip pat didesniu atsparumu rūgščiai terpei (pH 2) [83], parodė, kad didžiausi pieno ir acto rūgšties kiekiai susidaro terpėje po 36 h fermentacijos: fermentuojant LUHS100, atitinkamai 11 $\mu\text{g/ml}$ ir 7 $\mu\text{g/ml}$, o fermentuojant LUHS173, atitinkamai 13 $\mu\text{g/ml}$ ir 8 $\mu\text{g/ml}$. Naudojant LUHS173, acto rūgšties susidarė 11% daugiau, o pieno rūgšties – vidutiniškai 7 % mažiau, nei naudojant LUHS100. Ilgesnė fermentacija (48 h) pieno ir acto rūgščių susidarymą sumažino, atitinkamai 13 % ir 27 %, naudojant LUHS100, bei 32 % ir 44 %, naudojant LUHS173.



3.2 pav. Pieno ir acto rūgščių susidarymas RS terpėje, fermentuojant *L. brevis* LUHS173 (a) ir *P. pentosaceus* LUHS100 (b) padermėmis.

Pagal literatūroje pateiktus duomenis, esant žemoms pH vertėms, pieno rūgštis gali turėti stipresnį inhibicinį poveikį, nei acto rūgštis [84]. Tyrimų metu nustatytas antibakterinis poveikis LUHS173 mėginių, kuriuose nustatytas didesnis acto rūgšties kiekis, parodė teigiamą poveikį prieš *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Proteus* spp. padermes, sukeliančias maisto gedimą [85].

3.4. Bruknių išspaudų priedo įtaka rūgštingumo ir bioaktyvumo pokyčiams ryžių malimo šalutinių produktų fermentacijos terpėje

3.4.1. Rūgštingumo pokyčiai RS-BR terpėje, fermentuojant atrinktomis PRB

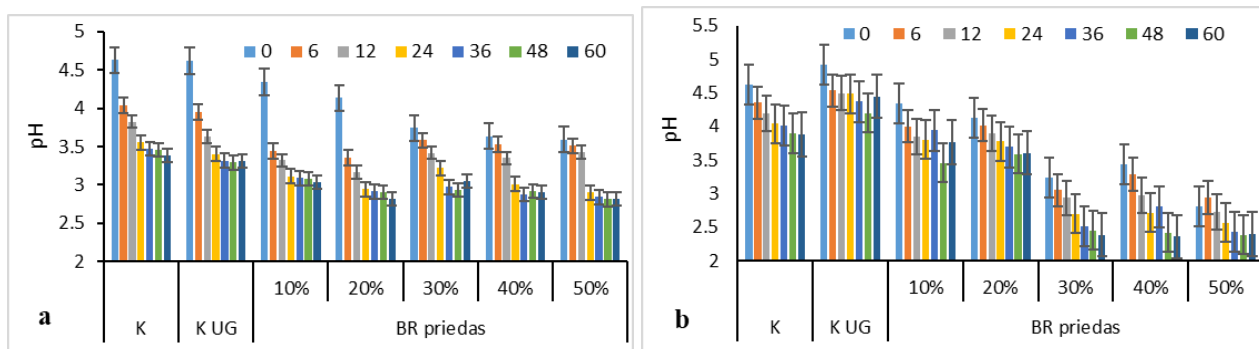
Šiame etape tyrimai atlikti, vertinant bruknių išspaudų priedo įtaką PRB gyvybingumui neapdorotų ir apdorotų ultragarsu (UG) ryžių sėlenų terpėje tikslu atrinkti geriausią RS ir BR santykį (RS/BR). Eksperimentui naudotos didžiausiu antigrybiniu ir antimikrobinio aktyvumu pasižyminčios PRB padermės: *P. pentosaceus* LUHS100 ir *L. brevis* LUHS173.

Tyrimo rezultatai rodo, kad fermentacijos terpės pH ir bendras titruojamasis rūgštingumas (BTR) reikšmingai priklausė nuo fermentacijai naudotos mikroorganizmų padermės, BR priedo ir fermentacijos trukmės.

Visu fermentacijos laikotarpiu intensyvesnis rūgštingumo padidėjimas (pH sumažėjo 25,4%, o BTR padidėjo 2,4 karto) nuo pradinių verčių nustatytas, fermentuojant LUHS173, lyginant su LUHS100

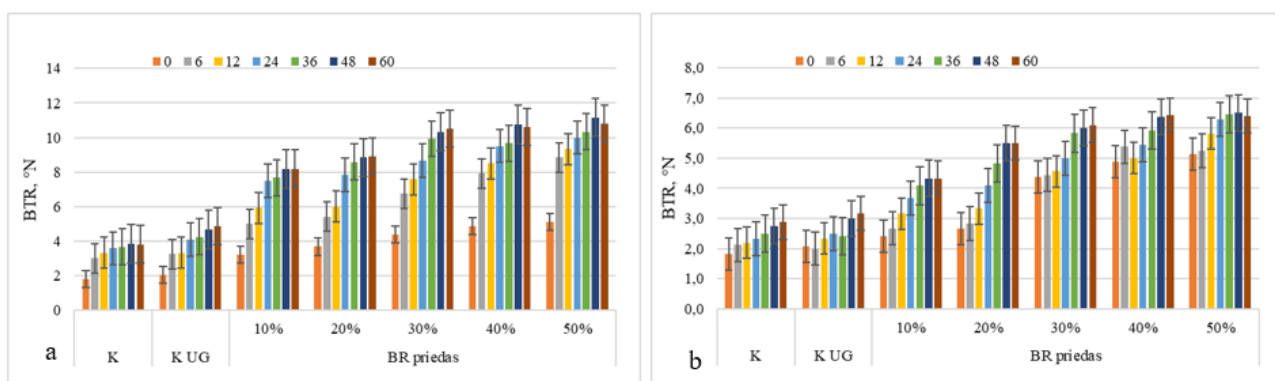
(atitinkamai pH sumažėjo 17,7% , o BTR padidėjo 1,52 karto) (3.3 ir 3.4 pav.). Tai rodo, kad LUHS173 mikroorganizmai ryžių terpėje adaptavosi greičiau; daugiausia rūgščių buvo pagaminta pirmąsias 24 h (pH sumažėjo 22%), vėliau rūgštingumas kito nežymiai (pH sumažėjo dar 4%). LUHS100 atveju, pH mažėjo, o BTR didėjo tolygiai visu fermentacijos periodu.

Visais atvejais, naudojant ultragarsu apdorotas RS, terpės pH pokyčiai tiek fermentuojant LUHS173, tiek LUHS100, nustatyti vidutiniškai 11,07 % mažesni, t.y. rūgštingumo susidarymas terpėje vyko lėčiau, lyginant su neapdorotų RS terpe, t.y. RS terpė su didesniu VAK kiekiu, padidino naudotų eksperimente PRB stabilumą.



3.3 pav. pH pokyčiai 60 h periodu, fermentuojant *L. brevis* LUHS173 (a) ir *P. pentosaceus* LUHS100 (b) padermėmis 35°C temperatūroje neapdorotas ir apdorotas ultragarsu (UG) ryžių sėlenas (RS) su bruknių išspaudų (BR) priedu.

Rezultatai rodo, kad BR priedas reikšmingai ($p < 0,05$) mažino terpės pH (3.3 pav.). Pridėjus 10-20% BR į RS terpę, pH ir BTR pokytis nustatytas pokytis (atitinkamai 8,2 % ir 68 %, fermentuojant LUHS173) ir 9,3% ir 22 % , fermentuojant LUHS100), lyginant su pradine verte (3.3 pav.). Didžiausias pH sumažėjimas (30–32 %) nustatytas po 36 h inkubacijos mėginiuose su 30–50% BR priedu (3.3 a pav.), fermentuojant LUHS100. Esant 50% BR priedo, pH vertė nustatyta vidutiniškai 42 % (LUHS100) ir 14 % (LUHS173) mažesnė nei be BR priedo (3.3 pav.), o BTR vidutiniškai 2,3 karto didesnis, lyginant su pradinėmis vertėmis.

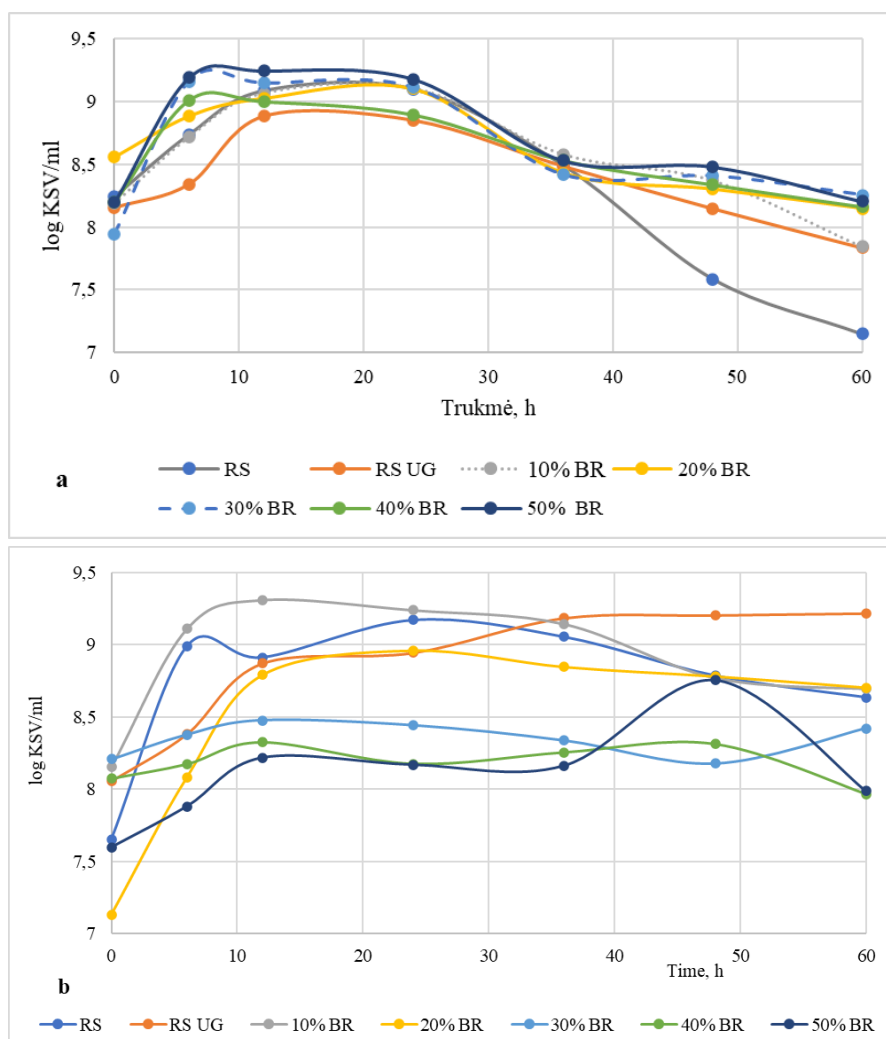


3.4 pav. Bendras titruojamasi rūgštingumas (BTR) RS-BR terpėje, fermentuojant *L. brevis* LUHS173 (a) ir *P. pentosaceus* LUHS100 (b) padermėmis.

3.4.2. Apdorotų ultragarsu (UG) ryžių sėlenų (RS) ir bruknių išspaudų (BR) priedo įtaka atrinktų PRB antimikrobinėms savybėms

Pieno rūgšties gyvybingumo (RS UG)-BR terpėje tyrimo rezultatai pateikti 3.5 paveiksle. Nustatyta, kad LUHS173 mikroorganizmai intensyviai dauginosi pirmąsias 6 h (eksponentinė fazė), o nuo 6 iki 12 h laikotarpiu pasiektas didžiausias ląstelių skaičius (stacionari augimo fazė). Ilgiau fermentuojant (24–36 h), užfiksuotas PRB ląstelių skaičiaus mažėjimas, priklausomai nuo apdorojimo ultragarsu ir BR priedo. Neapdorotų ultragarsu RS terpėje LUHS173 KSV skaičius 24–60 h periodu sumažėjo 0,61–1,34 log, tuo tarpu apdorotų UG RS terpėje su didesniu VAK kiekiu KSV skaičius nustatytas 0,56–0,69 log didesnis, lyginant su neapdorotomis RS.

LUHS100 greičiausiai dauginosi pirmąsias 6 valandas (eksponentinė augimo fazė), o didžiausias biomasės kiekis buvo pasiektas nuo 6 iki 36 h periodu (stacionari augimo fazė). Ilgiau fermentuojant (nuo 36 h), nustatytas LUHS100 ląstelių mažėjimas. Didžiausias ląstelių skaičius neapdorotoje RS terpėje nustatytas po 36 h (padidėjo 1,4 log KSV/ml, lyginant su pradine verte), o ultragarsu apdorotose RS didžiausias biomasės kiekis pasiektas po 60 h (9,22 log KSV/ml). Galima padaryti išvadą, kad VAK priedas (RS apdorotos UG) padidino PRB stabilumą, sulėtindamas PRB ląstelių skaičiaus mažėjimą žūtis fazėje, lyginant su kontroliniu mėginiu, kuris nebuvo apdorotas ultragarsu ir turėjo mažesnę VAK kiekį.



3.5 pav. *Lactobacillus brevis* LUHS173 (a) ir *Pediococcus pentosaceus* LUHS100 (b) augimo kreivės RS terpėje ir su BR priedu.

Vertinant BR priedo įtaką PRB gyvybingumui, nustatyta, kad visais atvejais BR priedas nuo 10 iki 50 % didino LUHS173 ląstelių skaičių, priklausomai nuo fermentacijos trukmės. Didžiausias *L. brevis* LUHS173 ląstelių skaičius (9,25 log KSV/ml) pasiektas po 12 h RS fermentacijos terpėje su 50% BR priedu, tuo tarpu mėginyje be BR priedo LUHS173 KVS nustatytas mažesnis (8,88 log KVS/ml) (3.5 pav.).

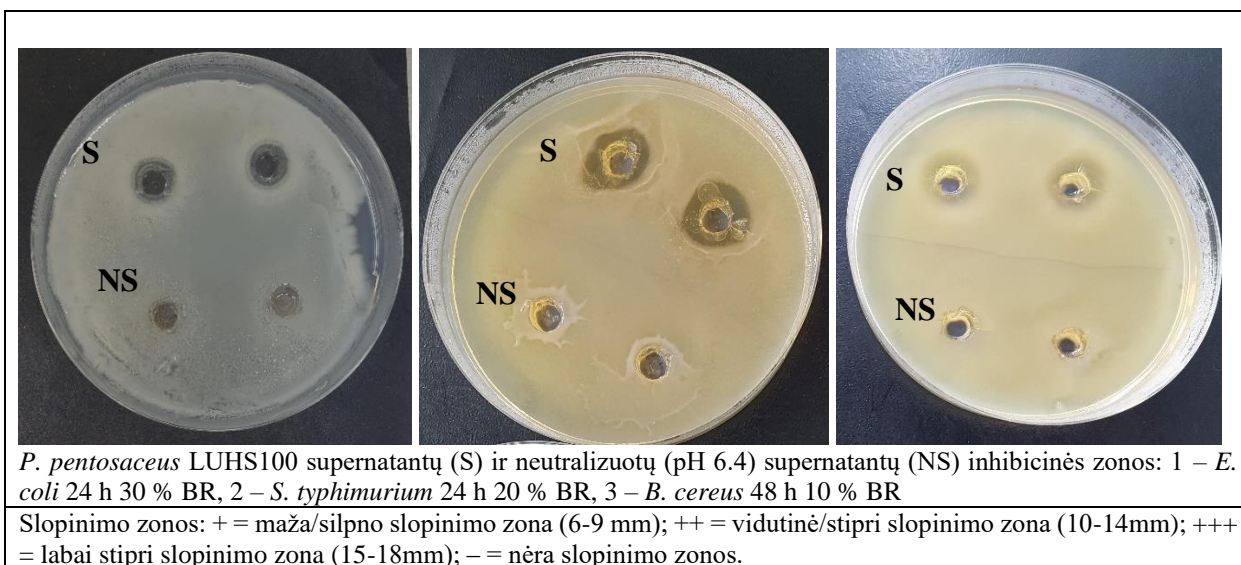
Fermentacijos metu naudojant LUHS100 didžiausi susidarę biomasės kiekiai nustatyti po 12 h fermentacijos. Atlikus fermentaciją su BR priedu, matoma tendencija, jog didesnis BR priedo kiekis slopina PRB dauginimąsi, su 10 ir 20% BR priedu po 36 h fermentacijos LUHS100 ląstelių skaičius padidėja 1,13 – 1,71 log KSV/ml, lyginant nuo pradinės reikšmės, tuo tarpu lyginant fermentaciją su didesniu kiekiu BR (30 – 50%), ląstelių kiekio padidėjimas matomas mažesnis (0,13 – 0,56 log KSV/ml).

Mikroorganizmų antimikrobinio aktyvumo ryžių sėlenų terpėje tyrimo rezultatai po 24 h ir 48 h fermentacijos P. pentosaceus LUHS100 ir L. brevis LUHS 173 pateikti, atitinkamai 3.5 ir 3.6 lentelėse. Antimikrobinis aktyvumas priklausė nuo fermentacijos trukmės ir BR priedo. Taip pat nustatyta, kad RS apdorojimas UG padidino LUHS100 ir LUHS173 antimikrobinį aktyvumą prieš B. cereus (LUHS100 ir LUHS173) bei prieš P. aeruginosa (LUHS173 atveju) po 24 h fermentacijos, bei E. coli, S. typhimurium ir P. aeruginosa (LUHS100 atveju) po 48 h fermentacijos, lyginant su neapdorotais UG mėginiais.

3.5 lentelė. *P. pentosaceus* LUHS100 supernatantų (S) ir neutralizuotų (pH 6,4) supernatantų (NS) antimikrobinis aktyvumas po 24 ir 48 h fermentacijos ryžių sėlenų (RS) terpėje ir su bruknių išspaudų (BR) priedu

Mėginiai		<i>E. coli</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>B. cereus</i>		<i>St. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
RS	S	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RS UG	S	-	++	-	++	+	+	-	-	-	+
	NS	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RS UG su BR priedu:											
10 % BR	S	-	++	-	-	-	++	-	+	-	+
	NS	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
20 % BR	S	-	+	++	+	+	-	-	+	-	-
	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30 % BR	S	+	++	+	-	-	+	+	+	-	+
	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40 % BR	S	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50 % BR	S	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
	NS	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

3.5 lentelės tęsinys

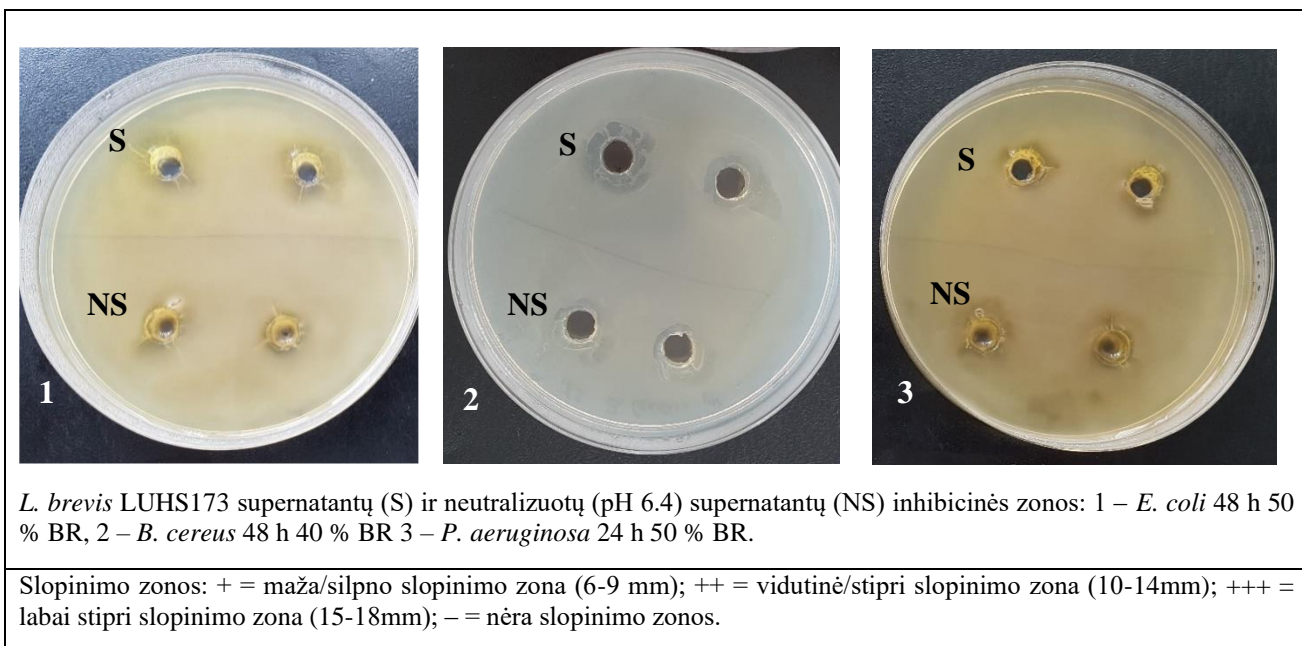


Analizuojant LUHS100 supernatantų (S) antimikrobinį aktyvumą po 24 h fermentacijos, pastebėta, kad visais atvejais BR priedas padidino šios PRB antimikrobinį aktyvumą, lyginant su kontroliniu mėginiu be BR priedo (3.5 lentelė). Didžiausiu antimikrobinio aktyvumu dėl susidariusių rūgščių poveikio pasižymėjo mėginiai su 50% BR priedu prieš *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus* ir *St. Aureus* (3.5 lentelė). Neutralizuotuose supernatantų (NS) mėginiuose po 24 h fermentacijos antimikrobinis aktyvumas nustatytas. Po 48 h fermentacijos nustatytas nedidelis aktyvumas ir neutralizuotų supernatantų mėginiuose, kaip indikatorinį mikroorganizmą naudojant *E. coli*. Nustatytas didesnis antimikrobinis aktyvumas prieš naudotus indikatorinius mikroorganizmus, lyginant su 24 h fermentuotais mėginiais.

3.6 lentelė. *L. brevis* LUHS173 supernatantų (S) ir neutralizuotų (pH 6.4) supernatantų (NS) antimikrobinis aktyvumas po 24 ir 48 h fermentacijos ryžių sėlenų (RS) terpėje be ir su bruknių išspaudų (BR) priedu

Mėginiai		<i>E. coli</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>B. cereus</i>		<i>St. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		24h	48h	24h	48h	24h	24h	48h	24h	48h	24h
RS	S	+	+	+	+	-	-	-	+	+	++
	NS	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RS UG	S	+	-	+	+	++	+	-	-	+	+
	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RS UG su BR priedu:											
10 % BR	S	+	++	+	++	++	+	+	-	+	++
	NS	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
20 % BR	S	++	++	+	+	++	++	+	+	++	++
	NS	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
30 % BR	S	++	+	++	++	++	++	+	+	+	+
	NS	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
40 % BR	S	++	++	++	+	++	++	+	++	+	++
	NS	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
50 % BR	S	++	++	+	++	++	+	+	++	+	++
	NS	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+

3.6 lentelės tęsinys



Fermentuojant RS su didesniu VAK kiekiu (po apdorojimo UG) LUHS173 paderme (3.6 lentelė), po 24 h nustatytas silpnas (+) inhibicinis *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* slopinimas (3.6 lentelė.). Didžiausias LUHS173 supernatantų antimikrobinis poveikis nustatytas po 48 h fermentacijos prieš visus indikatorinius mikroorganizmus, naudojant apdorotas UG RS ir 20–50 % BR priedą. Taip pat, silpną slopinamąjį poveikį prieš *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus* ir *P. aeruginosa* rodė mėginių su 40 ir 50 % BR priedu neutralizuoti supernatantai, gauti po 24 h fermentacijos.

Apibendrinant rezultatus, ryšių VAK kai kuriais atvejais didino PRB supernatantų ir neutralizuotų supernatantų (prieš *E. coli* LUHS100 atveju) antimikrobinį aktyvumą prieš gramneigiamas bakterijas. Statistinė analizė parodė, kad reikšmingą ($p < 0,05$) įtaką PRB antimikrobiniam aktyvumui turėjo fermentacijos trukmė ir BR priedas.

Taip pat, BR priedas turi įtakos patogeninių bakterijų slopinimui dėl sudėtyje esančių fenolinių junginių. Paprastai uogų ekstraktai slopina gramneigiamas, bet ne gramteigiamas bakterijas. Šie pokyčiai gali atspindėti ląstelių paviršiaus struktūrų skirtumus tarp gramneigiamų ir gramteigiamų bakterijų. Visų pirma, išorinė gramteigiamų bakterijų membrana veikia kaip prevencinė kliūtis nuo hidrofobinių junginių [47]. Gramneigiamų bakterijų išorinė membrana paprastai veikia kaip difuzijos barjeras nepolinių junginių atžvilgiu, tai lėmė asimetriją išoriniame membranos sluoksnyje, kurį didelė dalimi sudaro lipopolisaharidai ir baltymai, tuo tarpu fosfolipidai orientuoti į vidinį membranos sluoksnį [86].

Uogose yra daug įvairių fenolinių junginių, tokių kaip antocianinai, flavonoliai, taninai ir fenolio rūgštys. Fenolinių junginių bakterijų slopinimas yra siejamas su keliais mechanizmais, tokiais kaip citoplazminės membranos destabilizacija, plazminės membranos permeabilizacija, bakterijų tarpląstelinis fermentų slopinimas, tiesioginis poveikis mikrobuų metabolizmui ir substratų, reikalingų bakterijoms augti atėmimas [87, 88].

Juodųjų serbentų (*R. nigrum* L.) uogose ir lapuose randama stipriomis antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių polifenolinių junginių, juodasis serbentas taip pat žinomas kaip uoga, prevenciškai ir terapiškai veikianti žmogaus organizmą [89]. Laukiniuose šermukšniuose (*S. aucuparia*), pagrindiniai randami fenoliniai junginiai yra (neo)chlorogeninės rūgštys ir flavonoliai, tokie kaip kvercetino ir kaempferolio konjugatai [90, 91].

Pagal Bartkienė ir kt. (2019) atliktus tyrimus, plačiausią patogeninių ir oportunistinių bakterijų padermių slopinimo spektrą parodė liofilizuoti juodųjų serbentų ir liofilizuotų obuolių šalutiniai produktai (kurie slopino atitinkamai 13 ir 12 patogeninių padermių iš 15 tirtų padermių). Šiek tiek mažesnę patogeninių padermių skaičių slopino liofilizuotos avietės ir šermukšniai, kurie slopino 10 patogeninių padermių iš 15 tirtų padermių [92].

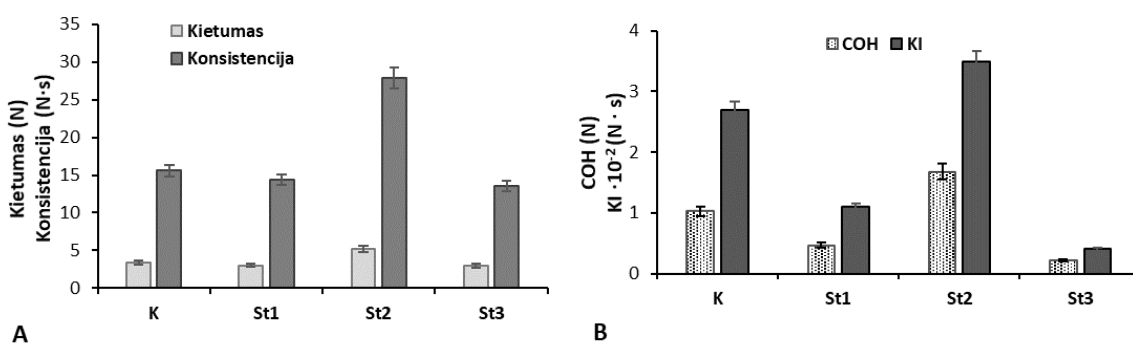
Antimikrobinis natūralių antrinių metabolitų (fenolinių junginių), tokių kaip galo rūgštis, kvercetinas, kofeino rūgštis, kumaro rūgštis, tanino rūgštis ir katecholis, tyrimas buvo atliekamas prieš mikrobines rūšis (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Bacillus subtilis*). Pagal literatūros duomenis, galo rūgštis neslopino veiksmingai *Bacillus subtilis* augimą, tačiau *E. coli* ir *P. aeruginosa* buvo jautrūs [93]. Pagal autorius, kvercetinas, kofeino rūgštis, kumaro rūgštis, tanino rūgštis ir katecholis veiksmingai slopino organizmų augimą [93].

Remiantis tyrimų rezultatais, PRB ląstelių įkapsuliavimas į virškinimui atsparaus krakmolo matricą leistų sėkmingai išlaikyti pakankamai aukštą probiotinių bakterijų gyvybingų ląstelių skaičių (minimalus terapinis PRB ląstelių skaičius 10^{-6} KSV).

3.5. Stabilizatorių įtakos ryžių sėlenų (RS) ir bruknių išspaudų (BR) modelinės sistemos stabilumui įvertinimas

Imobilizavimo sistemos tekstūros stabilumui užtikrinti naudoti skirtingi stingdikliai – agaras, natrio alginatas ir ksantano guma. Jų įtakos RS-BR gelių su imobilizuotomis PRB tekstūrai tyrimo rezultatai pateikti 3.6 paveiksle.

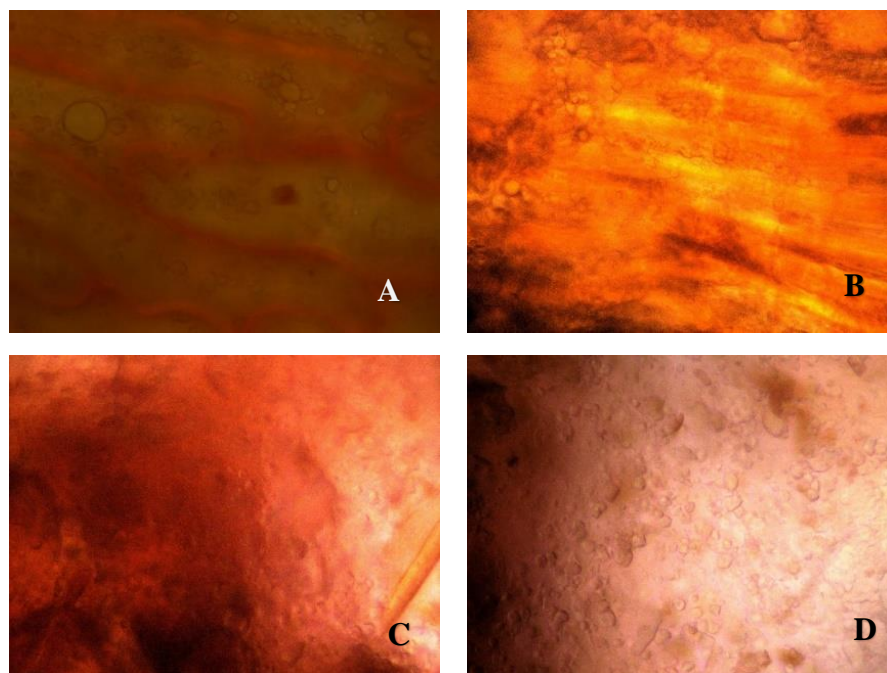
Rezultatai parodė, kad stingdikliai skirtingai veikė modelinių sistemų tekstūros parametrus. Stabiliausia tekstūra gauta, naudojant natrio alginatą: šios sistemos kietumo ir konsistencijos vertės nustatytos didžiausios (atitinkamai 5,2 N ir 27,8 N·s), o mažiausiomis šių parametru vertėmis pasižymėjo sistemos, ruoštos su agaru ir ksantano guma (atitinkamai vidutiniškai 3 N ir 13,9 N·s) (3.6 pav.).



3.6 pav. RS-BR modelinės sistemos su skirtingais stingdikliais kietumas ir konsistencija (a) bei lipnumo (COH) ir klampos indekso (KI) (b) vertės. St1 – agaras, St2 – alginatas ir St3 – ksantano guma.

Pažymėtina, kad su alginatu ruošta masė pasižymėjo didžiausiomis klampumo indekso ir kohezijos vertėmis (atitinkamai $1,68 \cdot 10^{-2}$ N·s ir 3,5 N), lyginant su kitais stingdikliais (vidutiniškai $0,75 \cdot 10^{-2}$ N ir 0,34 N) (3.6 pav.). Pagal gautus rezultatus, geriausi šios masės stingimo rezultatai gauti, naudojant natrio alginatą kaip stabilizatorių.

Imobilizavimo sistemos, ruoštos su agaru, natrio alginatu, ksantano guma, ir alginato ir ksantano mišiniu (1:1) papildomai analizuotos optiniu mikroskopu (3.7 pav.). Gelių mikroskopinė analizė parodė (3.7 pav.), kad stabilizatorius turėjo įtakos gelių homogeniškumui ir PRB suspensijos pasiskirstymui.



3.7 pav. Stabilizatorių įtaka gelių su ksantano guma (A), agaru (B), ksantano guma ir natrio alginatu (C), natrio alginatu (D) struktūrai.

Homogeniškiausia gelio struktūra gauta, naudojant agarą ir ksantano gumą: mikroskopinis vertinimas rodo, kad PRB suspensija pasiskirstė tolygiai, dalelių dydis 50–70 μm . Naudojant agarą, dalelių dydis 50 – 65 μm , alginatą – 55 – 70 μm . Netolygiausia struktūra ir didžiausios PRB suspensijos dalelės gautos geliuose su ksantano guma (40 – 75 μm).

Mikroskopinė analizė parodė reikšmingus skirtumus tarp gelių su skirtingais stabilizatoriais tekstūros ir gelio homogeniškumo. Vizualiai užfiksuotas drėgmės išsiskyrimas gelių su ksantano derva paviršiuje gali būti susijęs su tuo, kad ksantanas yra hidrofilinis polimeras, kurio tirpalai pasižymi dideliu klampumu ir dideliu pseudoplastiškumu, o geliai su alginatu parodė žymiai didesnę klampumą ir koheziškumą nei geliai su agaru ir ksantanu.

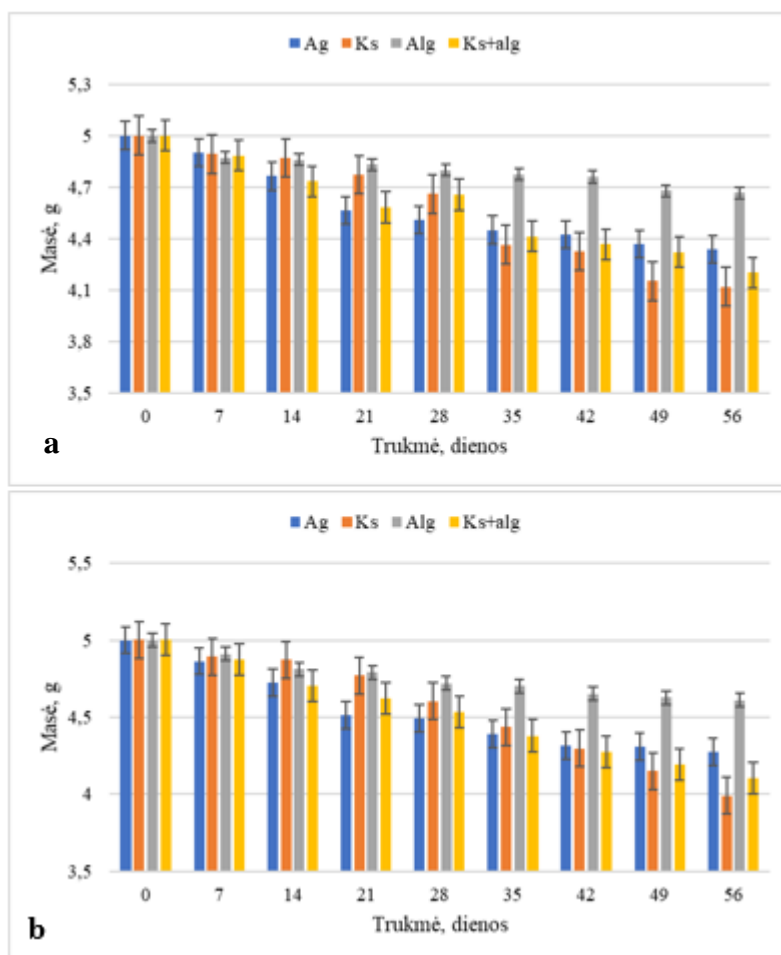
Remiantis tekstūros analize (3.6 pav.), agaras ir ksantanas sumažina RB-BR gelių viskoelastines savybes, tuo pačiu sumažina vandens sulaukymą gelio susidarymo metu, o geliuose su alginatu nepastebėtas vandens išsiskyrimas. Kaip nustatė Figuro ir Genovese (2018), didelio esterinimo laipsnio pektinas keičia maisto sistemos struktūrą dėl hidrofobinės sąveikos ir vandenilinių jungčių,

palaikančių gelio stabilumą [94]. Tikėtina, kad didesnis tokių hidrokoloidų, ryžių sėlenų ir bruknių pektino masės dalies vandens absorbcijos pajėgumas padidino vandens sulaikymą gelio tinkle.

3.6. RS-BR gelių stabilumo ir imobilizuotų pieno rūgšties bakterijų bioaktyvumo tyrimai laikymo metu

Pagal antimikrobinių tyrimų rezultatus, imobilizavimui RS-BR geliuose pasirinkta *L. brevis* LUHS173, padaugintos RS-BR apdorotų UG ultragarsu terpėje. PRB mikroorganizmų kiekis suspensijoje prieš imobilizavimą nustatytas 8,22 log KVS/g, po imobilizavimo PRB skaičius gelio tipo RS-BR mėginiuose sudarė vidutiniškai 7,38 log KVS/g. PRB stabilumas RS-BR geliuose analizuotas laike 56 dienų, mėginius laikant 4°C ir 18°C temperatūroje (3.8–3.9 pav.).

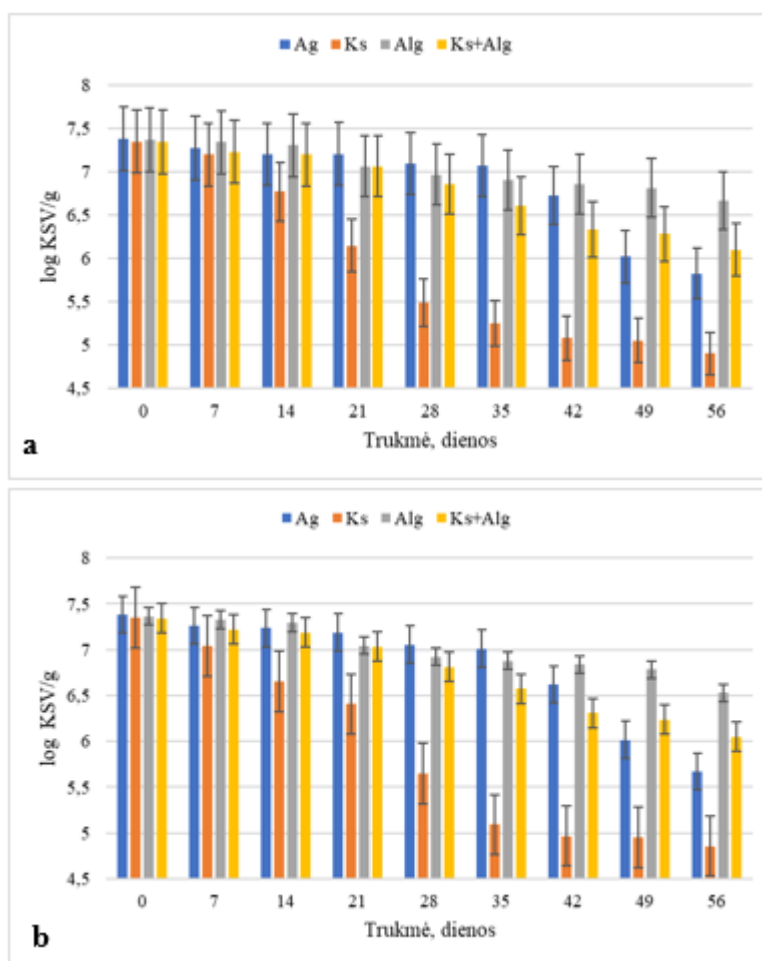
Gelių masės pokyčių laikymo metu tyrimo rezultatai parodė tolygų masės mažėjimą (3.8 pav.). Didesni drėgmės nuostoliai (vidutiniškai 12 %) nustatyti geliuose po 42 dienų laikymo 18 °C temperatūroje (3.8 b pav.), lyginant su geliiais, laikytais 4°C temperatūroje (vidutiniškai 13,4 %) (3.8 a pav.). Didžiausi drėgmės nuostoliai, laikant 18°C ir 4°C temperatūrose, nustatyti geliuose su agaru ir ksantano guma (atitinkamai 20,2 ir 17,6 %), o stabiliausi nustatyti geliiai, ruošti su natrio alginatu: drėgmės nuostoliai sudarė, atitinkamai 7,8 ir 6,6 % (3.8 pav.).



3.8 pav. RS-BR gelių masės pokyčiai, laikant 4°C (a) ir 18 °C (b) temperatūroje.

Vertinant PRB stabilumą laikymo metu, nustatyta, kad laikymo trukmė ir temperatūra turėjo reikšmingos ($p < 0,05$) įtakos imobilizuotų PRB ląstelių gyvybingumui (3.9 pav.). Po 7 dienų išlaikymo 4°C temperatūroje, LUHS173 gyvybingų ląstelių kiekis sumažėjo vidutiniškai 0,102 log KSV/g, o po 56 dienų laikymo – 1,49 log KSV/g. Laikant 18°C temperatūroje gyvybingų ląstelių skaičius vidutiniškai sumažėjo 0,146 log KSV/g po 7 dienų, ir 1,58 log KSV/g – po 56 dienų.

Didžiausias PRB sumažėjimas po 56 dienų laikymo nustatytas RS-BR gelyje su ksantano guma (sumažėjimas 2,464 log KSV/g), o stabiliausiai PRB ląstelės išsilaikė, imobilizavus gelyje su natrio alginatu (vidutiniškai sumažėjo 0,765 log KSV/g) (3.9 pav.). RS-BR gelis su agaru pasižymėjo mažesniu apsauginiu poveikiu PRB stabilumui: gyvybingų ląstelių skaičius po išlaikymo nustatytas vidutiniška 9,7 % mažesnis, lyginant su geliais, stabilizuotais alginatu ir ksantanu.



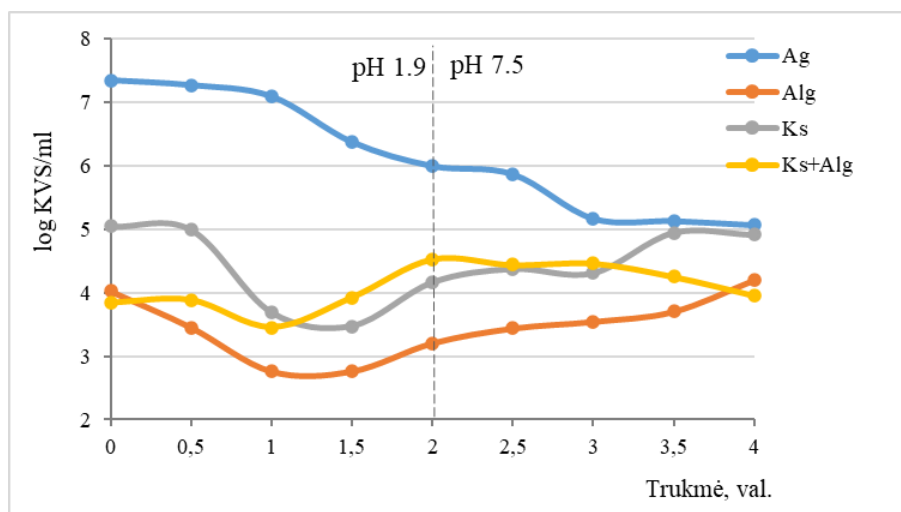
3.9 pav. Imobilizuotų *L. brevis* LUHS173 gyvybingų ląstelių skaičiaus pokyčiai geliuose su skirtingais stabilizatoriais, laikant 4°C (a) ir 18°C (b) temperatūrose.

3.7. RS-BR gelių stabilumo imituotomis virškinimo *in vitro* sąlygomis tyrimai

Vertinant imobilizuotų PRB stabilumą imituotomis virškinimo sąlygomis, nustatyta, kad stabilizatorius turėjo reikšmingą įtaką gyvybingų ląstelių išsiskyrimui iš gelyje (3.10 pav.).

PRB ląstelių skaičius, išsiskyres į pradinę terpę po 15 min išlaikymo, kito nuo 7,35 log KVS/ml (gelis su agaru) iki 5,05 log KVS/ml, iš gelio su ksantanu ir vidutiniškai 3,93 log KVS/ml iš gelių su alginatu ir alginato ir ksantano mišiniu. Mėginio su agaru atveju, visu išlaikymo imituotomis virškinimo

sąlygomis periodu, gyvybingų ląstelių skaičius mažėjo nereikšmingai ($p > 0,05$), išlaikius 60 min (nustatytas pokytis 4 %), o žymesni pokyčiai nustatytas po išlaikymo 2 h rūgščioje terpėje (18 %), ir papildomai 33 % po išlaikymo 2 h žarnyno terpėje (pH 7,5) (3.10 pav.).



3.10 pav. Skirtingų stabilizatorių įtaka PRB ląstelių išsiskyrimui iš RS-BR su gelių imituotomis virškinimo *in vitro* sąlygomis.

Kitų mėginių atveju, išlaikius rūgščioje terpėje 60 min., nustatytas mažesnis PRB ląstelių išsiskyrimas (vidutiniškai 17 %). Po 90 min išlaikymo skrandžio terpėje pastebėtas ląstelių skaičiaus padidėjimas rodo, kad geliai ruošti su alginatu ar ksantano guma pradeda irti. Skrandžio sultis imituotoje terpėje (pH 1,9) nustatytas žymesnis PRB išsiskyrimas po 2 h išlaikymo iš gelių su alginatu ir ksantanu: vidutinis gyvybingų ląstelių skaičius sudarė 3,2 log KSV/ml (Alg) ir vidutiniškai 4,3 log KVS/ml, lyginant su jų skaičiumi terpėje po 60 min (2,8 log KVS/ml (Alg) ir vidutiniškai 3,6 log KVS/ml (Ks ir Ks+Alg)).

Laikant RS-BR gelius su Alg ir Ks žarnyno sultis imituojančioje tulžies druskų terpėje (pH 7,5), gyvybingų ląstelių skaičius padidėjo terpėje vidutiniškai 13 %. Didesnį stabilumą šioje terpėje parodė geliai su alginatu ir alginato ir ksantano mišiniu (ląstelių į virškinimo terpę perėjo, atitinkamai 4,03 ir 3,85 log KSV/ml), didesnis pokytis nustatytas, laikant gelį, ruošimą tik su ksantanu (5,05 log KVS/ml) (3.10 pav.).

Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad rudųjų ryžių sėlenų su didesniu atsparus virškinimui krakmolo kiekiu ir bruknių uogų išspaudų matrica gali užtikrinti imobilizuotų mikroorganizmų ląstelių stabilumą, apsaugant nuo aplinkos poveikio laikymo metu (likusių ląstelių skaičius gelyje sudarė vidutiniškai 5,8 log KVS/g) ir nuo greito suirimo virškinimo sąlygomis, taip užtikrinant tolygų jų išsiskyrimą t.y. turintis potencialų teigiamą poveikį sveikatai.

Konkrečių bioaktyvių medžiagų išsiskyrimą būtų galima kontroliuoti, naudojant tinkamą stabilizatorių ir (arba) dangą. Rezultatai rodo, kad PRB ląstelių imobilizavimas RS – BR matricoje apsaugo nuo skrandžio ir plonosios žarnos aplinkos poveikio, o toks gelio tipo produktas, stabilizuotas natrio alginatu, gali užtikrinti ląstelių patekimą į storąją žarną. Šios išvados sudaro tvirtą pagrindą funkcinio maisto, turinčio pridėtinę vertę, kūrimui. Be to, struktūrizavimas didelės galios ultragarsu (2 W/cm²) žemoje temperatūroje suteikia veiksmingo ir ekologiško proceso taikymą augalų polisacharidų ir probiotikų valorizavimui ir padidina šių produktų antimikrobinį potencialą.

Sukurta technologija parodo, kad apdorojimas didelio galingumo ultragarsu žemoje temperatūroje gali būti panaudotas ryžių malimo šalutinių maisto žaliavų, panaudojant kaip substratą PRB ląstelių imobilizavimui, kartu su BR fitochemialų funkcionalizavimui į pageidaujamų savybių galutinį produktą [95,96].

4. Rekomendacijų dalis

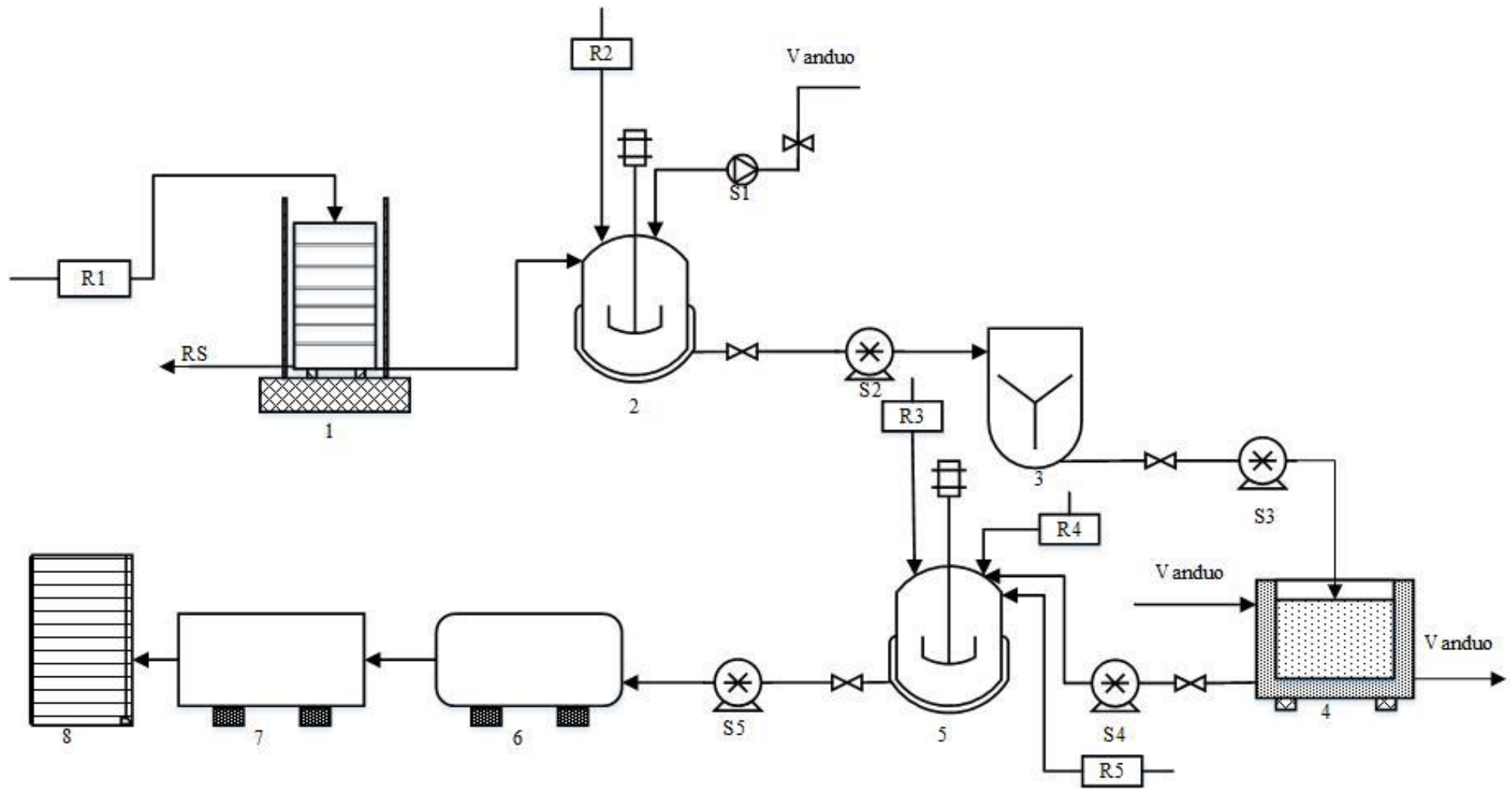
Dėl nuolat augančios paklausos maisto produktų turinčių bioaktyvių komponentų ir/arba gyvų bakterijų ląstelių ir maisto perdirbimo pramonėje susidarantių didelių kiekių atliekų, kuriose gausu biologiškai naudingų junginių, kurta sistema, kuri savo sudėtimi būtų naudinga organizmui ir pagerintų probiotinių bakterijų išsilaikymą, bet apsaugotų jas nuo nepalankių sąlygų susidarantių virškinimo metu. Šiuo darbu buvo siekiama iširti bruknių uogų ir ryžių perdirbimo šalutinių produktų valorizacijos galimybes, kuriant maisto struktūras, užtikrinančias imobilizuotų pieno rūgšties bakterijų gyvybingumą. Žemiau pateikta aparatūrinė schema ryžių sėlenų ir bruknių uogų gelio tipo produktui, pasižyminčiam antimikrobinu poveikiu, gaminti.

4.1 lentelė. Gamybos linijos aparatūra

Įrenginio Nr.	Įrenginys
1	Sijotuvai (<i>angl.</i> sieve shaker)
2	Maišyklė
3	Homogenizatorius
4	UG vonia
5	Maišyklė
6	Formavimo įrenginys
7	Pakavimo įrenginys
10	Vėsinimo kamera
S1,	Siurblys
S2,S3,S4, S5	Tūrinis siurblys (<i>angl.</i> positive displacement pump)
R1 – R5	Žaliavų rezervuarai

Aparatūrinės schemos aprašymas:

Iš talpyklos (**R1**) ryžių sėlenos rankiniu būdu pakraunamos į sijotuvą (**1**) ir frakcionuojamos pagal dalelių dydį atitinkamais sietais, surenkant atskiras frakcijas. Ryžių sėlenų frakcija R200 ir atitinkamas kiekis bruknių išspaudų miltelių (**R2**) (santykis 1:1) rankiniu būdu paduodama į maišyklę (**2**), kur tiekiamas ir 40°C vanduo. Maišoma iki vienalytės masės, po to masė tūriniu siurbliu (**S2**) tiekama į homogenizatorių (**3**), kur homogenizuojama 2 min. Po maišymo masė tūriniu siurbliu (**S3**) tiekama į ultragarso (UG) vonią (**4**) ir veikiama 20 min 2 W/cm² intensyvumo ultragarsu, palaikant 40°C temperatūrą. UG apdorota masė tūriniu siurbliu (**S4**) tiekama į maišymo tanką (**5**), kur temperatūra sureguliuojama iki 35°C ir dozuoja pieno rūgšties bakterijų LUHS173 *L. brevis* suspensija (**R5**) Mikroorganizmų imobilizavimas vykdomas, švelniai maišant 36 h. Po išlaikymo, į masę įmaišomi atitinkami kiekiai stingdiklio (10% s.m. natrio alginato) (**R3**). Šiame etape galima pridėti skoninių medžiagų (**R4**) (pvz. sorbitolio). Gauta masė atvėsinama iki 15°C ir tūriniu siurbliu (**S5**) nukreipiama formavimui ir pjaustymui (**6**). Gauti batonėliai (10 cm x 2 cm x 1 cm) transporteriu paduodami fasavimui (**7**) į sandarias polietileno pakuotes po vieną ir po 4 vnt. sudedami į kartono dėžutes su etiketėmis. Dėžutės dedamos į kartono dėžes, kurios sudedamos ant palečių (**8**) ir gabenamos į šaldymo kamerą (temperatūra 4°C), kur išlaikomos 24 h galutinei struktūrai susidaryti. Produktas laikomas ir gabenamas 4°C temperatūroje, o tinkamumo vartoti trukmė – iki 56 dienų, laikant 4°C temperatūroje.



4.1 pav. Ryžių sėlenų ir bruknių išspaudų gelių tipo produkto su imobilizuotomis bakterijomis gamybos schema

Išvados

1. Nustatyta, kad optimalios apdorojimo ultragarsu (850 kHz) sąlygos efektyviam virškinimui atsparaus krakmolo (VAK) susidarymui ryžių sėlenose yra: 2 W/cm² galia; trukmė 20 min., 40 °C temperatūra. Šiomis sąlygomis galima gauti 11,79 mg/100 g VAK kiekį.
2. Nustatyta, kad ryžių sėlenų (RS) apdorojimas ultragarsu ir bruknių uogų išspaudų (BR) priedas didino *Lactobacillus brevis* LUHS173, bakterijų stabilumą ir lėtino PRB, ląstelių skaičiaus mažėjimą žūties fazėje (vidutiniškai KSV skaičius padidėjo nuo 8,2 iki 9,06 log KVS/ml). *Pediococcus pentosaceus* LUHS100 lėčiau adaptavosi apdorotų UG RS terpėje, tačiau ilgiau išsilaikė stacionarioje fazėje ir turėjo lėtesnį ląstelių mažėjimą žūties fazėje.
3. Tyrimai parodė, kad didžiausiu antimikrobinu aktyvumu prieš tirtus indikatorinius mikroorganizmus *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* ir *Staphylococcus aureus* pasižymėjo *L. brevis* LUHS173 (slopinti 5 patogenai) ir *P. pentosaceus* LUHS100 (slopinti 4 patogenai) metabolitai. Silpnesnis slopinantis poveikis nustatytas *P. acidilactici* LUHS236, o mažiausiu antimikrobinu aktyvumu pasižymėjo *L. paracasei* LUHS244 metabolitai.
4. BR priedas reikšmingai ($p < 0,05$) didina PRB gyvybingumą ir stabilumą fermentuojant. BR 10-20% priedas padidino *L. brevis* LUHS173 ir *P. pentosaceus* LUHS100 skaičių atitinkamai 8,2 % ir 14%, lyginant su pradiniu skaičiumi. Esant 30-50 % BR priedo, KVS nustatyti vidutiniškai 7,8 % (LUHS100) mažesni ir 3 % (LUHS173) didesni nei be BR priedo. Pagal gautus rezultatus, imobilizavimui į RS-BR matricą atrinkta LUHS173 padermė ir 50% BR priedas.
5. Tyrime naudoti stingdikliai skirtingai veikė modeliųjų sistemų tekstūros parametrus. Stabiliausia RS-BR (komponentų santykis 1:1) gelio tekstūra gauta, naudojant natrio alginatą: šios sistemos kietumo ir konsistencijos vertės nustatytos didžiausios (atitinkamai 5,2 N ir 27,8 N·s), o mažiausiomis šių parametrų vertėmis pasižymėjo sistemos, ruoštos su agaru ir ksantano guma (atitinkamai vidutiniškai 3 N ir 13,9 N·s).
6. Gelių stabilumui laikant reikšmingą įtaką ($p < 0,05$) turėjo temperatūra ir stabilizatoriaus rūšis. Didžiausi drėgmės nuostoliai, laikant 18°C ir 4°C temperatūrose, nustatyti geliuose su agaru ir ksantano guma (atitinkamai 20,2 ir 17,6 %), o stabiliausi nustatyti geliai su natrio alginatu: drėgmės nuostoliai sudarė, atitinkamai 7,8 ir 6,6%.
7. Laikymo trukmė ir temperatūra turėjo reikšmingos ($p < 0,05$) įtakos imobilizuotų PRB ląstelių gyvybingumui. Po 7 ir 56 dienų išlaikymo 4°C ir 20°C temperatūroje, *L. brevis* LUHS173 gyvybingų ląstelių skaičius sumažėjo vidutiniškai atitinkamai 1,6 ir 20,8% . Didžiausias ląstelių skaičiaus sumažėjimas laikymo periodo pabaigoje nustatytas RS-BR gelyje su ksantano guma (sumažėjimas 2,46 log KSV/g), o stabiliausiai PRB ląstelės išsilaikė, imobilizavus gelyje su natrio alginatu (sumažėjimas 0,76 log KSV/g).
8. Imobilizuotų PRB stabilumui imituotomis virškinimo sąlygomis reikšmingą įtaką turėjo terpė ir naudotas stabilizatorius. Ląstelių skaičius skrandžio aplinką imituotoje terpėje (pH 1,9), išsiskyręs iš gelio su ksantanu sudarė vidutiniškai 4,27 log KVS/ml, o iš gelių su alginatu ir alginato ir ksantano mišiniu vidutiniškai sudarė 3,93 log KVS/ml. Žarnyno sultis imituojančioje terpėje (pH 7,5), išsiskyrusių gyvybingų ląstelių skaičius terpėje papildomai padidėjo vidutiniškai 9 %. Didesnį stabilumą šioje terpėje parodė geliai su alginatu ir alginato ir ksantano mišiniu (vidutinis ląstelių skaičius, atitinkamai 4,03 ir 3,85 log KSV/ml), o iš gelio su ksantanu sudarė vidutiniškai 4,64 log KVS/ml. Mėginio su agaru atveju, visu išlaikymo imituotomis

virškinimo sąlygomis periodu, gyvybingų ląstelių skaičius mažėjo nereikšmingai ($p>0,05$), išlaikius 60 min (nustatytas pokytis 4 %), o žymesni pokyčiai nustatytas po išlaikymo 2 h rūgščioje terpėje (18 %), ir papildomai 33 % po išlaikymo 2 h žarnyno terpėje.

9. Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad rudųjų ryžių sėlenų su didesniu atsparus virškinimui krakmolo kiekiu ir bruknių uogų išspaudų matrica gali užtikrinti imobilizuotų mikroorganizmų ląstelių stabilumą, apsaugant nuo aplinkos poveikio laikymo ir nuo greito suirimo virškinimo sąlygomis, taip užtikrinant tolygų jų išsiskyrimą t.y. turintis potencialų teigiamą poveikį sveikatai.

Literatūros sąrašas

1. LOHANI, Umesh C.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Application of the pulsed electric field to release bound phenolics in sorghum flour and apple pomace. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2016, 35: 29-35.
2. AADIL, Rana Muhammad, et al. A potential of ultrasound on minerals, micro-organisms, phenolic compounds and colouring pigments of grapefruit juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 2015, 50.5: 1144-1150.
3. CHATTERJEE, Emon; MANUEL, Suba GA; HASSAN, Syed Shamimul. Journal of Probiotics & Health. 2016. (Chatterjee M, Manuel GAS, Hassan SS (2016) Effect of Fruit Pectin on Growth of Lactic Acid Bacteria. J Prob Health 4: 147. doi: 10.4172/2329-8901.1000147)
4. OUWEHAND, Arthur C.; SALMINEN, Seppo; ISOLAURI, Erika. Probiotics: an overview of beneficial effects. In: *Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*. Springer, Dordrecht, 2002. p. 279-289.
5. DESHPANDE, Girish; RAO, Shripad; PATOLE, Sanjay. Progress in the field of probiotics: year 2011. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2011, 27.1: 13-18.
6. KUMAR, Manoj, et al. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental diabetes research*, 2012, 2012.
7. GU, Qing; LI, Ping. Biosynthesis of vitamins by probiotic bacteria. *Probiotics and prebiotics in human nutrition and health*, 2016.
8. PFALTZGRAFF, Lucie A., et al. Food waste biomass: a resource for high-value chemicals. *Green Chemistry*, 2013, 15.2: 307-314.
9. GIROTTO, Francesca; ALIBARDI, Luca; COSSU, Raffaello. Food waste generation and industrial uses: a review. *Waste management*, 2015, 45: 32-41.
10. TUCK, Christopher O., et al. Valorization of biomass: deriving more value from waste. *Science*, 2012, 337.6095: 695-699.
11. GUL, Khalid, et al. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food—A review. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2015, 6.1: 24-30.
12. DOS SANTOS OLIVEIRA, Melissa, et al. Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. *Bioresource Technology*, 2011, 102.17: 8335-8338.
13. SAUNDERS, R. M. Rice bran: composition and potential food uses. *Food Reviews International*, 1985, 1.3: 465-495.
14. IQBAL, Shahid; BHANGER, M. I.; ANWAR, Farooq. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food chemistry*, 2005, 93.2: 265-272.

15. OHSAKI, Yusuke, et al. Novel effects of a single administration of ferulic acid on the regulation of blood pressure and the hepatic lipid metabolic profile in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008, 56.8: 2825-2830.
16. SHIRAKAWA, Hitoshi, et al. Adenosine, an identified active component from the Driselase-treated fraction of rice bran, is effective at improving metabolic syndrome in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009, 57.6: 2558-2564.
17. MCCLEARY, Barry V. Dietary fibre analysis. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2003, 62.1: 3-9.
18. ENGLYST, Hans N.; KINGMAN, S. M.; CUMMINGS, J. H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European journal of clinical nutrition*, 1992
19. AI, Yongfeng; HASJIM, Jovin; JANE, Jay-lin. Effects of lipids on enzymatic hydrolysis and physical properties of starch. *Carbohydrate polymers*, 2013, 92.1: 120-127.
20. LESZCZYŃSKI, Waclaw. Resistant starch—classification, structure, production. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2004, 13.54: 37-50
21. GIDLEY, M. J., et al. Molecular order and structure in enzyme-resistant retrograded starch. *Carbohydrate Polymers*, 1995, 28.1: 23-31.
22. ZHANG, Bin, et al. Effects of octenylsuccinylation on the structure and properties of high-amylose maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84.4: 1276-1281.
23. FUENTES-ZARAGOZA, Evangélica, et al. Resistant starch as prebiotic: a review. *Starch-Stärke*, 2011, 63.7: 406-415
24. CUMMINGS, John H.; EDMOND, Laurie M.; MAGEE, Elizabeth A. Dietary carbohydrates and health: do we still need the fibre concept?. *Clinical Nutrition Supplements*, 2004, 1.2: 5-17
25. GIBSON, Glenn R.; ROBERFROID, Marcel B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 1995, 125.6: 1401-1412.
26. WALTER, Melissa; DA SILVA, Leila Picolli; DENARDIN, Cristiane Casagrande. Rice and resistant starch: different content depending on chosen methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, 18.4: 279-285.
27. SCOURBOUTAKOS, Mary. 1+ 1= 3... Synbiotics: Combining the Power of Pre-and Probiotics. *Journal of Food Science Education*, 2010, 9.1: 36-37.
28. LE BLAY, G. M., et al. Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. *Journal of applied microbiology*, 2003, 94.2: 312-320.
29. CHARALAMPOPOULOS, D., et al. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International journal of food microbiology*, 2002, 79.1-2: 131-141.

30. SHIMONI, Eyal. Starch as an encapsulation material to control digestion rate in the delivery of active food components. In: *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals*. Woodhead Publishing, 2008. p. 279-293.
31. AND, C. Iyer; KAILASAPATHY, Kasipathy. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of food science*, 2005, 70.1: M18-M23.
32. SULTANA, Khalida, et al. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International journal of food microbiology*, 2000, 62.1-2: 47-55.
33. HOMAYOUNI, A., et al. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food chemistry*, 2008, 111.1: 50-55.
34. ROSHANZAMIR, Mehdi, et al. The survival of probiotic bacteria and sensory properties of yogurt affected by microencapsulation with resistant starch. *Journal of Food Safety and Hygiene*, 2017, 3.3/4: 59-64.
35. HEIDEBACH, Thomas; FÖRST, Petra; KULOZIK, Ulrich. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of food engineering*, 2010, 98.3: 309-316.
36. SHAFIEI, Yahya, et al. Survivability of free and microencapsulated *Lactobacillus plantarum* with alginate and resistant starch in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 2012, 10.3-4: 207-212.
37. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life*. World Health Organization, 2002., STAPLETON, Phoebe A., et al. Obesity and vascular dysfunction. *Pathophysiology*, 2008, 15.2: 79-89.
38. HAN, Xiuzhen; SHEN, Tao; LOU, Hongxiang. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2007, 8.9: 950-988
39. BELITZ, Ing H.-D.; GROSCH, Ing W. *Food chemistry*. Springer Science & Business Media, 2013
40. Mitropoulou G., Nedovic V., et al. Immobilization Technologies in Probiotic Food roduction, *Journal of Nutrition and Metabolism*,. 2013, prieiga per <https://doi.org/10.1155/2013/716861>
41. MORTAZAVIAN, Amir, et al. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2007.
42. MÄÄTTÄ-RIIHINEN, Kaisu R., et al. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, 52.14: 4477-4486.
43. EK, Sari, et al. Characterization of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, 54.26: 9834-9842.

44. PAREDES-LÓPEZ, Octavio, et al. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life—a review. *Plant foods for human nutrition*, 2010, 65.3: 299-308.
45. MUDGAL, V., et al. Dietary polyphenols and human health. *Asian Journal of Biochemistry*, 2010, 5.3: 154-62.
46. JIMENEZ-GARCIA, Sandra Neli, et al. Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. *Food Research International*, 2013, 54.1: 1195-1207
47. PUUPPONEN-PIMIÄ, Riitta, et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology*, 2001, 90.4: 494-507.
48. KRIS-ETHERTON, Penny M., et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 2002, 113.9: 71-88.
49. VAUZOUR, David, et al. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2010, 2.11: 1106-1131.
50. XIAO, J. B.; HOGGER, P. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. *Current medicinal chemistry*, 2015, 22.1: 23-38
51. PANDEY, Kavita R.; NAIK, Suresh R.; VAKIL, Babu V. Probiotics, prebiotics and synbiotics—a review. *Journal of food science and technology*, 2015, 52.12: 7577-7587.
52. REALE, Anna, et al. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 60.2: 721-728.
53. BUTEL, M.-J. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et maladies infectieuses*, 2014, 44.1: 1-8.
54. GOTCHEVA, Velitchka, et al. Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. *Food Biotechnology*, 2002, 16.3: 211-225.
55. SAARELA, Maria, et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 2000, 84.3: 197-215.
56. CIZEIKIENE, Dalia, et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 2013, 31.2: 539-545.
57. DIXIT, Y.; WAGLE, A.; VAKIL, B. Patents in the field of probiotics, prebiotics, synbiotics: A review. *J. Food Microbiol. Saf. Hyg*, 2016, 1: 1-13.
58. MOZURIENE, Erika, et al. The effect of savoury plants, fermented with lactic acid bacteria, on the microbiological contamination, quality, and acceptability of unripened curd cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 69: 161-168.

59. BARTKIENE, Elena, et al. The impact of lactic acid bacteria with antimicrobial properties on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and biogenic amines in cold smoked pork sausages. *Food Control*, 2017, 71: 285-292.
60. HEIDEBACH, Thomas; FÖRST, Petra; KULOZIK, Ulrich. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23.7: 1670-1677.
61. MAKINEN, K., et al. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *Journal of biotechnology*, 2012, 162.4: 356-365.
62. COMMONWEALTH SCIENTIFIC & INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION (AU). Probiotic storage and delivery [interaktyvus]. Inventors: Ross CRITTENDEN, Luz SANGUANSRI, Mary Ann AUGUSTIN. Int. CI A61K35/74. PCT/AU2004/001341. World Intellectual Property Organization [žiūrėta 2020-05-07]. Prieiga per: European Patent Office
63. ERCAN, Songül Şahin; SOYSAL, Çiğdem. Effect of ultrasound and temperature on tomato peroxidase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2011, 18.2: 689-695.
64. TIWARI, B. K.; MASON, T. J. Ultrasound processing of fluid foods. In: *Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods*. Academic Press, 2012. p. 135-165.
65. ALEGRIA, Carla, et al. Quality attributes of shredded carrot (*Daucus carota* L. cv. Nantes) as affected by alternative decontamination processes to chlorine. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2009, 10.1: 61-69.
66. CHEMAT, Farid, et al. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 2011, 18.4: 813-835
67. MAJID, Ishrat; NAYIK, Gulzar Ahmad; NANDA, Vikas. Ultrasonication and food technology: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2015, 1.1: 1071022
68. PATIST, Alex; BATES, Darren. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative food science & emerging technologies*, 2008, 9.2: 147-154.
69. VILLAMIEL, Mar; DE JONG, Peter. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase® Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. *Journal of food engineering*,
70. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST EN ISO 712:2010]. *Grūdai ir jų produktai. Drėgmės kiekio nustatymas. Pamatinis metodas (ISO 712:2009) =: Cereals and Cereal Products. Determination of Moisture Content. Reference Method : Europos Standartas EN ISO 712:2009 Turi Lietuvos Standarto Statusą*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2010.
71. SERNA-SALDIVAR, Sergio O. *Cereal grains: laboratory reference and procedures manual*. CRC Press, 2012.66-67 psl

72. TANG, P. Y., et al. Optimization of pectin extraction from peel of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Asian Journal of Biological Sciences*, 2011, 4.2: 189-195.
73. [LST EN ISO 6887-1:2017. Maisto Ir Pašarų Mikrobiologija. Tiriamųjų Mėginių, Pradinės Suspensijos Ir Dešimtkarčių Skiedinių Ruošimas Mikrobiologiniams Tyrimams: Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination (2000): Ii. Print..
74. [LST 1553:1998]. Miltiniai Kepiniai Ir Konditerijos Gaminiai. Rūgštingumo Ir šarmingumo Nustatymo Metodai =: Bakery Goods and Confectionery. Methods for Determination of Acidity and Alkalinity (1998): 10. Print.
75. JUODEIKIENE, Grazina, et al. Functionalisation of flaxseed proteins assisted by ultrasonication to produce coatings enriched with raspberries phytochemicals. *LWT*, 2020, 124: 109180.
76. BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 2016, 6.2: 71-79.
77. CORBO, Maria Rosaria, et al. Immobilization and microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*: Performances and in vivo applications. *Innovative food science & emerging technologies*, 2013, 18: 196-201. JUODEIKIENE, G., et al. Effect of heating method on the microbial levels and acrylamide in corn grits and subsequent use as functional ingredient for bread making. *Food and Bioproducts Processing*, 2018, 112: 22-30.
78. SETYANINGSIH, W., et al. Optimisation and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food chemistry*, 2015, 169: 141-149.
79. BHATTACHARYA, K. R. Gelatinization temperature of rice starch and its determination. *Chemical aspects of rice grain quality*, 1979, 116-118..
80. CUI, Lu, et al. Effect of ultrasonic treatment of brown rice at different temperatures on cooking properties and quality. *Cereal chemistry*, 2010, 87.5: 403-408.
81. WANI, Ali Abas, et al. Rice starch diversity: Effects on structural, morphological, thermal, and physicochemical properties—A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2012, 11.5: 417-436.
82. SAJILATA, M. G†; SINGHAL, Rekha S.; KULKARNI, Pushpa R. Resistant starch—a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2006, 5.1: 1-17.
83. JUKONYTE, Ruta, et al. A potential of brown rice polish as a substrate for the lactic acid and bioactive compounds production by the lactic acid bacteria newly isolated from cereal-based fermented products. *LWT*, 2018, 97: 323-331.
84. THERON, Maria M.; LUES, JF Rykers. *Organic acids and food preservation*. CRC press, 2010.
85. WALI, Mohammed Kadhum; ABED, Marwa Mohammed. Antibacterial activity of acetic acid against different types of bacteria causes food spoilage. *J Food Technol Pres* 2018;3(1):1-4.

86. VAQUERO, MJ Rodríguez; ALBERTO, Maria Rosa; DE NADRA, MC Manca. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food control*, 2007, 18.2: 93-101.
87. PUUPPONEN-PIMIÄ, Riitta, et al. Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67.1: 8-18.
88. PUUPPONEN-PIMIÄ, Riitta, et al. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of applied microbiology*, 2005, 98.4: 991-1000.
89. PAUNOVIĆ, Svetlana M., et al. Bioactive compounds and antimicrobial activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) berries and leaves extract obtained by different soil management system. *Scientia Horticulturae*, 2017, 222: 69-75.
90. KÄHKÖNEN, Marja P.; HOPIA, Anu I.; HEINONEN, Marina. Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2001, 49.8: 4076-4082.
91. HUKKANEN, Anne T., et al. Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, 54.1: 112-119.
92. BARTKIENE, Elena, et al. Improvement of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria in combination with berries/fruits and dairy industry by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99.8: 3992-4002.]
93. TYAGI, Bhawna, et al. Antibacterial activity of phenolics compounds against pathogenic bacteria. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2015, 35: 16-18.
94. FIGUEROA, Lilian E.; GENOVESE, Diego B. Pectin gels enriched with dietary fibre for the development of healthy confectionery jams. *Food technology and biotechnology*, 2018, 56.3: 441-453.
95. ZANJANI, Mohammad Ali Khosravi, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6.26: 5511-5517.
96. MIRZAEI, H.; POURJAFAR, H.; HOMAYOUNI, A. Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. *Food chemistry*, 2012, 132.4: 1966-1970.