

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

DALIA ČIŽEIKIENĖ

**BAKTERIOCINUS GAMINANČIŲ PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ
BIOPRODUKTAI, JŲ ANTIMIKROBINIS IR FITAZINIS
AKTYVUMAS BEI TAIKYMAS**

Daktaro disertacija

Technologijos mokslai, chemijos inžinerija (05T)

2015, Kaunas

Disertacija parengta 2010 – 2014 metais Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakultete, Maisto mokslo ir technologijos katedroje. Dalis tyrimų atlikta Kopenhagos universitete, Gamtos mokslų fakultete, Maisto mokslo katedroje, Danija (University of Copenhagen, Faculty of Science, Department of Food Science, Food Microbiology section); Botanikos institute, Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje, Vilnius; ir LAMMC Žemdirbystės institute, Augalų patologijos ir apsaugos skyriuje, Kėdainių r. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (doktorantų stažuotės užsienio mokslo centruose, 2012–2013; projektas SVE-09/2011 BIOFITAS) ir Mokslo inovacijų ir technologijų agentūra (projekto Nr 31V BIOEKOTECH).

Mokslinė vadovė:

Prof. habil. dr. Gražina JUODEIKIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T).

TURINYS

SIMBOLIAI IR SANTRUMPOS.....	5
ĮVADAS.....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
1.1. PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ DUONOS RAUGUOSE CHARAKTERISTIKA IR JŲ PANAUDOJIMO GALIMYBĖS BIOPRODUKTŲ GAMYBAI.....	10
1.1.1. Pieno rūgšties bakterijų metabolizmo produktų antimikrobinis aktyvumas..	13
1.1.2. Fermentacinės terpės ir kitų veiksnių įtaka antimikrobiniam pieno rūgšties bakterijų aktyvumui.....	21
1.1.3. Raugų pieno rūgšties bakterijų identifikavimui taikomi metodai.....	24
1.2. MIKROORGANIZMŲ PANAUDOJIMO GALIMYBĖS EKOLOGINĖS ŽEMDIRBYSTĖS VYSTYMUI.....	24
1.2.1. <i>Fusarium</i> genties ir <i>Cochliobolus sativus</i> mikroskopinių grybų sukeltos pašaknio ligos.....	25
1.2.2. Biologiniai preparatai kovai su pašaknio ligomis ekologinėje žemdirbystėje.....	26
1.3. PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ PANAUDOJIMO GALIMYBĖS KEPINIŲ MAISTINEI VERTEI DIDINTI.....	27
1.3.1. Mitybiniu požiūriu svarbių medžiagų pasiskirstymas anatomicinėse grūdo dalyse ir viso grūdo dalių miltų maistinė vertė.....	27
1.3.2. Fito rūgštis ir fitatų grūdinėje žaliavoje paplitimas.....	30
1.3.3. Maistinės vertės mažėjančią sąlygojanti mineralinių medžiagų sąveika su fito rūgštimi.....	31
1.3.4. Fermentinis fitatų skaldymas.....	32
1.3.5. Pieno rūgšties bakterijų fitazinis aktyvumas ir jų panaudojimo galimybės kepinų maistinei vertei didinti.....	34
1.4. BAKTERIOFAGAI IR JŲ VAIDMUO FERMENTACIJOS PROCESUOSE.....	35
1.4.1. Pieno rūgšties bakterijas infekuojantys bakteriofagai.....	36
1.5. LITERATŪRINĖS DALIES APIBENDRINIMAS IR DARBO TIKSLŲ PAGRINDIMAS.....	38
2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI.....	40
2.1. TYRIMŲ OBJEKTAI.....	40
2.1.1. Mikroorganizmai ir auginimo sąlygos.....	40
2.1.2. Pramoniniai duonos raugai fitaziniu aktyvumu pasižyminčių pieno rūgšties bakterijų išskyrimui.....	42
2.1.3. Kvietiniai kepiniai mineralinių medžiagų pasisavinamumo įvertinimui.....	42
2.1.4. Apkrėsti sėkliniai vasarinių kviečių grūdai.....	43
2.1.5. Augalinių produktų terpės bioproducto gamybai.....	43
2.1.6. Duonos raugai bakteriofagų išskyrimui ir temperatūros įtakos pieno rūgšties bakterijų rūšių populiacijos vertinimui.....	44
2.2. TYRIMO METODAI.....	44
2.2.1. Pieno rūgšties bakterijų antimikrobinio poveikio vertinimas.....	44
2.2.2. Pieno rūgšties bakterijų išskyrimas iš pramoninių duonos raugų.....	46
2.2.3. Fitaziniu aktyvumu pasižyminčių pieno rūgšties bakterijų atranka.....	46
2.2.4. Genetinis pieno rūgšties bakterijų identifikavimas.....	47

2.2.5. Pieno rūgštis bakterijų fitazinio aktyvumo nustatymas	49
2.2.6. Mineralinių elementų kiekio kvietiniuose kepinuose nustatymas	50
2.2.7. Terpės ir fermentacijos sąlygų įtakos pieno rūgštis bakterijų aktyvumui nustatymas	50
2.2.8. Bioproducto reologinių savybių tyrimas	51
2.2.9. Pieno rūgštis bakterijų bioproducto išbandymas grūdų sėklų biologinės taršos mažinimui ir sveikatingumo didinimui	51
2.2.10. Bioproductų panaudojimas ir jų antimikrobinio poveikio vertinimas kepinuose	53
2.2.11. Bakteriofagų išskyrimas ir gryninimas	53
2.2.12. Statistinis duomenų apdorojimas	54
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	55
3.1. IŠSKIRTŲ IŠ DUONOS RAUGŲ BAKTERIOCINUS GAMINANČIŲ PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ ANTIMIKROBINIS POVEIKIS	55
3.1.1. Pieno rūgštis bakterijų metabolizmo produktų antimikrobinis poveikis	55
3.1.2. Pieno rūgštis bakterijų gaminamų į bakteriocinus panašių medžiagų antimikrobinis poveikis	63
3.1.3. Pieno rūgštis bakterijų neutralizuotų metabolizmo produktų antigrybinis poveikis	65
3.1.4. Pieno rūgštis bakterijų ląstelių antimikrobinis poveikis	67
3.2. PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ FITAZINIS AKTYVUMAS	68
3.3. VEIKSNIAI, AKTYVINANTYS IR SLOPINANTYS PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ AKTYVUMĄ	73
3.3.1. Fermentacinės terpės ir pieno rūgštis bakterijų kultivavimo sąlygų įtaka į bakteriocinus panašių medžiagų aktyvumui	73
3.3.2. Įvairios kilmės augalinių produktų panaudojimo galimybės pieno rūgštis bakterijų kultivavimui ir metabolizmo produktų susidarymui	80
3.3.3. Temperatūrų įtaka pieno rūgštis bakterijų rūšiniams pokyčiams duonos raugų fermentacijos gamybinėse sąlygose metu	86
3.3.4. Bakteriofagai ir jų įtaka pieno rūgštis bakterijų pokyčiams raugų dauginimo gamybinėse sąlygose metu	88
3.4. PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ PANAUDOJIMAS NAUJŲ BIOPRODUKTŲ GAMYBOJE	94
3.4.1. Pieno rūgštis bakterijų bioproductų panaudojimo galimybės sėklinių vasarinių kviečių grūdų biologinės taršos mažinimui ir sveikumo didinimui	94
3.4.2. Fitaziniu aktyvumu pasižyminčių pieno rūgštis bakterijų panaudojimo galimybės kvietinių viso grūdo dalių kepinų maistinės vertės ir saugos didinimui	100
IŠVADOS	108
LITERATŪRA	110
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS	128
PADĖKA	133
PRIEDAI	134

SIMBOLIAI IR SANTRUMPOS

AV	aktyvumo vienetai
BDA	bulvių dekstrozės agaras
biovar.	biovaras
BPM	į bakteriocinus panašios medžiagos
BTR	bendras titruojamasis rūgštingumas
dNTP	deoksiribonukleotidų trifosfatas
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
IF	inozitolio fosfatas
KSV	kolonijas sudarantys vienetai
MHS	Mueller-Hinton sultinys
MMT+FIT	minimalaus maistingumo terpė, papildyta fito rūgšties dikalio druska
MMT-P	minimalaus maistingumo terpė, kurios sudėtyje nėra fosforo
MMT+P	minimalaus maistingumo terpė papildyta KH_2PO_4
MP	metabolizmo produktai
MPGA	mielių ekstrakto, peptono ir gliukozės agaras
MS	mitybinis sultinys
MSS	600 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio sugertis tiriamąja suspensija
NMP	neutralizuoti metabolizmo produktai
MRS	de Man, Rogosa ir Sharpe mitybinė terpė
mMRS	modifikuota de Man, Rogosa ir Sharpe mitybinė terpė
PRB	pieno rūgšties bakterijos
PGR	polimerazės grandininė reakcija (<i>angl.</i> polymerase chain reaction, PCR)
<i>ps</i> -PGR	pasikartojančio sekvenavimo polimerazės grandininė reakcija (<i>angl.</i> repetitive sequence based polymerase chain reaction, rep-PCR)
pv.	patovaras
RNR	ribonukleorūgštis
SDA	Sabouraud dekstrozės agaras
SSI	smegenų širdies infuzinis sultinys
s.m.	sausosios medžiagos
ssp.	porūšis (<i>angl.</i> subspecies)
TAE	tris-acetato-etilendiaminotetraacto rūgštis
TCA	trichloracto rūgštis
Xaa	bet kuri aminorūgštis

Mikroorganizmų genčių sąrašas

A. – *Aspergillus*
Alt. – *Alternaria*
Aure. – *Aureobasidium*
B. – *Bacillus*
C. – *Candida*
Coch. – *Cochliobolus*
D. – *Debaryomyces*
E. – *Escherichia*
Ent. – *Enterococcus*
F. – *Fusarium*
G. – *Geotrichum*
Y. – *Yersinia*
K. – *Kluyveromyces*
L. – *Lactobacillus*
Lact. – *Lactococcus*

Leuc. – *Leuconostoc*
List. – *Listeria*
P. – *Pediococcus*
Penic. – *Penicillium*
Pi. – *Pichia*
Ps. – *Pseudomonas*
R. – *Rhodotorula*
Rh. – *Rhizopus*
S. – *Salmonella*
Sc. – *Saccharomyces*
Sach. – *Saccharomycopsis*
St. – *Staphylococcus*
Strep. – *Streptococcus*
Z. – *Zygosaccharomyces*

ĮVADAS

Temos aktualumas

Grūdų produktai, įskaitant kasdien vartojamus duonos kepinius, yra mitybinės piramidės pagrindas ir pagrindinis skaidulinių ir mineralinių medžiagų, pvz., geležies, kalcio, magnio, seleno, cinko, taip pat ir folio rūgšties, jodo, B grupės vitaminų šaltinis. Tačiau mineralinių medžiagų pasisavinamumas žmonių ir gyvūnų organizme iš grūdų produktų skaidulinių medžiagų yra ribotas. Jų sudėtyje esanti fito rūgštis linkusi su skaidulinių medžiagų mineralinėmis medžiagomis sudaryti organizmo neįsisavinamus fitatų kompleksus. Ši problema ypač aktuali viso grūdo dalių kvietinių kepinų gamyboje, kur naudojami pagreitinanti tešlos gamybos būdai ir fermentacijos metu mineralinės medžiagos nėra išlaisvinamos iš fitatų kompleksų. Dėl mineralinių elementų trūkumo kasdieninėje mityboje ir nepakankamo jų įsisavinimo iš grūdų produktų žmogaus organizme atsiranda specifiniai medžiagų apykaitos sutrikimai, sukelti įvairius negalavimus ir netgi susirgimus.

Įvertinant šias mitybos problemas, aktuali naujų biotechnologinių priemonių, leidžiančių padidinti mineralinių medžiagų pasisavinamumą iš grūdų produktų, paieška. Viena iš natūralių ir dažniausiai galimų naudoti kvietinių kepinų kokybei pagerinti priemonių galėtų būti fitaziniu aktyvumu pasižymintys mikroorganizmai. Pastaruoju metu daugelyje šalių mokslininkų susidomėjimo sulaukė tiek mielės, tiek pieno rūgšties bakterijos (PRB), pasižyminčios fitaziniu aktyvumu. Literatūroje sutinkamos prieštaringos nuomonės dėl PRB fitazinio aktyvumo. Šiuo metu nėra išskirtos PRB, pasižyminčios dideliu fitaziniu aktyvumu, kurias būtų galima panaudoti duonos gamyboje. Todėl jų paieška ir išskyrimas iš fermentuotų produktų bei tolesnis pritaikymas vystant naujus bioproduktus yra aktualus, sprendžiant mineralinių medžiagų pasisavinamumo problemą. Vis plačiau nagrinėjamos galimybės šiam tikslui panaudoti antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčias PRB, kurių sintetinami bakteriocinai gali slopinti duonos ligas sukeliančių mikroorganizmų, pvz., *Bacillus subtilis*, ir mikroskopinių grybų augimą.

Duonos gamybos technologijoje, ypač vasaros laikotarpiu, aktuali išlieka kepinų mikrobiologinio gedimo, kurį sukelia šiltuoju metų laikotarpiu kepyklose plintantys *Bacillus subtilis* ir mikroskopiniai grybai, problema. Pastaruoju metu didelio mokslininkų susidomėjimo sulaukė ir į bakteriocinus panašias medžiagas (BPM) gaminančios PRB, kurių antimikrobinis poveikis pasireiškia prieš įvairias bakterijas ir net maisto patogenus, pvz., *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia* gentims priklausančias bakterijas. Natūralūs priedai – PRB fermentuoti bioproduktai, pasižymintys tiek antimikrobinėmis, tiek ir fitaziniu aktyvumu – galėtų būti vienas iš būdų sulėtinti kvietinės duonos mikrobiologinį gedimą ir tuo pačiu padidinti kvietinių kepinų, praturtintų skaidulinėmis medžiagomis, maistinę vertę.

KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje jau anksčiau buvo įvertinta lietuviškų pramoninių duonos raugų bei spontaninių ruginių raugų mikroflora ir išskirtos iš jų penkios bakteriocinus gaminančios PRB: *Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermės. Pirminiai šių mikroorganizmų antimikrobinės savybių tyrimo rezultatai parodė vykdomų darbų perspektyvumą ir tikslingumą plėsti

antimikrobinų preparatų taikymą ne tik duonos pramonėje, bet ir kitose srityse, ypač ekologinėje žemdirbystėje mažinti grūdų sėklos biologinę taršą. Todėl aktuali naujų terpių, skirtų PRB kultivuoti, paieška, atkreipiant dėmesį į šalutinius maisto pramonės produktus, galinčius atpiginti bioproduktų gamybą.

Tiriant PRB panaudojimo galimybes fermentacijos procesuose ir naujiems bioproduktams kurti, būtina iširti fermentacijos inhibitorius bakteriofagus, kurie, patekę į fermentacijos terpę, gali suardyti jiems jautrias PRB ląsteles ir fermentacijos procesą pakreipti nepageidaujama linkme, todėl būtų gaunamas nekokybiškas produktas. Nors žinoma, kad bakteriofagai yra atsakingi už fermentacijos proceso nesėkmes, tačiau mažai duomenų yra apie duonos raugų PRB atakuojančius bakteriofagus. Iki šiol nėra duomenų ir apie bakteriofagų įtaką PRB populiacijai ilgalaikės duonos raugų gamybos metu.

Disertacinio darbo tikslas

Nustatyti pieno rūgšties bakterijų, išskirtų iš duonos raugų, antimikrobinį ir fitazinį aktyvumą, bei įvertinti bakteriocinus gaminančių pieno rūgšties bakterijų panaudojimo galimybes ekologinėje žemdirbystėje vasarinių kviečių grūdų sėklos biologinės taršos mažinimui ir viso grūdo dalių kvietinių kepininių maistinės vertės ir saugos didinimui.

Darbo tikslui pasiekti suformuluoti šie uždaviniai:

- 1 Nustatyti bakteriocinus gaminančių pieno rūgšties bakterijų ir jų metabolizmo produktų antimikrobinį aktyvumą prieš grūdų sėklų ir maisto produktų gedimą sukeliančius mikroorganizmus;
- 2 Įvertinti terpės komponentų ir fermentacijos sąlygų įtaką antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių į bakteriocinus panašių medžiagų aktyvumui;
- 3 Išskirti iš pramoninių duonos raugų, atrinkti ir genetiškai identifikuoti fitaziniu aktyvumu pasižyminčias PRB ir įvertinti jų fitazinį aktyvumą (intraląstelinį ir ekstraląstelinį), o taip pat nustatyti bakteriocinus gaminančių PRB fitazinį aktyvumą;
- 4 Įvertinti, imituojant virškinamojo trakto terpės pH vertes, atrinktų fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB bioproduktų, panaudojimo galimybes, viso grūdo dalių kvietinių kepininių biologiškai pasisavinamų mineralinių medžiagų padidinimui ir mikrobiologinio gedimo lėtinimui;
- 5 Išskirti ir charakterizuoti bakteriofagus iš duonos raugų ir įvertinti jų poveikį PRB populiacijai bioproduktų fermentacijos metu;
- 6 Nustatyti temperatūros įtaką PRB rūšių populiacijos pokyčiams duonos rauguose;
- 7 Iširti PRB bioproduktų įtaką vasarinių kviečių grūdų sėklos biologinės taršos mažinimui ir sveikumo didinimui.

Mokslinis darbo naujumas

Pirmą kartą įvertintas iš lietuviškų ruginių duonos raugų išskirtų bakteriocinus gaminančių PRB (*Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10) metabolizmo produktų, antimikrobinis aktyvumas prieš įvairias bakterijas priklausančias *Bacillus*,

Pseudomonas, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Listeria*, *Yersinia* gentims ir mikroskopinius grybus priklausančius *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* ir kt. gentims bei šio poveikio ypatumai.

Kvietinių kepinų su padidintu skaidulinių medžiagų kiekiu maistinės vertės didinimui atrinktos didžiausiu fitaziniu aktyvumu pasižyminčios bakteriocinus gaminančios PRB ir *in vitro* sąlygomis įrodytos jų panaudojimo galimybės mineralinių medžiagų pasisavinamumo didinimui.

Ištirtos L-pieno rūgšties gamybos galimybės iš maisto gamybos šalutinių produktų (sėlenų, melasos, salyklojų ir žlaugtų).

Pirmą kartą vasarinių kviečių grūdų sėklų biologinės taršos – *Fusarium*, *Alternaria* genčių ir *Cochliobolus sativus* rūšies mikroskopinių grybų mažinimui bei grūdų sveikumo didinimui išbandyti PRB bioproduktai ir nustatytas jų teigiamas poveikis.

Praktinė darbo vertė

Sukurtas naujas PRB bioproduktas, leidžiantis grūdų sėklų paviršiuje sumažinti *Fusarium*, *Alternaria*, *Cochliobolus sativus* infekcijas, šaknų ligotumą bei sėklų pažeidimą *Fusarium* genties ir *Cochliobolus sativus* mikroskopiniais grybais. Įrodyta, kad maisto gamybos šalutiniai produktai – kviečių sėlenos, salyklojai, melasa, žlaugtai, taip pat galėtų būti (ne tik bulvių sultys) tinkama terpė PRB dauginimui ir antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčios pieno rūgšties (įskaitant L+ izomerą) susidarymui.

Sukurti antimikrobinio ir fitaziniu aktyvumu pasižymintys bioproduktai, kvietinių viso grūdo dalių kepinų maistinės vertės didinimui ir mikrobiologinio gedimo lėtinimui, panaudojant atrinktas PRB, o jų dauginimui – viso grūdo dalių kvietinių miltų terpę.

Nustatyta, kad PRB sudėtis duonos rauguose laikui bėgant keičiasi, dėl fagų infekcijos ir temperatūros pokyčių kepyklose, todėl tikslinga dažniau ruošti naują gamybinį raugą.

Ginamieji disertacijos teiginiai

- Antimikrobinio ir fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB panaudojimas viso grūdo dalių kvietinių kepinų gamyboje didina mineralinių medžiagų pasisavinamumą ir lėtina kepinų mikrobiologinį gedimą.
- PRB bioproduktai mažina mikroskopinių grybų infekciją vasarinių kviečių grūdų sėklų paviršiuje, daigų pašaknio ligotumą bei sėklų pažeidimą *Fusarium* ir *Cochliobolus sativus* mikroskopiniais grybais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ DUONOS RAUGUOSE CHARAKTERISTIKA IR JŲ PANAUDOJIMO GALIMYBĖS BIOPRODUKTŲ GAMYBAI

Raugas yra miltų ir vandens mišinys, kuriame vyksta pieno rūgšties bakterijų (PRB) ir mielių sukeltas fermentacijos procesas. Raugai naudojami tiek ruginės, tiek kvietinės duonos gamyboje kepinių tekstūros, aromato bei skonio pagerinimui, taip pat duonos realizacijos trukmės prailginimui, sulėtinant mikrobiologinį gedimą ir žiedėjimą. Pastaruoju metu atkreiptas dėmesys į ruošiamų su raugu kepinių maistinės vertės didinimo galimybes [1, 2, 3] ir vartojimo trukmės prailginimą [4].

Literatūroje duonos raugai skirstomi į savaiminius, pradinius ir pramoninius [5]. Pirmuoju atveju savaiminiai raugai ruošiami iš miltų ir vandens bei fermentuojami vieną–dvi dienas kambario temperatūroje. Tokiuose rauguose dominuoja natūraliai miltuose esantys mikroorganizmai (pieno rūgšties bakterijos), ir tešla rūgštėja dėl susidariusios pieno rūgšties. Duonos gamybiniame cikle plačiausiai naudojamas pramoninis raugas, tada dalis raugo sunaudojama duonai gaminti, o kita dalis atnaujinama, pridedant miltų ir vandens, ir taip išlaikant PRB aktyvumą ilgą laiką. Pramoniniam raugui gaminti naudojamas pradinis raugas, kuris ruošiamas pradiname gamybos etape iš grynų PRB ir / arba mielių. PRB kiekis rauguose sudaro 10^8 – 10^9 KSV/g, o mielių – 10^6 – 10^7 KSV/g [6], PRB ir mielių santykis duonos rauguose yra 100:1. Literatūroje minimi šie rauguose vykstančios fermentacijos tipai: homofermentinė ir heterofermentinė pienarūgštė fermentacija ir alkoholinė fermentacija. Fermentacijos metu skylantys piruvatai sąlygoja susidarymą minorinių tarpinių junginių ir galutinių produktų, kurie turi įtakos skoniui ir aromatu [7]. Pagrindiniai heterofermentiniai metabolizmo produktai – pieno ir acto rūgštys – sąlygoja pH verčių sumažėjimą rauguose. Optimaliai fermentuotuose rauguose pH vertės yra 3,5–3,8 [8, 9, 10]. Raugų bendro titruojamojo rūgštingumo (BTR) vertės, kurios priklauso nuo fermentacijos temperatūros, miltų tipo ir vandens santykio, kvietiniuose rauguose yra nuo 8 iki 11 smulkaus malimo miltams [8, 11] ir nuo 16 iki 22 viso grūdo dalių miltams, o ruošiant raugus iš ruginių miltų šio rodiklio vertės yra 15–26 [6, 9]. Pieno ir acto rūgščių kiekis bei jų santykis rauguose yra labai svarbus duonos aromatu ir skoniui, kepinių mikrobiologinio saugumo padidinimui bei šviežumo prailginimui [5].

Dažniausiai iš raugų išskiriamos PRB priklauso *Lactobacillaceae* šeimai. Šiai šeimai priklausančios bakterijos yra gramteigiamos, katalazei neigiamos, nesudarančios sporų, aerotolerantiškos arba mikroaerofilinės bei tolerantiškos druskai, be to, yra reiklios angliavandenių, aminorūgščių, peptidų, mineralinių medžiagų, nukleorūgščių ir vitaminų, atžvilgiu. Šių bakterijų energijos šaltinis yra angliavandeniai, o pagrindinis jų metabolizmo produktas – pieno rūgštis. Svarbiausios yra *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* ir *Streptococcus* genčiai priklausančios PRB [5, 12]. Pagal angliavandenių fermentacijos būdą PRB skirstomos į tris grupes: griežtos (obligatinės)

homofermentinės, fakultatyvinės heterofermentinės ir griežtos (obligatinės) heterofermentinės PRB [13]. Griežtos homofermentinės PRB beveik pilnai fermentuoja heksozes iki pieno rūgšties (>85 %) pagal Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) schemą. Šios PRB taip pat fermentuoja fruktozę, tačiau nei gliukonatų, nei pentozų nefermentuoja. Fakultatyvinės heterofermentinės PRB beveik pilnai fermentuoja heksozes iki pieno rūgšties pagal EMP schemą. Pentozės yra šių PRB fermentuojamos iki pieno ir acto rūgšties. Griežtos heterofermentinės PRB fermentuoja heksozes iki pieno ir acto rūgšties, etanolio ir CO₂. Pentozės fermentuojamos iki pieno ir acto rūgšties. Tarpiniai PRB homofermentinės ir heterofermentinės fermentacijos junginiai yra piruvatai, kurių skilimas fermentacijos metu sąlygoja tarpinių junginių ir galutinių fermentacijos produktų susidarymą, kurie turi įtakos maisto produktų skoniu ir aromatu bei pasižymi antimikrobinėmis savybėmis [14]. Antimikrobinėmis savybėmis pagrinde pasižymi tokie PRB metabolizmo produktai kaip pieno, acto rūgštys, diacetilas, vandenilio peroksidas, fenoliniai junginiai, benzenkarboksirūgštis [15, 16, 17], o pastaruoju metu didelio susidomėjimo sulaukė ir baltyminės prigimties junginiai – bakteriocinai ir į bakteriocinus panašios medžiagos (BPM) [18, 19, 20, 21].

PRB yra atsakingos už fermentacijos procesą, kadangi gamina natūraliems biokonservantams priskiriamus antimikrobinį aktyvumą pasižyminčius junginius, užtikrinančius produkto kokybę ir saugą. PRB yra pripažintos saugiomis, o jų gaminami bakteriocinai laikomi natūraliais inhibitoriais ir turi GRAS statusą (angl. Generally Recognized as Safe) – Pasaulinės Sveikatos Organizacijos pripažinimą. Pastaruoju metu didelio mokslininkų susidomėjimo sulaukė savitomis savybėmis pasižyminčių bioproduktų gamyba, naudojant jų fermentacijai atrinktas pradinės PRB kultūras. PRB parenkamos pagal pageidaujimą gauti poveikį technologiniam procesui ir gatavo kepinio kokybei. Parinkus atitinkamas pradinės kultūras, galima pagerinti grūdų produktų su PRB raugais aromatą [22, 23, 24], reologines ir juslines savybes [25, 26], taip pat išvengti mikrobiologinio gedimo [27].

Vienas iš svarbiausių duonos gedimų yra mikroskopinių grybų sukeltas kepinų pelėjimas. Duonos pelėjimą dažniausiai sukelia *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium* ir *Monilia* gentims priklausantys mikroskopiniai grybai [27]. Mikroskopinių grybų fermentams hidrolizavus krakmolą, baltymus ir riebalus, susidarę hidrolizės produktai suteikia kepinui nemalonų skonį ir kvapą, o kai kurie mikroskopiniai grybai gamina toksinus ir gali sukelti mikotoksikozes. Siekiant išvengti mikroskopinių grybų sukeltą pelėjimą, naudojami natrio ir kalcio propionatai, sorbatai. Kaip alternatyva konservantams gali būti naudojamas antimikrobinis poveikiu pasižyminčių PRB raugas. Antigrybinis aktyvumas daugiausiai pasižymi PRB gaminamos pieno ir acto rūgštys, vandenilio peroksidas ir kiti jų metabolizmo produktai. Kai kurių PRB padermių gaminami bakteriocinai gali būti aktyvūs prieš mikroskopinius grybus. Juodeikienė su bendraautorais [25] nustatė bakteriocinus gaminančių ir antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių *P. acidilactici* fermentuotų raugų įtaką kvietinių kepinų pelėjimui. Autoriai nustatė, kad duonos kepiniai su *P. acidilactici* raugo priedu lėčiau pelijo. Be to, raugai, fermentuoti su *P. acidilactici*, slopino vieną iš dažniausiai duonos pelėjimą sukeliančių mikroskopinių grybų *Penic. commune* augimą.

Kitas svarbus kepinių mikrobinis gedimas yra bulvinė liga, kuri pasitaiko vasarą, esant palankioms sąlygoms jos pagrindinio sukėlėjo *B. subtilis* bakterijų augimui. Taip pat bulvinę ligą sukelti gali ir kitos *Bacillus* genties bakterijos, tokios kaip *B. licheniformis*, *B. megaterium* ir *B. cereus*. Pagrindiniai bulvinės ligos požymiai – nemalonus specifinis vaisių kvapas, panašus į sugedusių melionų, lipnus minkštumas, tįstantis siūlais. *Bacillus* bakterijos į duoną patenka iš žaliavų arba nesilaikant proceso higienos reikalavimų. *Bacillus* sporos yra atsparios karščiui ir išlieka duonos kepimo metu, kai maksimali temperatūra centriniuose kepalų sluoksniuose kelias minutes būna 97–101 °C [28, 29]. Literatūros duomenimis, bulvinės ligos galima išvengti naudojant 10 % PRB fermentuoto produkto kvietinės duonos receptūroje, tačiau tik tada, kai miltuose yra mažiau nei 10⁶ *Bacillus* sporų/g [30]. Corsetti su bendraautoriais [31] nustatė, kad *L. sanfranciscensis*, *L. brevis*, *L. fructivorans*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. farciminis*, *L. acidophilus*, *L. alimentarius* ir *L. hilgardii* slopino *B. subtilis* augimą. Todorov su bendraautoriais [32] iš ruginių raugų išskyrė *L. plantarum* ST31 sintetinamą bakteriociną – plantariciną ST31, kuris slopino *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* ir kai kurių patogeninių mikroorganizmų (*St. aureus*) augimą. Plantaricinas buvo stabilus plačiose pH verčių ribose nuo 3 iki 8 bei atsparus amilolitiniams fermentams. Pepe su bendraautoriais [29] paskelbė, kad *L. plantarum* E5, *L. sanfranciscensis* M207, *L. sakei* T56, *Leuc. mesenteroides* A27, *Weissella paramesenteroides* A51 ir *Ent. faecium* A86 slopino duonos bulvinės ligos sukėlėjų vystymąsi iki 7 dienų (priklausomai nuo duonos mėginių laikymo temperatūros). Digaitienė [33] tyrė PRB, išskirtas iš savaiminių duonos raugų. Ji nustatė, kad 67 % savaiminių ruginių duonos raugų bakterijų pasižymi antibakterinėmis savybėmis, iš kurių *L. sakei* MI806, *P. acidilactici* MI807, *P. pentosaceus* MI808, MI809 ir MI810 (pastaruoju metu pervadintos į *L. sakei* KTU05-6, *P. acidilactici* KTU05-7, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10) sintetina skirtingus bakteriocinus. Digaitienė nustatė kad, šios bakteriocinus gaminančios PRB slopino *B. subtilis* ir įvairias raugų PRB, pvz. *L. bulgaricus* 140.3-148.3-3, *L. acidophilus* 336, *Strep. thermophilus* 3070, *Leuc. cremoris* ir kt., o taip pat mikroskopinius grybus *Eurotium repens* IBT 18000 ir *Penicillium commune* IBT 18708. Mokslininkė pritaikė naują netradicinę kleisterizuotų grūdų terpę šių PRB vystymui ir kvietinės duonos kokybės pagerinimui.

Narbutaitė [34] pritaikė šias PRB ekstrudotos grūdinės žaliavos fermentacijai. Tyrė PRB fermentinius aktyvumus grūdinės žaliavos terpėse ir fermentinių preparatų poveikį PRB gaminamų bakteriocinų aktyvumui. Nustatė sakacino 806 ir pediocino 810 antimikrobinį poveikį prieš *B. subtilis* EC1524 smegenų širdies infuziniame (SSI) sultinyje. Pritaikė bakteriocinus gaminančias PRB pusruginei duonai gaminti. Nustatė, kad PRB fermentuoti produktai pasižymėjo teigiama įtaka kepinių savitajam tūriui, minkštimo aktyvumui bei struktūros tolygumui. Makaravičius [35] tyrė bakteriocinus gaminančių PRB *L. sakei* KTU05-6 ir *P. pentosaceus* KTU05-10 bakterijų panaudojimo galimybes nealkoholinio gėrimo gamyboje. Mokslininkas įrodė, kad arabinoksilo- ir ksilooligosacharidai misoje išlieka nesuskaldyti PRB fermentacijos metu. Nustatė, kad pakeitus mieles antimikrobiškai aktyviomis pieno rūgšties bakterijomis, galima pagaminti priimtino

kvapo ir skonio nealkoholinį gėrimą ir sulėtinti jame pašalinių mikroorganizmų dauginimąsi. Juodeikienė su bendraautoriais [36] panaudojo šias antimikrobiškai aktyvias PRB vaistinių prieskoninių augalų *Silybum marianum* L. fermentacijai, o fermentuotus produktus sėkmingai pritaikė kvietinių kepinų gamyboje. Fermentuoti *Silybum marianum* L. produktai sulėtino kepinų mikrobiologinį gedimą ir suteikė produktams malonų skonį ir aromatą, bei buvo priimtinesni vartotojams lyginant su kepiniais be fermentuotų PRB priedu.

Juodeikienė su bendraautoriais [37] tyrė *L. sakei* KTU05-6, *P. acidilactici* KTU05-7 ir *P. pentosaceus* KTU05-10 bakterijomis fermentuotų grūdų produktų laikymo skirtingose temperatūrose (šaldytuvo ir patalpos) įtaką duonos kokybei bei jos pokyčiams laikymo metu. Nustatė, kad didžiausiu stabilumu laikymo metu ir teigiamu poveikiu kepinio kokybei išsiskyrė *P. pentosaceus* fermentuoti ekstruduotų produktų priedai (20 % nuo miltų masės) ir šis teigiamas efektas pasireiškė, laikant fermentuotus produktus tiek 4 °C, tiek 30 °C temperatūroje iki 16 dienų. *L. sakei* fermentuotų produktų teigiamas efektas pasireiškė, laikant juos 4 °C temperatūroje iki 16 dienų, o 30 °C temperatūroje 6 dienas.

Pirminiai šių mikroorganizmų antimikrobinių savybių tyrimo rezultatai parodė vykdomų darbų perspektyvumą ir suteikė pagrindą plėsti šių PRB pritaikymą. Vertinant PRB platesnio pritaikymo galimybes svarbu nustatyti jų antimikrobinio poveikio spektrą prieš kitus mikroorganizmus, pvz., *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Listeria*, *Yersinia* genčių bakterijas ir mikroskopinius grybus priklausančius *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* ir kt gentims.

1.1.1. Pieno rūgšties bakterijų metabolizmo produktų antimikrobinis aktyvumas

PRB antimikrobinis poveikis pasireiškia daugiausia dėl pagrindinių jų metabolizmo produktų – pieno ir acto rūgščių – susidarymo ir sumažėjusių terpės pH verčių [38, 39, 40]. PRB taip pat gamina kitas įvairias organines rūgštis, tokias kaip benzenkarboksirūgštis, heksano, propiono, sviesto, valerijono rūgštys [41, 42], ir kitus mažos molekulinės masės antimikrobinius junginius – vandenilio peroksidadą [43], anglies dioksidadą, diacetilą [43], riebalų rūgštis [44], ciklinius peptidus [45, 46, 47]. Pastaruoju metu didelio mokslininkų susidomėjimo sulaukė baltyminės antimikrobiniu aktyvumu pasižyminčios medžiagos – bakteriocinai ar į bakteriocinus panašios medžiagos [48, 49, 50, 51, 52]. Antimikrobiniu aktyvumu pasižymintys baltyminės prigimties junginiai su bakteriocinams būdingomis savybėmis, kurių aminorūgščių seka ir sudėtis nėra identifikuota literatūroje, vadinami į bakteriocinus panašiomis medžiagomis (BPM) [53]. Antigrybiniu poveikiu pasižymėję PRB metabolizmo produktai pateikti 1.1 lentelėje. Visi šie junginiai gali dalyvauti slopinant kitų mikroorganizmų veiklą, apsaugant maisto produktus nuo pavojingų ligų sukėlėjų ar gedimo. Su laiku atrandama vis naujų, kol kas neidentifikuotų junginių, pasižyminčių antimikrobinėmis savybėmis.

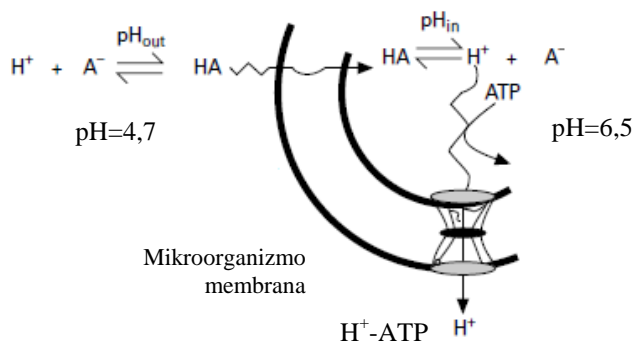
1.1 lentelė. Antigrybinių poveikiu pasižymėję PRB metabolizmo produktai

Junginys	Gamintojas	Nuslopintas mikroorganizmas	Literatūra
Galimai baltyminės prigimties	<i>P. acidilactici</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>	[54]
Galimai baltyminės prigimties	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CHD 28.3	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>Fusarium</i> genties	[55]
Heksano rūgštis, propiono rūgštis, sviesto rūgštis, valerijono rūgštis	<i>L. sanfranciscensis</i> CB1	<i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Monilia</i> genties	[41]
Benzenkarboksirūgštis, mevalono laktonas, 5-metil-2,4-imidazolidinodionas	<i>L. plantarum</i> VTT E78076	<i>F. avenaceum</i>	[42]
3-Fenilpieno ir 4-hidroksi-fenilpieno rūgštys	<i>L. plantarum</i> 21B	<i>Eurotium repens</i> IBT18000, <i>Eurotium rubrum</i> FTDC3228, <i>Penicillium</i> genties, <i>Endomyces fibuliger</i> , <i>A. niger</i> FTDC3227 ir IDM1, <i>A. flavus</i> FTDC3226, <i>Monilia sitophila</i> IDM/FS5 ir <i>F. graminearum</i> IDM623	[56]
3-Fenilpieno rūštis, (3 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-heksahidro-3-(fenil,metil)-pirolo[1,2]pirazino-1,4-dionas [ciklo(L-Phe-OH-L-Pro)], (3 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-heksahidro-7-hidroksi-3-(fenil,metil)-pirolo[1,2]pirazino-1,4-dionas [ciklo(L-Phe-L-Pro)]	<i>L. plantarum</i> MiLAB 393	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>K. marxianus</i>	[57]
Hidroksiribialų rūgštys (3-hidroksidekano rūgštis, 3-hidroksidodekano rūgštis, 3-hidroksitetradekano rūgštis ir 3-hidroksi-5- <i>cis</i> -dodekano rūgštis), ciklo (L-Phe-OH-L-Pro), 3-fenilpieno rūgštis	<i>L. plantarum</i> MiLAB14	Platus spektras	[44]
Fenolinis junginys	<i>P. acidilactici</i> LAB5	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Penicillium</i> genties	[58]
Galimai cikliniai peptidai	<i>P. pentosaceus</i>	<i>Penic. expansum</i>	[45]
Diacetilas, vandenilio peroksidas	<i>L. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Penicillium</i> genties, <i>F. oxysporum</i>	[43]
Acto rūgštis, 3-fenilpieno rūgštis	<i>L. reuteri</i> 1100	<i>F. graminearum</i>	[27]
Ciklo (Leu-Leu)	<i>L. plantarum</i> AF1	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	[19]

1.1 lentelė (tęsinys). Antigrybiniu poveikiu pasižymėję PRB metabolizmo produktai

Junginys	Gamintojas	Nuslopintas mikroorganizmas	Literatūra
Peptidai su mažesne nei 10 kDa molekuline mase, organinių rūgščių mišinys	<i>L. plantarum</i> LB1 ir <i>L. rossiae</i> LB5	<i>Penic. roqueforti</i> DPPMAF1	[59]
Peptidų mišinys	<i>L. plantarum</i> 1A7	Platus spektras	[60]
Galimai į baltymus panašios medžiagos	<i>L. fermentum</i> Te007, <i>P. pentosaceus</i> Te010, <i>L. pentosus</i> G004 ir <i>L. paracasei</i> D5	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>	[61]
PRB metabolitai	<i>L. pentosus</i> G004; <i>L. fermentum</i> Te007; <i>P. pentosaceus</i> Te010	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>	[62, 63]
Devynios karboksirūgštys: D-gliukurono rūgštis, 3-fenilpropano rūgštis, <i>p</i> -kumarino rūgštis, 3-fenilpieno rūgštis, 3-(4-hidroksifenil)pieno rūgštis (E)-3-fenilpropil-2-metil-2-enoinė rūgštis, benzenkarboksirūgštis; Riebalų rūgštis: natrio dekanooatas; Nukleozidai: citidinas, 2'-deoksicitidinas; Cikliniai peptidai: ciklo (L-His-L-Pro), ciklo (L-Pro-L-Pro), ciklo (L-Met-L-Pro), ciklo (L-Leu-L-Pro), ciklo (L-Tyr-L-Pro)	<i>L. amylovorus</i> DSM 19280	<i>A. fumigatus</i> J9,	[47]
PRB metabolitai	<i>L. amylovorus</i> DSM 19280	<i>A. niger</i> FST 4.21, <i>F. culmorum</i> TMW 4.0754 <i>Penic. expansum</i> FST 4.22 ir <i>Penic. roqueforti</i> FST 4.11	[47]
δ-Dodekanolaktonas	<i>L. plantarum</i> AF1	<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. petrakii</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>Penic. roqueforti</i> , <i>C. albicans</i>	[46]
6-Heptil-tetra-hidro-2H-pirano-2-onas			
3-Fenilpieno rūgštis, acto rūgštis, 2-propenilo esteris	<i>L. plantarum</i> IMAU10014	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Glomerella cingulata</i> , <i>Phytophthora drechsleri</i> , <i>Penic. citrinum</i> , <i>Penic. digitatum</i> ir <i>F. oxysporum</i>	[64]

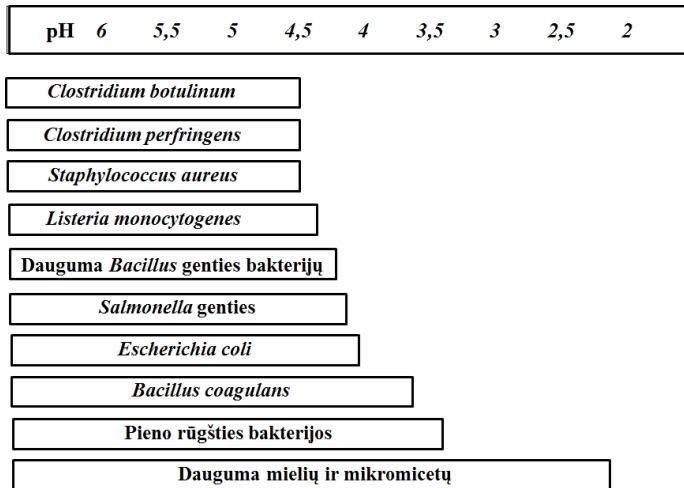
Organinės rūgštys. Pagrindinės PRB fermentacijos metu susidaranti organinės rūgštys yra pieno ir acto. Be šių rūgščių, priklausomai nuo PRB padermės, gali susidaryti ir kitos organinės rūgštys, pvz., benzenkarboksirūgštis, valerijono rūgštis, heksano rūgštis, 3-fenilpieno rūgštis, 4-hidroksi-pieno rūgštis, propiono rūgštis. Rūgščių antimikrobinis poveikis pasireiškia, kai jos difundavusios per mikroorganizmų ląstelės membraną sumažina citoplazmos pH vertes ir tokiu būdu yra stabdomi mikroorganizmų metaboliniai aktyvumai [39], be to, dėl rūgščių susidarymo sumažėję terpės pH vertės tiesiogiai slopina mikroorganizmų augimą [65]. Silpnų rūgščių konservantai pasižymi bendru veikimo pobūdžiu, nepaisant jų cheminės struktūros skirtumų [66]. Jų antimikrobinio poveikio veiksmingumas stipriau pasireiškia rūgštinėse terpėse ir didėja mažėjant pH vertėms. Vandeniniuose tirpaluose silpnos rūgštys egzistuoja nuo pH verčių priklausančioje pusiausvyroje tarp rūgšties molekulės ir jos atitinkamų krūvį turinčių jonų, pvz., acto rūgštis ir acetatas. Nedisocijuotoje formoje rūgšties didėja, mažėjant pH vertėms. pH vertė, prie kurios pasiekama molekulinės rūgšties ir disocijavusių jos jonų pusiausvyra, vadinama disociacijos konstanta (pK_a). Nedisocijuotoms rūgštims paveikus mikroorganizmus, jie retai yra nužudomi, tačiau augimas yra sustabdomas dėl labai užsitęsios latentinės fazės [66]. Silpnų rūgščių antimikrobinio poveikio mechanizmas siejamas su rūgšties molekulės difuzija per bakterijos membranos plazmą į citoplazmą [67]. Rūgšties molekulei patekus į citoplazmą, kur terpės pH vertė neutrali, rūgštis disocijuoja į jonus. Disocijavę anijonai negali grįžti atgal (anapus plazmos membranos) ir dėl to anijonai koncentruojami ląstelės viduje (1.1 pav.). Ląstelės citoplazmos pH vertė dėl tokio poveikio pakinta, kadangi kiekvienos silpnos rūgšties molekulės disociacija vis labiau rūgština ląstelę. Vandenilio jonų pašalinimui iš ląstelės yra sunaudojama energija, tačiau, tokiu būdu ląstelėje padidėjus pH vertei, naujos silpnos rūgštys gali prasiskverbti ir rūgštinti citoplazmą [66]. Citoplazmos rūgštėjimas gali sustabdyti augimą slopindamas glikolizę [68] arba pražudyti ląstelę [66, 69].



1.1 pav. Numanoma silpnų rūgščių ir jų jonų pusiausvyra tarp terpės ir citoplazmos. Tik nedisocijavusios silpnos rūgšties molekulės gali laisvai prasiskverbti pro plazmos membraną. Krūvį turintys protonai (H^+) ir anijonai (A^-) yra užlaikomi ląstelėje; citoplazmos protonai yra pašalinami per membraną panaudojant ląstelės energiją [66]

Rūgščių antimikrobinis poveikis taip pat pasireiškia ir dėl žemų pH verčių [70]. Daugumos maisto produktų gedimą bei apsinuodijimus maistu sukeliančių

mikroorganizmų augimas prie pH verčių mažesnių nei 4,2 yra ribojamas ir gali būti kontroliuojamas, o rūgštims atsparios PRB, tarp jų ir *B. coagulans*, gali augti esant pH vertei 3,7. Be to, terpėje, kurios pH vertės mažesnės nei 3, gali augti mielės ir pelėsiai (1.2 pav.).



1.2 pav. pH verčių ribos mikroorganizmų augimui

Benthin ir Villadsen [71] nustatė, kad L-pieno rūgšties izomeras pasižymi didesniu antimikrobinu poveikiu, nei D-izomeras. Acto ir propiono rūgštys yra antimikrobiškai aktyvesnės lyginant su pieno rūgštimi dėl jų didesnių pKa verčių (pieno rūgšties – 3,08; acto ir propiono rūgščių – atitinkamai 4,75 ir 4,87). Be to, acto rūgštis pasižymi stipresniu antimikrobinu poveikiu, nei pieno ar citrinų rūgštys, mikroorganizmų *List. monocytogenes* augimui [72, 73], taip pat *B. cereus* [74] augimui ir sporų susidarymui [75].

Anglies dioksidas ir vandenilio peroksidas. Anglies dioksidas daugiausia susidaro PRB heterofermentacijos metu. Eklund [76] manymu, anglies dioksidas vaidina svarbų vaidmenį anaerobinės aplinkos sudaryme ir tai sąlygoja fermentinę dekarboksilizaciją ir CO₂ akumuliaciją membranos lipiduose, kas sukelia membranos pralaidumo sutrikimus. Devlieghere ir Debevere [77] nustatė, kad gramneigiamos bakterijos pasižymėjo didesniu jautrumu anglies dioksidui, nei gramteigiamos. Vandenilio peroksido antimikrobinis aktyvumas aiškinamas ląstelės membranos baltymų tam tikrų aktyvių grupių oksidacija, kuri sąlygoja fermentų inaktyvaciją bei membranos lipidų peroksidaciją, dėl ko padidėja membranos pralaidumas [78].

Diacetilas ir acetaldehidai. Diacetilas (2,3-butanodionas) yra sintetinamas kai kurių *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ir *Pediococcus* gentims priklausančių PRB padermių, tiek homofermentinės, tiek heterofermentinės fermentacijos metu fermentuojant sacharidus ar citratus. Diacetilo antimikrobinis poveikis aiškinamas ryšių su argininą pernešančiais baltymais sudarymu, tokiu būdu ląstelėse atsiranda arginino trūkumas, nes nebėra kam jo pernešti, ir ląstelės nebegali vystytis [79]. Jay [80] nustatė, kad diacetilas antimikrobiškai buvo aktyvus prie

mažesnės pH vertės nei 7, be to, PRB buvo atspariausias diacetilo poveikiui. 300 µg/g diacetilo koncentracija visiškai nuslopino 90 % testuotų bakterijų, nepriklausančių PRB. Jautriausias diacetilo poveikiui buvo *Pseudomonas* genties bakterijos. Kai kurios *Pseudomonas* genties bakterijos buvo nuslopintos prie 86 µg/g diacetilo koncentracijos, esant pH vertei 6. Be to, šis junginys buvo efektyvesnis prieš gramneigiamas bakterijas, mieles ir pelėsius, lyginant su gramteigiamomis bakterijomis. 344 µg/ml diacetilo slopino *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, *E. coli* ir *Aeromonas* genties bakterijas. Tačiau PRB fermentacijos metu susidaro gerokai mažesnė diacetilo koncentracija. Cogan [81] nustatė, kad *Lact. lactis* ssp. *diacetylactis* fermentacijos metu susidaro 4 µg/ml diacetilo. Dėl susidariusio mažo diacetilo kiekio fermentacijos metu praktinis diacetilo antimikrobinis poveikis ribotas, tačiau diacetilas gali veikti sinergetiškai su kitais antimikrobiniais aktyvumu pasižyminčiais junginiais ir prisidėti prie konservavimo poveikio efektyvumo [79].

Kitas svarbus antimikrobinis aktyvumu pasižymintis junginys, susidarantis PRB fermentacijos metu, yra acetaldehidas, kurio 10–100 µg/g koncentracija antimikrobiškai aktyvi prieš *St. aureus*, *S. typhimurium* ir *E. coli* [39].

Hidroksiriebalų rūgštys. Kai kurios PRB padermės, priklausančios *Lactobacillus* ir *Lactococcus* gentims, sintetina antimikrobinis aktyvumu pasižyminčias riebalų rūgštis [82]. Nesočiosios riebalų rūgštys pasižymi antimikrobinis poveikiu prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas bei mikroskopinius grybus, o jų poveikis priklauso nuo molekulės grandinės ilgio, dvigubųjų jungčių skaičiaus, koncentracijos ir terpės pH vertės [83]. Riebalų rūgščių antimikrobinis poveikis didėja didėjant dvigubųjų jungčių skaičiui riebalų rūgšties molekulėje [84].

Reuterinas. *L. reuteri* sintetina reuteriną, kuris pasižymi plačiu antimikrobinio poveikio spektru prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas bei mikroskopinius grybus [85, 86, 87]. Be to, reuterinas gali būti sintetinamas tokių padermių kaip *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. collinoides* ir *L. coryniformis* anaerobinėmis sąlygomis [88]. Reuterinui jautrūs mikroorganizmai priklauso *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida*, *Trypanosoma*, *Aspergillus* ir *Fusarium* gentims [65, 89]. Reuterino tirpumas vandenyje, poveikis plačiame pH verčių intervale, atsparumas proteolitiniams ir lipolitiniams fermentams praplečia jo pritaikymo sritį maisto pramonėje.

Cikliniai dipeptidai. Atrandama vis naujų, kol kas neidentifikuotų junginių, pasižyminčių antimikrobinėmis savybėmis. Apie ciklinių dipeptidų antimikrobinį poveikį pirmasis paskelbė Ström su bendraautoriais [57]. Jie nustatė, kad *L. plantarum* MiLAB 393 sintetinami cikliniai dipeptidai (3S,9S)-heksahidro-3-(fenil,metil)-pirolo[1,2]pirazino-1,4-dionas [ciklo (L-Phe-OH-L-Pro)] ir (3S,7R,9S)-heksahidro-7-hidroksi-3-(fenil,metil)-pirolo[1,2]pirazino-1,4-dionas [ciklo (L-Phe-L-Pro)] pasižymi antigrybiniu poveikiu *F. sporotrichioides*, *A. fumigatus*, *K. marxianus* mikroorganizmams, tačiau nėra antimikrobiškai aktyvūs prieš *Penic. roqueforti* ir *Z. bailii*. Be to, pasižymi sinergetiniu poveikiu kartu su kitais antimikrobiniais komponentais, tokiais kaip 3-fenil-L-pieno rūgštis. *F. sporotrichioides* ir *A. fumigatus* mikroorganizmų slopinimui minimali reikalinga fenilpieno rūgšties koncentracija yra 7,5 mg/ml, o ciklo (L-Phe-L-Pro) dipeptido –

20 mg/ml. Tuo tarpu 30 mg/ml ciklo (L-Phe-L-Pro) dipeptido koncentracija buvo toksiška jį sintetinančiai *L. plantarum* MiLAB 393 padermei.

Ryan su bendraautoriais [47] identifikavo *L. amylovorus* DSM19280 sintetinamus penkis ciklinius dipeptidus: ciklo (L-His-L-Pro), ciklo (L-Pro-L-Pro), ciklo (L-Met-L-Pro), ciklo (L-Leu-L-Pro) ir ciklo (L-Tyr-L-Pro), kurių minimali antimikrobinio poveikio koncentracija *A. fumigatus* J9 yra 25–50 mg/ml.

Bakteriocinai. Fermentacijos metu PRB, be organinių rūgščių ir anksčiau paminėtų antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių junginių, sintetina ir baltymines medžiagas – bakteriocinus, kurie slopina pašalinių mikroorganizmų dauginimąsi. Bakteriocinų tyrimų pradžia siejama su 1928 metais padarytu nizino, kurį sintetino *Lact. lactis*, atradimu. Nizinas – policiklinis antibakterinis peptidas, sudarytas iš 34 aminorūgščių liekanų. Jo antibakterinis aktyvumas pasireiškia prieš daugelį PRB padermių, taip pat prieš *St. aureus*, *List. monocytogenes* bei vegetatyvines *Bacillus* genties ląsteles ir *Clostridium* genties bakterijas. Be to, nizinas slopina *Bacillus* ir *Clostridium* genčių bakterijų sporų vystymąsi. Šio bakteriocino atradimas patraukė ne tik mokslininkų, bet ir maisto pramonės atstovų dėmesį. Šiuo metu nizinas turi Pasaulinės Sveikatos Organizacijos pripažinimą bei JAV Maisto ir vaistų administracijos patvirtinimą [90]. Šiandien nizinas yra plačiai naudojamas visame pasaulyje kaip natūralus maisto produktų konservantas (E 234).

Bakteriocinų veikimas pagrįstas tuo, kad jie adsorbuojasi ant jautrių bakterijų ląstelių ir, įsiskverbę į ląstelės vidų, sutrikdo jų metabolizmą, todėl ląstelė žūva. Jie skirstomi į siauro veikimo spektro, kai veikia tik vieną gentį ar rūšį; vidutinio veikimo spektro, kai veikia kelias kitas gentis; ir plataus veikimo spektro, slopinantys daugelio panašių ar giminingų genčių veiklą [90, 91, 92, 93]. Pagal PRB gaminamų bakteriocinų biochemines ir genetines savybes jie skirstomi į keturias pagrindines klases: lantibiotikus, mažus hidrofobinius termostabilius peptidus, didelius termolabilius baltymus ir kompleksus su lipidais ar angliavandeniais sudarančius bakteriocinus (1.2 lent.) [21, 94, 95].

I bakteriocinų klasei priskiriami peptidai, turintys lantionino žiedą, dar vadinami lantibiotikais. Tai mažos molekulinės masės (< 5 kDa) termostabilūs peptidai, savo struktūroje turintys retas aminorūgštis – lantioniną, β-metillantioniną, dehidroalaniną. Atsižvelgiant į bakteriocinų cheminę struktūrą ir biologines savybes, pirmai klasei priklausantys lantibiotikai papildomai skirstomi į A ir B tipus. A tipui priskiriami linijinės struktūros teigiamą krūvį turintys peptidai, kurių molekulės ilgis yra iki 33 aminorūgščių. A tipo lantibiotikų aktyvumas siejamas su porų sudarymu ląstelės membranoje ir jos pažeidimu. B tipui priskiriami maži (iki 19 aminorūgščių likučių) globuliniai peptidai (turintys neigiamą krūvį arba krūvio neturintys). B tipo lantibiotikų antimikrobinis poveikis siejamas su specifinių fermentų inaktyvavimu [95, 96].

II klasei priskiriami bakteriocinai sudaryti iš mažų (<10 kDa), termostabilių, lantionino savo struktūroje neturinčių peptidų, kurių antimikrobinis veikimas siejamas su ląstelės membranos pažeidimu. II klasės bakteriocinai skirstomi į tris tipus (a, b ir c) ir yra didžiausia charakterizuotų bakteriocinų grupė. Ila tipui priklauso pediocino grupės bakteriocinai, kurie pasižymi išskirtiniu antimikrobinio poveikiu *List. monocytogenes* mikroorganizmams, todėl kartais dar yra vadinami

antilisteriniais bakteriociniais. Šiam tipui priklausantys bakteriocinai turi vienodą N-terminalinį galą, sudarytą iš aminorūgščių grandinės – Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys. Pediocinas PA–1 yra geriausiai ištirtas šios klasės atstovas, tačiau kol kas dar nėra įtrauktas į leistinų vartoti maisto priedų sąrašą [95, 96]. Iib klasei priskiriami bakteriocinai, kurių antimikrobinis poveikis pasireiškia dalyvaujant dviem peptidams. Šios klasės dvikomponenčius bakteriocinus galima suskirstyti į sinergetinio veikimo ir susisumuojančio veikimo. Pirmuoju atveju bakteriocino aktyvumas priklauso nuo suderinto abiejų peptidų veikimo, o būdami atskirai šie peptidai nepasižymi jokių antimikrobinio aktyvumu. Antruoju atveju kiekvienas peptidas atskirai pasižymi antimikrobinio poveikiu, tačiau, abiem peptidams veikiant suderintai, antimikrobinis aktyvumas prieš tikslinius mikroorganizmus žymiai padidėja [21, 51, 52, 97]. Iic klasei priskiriami cikliniai peptidai, kurių pirmąją aminorūgštį su paskutiniąja jungia kovalentinis ryšys [98] ir kiti įvairūs peptidai, neatitinkantys Iia ir Iib klasių reikalavimų ir neturintys lantionino žiedo.

1.2 lentelė. Bakteriocinų klasifikacija

Klasė	Pagrindinės savybės	Poklasis	Savybės	Pavyzdžiai
I klasė	Lantibiotikai molekulinė masė < 5 kDa, termostabilūs peptidai	A tipo	linijinė struktūra, turi teigiamą krūvį, molekulės ilgis iki 39 aminorūgščių likučių	nizinas A, nizinas Z, laktocinas, lacticinas 481, subtilinas, epiderminas mersacidinas
		B tipo	mažesni (iki 19 aminorūgščių likučių) globuliniai peptidai, turintys neigiamą arba neturintys krūvio	
II klasė	Lantionino savo struktūroje neturintys peptidai, molekulinė masė <10 kDa, termostabilūs	Iia tipo	antilisteriniai pediocino grupei priklausantys bakteriocinai turintys bendrą aminorūgščių grandinės N-terminalinį galą Tyr-Gly-Asn-Gly- Val-Xaa-Cys	pediocinas PA-1, sakacinas A, sakacinas P, leukocinas A, kurvacinas A
		Iib tipo	reikalaujantys dviejų peptidų antimikrobiniam aktyvumui pasireikšti	laktokocinas G, laktocinas M, laktacinas F, plantaricinas A
		Iic tipo	kovalentiniai ryšiai tarp pirmos ir paskutinės aminorūgšties sąlygoja ciklinę struktūrą	acidocinas B, enterocinas P, enterocinas B, cirkularinas A, reuterinas 6, laktokocinas enterolisinas A, helveticinas J, helveticinas V-1829, milericinas B
III klasė	Didelės molekulinės masės (>30 kDa), termolabilūs baltymai			plantaricinas S, leukonocinas A, laktocinas 27, pediocinas SJ1
IV klasė	Kompleksus su lipidais ar angliavandeniais sudarantys bakteriocinai			

III klasei priskiriami bakteriocinai yra didelės molekulinės masės (>30 kDa), termolabilūs baltymai, tačiau jie dar nėra galutinai ištirti. Šios klasės

bakteriocinai gali būti dviejų tipų – bakteriolitiniai fermentai (hemoliziniai), kurie palengvina baktericidinį poveikį lizuodami bakterinę ląstelę, ir neliziniai antimikrobiniai baltymai [18, 52].

IV klasei priskiriami bakteriocinai, kurių antimikrobinis aktyvumas pasireiškia peptidams sudarius kompleksus su lipidais ar angliavandeniais [99].

Bakteriocinus ir kitus antimikrobinio poveikio pasižyminčius junginius sintetinančios ir plačiu antimikrobinio poveikio spektru pasižyminčios PRB, veikiančios tiek prieš bakterijas, tiek prieš mikroskopinius grybus, galėtų būti sėkmingai naudojamos maisto biokonservavimui ir pakeisti cheminius konservantų priedus.

1.1.2. Fermentacinės terpės ir kitų veiksnių įtaka antimikrobiniam pieno rūgšties bakterijų aktyvumui

PRB fermentaciniais procesams palaikyti ir jų metabolizmo produktų susidarymui svarbi fermentuojamos žaliavos sudėtis (azoto ir anglies šaltiniai bei mineralinės medžiagos) bei fermentacijos veiksniai, tokie kaip temperatūra, terpės pH vertė, drėgnis, deguonies koncentracija.

Anglies šaltinis apsprendžia mikroorganizmo augimo, produkto gamybos bei šalutinių metabolitų kaupimosi greitį. Kuo greičiau anglies šaltinis yra įsisavinamas ir metabolizuojamas, tuo spartesnis šalutinių, nepageidaujamų metabolitų kaupimasis. Turi būti parenkamas atitinkamas anglies šaltinis, užtikrinantis optimalų mikroorganizmų augimą ir minimalų šalutinių produktų kaupimąsi. Kultivuojant sintetinėje terpėje kaip anglies šaltinis dažniausiai yra naudojamas glicerolis ar gliukozė, kai kuriose kompleksinėse terpėse kaip anglies šaltinis naudojama fruktozė, maltozė. Kompleksinėse mikroorganizmų kultivavimo terpėse kaip anglies šaltinis naudojama greitai asimiliuojama gliukozė, kadangi oligopeptidus ir aminorūgštis mikroorganizmai asimiliuotų per lėtai ir išsiskirtų didelis kiekis toksiškų antrinių metabolitų, o tai nulemtų labai mažas mikroorganizmų biomasių išėigas. Kompleksinėse mikroorganizmų kultivavimo terpėse anglies šaltinis turi būti gerai subalansuotas, kad būtų gaminami antimikrobiniai komponentai – bakteriocinai. Todorov ir Dicks [100] tyrė angliavandenių įtaką *L. pentosus* ST151BR gaminamų bakteriocinų aktyvumui. Autoriai nustatė, kad tokių angliavandenių kaip sacharozė ir fruktozė (20 g/l) panaudojimas PRB kompleksinėje mitybinėje terpėje neigiamai paveikė bakteriocinų aktyvumą, kuris sumažėjo atitinkamai 75 ir 50 % (priklausomai nuo PRB padermės), palyginus su poveikiu kaip anglies šaltinį naudojant maltozę, manozę ir laktozę (20 g/l). Gliukozės panaudojimas įvairiai paveikė bakteriocinų aktyvumus (priklausomai nuo panaudoto kiekio). 10, 15 ir 20 g/l gliukozės teigiamai veikė bakteriocinų aktyvumą, o mažesni ir ženkliai didesni (30 ir 40 g/l) kiekiai sumažino bakteriocinų aktyvumą net iki 94 %. Taip pat šių autorių buvo nustatyta, kad glicerolio kaip anglies šaltinio priedai mažino *L. pentosus* gaminamų bakteriocinų aktyvumą. Autoriai taip pat tyrė skirtingų terpės komponentų įtaką *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* bakteriocino ST33LD aktyvumui ir nustatė, kad, mitybinėje terpėje kaip anglies šaltinį naudojant 2 % sacharozės ar maltozės, du kartus padidėjo šio bakteriocino aktyvumas, lyginant su 2 % gliukozės ar laktozės [101]. Tuo tarpu didžiausi *L. plantarum* ST414BZ ir

ST664BZ padermių bakteriocinų aktyvumai buvo de Man, Rogosa ir Sharpe mitybinėje terpėje (MRS), kurioje gliukozė pakeista maltoze. ST664BZ bakteriocino aktyvumas buvo dvigubai didesnis, kai gliukozė buvo pakeista sacharoze, maltoze ar manoze [102]. Išnagrinėjus literatūroje pateiktus rezultatus apie angliavandenių kaip anglies šaltinio įtaką PRB gaminamų bakteriocinų aktyvumui, galima teigti, kad skirtingoms bakterijų rūšims ir jų porūšiams labiausiai tinkantis ir bakteriocinų aktyvumą didinantis anglies šaltinis turi būti parenkamas kiekvienai PRB padermei atskirai.

Kitas svarbus PRB mitybinis komponentas yra azoto šaltinis, kuris gali būti mineralinis arba organinis. Mineraliniu azoto šaltiniu gali būti amoniakas, amonio druskos arba nitratai. Organiniu azoto šaltiniu gali būti aminorūgštys, karbamidas arba oligopeptidai, kurie kompleksinėse mitybinėse terpėse būna mielių ir mėsos ekstraktuose, triptone ar peptone. Todorov ir Dicks [100], tyrė mitybinių komponentų įtaką *L. pentosus* ST151BR bakteriocinų aktyvumui ir nustatė triptono, o taip pat triptono ir mėsos ekstrakto kombinacijos teigiamą poveikį bakteriocinų aktyvumui. *L. pentosus* ST151BR bakteriocinų aktyvumas mažėjo, kaip azoto šaltinį naudojant tik mėsos ekstraktą arba tik mielių ekstraktą, taip pat ir triptono ir mielių ekstrakto kombinaciją, mėsos ekstrakto ir mielių kombinaciją bei triptono, mėsos ekstrakto ir mielių ekstrakto kombinaciją. Kitame darbe Todorov ir Dicks [101] tyrė skirtingų terpės komponentų įtaką *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* bakteriocino ST33LD aktyvumui ir nustatė, kad didžiausias bakteriocinų aktyvumas buvo terpėje, ruoštoje su triptonu, o triptono, mėsos ekstrakto bei mielių ekstrakto kombinacijos aktyvumą ženkliai sumažino. *L. plantarum* ST414BZ ir ST664BZ padermių bakteriocinų aktyvumas buvo didžiausias naudojant MRS mitybinę terpę (pH verčių ribose nuo 6 iki 6,5), kurioje naudotas vienintelis azoto šaltinis – triptonas [102]. Išnagrinėjus literatūroje pateiktus rezultatus, galima teigti, kad skirtingas azoto, kaip ir anglies šaltinis, skirtingai veikia PRB antimikrobinį komponentų – bakteriocinų aktyvumą.

Mitybinėje terpėje mineralinių druskų katijonai (Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} ir kt.) reikalingi biocheminių reakcijų katalizatorių – fermentų – aktyvumui užtikrinti, kad būtų palaikoma izotoninė aplinka. Larsen su bendraautorais [103] tyrė PRB, išskirtų iš duonos raugų, antimikrobinį aktyvumą ir nustatė, kad *L. bavaricus* MI401 gamino bavariciną. Autoriai taip pat nustatė, kad 100 $\mu\text{g/g}$ natrio nitrato priedas neturėjo įtakos bavaricino A gamybai, o NaCl priedas stipriai paveikė bavaricino A aktyvumą: papildžius MRS terpę 1 % NaCl, bavaricino A gamyba reikšmingai nepakito, o MRS terpę papildžius 3 ir 5 % NaCl priedu, bavaricino A aktyvumas 4 °C temperatūroje nepasireiškė, nors esamoje mitybinėje terpėje PRB augo. Todorov ir Dicks [100], tyrė mitybinės terpės komponentų įtaką *L. pentosus* ST151BR bakteriocinų aktyvumui, nustatė, kad neorganinis fosforas KH_2PO_4 (2 g/l) sąlygojo maksimalų šio bakteriocino aktyvumą. Autoriai taip pat nustatė K_2HPO_4 priedo (2 ir 5 g/l) teigiamą įtaką bakteriocinų aktyvumui. Didesni šios druskos kiekiai sumažino aktyvumą net iki 75 % [101, 104]. Todorov ir Dicks [102] tyrinėdami mitybinės terpės komponentų įtaką *L. plantarum* ST414BZ ir ST664BZ padermių bakteriocinų susidarymo aktyvumui nustatė, kad 2 g/l KH_2PO_4 priedas neigiamai paveikė bakteriocino ST414BZ aktyvumą, o bakteriocino

ST664BZ aktyvumą padidino du kartus. 20 ir 50 g/l priedas bakteriocino ST664BZ aktyvumą padidino net keturis kartus.

Tam, kad būtų užtikrintas geras ląstelių augimas, naudojami vitaminai, aminorūgštys, riebalų rūgštys ir kiti augimo veiksniai. Literatūros duomenimis, vitaminų priedai gali turėti skirtingą įtaką PRB gaminamų bakteriocinų susidarymui. Pasak Todorov ir Dicks [102], kurie tyrinėjo vitaminų įtaką *L. plantarum* ST414BZ ir ST664BZ padermių bakteriocinų aktyvumui, MRS mitybinės terpės praturtinimas vitaminais B₁₂, B₁ ar vitaminu C neskatino tiriamų bakteriocinų gamybos, o D,L-6,8-tioktinė rūgštis padidino bakteriocino ST664BZ aktyvumą du kartus, nors 50 % sumažino ST414BZ bakteriocino aktyvumą. Šių vitaminų priedai neturėjo įtakos ir *L. pentosus* ST151BR produkuojamų bakteriocinų aktyvumui [100]. *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ST33LD bakteriocinų aktyvumui vitaminų B₁₂, B₁ ir C priedai (1,0 µg/l) MRS terpėje, turėjo teigiamos įtakos [101].

Siekiant gauti didesnę biomasės kiekį, o tuo pačiu – ir didesnę tikslinio baltymo išėgą auginimo metu, kai kuriais atvejais reikalinga taikyti aeraciją, ypač aerobiniams mikroorganizmams. Anastasiadou su bendraautorais [105] tyrė *P. pentosaceus* augimą bei pediocino ir pieno rūgšties gamybą įvairios aeracijos sąlygomis. Autoriai naudojo orą kaip aerobines kultivavimo sąlygas, oro ir azoto dujų mišinį kaip pusiau aerobines sąlygas, ir azoto dujas, sudarydami anaerobines sąlygas. Pediocino SM-1 aktyvumas taikant pusiau anaerobines sąlygas buvo vidutiniškai 3,8 karto didesnis, lyginant su kitomis eksperimente išbandytais sąlygomis, o pieno rūgšties koncentracija po 52 val. kultivavimo pilnai aerobinėmis, pusiau anaerobinėmis ir anaerobinėmis sąlygomis buvo atitinkamai 6,9, 8,5 ir 9,2 g/l. Cabo su bendraautorais [106] nustatė, kad *L. lactis* nizino A gamyba padidėjo keturis kartus, kai deguonies kiekis dujų mišinyje buvo padidintas nuo 50 iki 100 %. Anastasiadou su bendraautorais [107] nustatė tokį pat ištirpusio deguonies poveikį pediocinui SA-1, gaminamam *P. acidilactici* NRRL B5627. Amali su bendraautorais [108], aeracijai naudodami dujų mišinį sudarytą iš 60 % deguonies, nustatė, kad *L. lactis* gaminamo nizino Z kiekis žymiai padidėjo. Literatūroje sutinkamus prieštarigus rezultatus būtų galima paaiškinti tuo, kad skirtingoms PRB reikalingos skirtingos aeravimo sąlygos, kad būtų gautas didžiausias antimikrobinų komponentų produktyvumas.

Tik optimali mitybinės terpės pH vertė užtikrina mikroorganizmų augimą ir lemia pageidaujamų metabolizmo produktų susidarymą. Terpės pH vertės palaikymui naudojamos buferinės sistemos (KH₂PO₄ ir Na₂HPO₄). Kompleksinėse terpėse buferines sistemas dalinai sudaro aminorūgštys, oligopeptidai, baltymai, todėl kartais jose buferinės talpos pakanka ir specialus pH rodiklio kontroliavimas fermentacijos metu nebūtinai. Optimaliausia terpės pH vertė bakteriocinų susidarymui yra nuo 5,5 iki 6,5 ir priklauso nuo bakteriocinų sintetinančių mikroorganizmų [100, 109].

Mezofilinių bakterijų augimui optimali temperatūra yra 25–37 °C. Norint išvengti netirpių intarpinių kūnelių formavimosi temperatūra mažinama iki 30 °C ar dar žemesnės. Larsen su bendraautorais [103] nustatė, kad *L. bavaricus* MI401 gamino bakteriocinus 4–30 °C temperatūros intervale.

1.1.3. Raugų pieno rūgšties bakterijų identifikavimui taikomi metodai

Daug metų bakterijos buvo identifikuojamos klasikiniiais metodais pagal morfologinius požymius ir biochemines savybes, o tai reikalauja daug laiko ir brangiai kainuoja. Klasikiniai metodai reikalauja didelės tyrėjo patirties, o gauti rezultatai gali būti netikslūs, kadangi patikimumas ir charakteringi skirtumai tarp genetiškai artimų izoliatų yra labai maži [110]. Alternatyva tradiciniams klasikiniams bakterijų identifikavimo metodams tapo polimerazės grandininės reakcijos (PGR) technologijos išradimas [111], kuris buvo didelis įnašas į molekulinės biologijos vystymąsi ir iš pagrindų pakeitė mikroorganizmų identifikavimo metodus. Pasikartojančių elementų sekvenavimo polimerazės grandininė reakcija (*ps*-PGR) naudojama greitam ir tiksliam PRB, išskirtų iš maisto produktų, identifikavimui, grupuojant PRB padermes pagal PGR produkto agarozės gelyje paliktus pėdsakus [112, 113, 114, 115, 116]. Paprastai PGR susideda iš apytiksliai 30 ciklų. Kiekvienas ciklas apima tris fazes: denatūravimo, hibridizacijos ir pailginimo. Denatūravimo fazės metu (95 °C) dėl aukštos temperatūros dviguba DNR spirale pasidalija į dvi atskiras komplementarias grandines, prie kurių kito etapo metu jau gali jungtis pradmenys. Hibridizacijos fazės metu pradmenys prisitvirtina DNR grandinės galuose. Tam reikalinga žemesnė temperatūra (40–45 °C), dėl to reakcijos mišinys atvėšinamas. Pradmenys, naudojami *ps*-PGR, yra sukonstruoti siekiant gauti sekas, kurios yra atvirkščios komplementariai DNR. Pailginimo fazėje temperatūra pakeliama iki DNR polimerazei optimalios (72 °C). DNR polimerazė pradeda veikti nuo pradmens ir sintetina naują DNR.

Atlikus PRG produkto elektroforezę, galima suskirstyti bakterijas į grupes, iš kurių užtenka atrinkti po vieną 16S rDNR sekoskaitai. Šis metodas yra plačiai naudojamas raugų mikroorganizmams identifikuoti [117]. 16S rDNR genas daugiausia naudojamas bakterijų identifikavimui dėl šių priežasčių: jį turi beveik visos bakterijos; jo seka nesikeičia laikui bėgant; 16S rDNR genas pakankamai didelis (apytiksliai 1500 bazių) informacijos gavimui [118, 119]. Po sekvenavimo gautos 16S ribosominės DNR sekos palyginamos su Nacionalinio biotechnologijos informacijos centro bakterijų banko sekomis. Mikroorganizmų genomų nukleotidų sekos yra unikalios, todėl jų nustatymas padeda greitai surasti ir atpažinti mikroorganizmus.

PRB rūšies rauguose identifikavimui galima taikyti kitą naują ir vis platesnio pritaikymo sulaukiantį jungtinį PGR ir denatūruojančio gradiento gelio elektroforezės (DGGE) metodą [120]. Metodo esmė ta, kad skirtingos bakterijų DNR turi skirtingą bazių santykį, tai yra, vienų bakterijų rūšių DNR grandinėje yra daugiau guanino ir citozino, o kitų – daugiau adenino ir timino. DGGE metodu galima nustatyti PRB rūšis mėginiuose dėl skirtingo jų polinkio denatūruoti poliakrilamido gelyje, sudarius denatūruojančių agentų koncentracijos gradientą.

1.2. MIKROORGANIZMŲ PANAUDOJIMO GALIMYBĖS EKOLOGINĖS ŽEMDIRBYSTĖS VYSTYMU

Ekologinė žemdirbystė pagrįsta sėjomaina, ūkyje sukauptomis organinėmis trąšomis (tokiomis kaip augalų liekanos, gyvulių mėšlas, ankštiniai augalai, žalioji

traša) bei kenkėjų, ligų ir piktžolių necheminės kontrolės metodų įvairovė. Ekologinės žemdirbystės sistema labai apriboja sudėtinių sintetinių trąšų, pesticidų, herbicidų, augimo reguliatorių naudojimą.

Lietuvoje auginant vasarinius kviečius kenksmingųjų mikroorganizmų sukeliama augalų ligos, kai naudojami augalų apsaugos produktai, yra miltligė (*Blumeria graminis*), lapų ir varpų septoriozė (*Mycosphaerella graminicola*, *Phaeosphaeria nodorum*), kviečių dryžligė (*Pyrenophora tritici-repentis*), rudosios rūdys (*Puccinia recondita*), geltonosios rūdys (*Pyrenophora striiformis*), juodosios rūdys (*Pyrenophora graminis*), varpų fuzariozė (*Fusarium* spp.), taip pat ir pavasarinis pelėsis bei kiti pašaknio ir šaknų puviniai, kuriuos sukelia mikroskopiniai grybai, ypač *Cochliobolus sativus* ir *Fusarium* genties.

1.2.1. *Fusarium* genties ir *Cochliobolus sativus* mikroskopinių grybų sukeliama pašaknio ligos

Pašaknio ligomis pažeistų augalų apatinė stiebo dalis ir šaknys būna pajuodusios, apipuvusios, o stiebas iškrypsta arba palūžta. Taip pažeisti javai prastai krūmijasi, be to, varpos išauga tuščios, o grūdai būna smulkūs ir raukšlėti. Pašaknio puvinio ligos sukėlėjai žiemoja augalų liekanose, apkrestose sėklose ir tiesiog dirvoje, todėl fuzarioze javai serga jau nuo sudygimo iki sėklų subrendimo. Lietuvos klimatas ypač palankus *Fusarium* genties grybams plisti, todėl derliui iškyla pavojus būti užterštam deoksinivalenoliu, zearalenonu, T2, HT2 ir kitais šių grybų gaminamais mikotoksinais, pavojingais tiek žmonių, tiek gyvulių sveikatai. *Fusarium* genties grybai, kurie sukelia daigų pašaknio puvinį, daugiausia priklauso *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* ir kitoms rūšims. *Fusarium* genties mikroskopiniais grybais pažeistų daigų pašaknio pažeidimui yra būdingos rudos dėmės ant lapamakštės ties stiebo pagrindu. Pašaknio ligų požymiai ant miglinių šeimos augalų pateikti 1.3 paveiksle. Infekcijai plintant, ant stiebo išryškėja ilgi ir tamsiai rudi dryželiai. Vėlesniais tarpsniais dėl *Fusarium* genties mikroskopinių grybų infekcijos paruduoja ir apatiniai bambliai, be to, esant labai smarkiai infekcijai, augalams jau išplaukėjus, stiebo pagrindas pasidaro rudas ir pradeda trūnyti. Esant stipriai infekcijai galima pastebėti rausvų grūdų, kurie byloja apie didelį užsikrėtimo *Fusarium* genties grybais lygį. Be *Fusarium* genties mikroskopinių grybų, pašaknio ir šaknų puvinį sukelia su sėkla ir per dirvą plintantis fitopatogenas *Cochliobolus sativus*. Stebint plika akimi, stiebo apatinės dalies pažeidimo simptomai labai panašūs į *Fusarium* grybų sukeltus simptomus, bet *Cochliobolus sativus* užkrėstiems augalams dar būdingas ir šaknų parudavimas [121]. Lietuvoje registruoti becai veiksmingai mažina *Fusarium* genties ir *Cochliobolus sativus* sukeltus pašaknio puvinį, tačiau cheminių priemonių panaudojimas ekologiniame ūkyje nėra tinkamas ir turėtų būti pakeistas natūraliomis medžiagomis. Dabartinių beicų sudėtyje yra veikliųjų medžiagų, kurios sunaikina ligų sukėlėjų pradus, tačiau neretai padaro žalą gamtai, neigiamai veikia pasėto grūdo aplinką, be to, galimas liekamasis toksinis poveikis maisto produktuose. Todėl pastaruoju metu didelis dėmesys skiriamas mikroorganizmų, pasižyminčių antimikrobiniu poveikiu prieš įvairius fitopatogenus, parinkimui bioapsaugai ekologinėje žemdirbystėje.



1.3 pav. Pašaknio ligų požymiai ant miglinių šeimos augalų [121]

1.2.2. Biologiniai preparatai kovai su pašaknio ligomis ekologinėje žemdirbystėje

Didėjantis dėmesys aplinkai ir žmonių sveikatai saugioms kultūrinių augalų auginimo technologijoms kelia naujų uždavinių mokslui – pasiūlyti cheminei augalų apsaugai alternatyvius metodus ir priemones. Necheminiai kenksmingųjų organizmų kontrolės metodai, tarp jų ir biologinių augalų apsaugos produktų naudojimas, LR žemės ūkio ministro 2012 m. birželio 29 d. įsakymu 3D-535 patvirtintame Lietuvos nacionaliniame veiksmų plane „Augalų apsaugos planas“ yra įvardijamas kaip vienas iš prioritetų. Ekologinės žemdirbystės sistema labai apriboja sudėtinių sintetinių trąšų, pesticidų, herbicidų, augimo reguliatorių naudojimą. Pasaulyje jau sukurta per 500 pavadinimų bioproduktų, kurie dažniausiai naudojami kenkėjų populiacijoms miškuose kontroliuoti, kiek rečiau – nuo daržo ligų ir kenkėjų, ypač uždaramame grunte, ir nuo sodo žaladarių. Kol kas bioproduktai dar itin retai naudojami lauko augalų apsaugai. Labai menkas alternatyvių priemonių ir biologinių augalų apsaugos produktų pasirinkimas Lietuvoje yra viena iš priežasčių, ribojančių efektyvią kenksmingųjų organizmų kontrolę ekologiniuose ūkiuose ir integruotosios kenksmingųjų organizmų kontrolės taikymą.

Užsienio šalyse kuriami bioproduktai, į kurių sudėtį įeina įvairūs mikroorganizmai, atliekantys teigiamas funkcijas ekologinėje žemdirbystėje. Tokie bioproduktai gali būti naudojami kaip natūralus beicas prieš sėją, juose pamirkius ar apipurškus sėklas. Be to, galima purkšti dirvą, kurioje planuojama auginti augalus. Biologiniai preparatai naudojami sėklų daigumo aktyvinimui ir sėklų beicavimui – patogeninės mikrofloros pašalinimui. Augalų vegetacijos periodu naudojami augimui skatinti, pašaknio puviniai mažinti, kovoti su ligomis ir kenkėjais, derliaus kiekiui didinti, derliaus kokybei gerinti [122, 123]. Paskelbti mokslinių tyrimų rezultatai patvirtina biologinių preparatų teigiamą naudą kviečių grūdų derliaus padidinimui [124]. Tokių bioproduktų gamyboje naudojami mikroorganizmai yra

Paenibacillus macerans, *Pseudomonas putida*, *Sporobolomyces roseus* [125], *Streptomyces griseoviridis* [126, 127, 128].

Bioproduktų, ekologiškai auginamų grūdų sveikumui didinti, gamyboje galėtų būti naudojamos iš ruginių savaiminių duonos raugų išskirtos antimikrobinių poveikiu pasižymintys PRB. Jų panaudojimas galėtų būti puiki alternatyva cheminiams sėklų apdorojimo metodams ir rasti pritaikymą ekologinėje žemdirbystėje mikroskopinių grybų mažinimui, ypač *Fusarium* genties ir *Cochliobolus sativus*. Be to, PRB bioproduktai galėtų būti pritaikyti ir duonos kepinių gamyboje – ne tik mikrobiologinei taršai mažinti, bet ir mineralinių medžiagų biologiniam pasisavinamumui didinti, panaudojant fitaziniu aktyvumu pasižymintys PRB kvietinių viso grūdo dalių kepinių maistinei vertei didinti.

1.3. PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ PANAUDOJIMO GALIMYBĖS KEPINIŲ MAISTINEI VERTEI DIDINTI

Grūdų produktai, ypač kasdien vartojami duonos kepiniai, yra mitybinės piramidės pagrindas ir pagrindinis angliavandenių, mineralinių medžiagų, folio rūgšties, B grupės vitaminų šaltinis. Pastaruoju metu daugiau nei 90 % gyventojų vartoja aukšto išvalymo laipsnio grūdų produktus, tai gali nulemti lėtinių ligų, pvz., viršsvoris, II tipo diabetas, ar širdies ir kraujagyslių ligos, padažėjimą. Per paskutinius dešimtmečius dėmesys atkreiptas į viso grūdo dalių maisto produktus, nes juose yra didelis kiekis skaidulinių medžiagų, vitaminų, mineralinių medžiagų, fitoestrogenų ir antioksidantų, galinčių apsaugoti nuo lėtinių susirgimų [129]. Nors grūdai yra geras mineralinių medžiagų šaltinis, tačiau bendras jų kiekis grūdų produktuose neatitinka tikrojo žmogaus organizmui aprūpinti mineralinėmis medžiagomis reikalingo kiekio, kadangi, be papildomo apdorojimo, biologinis šių mineralinių medžiagų pasisavinamumas žmonių ir gyvūnų žarnyne yra labai ribotas dėl kompleksų su fito rūgštimi (fitatų) susidarymo [130]. Parenkant grūdų perdirbimo bei kuriant kvietinių kepinių technologijas svarbu įvertinti mineralinių medžiagų pasiskirstymą anatomicinėse grūdo dalyse bei spręsti jų pasisavinamumo problemą.

1.3.1. Mitybiniu požiūriu svarbių medžiagų pasiskirstymas anatomicinėse grūdo dalyse ir viso grūdo dalių miltų maistinė vertė

Pagrindinės kviečių sudedamosios dalys yra endospermas, aleurono sluoksnis, gemalas ir luobelės. Sėlenų frakcijas sudaro išorinis ir vidinis perikarpis, testa bei aleurono sluoksnis. Sėlenų frakcijos vidutiniškai sudaro 14–16 % kviečio grūdo. Išoriniai grūdo sluoksniai yra turtingi netirpių skaidulinių medžiagų, pvz., celiuliozės, lignino ir ksilanų komplekso [131]. Sėklinė ir vaisinė luobelės yra kiti du grūdo sluoksniai, esantys po perikarpio. Aleurono sluoksnis, išsidėstęs tarp sėklinės luobelės ir krakmolingojo endospermo, sudaro apie 5–8 % kviečio grūdo [132] ir turi didelį kiekį β -gliukanų, lyginant su visu grūdų [131], ir nemažus kiekius ferulio rūgšties, kuri pasižymi antioksidacinėmis savybėmis [133]. Be to, šis sluoksnis turtingas baltymų (32 % sausų medžiagų (s.m.)) ir lipidų (9 %, s.m.), B grupės vitaminų ir fermentų. Dideli magnio, fosforo, seleno, geležies, cinko ir kalio,

kiekiai yra susitelkę šiame sluoksnyje (1.3 lent.), todėl mitybiniu požiūriu grūdų sėlenos būtų labai vertingos. Nepaisant mineralinių medžiagų gausos, šiame sluoksnyje yra susitelkusios ir antimaitinės medžiagos – fitatai (84–88 %), kurie savo struktūroje yra prijungę mineralines medžiagas. Tai riboja šių mineralinių medžiagų perėjimą per žarnų sienelės ir dėl to mineralinės medžiagos yra nepasisavinamos žmogaus virškinamajame trakte [134].

1.3 lentelė. Kviečių sudedamųjų dalių paplitimas anatomicinėse grūdo dalyse [131]

	Sėlenų frakcija			endospermas	gemalas
	perikarpis	testa	aleurono sluoksnis		
Bendras kiekis [†]	7-9	1	5-7	81-86	2-4
Proteinai	-	-	**	**	**
Lipidai	-	*	*	-	***
Krakmolas	-	-	*	***	-
Maistinės skaidulos	***	***	**	*	-
B grupės vitaminai					
tiaminas	-	-	*	-	***
riboflavinas	-	-	*	-	***
niacinas	-	-	***	*	*
pantoteno rūgštis	-	-	**	-	*
piridoksinas	-	-	***	-	**
biotinas	-	-	***	-	**
folatai	-	-	***	-	**
tokotrienoliai	*	*	*	*	*
Mineralinės medžiagos					
magnis	*	*	***	-	**
fosforas	*	*	***	-	*
manganas	*	*	**	-	**
cinkas	*	*	**	-	*
geležis	*	*	**	-	*
Ferulio rūgštis	*	*	***	*	**
Fito rūgštis	-	-	***	-	*

[†] kviečių sudedamųjų dalių paplitimas anatomicinėse grūdo dalyse, % [135];

*, **, *** - sudedamųjų dalių gausa anatomicinėse grūdo dalyse [131];

– sudedamosios dalys nenustatytos arba yra labai mažomis koncentracijomis.

Endospermas yra didžiausia grūdo dalis, sudaranti 82–85 % kviečio grūdo [135]. Šitas sluoksnis sudarytas iš krakmolo granulių, apsuptų baltymų kompleksu. Gemalas sudaro 2,5–3,0 % grūdo masės ir yra sudarytas iš šaknelės ir skydelio [136]. Šaknelę nuo endospermo saugo skydelis, kuriame gausu lipidų (13–27 % s.m.), hidrolizinančių fermentų ir baltymų (25–34 % s.m.). Gemale taip pat gausu mineralinių medžiagų (4,5–5,5 s.m.), bet susitelkusi ir didelė dalis fitatų, kurie sudaro 12 % bendro fitatų kiekio.

Mineraliniai elementai skirtingose grūdo anatomicinėse dalyse yra pasiskirstę netolygiai. Todėl, perdirbant grūdus į įvairius malimo produktus, mineralinių elementų patekimas į produktą priklausys nuo to, kokios grūdo anatomicinės dalys buvo panaudotos perdirbimo metu. Kviečių aleurono sluoksnio peleningumas sudaro

nuo 7,3 iki 11 % [137, 138]. Išorinio perikarpio (vaisinės luobelės) sluoksnio pelenuų kiekis sudaro nuo 0,9 iki 1,5 %, o vidinio perikarpio – nuo 5,3 iki 13,7 %. Viso perikarpio peleningumas yra nuo 1,9 iki 4,3 % [139]. Sėklinės luobelės peleningumas yra nuo 12,6 iki 20,2 %, o krakmolingos endospermos peleningumas yra nuo 0,26 iki 0,55 %. Makro ir mikro elementų kiekiai endosperme mažėja einant nuo išorinio sluoksnio link grūdo centro [138]. Atskiri mineraliniai elementai grūde pasiskirsto netolygiai. Gemale daugiausia koncentruojasi kalcis, geležis, cinkas ir varis, aleurono sluoksnyje daugiausiai susitelkę magnis, fosforas ir kalis, o luobelėse – kalcis ir manganas [140]. Aleurono sluoksnyje yra susitelkę 84–88 % įvairių mineralinių medžiagų, todėl mitybiniu požiūriu šis sluoksnis labai vertingas. Tačiau dauguma šiame sluoksnyje susitelusių mineralinių medžiagų yra susijungusios į fitatus, sudarytus iš *mio*-inozitolio heksafosfato bei kalio, magnio ir kitų mineralinių medžiagų druskų [134], o tai riboja jų biologinį pasisavinamumą.

Viso grūdo dalių kvietiniai miltai yra sveikesni už įprastus, nes malant paliekamos sėlenos ir grūdų gemalai, kuriuose gausu žmogaus organizmui reikalingų mikroelementų ir vitaminų. Lyginant su endospermu, sėlenos yra B grupės vitaminų, mineralinių medžiagų ir skaidulinių medžiagų šaltinis, kuris turi teigiamą poveikį sveikatai – mažina tikimybę susirgti širdies ir kraujagyslių ligomis, mažina cholesterolio kiekį kraujyje [141, 142, 143]. Mitybiniu požiūriu didesnė nauda pasiekama naudojant viso grūdo miltus ir jų produktus, lyginant su 75 % ekstrakcijos ar dar labiau sumažinto peleningumo miltais, kurie gaminami iš grūdų pašalinus išorinius grūdo sluoksnius (sėlenas). Pedersen su bendraautorais [144] nustatė, kad miltuose, kurie ruošti atskyrus grūdo sėlenų sluoksnius, kalio koncentracija sumažėjo daugiau nei du kartus, o fosforo, geležies, cinko ir vario sumažėjo tris kartus, lyginant su viso grūdo dalių miltais (1.4 lent.).

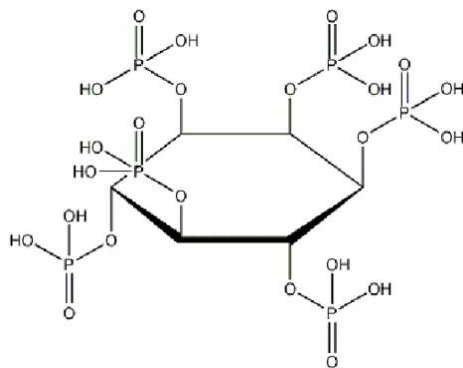
1.4 lentelė. Skirtingos išėigos miltų cheminė sudėtis [144]

	Išėiga, % (s.m.)		
	100	75	66
Peleningumas	1,8	0,6	0,5
Baltymai	14,2	13,5	12,7
Riebalai	2,7	1,4	1,1
Krakkolas ir cukrai	69,9	82,9	84,0
Skaidulinės medžiagos	12,1	2,8	2,8
Mineralinės medžiagos			
kalcis, mg/g	0,44	0,25	0,23
fosforas, mg/g	3,8	1,3	1,2
cinkas, µg/g	29	8	8
varis, µg/g	4,0	1,6	1,3
geležis, µg/g	35	13	10
Vitaminai, (µg/g)			
tiaminas	5,8	2,2	1,4
riboflavinas	0,95	0,39	0,37
piridoksinas	7,5	1,4	1,3
folatai	0,57	0,11	0,06
biotinas	116	46	25
niacinas	25,2	5,2	3,4

Nepaisant to, kad viso grūdo dalių mityba pasižymi teigiamu poveikiu žmogaus sveikatai apsaugodama nuo lėtinių ligų, visgi viso grūdo produktai yra turtingi antimaistinių komponentų. Vienas iš antimaistinių komponentų yra fitatai, kurie stabdo mineralinių medžiagų iš grūdų produktų pasisavinimą virškinamajame trakte [145].

1.3.2. Fito rūgštis ir fitatų grūdinėje žaliavoje paplitimas

Fito rūgštis dar žinoma kaip *mio*-inozitolio heksafosfatas (1.4 pav.). Fito rūgštis su mineralinėmis medžiagomis sudaro kompleksus, kurie vadinami fitatais ar inozitolio fosfatais (IF₁ – IF₆) ir yra plačiai paplitusių gamtoje organinių junginių grupė su įvairiu fosforilinimo laipsniu (nuo vieno iki šešių fosfato grupių) bei izomerinėmis formomis, iš kurių *mio*-inozitolio heksafosfatas yra plačiausiai paplitęs grūdinėje žaliavoje. Jį sudaro inozitolio žiedas su fosfato grupėmis, prijungtomis prie anglies atomų (cheminis pavadinimas yra *mio*-inozitolio 1,2,3,4,5,6 heksadihidrofosfatas). Fitatų suardymo produktai vadinami žemesnės



1.4 pav. Fito rūgšties molekulės struktūra [141]

eilės *mio*-inozitolio penta- (IF₅), tetra- (IF₄), tri- (IF₃), di- (IF₂) ar monofosfatais (IF₁) arba *mio*-inozitoliais (IF). IF₆ turi 12 pakeičiamų protonų, kurių pKa vertės, priklausomai nuo pH verčių, yra ribose nuo 1,1 iki 12,0, (didėjant pH vertėms, pKa vertės didėja) [146, 147]. Fito rūgšties kompleksai su metalų jonais yra netirpūs ir labai stabilūs [130]. Fiziologinis fitatų sėklose kaupimo vaidmuo daugiausia siejamas su pagrindinėmis fosforo atsargomis, kurios sutelktos ir saugomos sėklų dygimui ir vidutiniškai sudaro 60–90 % viso sėklų fosforo [148]. Be to, fito rūgštis pasižymi antioksidacinėmis savybėmis [149]. Lolas su bendraautoriais [150] ištyrė 38 kviečių rūšis ir nustatė, kad fitatų kiekis grūduose svyruoja nuo 0,3 iki 1,6 % ir priklauso nuo jų tipo. Garcia-Esteba su bendraautoriais [151] nustatė, kad šviesiausiuose kvietiniuose miltuose fito rūgšties kiekis yra 4,0 mg/g, viso grūdo kvietiniuose miltuose – 22,2 mg/g, ruginiuose miltuose – 4,5 mg/g, ryžių miltuose – 5,52 mg/g, miežiniuose miltuose – 6,3 mg/g, avižiniuose miltuose – 7,4 mg/g, sorų miltuose – 10,7 mg/g, kukurūzų miltuose – 10,8 mg/g, sorgų miltuose – 10,1 mg/g, kvietinėse sėlenose fitatų kiekis kinta plačiose ribose tarp 25–59 mg/g ir priklauso nuo sėlenų dydžio (didesnės dalelės sąlygoja didesnį fito rūgšties kiekį). Ryšį tarp fitatų kiekio ir kviečių sėlenų dalelių dydžio nustatė ir Harland ir Oberleas [152]. Kiti tyrėjai kviečių miltuose nustatė mažesnius, 1,5–3,2 mg/g ribose, fitatų kiekius [153, 154]. Viso grūdo dalių kvietiniuose miltuose fitatų koncentracija yra nuo 9,6 iki 17,5 mg/g [154]. Požrl su bendraautoriais [155] tyrė kvietinių miltų tipo bei duonos paruošimo būdo įtaką fitatų kiekiui. Jie nustatė, kad viso grūdo miltai pasižymi didžiausiu fitatų kiekiu, be to, tešla ir duona, paruošta su šiais miltais,

turėjo didžiausią fitatų kiekį. Fito rūgšties kiekiai taip pat priklauso ir nuo kviečių veislės bei svyruoja ribose tarp 5–10,5 mg/g [140]. Anjum su bendraautoriais [156] nustatė, kad fito rūgšties kiekis yra vidutiniškai tris kartus didesnis kviečių sėlenose, nei viso grūdo miltuose, ir devynis kartus didesnis, nei kvietiniuose miltuose. Tiek bendras fosforo kiekis, tiek fitatų kiekis grūdų malimo produktuose mažėja atskyrus paviršinius grūdo sluoksnius (1.5 lent.).

1.5 lentelė. Fosforo sudėtis (mg/100 g) grūduose bei jų malimo produktuose [134]

	Išeiga, %					
	Rugiai			Kviečiai		
	100	85	75	100	85	75
Bendras fosforo kiekis	359	193	129	350	188	109
Fosforas fitatuose	258	104	57	242	96	37

1.3.3. Maistinės vertės mažėjimą sąlygojanti mineralinių medžiagų sąveika su fito rūgštimi

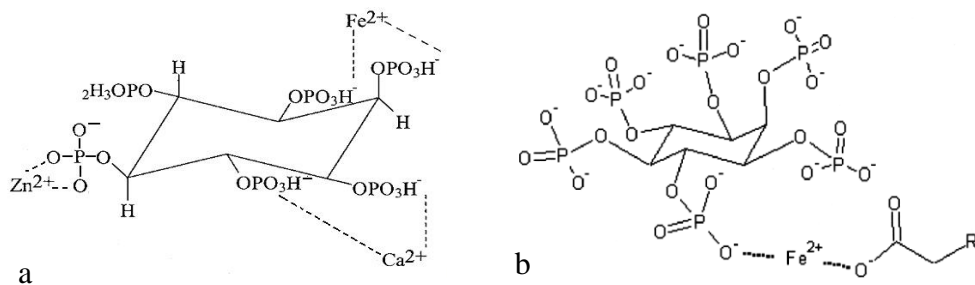
Fito rūgšties neigiamas krūvis, kintantis plačiose pH verčių ribose, sąlygoja teigiamai įkraudų grupių – divalenčių ir trivalenčių metalo jonų, aminorūgščių, baltymų sujungimą (1.5 pav.). Dėl fitatų kompleksų netirpumo virškinamojo trakto pH verčių terpėje yra sumažinamas biologiškai būtinų mineralinių elementų ir kitų maistinių medžiagų pasisavinamumas iš grūdinės žaliavos, taip pat ir iš kitų augalų produktų, turinčių didelius fitatų kiekius [157, 158]. Be to, galimybė hidrolizinti fitatus plonojoje žarnoje yra labai ribota dėl riboto juos hidrolizuojančių fermentų pajėgumo ir mikroorganizmų kiekio viršutinėje virškinimo trakto dalyje [159]. Todėl mityba, sudaryta daugiausia iš grūdų ir daržovių, yra nepakankama norint gauti subalansuotą mineralinių medžiagų kiekį, o tai gali įtakoti biologiškai vertingų mineralinių medžiagų trūkumą [160, 161].

Terpės pH vertė, metalų jonų surišimo geba ir fosfato grupių kiekis, prijungtas prie inozitolio molekulės, turi įtakos kompleksų patvarumui bei gebai prijungti mineralines medžiagas [162, 163]. Fito rūgštis sudaro blogai tirpstančias druskas su fosforu, kalciumu, magniu, geležimi, cinku, todėl nei mineralinės medžiagos, nei fosforas tokioje formoje nėra pasisavinami organizmo. Fitatai taip pat lėtina baltymų, krakmolo ir riebalų virškinamumą, nes su šiomis medžiagomis suformuoja nevirškinamus kompleksus, be to fito rūgštis slopina tokių fermentų kaip alfa amilazės, tripsino ir pepsino veiklą, todėl blogai virškinami krakmolai ir baltymai [164, 165, 166, 167]. Fitatų kompleksai yra patvarūs ir nevirškinami, dėl šios priežasties kompleksų suardymas būtinas maisto produktų ruošimo metu.

Fitatai sumažina mineralinių medžiagų pasisavinamumą žmonių virškinamajame trakte. Mokslininkų paskelbti tyrimai patvirtina, kad fitatai mažina geležies absorbciją virškinamajame trakte [168, 169, 170]. Nustatyta neigiama koreliacija tarp fitatų kiekio maiste ir cinko absorbcijos [171, 172, 173]. Literatūroje yra duomenų ir apie neigiamą fitatų poveikį kalcio [174, 175], magnio [176, 177] ir mangano [178] pasisavinamumui žmonių virškinamajame trakte. Žinoma, kad dėl mineralinių elementų trūkumo kasdieninėje mityboje ir nepakankamo jų įsisavinimo

iš grūdų produktų žmogaus organizme atsiranda specifiniai medžiagų apykaitos sutrikimai, sukiantys įvairius negalavimus ir netgi susirgimus [129].

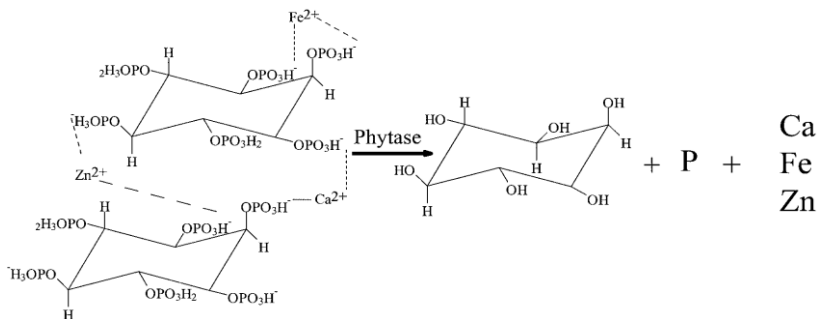
Siekiant didinti grūdinės žaliavos maistinę vertę, gali būti atliekama fitatų hidrolizė technologinių procesų metu. Fitatams hidrolizuoti gali būti taikomas mirkymas [179], daiginimas [157, 180] ar hidroterminis apdorojimo [181]. Be to, fitatų hidrolizei gali būti naudojami fermentinių preparatų (fitazių) priedai [182, 183]. Pastaruoju metu atkreiptas dėmesys į fitaziniu aktyvumu pasižyminčius mikroorganizmus: PRB [184] ir mieles [185, 186].



1.5 pav. Fitatų struktūra: a - fitatų- metalų [187]; b - fitatų-metalų-baltymų kompleksai [158]

1.3.4. Fermentinis fitatų skaldymas

Fitazės – fermentai, kurie katalizuoja fitatų suardymą iki žemesnės eilės inozitolio fosfatų ir laisvo neorganinio fosforo [188]. Fitazės gali būti skirstomos į grupes pagal: *mio*-inozitolio anglies šaltinio poziciją, nuo kurios pradeda fitatų hidrolizė; pH verčių veikimo ribas. Pagal tai, nuo kurio anglies atomo *mio*-inozitolio žiede pradeda fitatų skaldymas, fitazės tarptautinio klasifikavimo sistemoje skirstomos taip: 3-fitazė (EC 3.1.3.8); 5-fitazė (EC 3.1.3.72); ir 4-fitazė (EC 3.1.3.26), dažnai dar vadinama 6-fitaze. Priklausomai nuo jų veikimui optimalios pH vertės, fitazės gali būti skirstomos į rūgštines ir šarmines. Daugumos mikrobines kilmės fitazių produkuojamų bakterijų, mikroskopinių grybų ir mielių maksimalus fitatų skaldymo pajėgumas pasiekiamas rūgštinėje terpėje [157], o neutralioje ar šarminėje terpėje aktyvesnės sėklų ir daržovių fitazės [189]. Bakterinės fitazės pradeda hidrolizinti fosfatų esterinių ryšį nuo trečio anglies atomo, o grūdų fitazės pradeda skaldyti fitatus nuo šešto anglies atomo [190]. Fitatų kompleksų suardymas, veikiant fitazėms ir atlaisvinant neorganinį fosforą bei metalų jonus, pateiktas 1.6 paveiksle.



1.6 pav. Fitatų hidrolizė iki laisvo inozitolio, fosforo ir mineralinių medžiagų [191]

Grūdų fitazių aktyvumas ir pasiskirstymas grūde. Fitazių fermentinis aktyvumas įvairiuose grūduose yra skirtingas. Ruginuose esančių fitazių aktyvumas yra vidutiniškai penkis kartus didesnis, nei kviečiuose, ir vidutiniškai dešimt kartų didesnis, nei miežiuose [192, 193, 194, 195, 196]. Fretzdorff ir Weipert [197] tyrė fitazinį aktyvumą skirtingose rugių grūdo dalyse. Didžiausias aktyvumas nustatytas paviršinėse grūdo dalyse (epidermyje, testoje), taip pat – aleurono sluoksnyje, o endosperme yra 4–6 kartus mažesnis fitazinis aktyvumas nei sėlenų frakcijose. Tiek kviečiuose, tiek ruginuose ir miežiuose fitazės daugiausia pasiskirsčiusios aleurono sluoksnyje. Pagal Peers [198] fitazės yra pasiskirstę įvairiuose kviečio grūdo sluoksniuose (1.6 lent.), ir daug įvairiau nei jų substratas – fitatai. Didžiausiu aktyvumu pasižyminčios fitazės yra susitelkusios aleurono sluoksnyje.

1.6 lentelė. Fitazių pasiskirstymas kviečio grūdo sluoksniuose [198]

Grūdo frakcija	Nuo viso grūdo masės, %	Fitazinis aktyvumas (μg AV/val./mg. s.m.)	Nuo bendro fitazių kiekio, %
Visas grūdas	100	3,41	100
Endospermas	82,5	1,29	34,1
Gemalas	1,0	9,07	2,9
Skydelis	1,5	31,8	15,3
Epidermis	4,5	1,32	1,9
Sėklinė luobelė, skersinės ląstelės	3,5	4,34	4,8
Aleuronas	7,0	17,7	39,5

Išgrynintų fitazių molekulinė masė yra nuo 47 kDa (kviečių) iki 67 kDa (miežių). Grūdų fitazių charakteristikos – optimali pH vertė, optimali veikimo temperatūra, molekulinė masė, pateiktos 1.7 lentelėje. Išskirtų iš kviečių grūdų fitazių optimali pH vertė yra 5–5,5 [198], o rugių fitazių – pH vertė yra 6,0, o optimali temperatūra – 45–55 °C [199]. Be to, nustatyta, kad kai kurios PRB [200, 201, 202] bei mielės [185, 186, 203] gamina šiuos fermentus.

1.7 lentelė. Pagrindinės grūdų fitazių charakteristikos

Grūdų mėginys	pH	Optimali temperatūra °C	Molekulės dydis, kDa	Literatūra
Kviečiai				
Viso grūdo dalių miltai	5-5,5	55	n	[198]
Sėlenos	6,0	45	n	[206]
Sėlenos (frakcija 1)	5,6	n	47	[207]
Sėlenos (frakcija 2)	7,2	n	n	
Rugiai				
Viso grūdo dalių miltai	6,0	45-55	n	[199]
Viso grūdo dalių miltai	6,0	45	67	[195]
Miežiai				
Viso grūdo dalių miltai	5	45	67	[208]
Viso grūdo dalių miltai	6	55	67	
Viso grūdo dalių miltai	6	55	96	[209]
Viso grūdo dalių miltai	5	50	66	

n – nenustatyta

Mikrobinės kilmės fitazės. Bakterinių fitazių optimali pH vertė labai priklauso nuo šiuos fermentus produkuojančių mikroorganizmų ir yra artimesnė duonos raugų pH vertei. De Angelis su bendraautorais [184] atlikti tyrimai parodė, kad *L. sanfranciscensis* fitazių veiklai optimali pH vertė yra 4, ir yra labai artima raugų pH vertei. *L. amylovorus* ir *Leuc. mesenteroides* gaminamų fitazių optimali pH vertė yra 5,5 [204, 205]. *Leuc. mesenteroides* KC51 gaminamų fitazių aktyvumas yra ~16,5 mAV/mg [204]. Bakterinės kilmės fitazių dydis yra apie 50 kDa [184, 205].

1.3.5. Pieno rūgšties bakterijų fitazinis aktyvumas ir jų panaudojimo galimybės kepinų maistinei vertei didinti

Literatūroje pateikiamos prieštaringos nuomonės apie grūdų fitazių ir mikroorganizmų poveikį kepinų maistinės vertės didinimui. Pvz., Lopez su bendraautorais [2] siejo PRB, esančių rauguose, fitazinį aktyvumą su padidintu raugų rūgštingumu, kuris, autorių nuomone, ir sąlygoja magnio ir fosforo atskilimą nuo fitatų. Reale su bendraautorais [210] teigė, kad PRB, fermentacijos metu mažindamos terpės pH vertes, sudaro palankias sąlygas grūdų fitazių veiklai. Tuo tarpu Nielsen su bendraautorais [199] nustatė, kad, mažėjant terpės pH vertei, grūdų fitazių aktyvumas mažėja. Nielsen su bendraautorais [211] nustatė, kad miltų ir grūdų fitazinis aktyvumas yra vidutiniškai du kartus didesnis nei duonos raugų. Ruginės tešlos pH vertė yra apie 4,3 ir, esant tokiai terpės pH vertei, fitazių aktyvumas buvo 50 % mažesnis, lyginant su optimaliu grūdų fitazių aktyvumu, kuris pasiekiamas esant pH vertei 6. Kvietinių raugų fermentacijos metu pasiekama mažesnė pH vertė nei 4, todėl yra nepalanki grūdų fitazių veiklai, bet palankesnė mikroorganizmų fitazių veiklai [184]. Dėl to būtų svarbu maistinės vertės didinimui panaudoti PRB, kurios pasižymėtų fitaziniu aktyvumu ir, tokiu būdu, praturtintų grūdų produktus lengviau organizme pasisavinamomis mineralinių medžiagų formomis.

Reale su bendraautorais [212] nustatė, kad fitatų kiekis sumažėjo tešloje, paruoštoje su pradinių kultūrų mišiniu (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. curvatus*) apie 80–90 % po 12 val. fermentacijos, lyginant su kontroliniu mėginiu (nenaudojant PRB). Panašius rezultatus paskelbė ir de Angelis su bendraautorais [184], nustatė, kad *L. sanfranciscensis* CB1, fermentuojant tešlą 8 val., natrio fitatų kiekį sumažino 64–74 %, lyginant su raugu, paruoštu be pradinių PRB. Tyrimai parodė, kad tarpusavyje derinant raugų mikroorganizmus (PRB ir mieles) duonos raugo fermentacijos metu gali būti pasiektas didesnis fitazių aktyvumas ir fitatų suardymo laipsnis. Chaoui su bendraautorais [213] parinko mikroorganizmų kombinaciją (*Sc. cerevisiae*, *L. plantarum*, *Leuc. mesenteroides*), kuri padidino fitatų skaldymo efektyvumą ir duonos maistinę vertę. Lopez su bendraautorais [1] paskelbė, kad naudojant turtingą fitatais viso grūdo kviečių miltų terpę ir *Leuc. mesenteroides* 38 padermę, po 9 val. raugų fermentacijos pasiekta didesnė fitatų hidrolizė, lyginant su kontroliniu mėginiu. Autoriai įrodė, kad prailginta raugų fermentacija didina kepinuose kalcio ir magnio pasisavinamumą, bei teigė, kad viso grūdo miltų duona, kurios gamyboje panaudota ilgesnė raugų fermentacija, būtų geras kalcio, magnio ir fosforo šaltinis [2]. Zotta su bendraautorais [200] tyrė PRB, išskirtų iš duonos raugų, fitazinį aktyvumą ir nustatė, kad *Leuc. mesenteroides*, *L. curvatus*, *L.*

plantarum ir *Weissella cibaria* ženkliai sumažino natrio fitatų kiekį. De Angelis su bendraautoriais [184] tyrė intraląstelinį dvylikos skirtingų PRB padermių (*L. farciminis*, *L. alimentarius*, *Leuc. citreum*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. hilgardii*, *L. fructivorans*, *Lact. lactis* ssp. *lactis*, *L. brevis*, *L. sanfranciscensis*), išskirtų iš duonos raugų, fitazinių aktyvumą ir nustatė, kad tirtos PRB pasižymėjo intraląstelinio fitaziniu aktyvumu, iš jų ypač didelį aktyvumą rodė *L. sanfranciscensis* CB1. Sreeramulu su bendraautoriais [214] tyrė ekstraląstelinį PRB fitazinių aktyvumą. Iš tirtų PRB didžiausią fitazinių aktyvumą turėjo *L. amylovorus* B4552, o kitos tirtos PRB (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* ir *L. delbrueckii*) pasižymėjo silpnesniu fitaziniu aktyvumu. Zamudio su bendraautoriais [205] stebėjo intraląstelinį ir ekstraląstelinį *P. pentosaceus*, *Leuc. mesenteroides*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* ir *L. plantarum* padermių fitazių aktyvumą. Priešingai nei de Angelis su bendraautoriais [184], jie nustatė, kad šios PRB nepasižymėjo intraląstelinio fitaziniu aktyvumu ir rodė tik labai silpną ekstraląstelinį aktyvumą; didžiausias vertes rodė *L. plantarum*, kas sutampa su Sreeramulu tyrimais [214]. Prieštaringi rezultatai gali būti paaiškinami skirtingų padermių nevienodais fermentiniais aktyvumais. Valcheva su bendraautoriais [201] patvirtino, kad *L. plantarum*, *L. acidophilus* ir *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* pasižymi fitaziniu aktyvumu. Didelis fitazinis aktyvumas nustatytas *L. reuteri* L-M15 bei *L. salivarius* L-ID15 [202].

Dėl prieštaringų literatūroje pateikiamų nuomonių apie PRB ir grūdų fitazių veiklą tikslinga išskirti ir identifikuoti fitaziniu aktyvumu pasižyminčias PRB iš duonos raugų, nustatyti jų fitazinių aktyvumą ir įvertinti fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB panaudojimo galimybes mineralinių medžiagų pasisavinamumo didinimui iš viso grūdo dalių kvietinių kepinų.

1.4. BAKTERIOFAGAI IR JŲ VAIDMUO FERMENTACIJOS PROCESUOSE

Bakteriofagai – tai bakterijas infekuojantys virusai, aptinkami ten, kur gyvuoja bakterijos. Jie yra selektyvūs, taigi naikina tik tam tikras bakterijas, turi neląstelinės sandaros struktūrą, negali augti ir daugintis už šeimininko ląstelės ribų. Šiuos mažus mikroorganizmus mokslininkai atrado dar dvidešimtojo amžiaus pradžioje [215, 216]. Nuo to momento, kai bakteriofagai buvo atrasti, mokslininkai stengiasi pritaikyti jų panaudojimą kovai su patogeninėmis bakterijomis. Deja, fagų pritaikymas gydymo terapijai Vakaruose buvo nutrauktas išradus antibiotikus (1940 metais). Tuo tarpu Sovietų Sąjungoje, ypač Tbilisyje, Gruzijoje, moksliniai tyrimai fagų terapijos kryptimi buvo tęsiami. Šiuo metu Tbilisio institutas yra sukaukęs didžiausią fagų kolekciją pasaulyje, o sėkmingi tyrimai rodo, kad fagų terapijoje slypi didžiulės perspektyvos. Pirmas prekyboje pasirodęs fagų „kokteilis“, aktyvus prieš *List. monocytogenes*, yra patvirtintas FDA, USDA ir EPA nuo 2006 rugpjūčio [217]. Nepaisant didelių perspektyvų gydymo terapijoje, fagai sukelia didelių sunkumų fermentacijoje. Nors 1930 metais buvo įrodyta bakteriofagų žala pieno pramonėje [218, 219], šiandien jie vis dar sukelia didelius nuostolius pieninėse [220,

221]. Apie bakteriofagų neigiamą įtaką raugų fermentacijai kepyklose ir jų poveikį pradinėms duonos raugų kultūroms literatūroje duomenų trūksta.

Bakteriofagai klasifikuojami pagal jų savybes, tarp kurių svarbiausios yra morfologija, fizinės ir cheminės savybės, nukleorūgštį (DNR ar RNR, viengrandė ar dvigrandė) ir genomų duomenis [222]. Bakteriofagai yra didžiausia virusų grupė ir priskiriama *Caudovirales* būriui. Šiam būriui priskiriami bakteriofagai skirstomi į tris šeimas: *Podoviridae* (14 % tirtų fagų), *Myoviridae* (25 %) ir *Siphoviridae* (61 %). *Podoviridae* šeimai priskiriami fagai turi ikosaedro formos kapsidę ir trumpą susitraukiančią uodegėlę, *Myoviridae* šeimai priskiriami fagai turi ikosaedro arba pailgos formos galvutę ir ilgą susitraukiančią uodegėlę, tuo tarpu *Siphoviridae* šeimai priskiriami fagai turi taip pat ikosaedro formos kapsidę, tačiau ilgą nesusitraukiančią uodegėlę [223, 224].

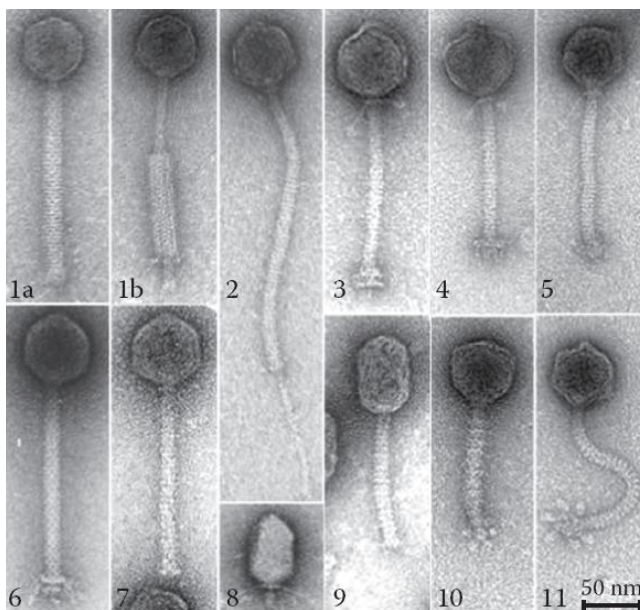
1.4.1. Pieno rūgšties bakterijas infekuojantys bakteriofagai

PRB plačiai naudojamos maisto fermentacijoje ir biotechnologijoje. Daugiausia maisto ir gėrimų technologijoje naudojamos PRB, priklausančios *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ir *Enterococcus* gentims [225]. *Lact. lactis* yra plačiausiai pieno produktų gamyboje naudojama PRB [226]. Gamybos proceso metu patekus bakteriofagams infekuojantiems *Lact. lactis* yra stabdomas rūgimo procesas ir pageidaujimų produktų gamyba [227]. *Lact. lactis* bakteriofagai yra daugiausiai ištyrinėti fagai dėl jų didelės ekonominės žalos pieno pramonėje [228]. Pienininkystėje sutinkamų bakteriofagų morfologinė įvairovė pateikta 1.7 paveiksle.

Lact. lactis atakuojantys fagai randami piene, augaluose, šiene [230]. Šie fagai dažnai išgyvena pasterizacijos procesus [232, 233]. Be to, lizogeninės bakterijos gali būti fagų užkrato šaltiniu [234]. Šie fagai neigiamai įtakoja fermentacijos procesus ir sąlygoja didelius nuostolius pieno pramonėje. *Strep. thermophilus* ląstelių lizė po bakteriofagų infekcijos užfiksuota skenuojančiu elektronų mikroskopu pavaizduota 1.8 paveiksle.

Lyginant PRB fagus, lizuojančius *Leuc. lactis* ir *Strep. thermophilus*, su *Leuconostoc* genties bakterijas infekuojančiais fagais, informacijos apie pastaruosius literatūroje nėra daug. Pirmąsias publikacijas, apie *Leuconostoc* fagus, paskelbė Shin ir Sato [235] ir Sozzi su bendraautoriais [236] 1978 ir 1979 metais. Pirmą pilną genomą sekoskaita virulentinio *Leuc. mesenteroides* bakteriofago, išskirto iš raugintų kopūstų fermentacijos, buvo atlikta tik 2010 metais [237]. Vėliau nuosaikais *Leuc. pseudomesenteroides* fago MH1 sekoskaita buvo atlikta 2012 metais [238]. 2012 metais pirmą kartą atlikta *Leuconostoc* genties bakterijas atakuojančio fago ϕ Lmd1, išskirto iš pieno pramonės, DNR sekoskaita [239]. Vėliau Ali su bendraautoriais [240] atliko pilną sekoskaitą devynių *Leuconostoc* genčiai priklausančių bakteriofagų. 2011 metais Mills su bendraautoriais [241] išskyrė ir apibūdino naują fagą, atakuojantį *Strep. thermophilus*, kuris labai skyrėsi nuo kitų ir priskiriamas naujai *Strep. thermophilus* fagų grupei. Didėjant susidomėjimu probiotinėmis PRB ir platesniu jų panaudojimu, vis didesnis dėmesys skiriamas *Lactobacillus* genties bakterijas lizuojantiems fagams [242, 243], kurie patekę į

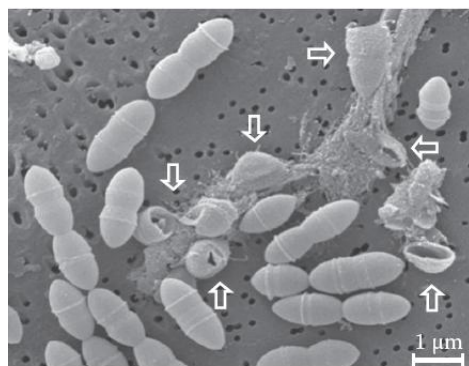
fermentacijos terpę atakuoja PRB, jas infekuoja ir suardo. Bakteriofagai sustabdo fermentacijos procesą arba jį pakreipia nepageidaujama linkme.



1.7 pav. Transmisiniu elektroniniu mikroskopu užfiksuota fagų įvairovė pieno pramonėje: 1a ir 1b – *Myoviridae* fagai atakuojantys *L. gasseri* [229]; 2-10 – *Siphoviridae* fagai atakuojantys *Lact. lactis* [230]; 11 – *Siphoviridae* fagas atakuojantis *Leuc. mesenteroides* [231]

Su fagų infekcijos problemomis susiduriama ir kituose fermentacijos procesuose, pvz., japonų tradicinio maisto „natto“ ruošimo metu, kur sojos pupelės fermentuojamos *B. subtilis* bakterijomis [244].

Nors literatūroje yra daug duomenų apie bakteriofagų sukeltus nuostolius pieno pramonėje, tačiau labai mažai duomenų galima surasti apie duonos raugų bakteriofagus ir jų poveikį duonos raugų PRB bei duonos gamybos technologiniam procesui. Bakteriofagams patekus į duonos raugus gali sutrikti technologinis procesas, kadangi raugai, paveikti bakteriofagų, nebetenka savo aktyvumo. Tik keletas bakteriofagų yra išskirta iš duonos raugų. Foschino su bendraautorais [245, 246, 247] tyrinėjo *L. fermentum* lizuojančius fagus Z63-B2, priklausančius *Siphoviridae* šeimai, išskirtus iš duonos raugų. Tačiau iki šiol nėra duomenų apie bakteriofagų įtaką raugų fermentacijai, PRB pokyčius. 2005



1.8 pav. Bakteriofagų lizuojantis poveikis *Strep. thermophilus* kultūrai. Rodyklės žymi jau lizavusias ląsteles [228]

metais Foschino su bendraautorais [248] išskyrė ir charakterizavo bakteriofagą, atakuojantį *L. sanfranciscensis* padermę, ir paskelbė, kad fagų priedas į raugą neturėjo neigiamos įtakos raugo rūgštingumui ir kepinio tūriui bei PRB skaičiui. Tokie rezultatai gali būti paaiškinami tuo, kad duonos raugų fermentacijos metu fagų lizuotos ląstelės yra pakeičiamos kitomis jų padermėmis, patekusiomis į terpę su žaliava. Jei į terpę patekusios naujos PRB yra atsparios prieš tai bakterijų ląsteles lizavusiems fagams, tai bendras PRB skaičius, terpės rūgštingumas gali nekisti.

Tačiau duonos raugų fermentacijos metu, naudojant savitomis savybėmis pasižyminčias pradines kultūras, tokias kaip fitaziniu aktyvumu pasižyminčios ar bakteriocinus gaminančios PRB, ilgalaikės fermentacijos metu jos gali būti prarastos ir pakeistos kitomis padermėmis, kurios pageidaujamos savybėmis gali nebepasižymėti. *L. sanfranciensis* yra tipinė raugų PRB, dominuojanti tiek kvietiniuose, tiek ruginiuose rauguose [249]. Tačiau fagai, atakuojantys šios rūšies bakterijas, mūsų žiniomis, iki šiol dar nebuvo detalai charakterizuoti.

1.5. LITERATŪRINĖS DALIES APIBENDRINIMAS IR DARBO TIKSLO PAGRINDIMAS

Fermentacijos metu PRB gamina įvairius junginius, kurie ne tik suteikia pageidautiną produkto skonį ar aromatą, bet ir pasižymi antimikrobinio poveikio prieš įvairius maisto gedimą ir ligas sukeliančius mikroorganizmus [27, 61]. KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje jau anksčiau buvo įvertinta spontaninių ruginių raugų mikroflora ir išskirtos iš jų penkios bakteriocinus gaminančios PRB: *L. sakei* KTU05-6, *P. acidilactici* KTU05-7, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermės [250]. Iširtas šių PRB antimikrobinis poveikis prieš *B. subtilis*, įvairias PRB, *Eurotium repens* IBT 18000 ir *Penicillium commune* IBT 18708 mikroskopinius grybus [4, 33]. Pirminiai šių PRB antimikrobinio poveikio tyrimo rezultatai parodė vykdomų darbų perspektyvumą ir tikslingumą plėsti PRB antimikrobinio bioproduktų taikymą ne tik duonos pramonėje, bet ir ekologinėje žemdirbystėje – grūdų sėklos biologinės taršos mažinimui.

Plečiant PRB pritaikymą svarbu išsiaiškinti jų antimikrobinio poveikio aktyvumą ir kitiems grūdų bei maisto gedimą ir ligas sukeliančiams mikroorganizmams, pvz. *Escherichia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* ir kitoms gentims priklausančias bakterijas, o taip pat *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* ir kitoms gentims priklausančius mikroskopinius grybus. Ekologinėje žemdirbystėje grūdų sėklai apdoroti skirti bioproduktai turėtų būti ne tik efektyvūs, bet ir pigūs. Iškelus tokį uždavinį, aktuali naujų terpių, skirtų PRB kultivuoti, paieška, atkreipiant dėmesį į krakmolingas gausiai Lietuvoje auginamas daržoves ir į šalutinius maisto pramonės produktus, galinčius atpiginti bioproduktų gamybą.

Ekologinės žemdirbystės sistema labai apriboja sudėtinių sintetinių trąšų, pesticidų, herbicidų, augimo reguliatorių naudojimą. Kol kas bioproduktai dar itin retai naudojami lauko augalų apsaugai. Labai menkas alternatyvių priemonių ir biologinių augalų apsaugos produktų pasirinkimas Lietuvoje yra viena iš priežasčių, ribojančių efektyvią kenksmingųjų organizmų kontrolę ekologiniuose ūkiuose.

Vertinant problemos aktualumą svarbu sukurti antimikrobiškai aktyvių PRB bioproduktą sėkliniams grūdams apdoroti prieš sėją ir išbandyti jo efektyvumą prieš daugiausia problemų ekologinėje žemdirbystėje sukeliančius *Fusarium* rūšies ir *Cochliobolus sativus* fitopatogenus. Užsienio šalyse kuriami bioproduktai, į kurių sudėtį įeina įvairūs mikroorganizmai, atliekantys teigiamas funkcijas ekologinėje žemdirbystėje. Tokių bioproduktų gamyboje naudojama *Paenibacillus macerans*, *Pseudomonas putida*, *Sporbolomyces roseus* [125], *Streptomyces griseoviridis* [126, 127, 128] mikroorganizmai. Be šių mikroorganizmų, bioprodukto, ekologiškai auginamų grūdų sveikatingumui didinti, gamyboje galėtų būti naudojamos iš ruginių savaiminių duonos raugų išskirtos antimikrobiniai poveikiu pasižyminčios PRB. Jų panaudojimas būtų puiki alternatyva cheminiams sėklų apdorojimo metodams ir rasti pritaikymą ekologinėje žemdirbystėje. Be to, PRB bioproduktai galėtų būti pritaikyti ir duonos kepinių gamyboje ne tik mikrobiologinei taršai mažinti, bet ir mineralinių medžiagų biologiniam pasisavinamumui didinti, panaudojant fitaziniu aktyvumu pasižyminčias PRB.

Mineralinių medžiagų pasisavinamumas žmonių ir gyvūnų organizme iš grūdų produktų skaidulinių medžiagų yra ribotas, kadangi jų sudėtyje esanti fito rūgštis linkusi su skaidulinių medžiagų mineralinėmis medžiagomis sudaryti organizmo neįsisavinamus fitatų kompleksus [157, 158]. Ši problema ypač aktuali kvietinių viso grūdo dalių kepinių gamyboje, kur naudojami pagreitinanti tešlos gamybos būdai ir fermentacijos metu mineralinės medžiagos nėra išlaisvinamos iš fitatų kompleksų dėl grūdų fitazių veiklai nepalankios terpės pH vertės ir temperatūros [198, 199]. Dėl mineralinių elementų trūkumo kasdieninėje mityboje ir nepakankamo jų įsisavinimo iš grūdų produktų žmogaus organizme atsiranda specifiniai medžiagų apykaitos sutrikimai, sukiantys įvairius negalavimus ir netgi susirgimus [129, 142]. Įvertinant šias mitybos problemas, aktuali naujų biotechnologinių priemonių, leidžiančių padidinti mineralinių medžiagų pasisavinamumą iš grūdų produktų, paieška. Viena iš natūralių ir dažniausiai galimų naudoti kvietinių kepinių kokybei pagerinti priemonių galėtų būti fitaziniu aktyvumu pasižyminčios PRB. Šiuo metu nėra išskirtos PRB, pasižyminčios dideliu fitaziniu aktyvumu, kurias būtų galima panaudoti duonos gamyboje. Todėl jų paieška ir išskyrimas iš fermentuotų produktų bei tolesnis pritaikymas vystant naujus bioproduktus yra aktualus, sprendžiant mineralinių medžiagų pasisavinamumo problemą.

Be to, literatūroje trūksta duomenų apie bakteriofagų poveikį PRB populiacijai ir jų stabilumui duonos raugų fermentacijos metu, todėl svarbu išskirti ir ištirti bakteriofagus iš raugų ir įvertinti jų poveikį PRB, ypač bakteriocinus gaminančioms ir fitaziniu aktyvumu pasižyminčioms PRB.

2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

2.1. TYRIMŲ OBJEKTAI

2.1.1. Mikroorganizmai ir auginimo sąlygos

Tyrimams pasirinktos PRB: *Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermės, kurios prieš tai išskirtos iš savaiminių ruginių duonos raugų [250] ir saugomos KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje. PRB ruošimo tolimesniems tyrimams sąlygos pateiktos 2.1. lentelėje. Antimikrobinio poveikio vertinimui sudaryti PRB padermių mišiniai (lygiomis dalimis), kurie dauginami MRS terpėje 35 °C temperatūroje: 1 – *L. sakei* ir *P. acidilactici*; 2 – *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10; 3 – *P. pentosaceus* KTU05-8, *P. pentosaceus* KTU05-9 ir *P. pentosaceus* KTU05-10; 4 – visų penkių PRB padermių mišinys.

2.1 lentelė. PBR ruošimo tolimesniems tyrimams sąlygos

PRB	Kultivavimo trukmė val.	Kultivavimo temp. °C	pH	Naudota terpė	Koncentracija KSV/ml
<i>L. sakei</i> KTU05-6	18	30	3,92	MRS*	2,47±0,05x10 ⁹
<i>P. acidilactici</i> KTU05-7	18	35	3,95	MRS	1,77±0,11x10 ⁹
<i>P. pentosaceus</i> KTU05-8	18	25	3,95	MRS	1,89±0,10 x10 ⁹
<i>P. pentosaceus</i> KTU05-9	18	25	3,93	MRS	1,60±0,15 x10 ⁹
<i>P. pentosaceus</i> KTU05-10	18	35	3,90	MRS	2,04±0,15 x10 ⁹

*De Man Rogosa ir Sharpe terpė (Biolife, Italija)

PRB antimikrobinio poveikio tyrimams naudoti indikatoriniai mikroorganizmai išskirti iš įvairių maisto produktų ir žaliavų, taip pat gauti iš VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų ambulatorinių bei stacionariųjų ligonių patloginės medžiagos. Indikatorinių mikroorganizmų dauginimui taikytos sąlygos pateiktos 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Indikatoriniai mikroorganizmai

Indikatoriniai mikroorganizmai	Terpė	Temperatūra, °C	Šaltinis	Kolekcija
<i>Bacillus thuringiensis</i> 1.1	MS ^a	28	vanduo	BI ^h
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>	SŠI ^b	30	n ^g	MI ⁱ
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i>	SŠI	30	n	MI
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	MS	37	gertuvė	MI
<i>Pseudomonas gladioli</i> pv. <i>allicola</i> 3.1	MS	28	svogūnai	BI
<i>Pseudomonas cepacia</i> 1.1	MS	28	svogūnai	BI
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar. V 3.3	MS	28	svogūnai	BI
<i>Pseudomonas marginalis</i> 3.5	MS	28	bulvės	BI
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar. V 1.2	MS	28	bulvės	BI
<i>Pseudomonas facilis</i> 4.1	MS	28	bulvės	BI
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> biovar. III 2.4.1	MS	28	burokėliai	BI
<i>Pseudomonas marginalis</i> 4.2	MS	28	burokėliai	BI
<i>Pseudomonas cichorii</i> 7.3.1	MS	28	morkos	BI
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar. III 2.1.1.1	MS	28	mėsa	BI
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> 11	MS	28	riebalai	BI

2.2 lentelė (tęsinys). Indikatoriniai mikroorganizmai

Indikatoriniai mikroorganizmai	Terpė	Temperatūra, °C	Šaltinis	Kolekcija
<i>Pseudomonas cepacia</i> 7.2	MS	28	morkos	BI
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar. I 9.2	MS	28	morkos	BI
<i>Listeria monocytogenes</i> 1.1	MS	28	žuvis	BI
<i>Listeria monocytogenes</i> 1.5	MS	28	žuvis	BI
<i>Escherichia coli</i> 1.10	MS	28	vanduo	BI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	MS	37	n.	MI
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	MS	37	n.	MI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	MS	37	n.	MI
<i>Escherichia coli</i>	MHS ^c	27		VUL ^j
<i>Enterococcus faecalis</i>	MHS	27		VUL
<i>Staphylococcus aureus</i>	MHS	27		VUL
<i>Bacillus macerans</i>	MHS	27	ligonių	VUL
<i>Salmonella enteritidis</i>	MHS	27	patologinė	VUL
<i>Micrococcus genties</i>	MHS	27	medžiaga	VUL
<i>Yersinia enterocolitica</i>	MHS	27		VUL
<i>Listeria genties</i>	MHS	27		VUL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MHS	27		VUL
<i>Rhizopus stolonifer</i> 2-KA	MPGA ^d	25	pyragas	BI
<i>Penicillium expansum</i> 23L	MPGA	25	obuoliai	BI
<i>Aspergillus niger</i> MD-029	MPGA	25	duona	BI
<i>Aspergillus versicolor</i> MI-130	MPGA	25	pyragas	BI
<i>Aspergillus fumigatus</i> KO-5	MPGA	25	grūdai	BI
<i>Penicillium chrysogenum</i> 48-L	MPGA	25	grūdai	BI
<i>Alternaria alternata</i> 1-4U	MPGA	25	morkos	BI
<i>Penicillium cyclopium</i> 21AL	MPGA	25	grūdai	BI
<i>Aspergillus tereus</i> S-1	MPGA	25	grūdai	BI
<i>Fusarium culmorum</i> L-2	MPGA	25	grūdai	BI
<i>Fusarium solani</i> 4-SA	MPGA	25	grūdai	BI
<i>Penicillium verrucosum</i>	SDA ^e	27	m.p. ^f	BI
<i>Fusarium culmorum</i> I	SDA	27	m.p.	BI
<i>Fusarium culmorum</i> II	SDA	27	m.p.	ŽI ^k
<i>Aspergillus versicolor</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Fusarium poae</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Penicillium chrysogenum</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Alternaria alternata</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Penicillium cyclopium</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Fusarium avenaceum</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Fusarium solani</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Aspergillus tereus</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Penicillium expansum</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Aspergillus niger</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Aureobasidium pullulans</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Candida kruisii</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Candida pelliculosa</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Debaryomyces vanriijae</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Geotrichum fermentans</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Kluyveromyces lodderae</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Pichia farinosa</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Pichia fermentans</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Pichia membranifaciens</i>	SDA	27	m.p.	BI
<i>Rhodotorula rubra</i>	SDA	25	n.	MI

2.2 lentelė (tęsinys). Indikatoriniai mikroorganizmai

Indikatoriniai mikroorganizmai	Terpė	Temperatūra, °C	Šaltinis	Kolekcija
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SDA	25	n.	MI
<i>Pichia burtonii</i> P.3	MPGA	25	obuoliai	BI
<i>Saccharomycopsis capsularis</i> S.1	MPGA	25	morkos	BI
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> Z.1(T)	MPGA	25	uogienė	BI
<i>Kluyveromyces marxianus</i> K.7.1(T)	MPGA	25	sūris	BI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sa.1.5(T)	MPGA	25	sultys	BI
<i>Candida parapsilosis</i> C.7.2	MPGA	25	mėsa	BI
<i>Yarrowia lipolytica</i> Y.C.6.1	MPGA	25	mėsa	BI
<i>Debaryomyces hansenii</i> Deb.4(T)	MPGA	25	kopūstai	BI

^aMitybinis sultinys (Nutrient Broth, Liofilchem, Italija); ^bSmegenų širdies infuzinis – (Liofilchem, Italija); ^cMueller-Hinton sultinys (Oxoid, CM0405); ^dMPGA terpė (litrai: 10 g mielių ekstrakto, 20 g peptono, 20 g gliukozės ir 18 g agarą (Liofilchem, Italija)); ^eSabouraud dekstrozės agaras (Oxoid, CM0041); ^fmaisto produktai; ^gnežinomas; ^hBotanikos institutas, ⁱMaisto institutas, ^jVŠĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santariškių klinikos; ^kŽemdirbystės institutas.

2.1.2. Pramoniniai duonos raugai fitaziniu aktyvumu pasižyminčių pieno rūgšties bakterijų išskyrimui

Fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB išskyrimui gauti devyni pramoniniu būdu pagaminti raugai iš trijų skirtingų Lietuvos kepyklų. Vienas iš jų – kvietinis (E), kiti – ruginiai. Iš kepyklų gauti raugai buvo užšaldyti ir iki eksperimento laikyti –18 °C temperatūroje. Raugai atšviežinti ir dauginti pagal kepyklų rekomendacijas (2.3 lent.). Fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB išskyrimui naudoti skirtingi raugų dauginimo būdai: naudojant vandeninę miltų suspensiją ir plikinius. Dauginant raugus pirmuoju būdu, ruošti 40, 26 ir 43 % tiršti raugai (atitinkamai A, C, D) ir 64 % drėgnio skystas raugas (B). Kitu atveju ruošti 60 % drėgnio raugai su plikiniais (E, F, G, H, I). Plikiniai ruošti sumaišant miltus ir salyklą su 95–98 °C temperatūros vandeniui. Gauti plikiniai apcukrinti 4 val. patalpos temperatūroje. Po to saldusis plikinis sumaišytas su pramoniniu raugu ir fermentuotas 24 val.

2.3 lentelė. Žaliavų kiekiai raugų dauginimui

Raugo mėginys	Pramoninio raugo kiekis, g	Žaliavos, g			Temperatūra, °C
		miltai		vanduo	
		viso grūdo dalių ruginiai	550 C tipo kvietiniai		
A	100	60		40	30
B	40	58		102	44
C	68	98		34	25
D	64	78		58	25
E	60		56	84	35
F	60	53		84	3
G	60	53		84	3
H	60	56		84	35
I	60	56		84	35

2.1.3. Kvietiniai kepiniai mineralinių medžiagų prisavinamumo įvertinimui

Kepiniai ruošti naudojant fermentuotus *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermėmis bioproduktus iš viso grūdo dalių kvietinių miltų (UAB

„Ustukių malūnas“, Ustukių kaimas, Pasvalio rajonas, Lietuva). Fermentuoti produktai ruošti 65 % drėgnio, keturiomis stadijomis (2.4 lent.). Fermentuotų produktų ruošimui naudotos atrinktos fitaziniu aktyvumu pasižymėjusios PRB padermės *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10. PRB padaugintos MRS sultinyje, tris kartus plautos distiliuotu vandeniu, kad būtų pašalinti mitybinės terpės sudėtyje esantys mineralinių medžiagų likučiai, ir centrifuguotos (3000 g, 5 min). Išplautos PRB ląstelės suspenduotos 5 ml distiliuoto vandens ir inokuliuotos į miltų ir vandens terpę. Fermentuoti produktai dauginami 35 °C temperatūrose 24 val. Kiekvienoje raugų dauginimo stadijoje prieš raugų gausinimą tirtos jų pH ir BTR vertės. Tyrimams pasirinkta kvietinė forminė duona, kurios gamyboje naudota viso grūdo dalių kvietiniai miltai; 10, 20 ir 30 % miltų masės PRB fermentuoto bioproducto; 1,5 % miltų masės juoduota druska ir vanduo pagal apskaičiavimus (tešlos drėgnis 46 %). Kepimo bandymai atlikti laboratorinėmis sąlygomis vienfaziu būdu, sumaišant paruoštą fermentuotą PRB bioproductą su likusiais receptūriniais komponentais. Kepiniui tešla ruošta iš 500 g miltų. Technologinės kvietinių kepinų ruošimo stadijos vykdytos pagal duonos kepimo krosnelėse (AFK/GERMATIC BM-2, Vokietija) užprogramuotą režimą: pirmasis minkymas – 10 min, 18–22 °C temperatūra; pirmasis kildinimas – 25 min, 25 °C temperatūroje; antrasis minkymas – 15 min, 30 °C temperatūroje; antrasis kildinimas – 35 min, 32 °C temperatūroje; trečiasis kildinimas – 70 min, 38 °C temperatūroje; kepimas – 55 min, 121 °C temperatūroje. Kontrolinis mėginys ruoštas be atrinktų PRB. Nustatytas kvietinės forminės duonos kepinų BTR ir mineralinės medžiagos, praėjus 24 val. po kepimo.

2.4 lentelė. Fermentuotų bioproductų gamybos stadijos

Žaliavos ir technologiniai parametrai	I stadija	II stadija	III stadija	IV stadija
PRB ląstelės suspenduotos vandenyje, ml	5	—	—	—
Fermentuotas produktas, g	—	35,5	90,5	200,5
Viso grūdo dalių kvietiniai miltai, g	10	20	35	70
Distiliuotas vanduo, ml	20	40	70	140
Fermentavimo trukmė, val.	3–4	20	24	24

2.1.4. Apkrėsti sėkliniai vasarinių kviečių grūdai

Vasarinių kviečių grūdų mėginiai PRB antigrybinio aktyvumo ir sveikatingumo įvertinimui gauti iš Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Žemdirbystės instituto tikslųjų lauko bandymų. Vasarinių kviečių grūdai ‘Grami’ buvo 100 % pažeisti *Fusarium* genties gyvais ir juose vyravo *F. culmorum* rūšis - viena iš pagrindinių pašaknio puvinų sukėlėjų. Tuo tarpu vasariniai kviečių grūdai ‘Triso’ buvo gausiai apkrėsti *Cochliobolus sativus* ir *Fusarium* genties gryvais.

2.1.5. Augalinių produktų terpės bioproducto gamybai

Maisto gamybos šalutiniai produktai. Fermentuoti maisto gamybos šalutiniai produktai: melasa, žlaugtai, salyklojai ir sėlenos, taip pat bulvių sulčių terpės. Šalutiniai gamybos produktai sumaišyti su vandeniu santykiais: 1:10 ruošiant melasos terpę, 1:4 – žlaugtų terpę, 1:3 – salyklojų terpę ir 1:3 – sėlenų terpę. Terpės sterilizuotos 121 °C temperatūroje 15 min. Inokuliuota MRS terpėje padaugintų PRB ląstelių (2 % nuo bendros masės) ir fermentuota 96 val. Po 48 ir 96 val. nustatyta

bioproduktų pH, fermentacijos pabaigoje nustatytas PRB skaičius, pieno rūgštis ir jos izomerų kiekis.

Bulvių terpės. Ruoštos bulvių terpės iš gerai nuplautų ir sutarkuotų bei per medžiaginį filtrą nusunktų bulvių masės: bulvių sulčių terpė; bulvių sulčių terpė, atskyrus per 30 min nusistovėjusį krakmolą; ir tarkuotų bulvių masė. Terpės sterilizuotos 121 °C temperatūroje 15 min ir fermentuotos 72 val., inokuliuojant 2 % atrinktų PRB ląstelių ir jų mišinių (sumaišius lygiomis dalimis), padaugintų MRS terpėje. Kas 24 val. nustatytos terpės pH vertės ir PRB skaičius. Be to, ruoštos bulvių sulčių terpės su ekstruduotų ryžių priedais (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 ir 25 %) (Ustukių malūnas, Lietuva), taip pat papildytos priedais: 0,2, 0,1 ir 2 g/l atitinkamai $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ir cisteino-HCl·H₂O bei 10, 20 ir 30 ml/100 g terpės MRS sultinio priedais. Nustatyta fermentuotų bioproduktų pH, BTR vertės, reologinės savybės, PRB skaičius. Atrinkti bioproduktai išbandyti sėklinių vasarinių kviečių grūdų taršos ir sveikumo gerinimo tyrimuose.

2.1.6. Duonos raugai bakteriofagų išskyrimui ir temperatūros įtakos pieno rūgštis bakterijų rūšių populiacijos vertinimui

Siekiant įvertinti PRB rūšių pokyčius duonos raugų fermentacijos metu ir išskirti bei genetiškai identifikuoti rauguose vyraujančius bakteriofagus, iš Lietuvos kepyklų mėnesio laikotarpyje surinkti duonos raugų (GL, GH ir M) mėginiai (iš viso – 84 mėginiai), kurie užšaldyti ir iki analizės laikyti –18 °C temperatūroje. Be to, mėnesio laikotarpyje rinkti dviejų rūšių raugai (kvietinis ir ruginis) iš Danijos kepyklos (iš viso – 40 mėginių), kurie vėliau papildomai dar šešias savaites dauginami laboratorijoje (iš viso – 60 mėginių) pagal kepykloje naudojamą receptūrą (ruginis raugas ruoštas iš 13,8 g pradinio ruginio raugo, 137,9 ml vandens, 48,4 g ruginių miltų; kvietinis raugas ruoštas iš 2,6 g pradinio kvietinio raugo, 98,7 ml vandens ir 98,7 g kvietinių miltų). Kiekvieną dieną imti raugų mėginiai bakteriofagų paieškai, jų išskyrimui, ir PRB dezoksiribonukleino rūgštis (DNR) išskyrimui. Iš duonos raugų, surinktų pirmą dieną, išskirta po ~32 PRB kolonijos. Papildomai po 32 PRB kolonijas išskirta iš daniškų raugų paskutinės fermentacijos dienos. Išskirtos PRB panaudotos bakteriofagų paieškos tyrimuose.

2.2. TYRIMO METODAI

2.2.1. Pieno rūgštis bakterijų antimikrobinio poveikio vertinimas

PRB mėginių paruošimas. Antimikrobiniam tyrimams PRB ir jų mišiniai 18 val. auginti modifikuotame MRS (mMRS) sultinyje, ruošdami ištirpinant 10 g peptono, 5 g mėsos ekstrakto, 3 g mielių ekstrakto, 15 ml šviežių mielių ekstrakto (50 g šviežių mielių ištirpinta 200 ml demineralizuotame vandenyje, sterilizuota ir palikta nusėsti per naktį šaldytuve), po 7 g gliukozės, fruktozės, maltozės, 3 g natrio acetato trihidrato, 2 g natrio gliukonato, 2,6 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,1 g $MgSO_4 \cdot H_2O$, 0,05 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,5 g cisteino hidroklorido, 1 ml tveen 80 ir 1 litras demineralizuoto vandens. Terpė sterilizuota 15 min 118 °C temperatūroje. 2 % kultūros inokuluota į šviežiai paruoštą mMRS terpę ir auginta 24 val. Susidare bakteriocinai ir kiti PRB metabolizmo produktai, tokie kaip acto, pieno rūgštys,

fenoliniai junginiai ir kiti, išsiskiria į mitybos terpę. Po 24 val. kultivavimo PRB ląstelės nucentrifuguotos (5000 g, 10 min) ir atskirtos, o supernatantai filtruoti per sterilių 0,2 µm filtrą, siekiant pašalinti bakterijų likučius, ir perpilti į naujus mėgintuvėlius, kurie iki analizės laikyti 4 °C temperatūroje. Antimikrobinis PRB aktyvumas difuzijos į agarą metodu vertintas tikrinant: 1 – PRB supernatantų / metabolizmo produktų (MP) aktyvumą, kaip organinių rūgščių ir kitų į terpę išsiskyrusių metabolitų; 2 – neutralizuotų supernatantų / neutralizuotų metabolizmo produktų (NMP), pašalinus organinių rūgščių poveikį, tai yra, neutralizavus su 5 M NaOH iki pH vertės 6,5, priimant kaip į bakteriocinus panašių medžiagų, tirpalą (baltyminių junginių patvirtinimui atliktas proteazės K testas); 3 – PRB ląstelių. Vertinant PRB mišinių antimikrobinį poveikį PRB mišiniai buvo sudaryti lygiomis dalimis sumaišius padaugintas PRB ir 2 % šio mišinio inokuliuota į šviežiai paruoštą mMRS terpę.

Difuzijos į agarą metodas. PRB MP ir NMP antimikrobinis poveikis prieš indikatorinius mikroorganizmus buvo atliktas difuzijos į agarą metodu [251]. PRB antimikrobinio poveikio vertinimui naudoti indikatoriniai mikroorganizmai pateikti 2.2 lentelėje. Indikatorinių bakterijų ir mielių ląstelių suspensija ruošta naudojant McFarland'o standartą Nr. 1 (~10⁸ KSV/ml). Vertinant PRB BPM antimikrobinį poveikį *B. subtilis* ir *B. thuringiensis* sporoms, bakterijų mėginiai kaitinti 80 °C temperatūroje 15 min. Po 100 µl paruoštos indikatorinių mikroorganizmų suspensijos išpilstyta į Petri lėkšteles ir užpilta po 20 ml iki 45 °C temperatūros atvėsintos atitinkamos mitybinės terpės. Antimikrobinio poveikio įvertinimui prieš mikroskopinius grybus buvo ruošta jų sporų suspensija iki ~10⁵ sporų gazonui, kuri po 1 ml išpilstyta į lėkšteles. Sustingus terpei, steriliu cilindru išpjautos 6 mm skersmens įdubos ir agaras pašalintas. Į šulinėlius dozuota po 100 µl mėginio. Petri lėkštelės su pasėliais inkubuotos termostate – indikatoriniams mikroorganizmams parinktoje temperatūroje (2.2 lent.). Antimikrobinis PRB poveikis prieš bakterijas įvertintas po 24 val., o prieš mikroskopinius grybus – po 3–4 parų. Vertinta skaidri zona (augimo slopinimo) apie įdubą, išmatuojant skaidrios zonos aplink įdubą skersmenį horizontalia ir vertikalia kryptimis. Iš gautų duomenų išvestas vidurkis bei apskaičiuotas slopinimo zonos skersmuo (išreikštas mm). Visiškai skaidri zona vertinta kaip fungicidinis poveikis, o tas atvejis, kai indikatorinių mikroorganizmų augimas ar sporų susidarymas buvo prislopintas, bet ne sustabdytas, buvo vertinama kaip fungistatinis poveikis. Baltyminės kilmės antimikrobininių komponentų – bakteriocinų patvirtinimui atliktas testas su proteolitiniais fermentais. Jautrumas proteinazei K, tripsinui, pepsinui ir chimotripsinui patikrintas, sumaišius NMP su fermentais (0,5 µg/ml) ir inkubavus 30 min 37 °C temperatūroje.

Vertinant PRB ląstelių antimikrobinį poveikį prieš indikatorinius mikroorganizmus, išplautos PRB ląstelės naudojant sterilią mikrobiologinę kilpelę uždėtos 3–4 mm skersmens taškeliais ant sustingusio agaro, paruošto pagal aukščiau pateiktą metodą.

Kaip kontroliniai mėginiai mikroskopiniams grybams naudoti antigrybiniai preparatai: nistatinas 100 AV (Liofilchem, Italija), flucitozinas 1 µg (Liofilchem, Italija) ir itrakonazolis 50 µg (Liofilchem, Italija), o bakterijoms – streptomocinas 10

μg ir tetraciklinas 30 μg (Liofilchem, Italija). Preparatai diskelio formos (skersmuo 6 mm) uždėti ant agarų, paruošto su indikatoriniais mikroorganizmais.

Papildomai įvertinta 5 % pieno rūgšties, 5 % acto rūgšties, 1 % gintaro rūgšties ir 0,3 % benzenkarboksirūgšties tirpalų ir neutralizuotų iki pH verčių 6,5 šių tirpalų antimikrobinis poveikis prieš indikatorinius mikroorganizmus.

2.2.2. Pieno rūgšties bakterijų išskyrimas iš pramoninių duonos raugų

10 g raugo ir 90 ml sterilaus fiziologinio NaCl tirpalo (9 g/l) homogenizuota (*Stomacher* 400, Seward medical, Londonas, JK). Iš gautos suspensijos ruošti nuo 10^{-2} iki 10^{-7} skiediniai. Atitinkamai 10^{-4} ir 10^{-7} skiediniai pasėti į Petri lėkšteles su mMRS agaru. Lėkštelės inkubuotos temperatūrose pagal kepyklų rekomendacijas (2.3 lent.), sudarius anaerobines sąlygas (AeroGen, Oxoid). Po keturių parų skaičiuotos išaugusios kolonijos ir nustatytas PRB skaičius kolonijas sudarančiais vienetais viename grame raugo (KSV/g). Atsitiktinai pasirinktos bakterijų kolonijos (iš kiekvieno raugo mėginio po 24 PRB) išgrynintos, persėjant į naujas lėkšteles. Išskirtos ir mMRS terpėje padaugintos PRB lėkštelės suspenduotos 25 % glicerolio tirpale ir saugotos tolimesniems tyrimams (fitazinio aktyvumo nustatymui bei genetiniam identifikavimui) $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

2.2.3. Fitaziniu aktyvumu pasižyminčių pieno rūgšties bakterijų atranka

Išskirtos iš raugų PRB daugintos 10 ml mMRS sultinio $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 18 val. Nuosėdos surinktos centrifuguojant (6000 g, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) ir po to plautos 3 kartus 20 ml steriliu 0,9 % NaCl tirpalu ir jame suspenduotos (600 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio sugertis tiriamąja suspensija (MSS_{600}) buvo lygi ~ 1) (Aligent 8435 Spectrophotometer). Minimalaus maistingumo mitybinė terpė (MMT) ruošta pagal Herbert ir bendraautorius [252] su tam tikromis modifikacijomis. MMT, papildyta neorganiniu fosforu KH_2PO_4 (6 g/l) (MMT+P), buvo naudota kaip teigiamas kontrolinis mėginys. Ta pati terpė be fosforo šaltinio naudota, kaip neigiamas kontrolinis mėginys (MMT-P). MMT mitybinė terpė, papildyta fito rūgšties dikalio druska (0,74 g/l) (MMT+FIT), buvo naudota PRB fitazinio aktyvumo įvertinimui. MMT komponentų sudėtis pateikta 2.5 lentelėje. Prieš sterilizavimą (15 min, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$) mitybinė terpė ruošta be aminorūgščių, vitaminų, geležies sulfato ir fito rūgšties dikalio druskos dėl šių medžiagų jautrumo temperatūrai. Atvėsinus mitybinę terpę iki $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros, sudėti vitaminų, aminorūgščių, geležies sulfato ir fito rūgšties dikalio druskos tirpalai, steriliai filtruoti pro 0,2 μm membraninius celiuliozės filtrus (Sigma-Aldrich, Vokietija). PRB fitazinio aktyvumo įvertinimui naudoti du testai: naudojant mitybines agarų ir skystą terpę pagal Nuobariene ir bendraautorius [185] su tam tikromis modifikacijomis.

PRB fitazinio aktyvumo įvertinimo testas, panaudojant mitybinę agarų terpę. Išplautos ir suspenduotos PRB steriliame 0,9 % NaCl tirpale ($\text{MSS}_{600} \sim 1$) sėtos po 2 μl ant MMT+P, MMT-P ir MMT+FIT mitybinių agarų terpių. Lėkštelės inkubuotos $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 4 dienas, sudarant anaerobines sąlygas. PRB kultūrų gebėjimas augti terpėse su fitatais, kaip vieninteliu fosforo šaltiniu, palygintas su augimu terpėse, ruošiose su neorganiniu fosforu ir be jo.

PRB fitazinio aktyvumo įvertinimo testas, panaudojant skystą mitybinę terpę. PRB fitaziniam aktyvumui stebėti į mikro lėkštelės celes supilstyta po 200 µl MMT terpės ir po 2 µl suspenduotų 0,9 % NaCl tirpale (MSS₆₀₀ ~ 1) PRB ląstelių. Lėkštelės inkubuotos 35 °C temperatūroje. 600 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio sugerties matavimai atlikti po 8, 16, 24, 32, 40, 48 ir 72 val. spektrofotometru (Power Wave 200, Bio-Tek Instruments).

2.5 lentelė. MMT sudėtis

Medžiaga, g	Kiekis, ml		
	MMT+P	MMT-P	MMT+FIT
Aminorūgščių ir vitaminų tirpalai*	+	+	+
Maltozė	7	7	7
Gliukozė	7	7	7
Fruktozė	7	7	7
Natrio gliukonatas	2	2	2
Natrio acetatas · 3 H ₂ O	5	5	5
(NH ₄) ₂ citratas	4	4	4
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1	0,1	0,1
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	0,05	0,05	0,05
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,02	0,02	0,02
Cisteino-HCl · H ₂ O	0,5	0,5	0,5
KCl	-	3,28	3,21
KH ₂ PO ₄	6	-	-
Kalio fitatas	-	-	0,74
Tveen 80, ml	1	1	1
0,2 M sukcinato buferis, ml	500	500	500
Demineralizuotas vanduo, ml	500	500	500
Sureguliuotas su 1 M HCl pH vertės buvo 5,5			

*aminorūgštys: po 0,1 g/l L-alanino, L-arginino, glicino, L-histidino, L-isoleucino, L-leucino, L-lizino, L-metionino, L-fenilalanino, L-prolino, L-serino, L-treonino, L-triptofano, L-tirozino, L-valino, po 0,2 g/l L-asparagino, L-asparto rūgšties, L-cisteino, L-glutamino, L-glutamo rūgšties; vitaminai: 0,0005 g/l tiamino, 0,002 g/l vitamino B₆, 0,005 g/l riboflavino, po 0,001 g/l vitamino B₁₂, biotino, folio rūgšties, nicotino rūgšties, kalcio pantotenato; po 0,01 g/l *p*-aminobenzoato, pantoteno rūgšties; basės: po 0,01 g/l guanino, adenino, ksantino, timino, uracilo

2.2.4. Genetinis pieno rūgšties bakterijų identifikavimas

Fitaziniu aktyvumu pasižymintios PRB buvo suskirstytos į rūšis ir porūšius, pasinaudojant pasikartojančio sekvenavimo polimerazės grandininės reakcijos (*ps-PGR*) metodu ir identifiikuotos 16S rDNR geno sekos amplifikacijos polimerazės grandininės reakcijos metodu. PRB DNR išskirta naudojant *Sigma GenElute™ Bacterial Genomic Kit* paketą pagal gamintojų rekomendacijas granteigiamoms bakterijoms. Išskirta DNR laikyta –20 °C temperatūroje.

ps-PGR amplifikacija atlikta pagal Versalovic ir bendraautorius [253] naudojant *DAP GoldStar polymerase Kit* (Eurogentec, Belgija) rinkinį. 1 µl išskirtos DNR suspensijos sumaišyta su 24 µl PGR reakcijos mišiniu, kuris paruoštas sumaišant 4,0 µl 1,25 mM dNTP, 2,5 µl 10xPGR buferio, 0,3 µl polimerazės, 2 µl 50 mM MgCl₂ tirpalo, po 1 µl pradmens (5'-IIINCGNCGNCATCNGGC-3') ir (5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3') (Eurofins MWG Operon, Ebersbergas, Vokietija) ir 13,2 µl vandens. PGR atlikta termocikleryje (GeneAmp PCR System

9700, Perkin-Elmer, Stratagene, Kalifornija, JAV) pagal Christiansen ir bendraautorius [254].

Amplifikuoto ps-PGR produkto elektroforezė vykdyta 5 val. naudojant 120 V įtampą. Po elektroforezės gelis (1,2 % agarozės) išlaikytas per naktį vonelėje su šviežiai paruoštu SYBR žaliuoju (Thermo Fisher Scientific, Lietuva) (1:20000) ir fotografuotas UV šviesoje (Alpha Innotech, Kanada). Gautos nuotraukos analizuotos suskirstant PRB į atskiras grupes pagal paliktų atspaudų ypatumus. Iš kiekvienos grupės atrinkta po vieną PRB jų identifikavimui 16S rDNR geno sekos amplifikacijos PGR metodu.

Amplifikuotų DNR mėginių paruošimas sekvenavimui buvo atliktas taip: 1 μl išskirtos DNR suspensijos sumaišyta su 49 μl PGR reakcijos mišiniu, kuris paruoštas sumaišant 26 μl „Green Mix“ (Thermo Fisher Scientific, Lietuva), po 2,5 μl pradmenis 5 μM 16S-27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') ir 16S-1540R (5'-TAC GGY TAC CTTGTT AGG ACT-3'), 0,5 μl formamido, 17,5 μl vandens. PGR reakcija vykdyta termocikleryje pagal Tuma ir bendraautorius [255]: 1 ciklas – 5 min 95 °C temperatūroje; 35 ciklai – 30 sek. 95 °C temperatūroje, 30 sek. 60 °C temperatūroje ir 1 min 72 °C temperatūroje; 1 ciklas – 7 min 72 °C temperatūroje. Amplifikuotos DNR sekvenavimas atliktas Macrogen Inc., Olandijoje. Po sekvenavimo gautos PRB 16S rDNR sekos sudėliotos naudojant CLC Main Workbench 6 (CLC bio A/S, Aarhus) programą ir palygintos su Nacionalinio biotechnologijos informacijos centro bakterijų banko sekomis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Denatūruojančio gradiento gelio elektroforezė (DGGE) atlikta pagal Kopenhagos universitete, Gamtos mokslų fakultete, Maisto mokslo katedroje sudarytą protokolą. 10 g raugo ir 90 ml 0,9 % NaCl tirpalo homogenizuota 40 ml homogenizato ir centrifuguota (1000 g, 5 min, 4 °C). 20 ml centrifugato perpilta į naują mėgintuvėlį ir vėl centrifuguota (5000 g, 10 min, 4 °C). Iš gautų nuosėdų ekstrahuota PRB DNR naudojant *Sigma GenElute™ Bacterial Genomic Kit* paketą pagal gamintojų rekomendacijas gramteigiamoms bakterijoms. 1 μl išskirtos DNR suspensijos sumaišyta su 49 μl PGR reakcijos mišiniu, kuris ruoštas sumaišant su 26 μl „Green Mix“ tirpalu, po 2,5 μl 5 μM pradmenis PRBA338fGC ir PRUN518r, 0,5 μl formamido, 0,5 μl jaučio serumo albumino ir 17,0 μl vandens. PGR reakcija vykdyta termocikleryje ciklais: 1 ciklas – 5 min 95 °C temperatūroje; 35 ciklai – 30 sek. 95 °C temperatūroje, 30 sek. 60 °C temperatūroje ir 1 min 72 °C temperatūroje; 1 ciklas – 7 min 72 °C temperatūroje.

DGGE analizei gelis ruoštas iš tirpalų: A (1 ml 50 kartų koncentruoto tris-acetato-etilendiaminotetraacto rūgšties buferio (50×TAE), 22,5 ml 40 % bisacrilamido, 26 ml formamido, 27,3 g karbamido ir praskiesta vandeniu iki 100 ml) ir B (1 ml 50×TAE buferio, 22,5 ml 40 % bisacrilamido, 12 ml formamido, 12,6 g karbamido ir praskiesta vandeniu iki 100 ml). Gelis paruoštas užpildant elektroforezės sistemos kasetę A ir B tirpalais, sudarius koncentracijos gradientą. 20 % amonio persulfato tirpalas ir tetrametileileno tiaminas naudoti kaip katalizatoriai akrilamido polimerizacijai ruošiant gelį elektroforezei. Viršutinis gradiento gelio sluoksnis užpildytas tirpalu, ruoštu iš 100 μl 50×TAE buferio, 2,25 ml 40 % bisacrilamido ir praskiesta vandeniu iki 10 ml. Polimerizacijos reakcija katalizuota

100 µl 20 % amonio persulfatu ir 10 µl tetrametiletileno tiamino. Elektroforezės sąlygos: 120 V, 300 mA, 16 val., 60 °C temperatūra. Gelis po elektroforezės dažytas Syber Gold (300 ml 0,5×TAE buferio ir 25 µl Syber Gold) tirpale ir fotografuotas UV šviesoje.

2.2.5. Pieno rūgšties bakterijų fitazinio aktyvumo nustatymas

PRB fitazės katalizuoja fitato hidrolizę, kurios metu atsiskiria fosforas. Fitazinio aktyvumo vienetas apibrėžiamas PRB fermentinio ekstrakto kiekiu, reikalingu išlaisvinti 1 nmol neorganinio fosforo per min naudotomis matavimo sąlygomis. PRB fitazinis aktyvumas nustatytas pagal Nuobariene ir bendraautorius [185].

PRB kultūrų paruošimas fitazinio aktyvumo nustatymui. PRB dauginamos šviežiai paruoštame 50 ml mMRS sultinyje (Erlenmejerio kolboje) 24 val. 35 °C temperatūroje. PRB nuosėdos surinktos centrifuguojant (6000 g, 10 min, 4 °C), plautos du kartus 50 ml demineralizuotu vandeniu ir vieną kartą 25 ml MMT+FIT terpe. Po plovimo suspenduotos PRB ląstelės inokuliuotos 100 ml šviežiai paruoštoje MMT+FIT mitybinėje terpėje (MSS₆₀₀ ~ 0,1) ir dauginamos 48 val. 35 °C temperatūroje. Nustatytas PRB skaičius sėjant ant mMRS agaro.

PRB ekstrakto fitazinio aktyvumo nustatymui paruošimas. Ruošiant PRB ekstraktą ląstelinio fitazinio aktyvumo nustatymui, PRB kultūros dauginamos 48 val. MMT+FIT terpėje ir centrifuguojamos (5000 g, 10 min, 4 °C). Surinkti supernatantai filtruoti pro 2 µm celiuliozės membranos filtrą. Ruošiant PRB intraląstelinio fitazinio aktyvumo nustatymui, gautos po centrifugavimo PRB nuosėdos du kartus plautos 20 ml natrio acetato buferiu (0,2 M, pH=5,5), pakartotinai centrifuguojamos ir suspenduotos 5 ml natrio acetato buferyje (0,2 M, pH=5,5). Po to geresniam ląstelių suardymui suspenduotos nuosėdos papildytos 1 g stiklo rutulėlių (425–600 µm, Sigma) ir mechaniškai ardytos purtyklėje (3000 min⁻¹) penkis kartus po 1 min, tarp ardyimų po 1 min atvėsinant turinį lede. Suardyta PRB ląstelių suspensija centrifuguojama (6000 g, 10 min, 4 °C) ir nufiltruota. Visoms tirtoms PRB kultūroms ekstraktų ruošimo bandymas kartotas tris kartus.

PRB fitazinio aktyvumo įvertinimas spektrofotometru. Reakcijos mišinys sudarytas iš 0,02 ml paruošto PRB fermentinio ekstrakto tirpalo ir 0,08 ml natrio acetato buferio (0,2 M, pH=5,5), sudėtyje turinčio 3 mM kalio fitato. Reakcija vykdyta 30 °C temperatūroje. Reakcija buvo stabdoma kas 15 min (0, 15, 30, 45 ir 60 min), pridėjus 0,1 ml 10 % trichloracto rūgšties (TCA). Neigiamas kontrolinis mėginys (be kalio fitato) ruoštas sumaišant 0,02 ml fermento tirpalo su 0,08 ml natrio acetato buferiu (0,2 M, pH 5,5). Po 60 min reakcija stabdyta 10 % TCA tirpalu. Tuščias mėginys ruoštas PRB fermentinį tirpalą pakeičiant natrio acetato buferiu. 0,2 ml reakcijos mišinio sumaišyta su 1,6 ml spalvinės reakcijos reagentu (1 dalis 10 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O : 1 dalis 2,5 M H₂SO₄ : 2 dalys acetono) pagal Olstorpe ir bendraautorius [256]. Reakcijos trukmė – 20 min. 335 nm UV spindulio sugertis gautu tirpalu išmatuota spektrofotometru (Accu reader M965, Metertech). Fosforo koncentracijos nustatymui sudaryta kalibravimo kreivė, naudojant KH₂PO₄ koncentracijas 0–3,23 µmol/ml ribose.

Fermentinis aktyvumas išreikštas nmol neorganinio fosforo, išlaisvinto 10^{10} PRB ląstelių per 1 min esant 30 °C temperatūrai, pH=5,5 iš 3 mM fito rūgšties dikalio druskos.

2.2.6. Mineralinių elementų kiekio kvietiniuose kepinuose nustatymas

Mineralinės medžiagos kepinuose nustatytos pagal AACC metodą 40-70 [257]. 5 g kepinio mėginio išdžiovinta (105 °C temperatūroje) krosnelėje, apanglinta, apdorota HNO₃ (1:1) ir sausai mineralizuota mufelinėje krosnyje 500 °C temperatūroje. Po to pelenai apdoroti 10 ml koncentruota HCl, nusausinti kaitinant ir ištirpinti 20 ml 2 M HCl. Gautas tirpalas kaitintas iki užvirimo, filtruotas į 100 ml matavimo kolbą bei praskiestas iki 100 ml. Mėginiai tirti atominiu absorbciniu spektrometru (Spectr AA-Plus). Kalcio, mangano, geležies ir cinko koncentracijos apskaičiuotos iš kalibracinių kreivių, kurios sudarytos ruošiant CaCO₃, FeSO₄·7H₂O, MnSO₄, ZnSO₄·7H₂O tirpalus įvairiomis koncentracijomis. Fosforo kiekis buvo nustatytas standartiniu spektrofotometrinio molibdatiniu metodu (LST EN 1136:2000).

Tirpių mineralinių medžiagų junginių nustatymas atliktas pagal Žiaukienės aprašytą metodą [258], atlikus keletą pakeitimų. Tiriant tirpių mineralinių medžiagų junginių kiekį, 10 g mėginio buvo užpilta 50 ml distiliuoto vandens, ekstrahuota 30 min ir centrifuguota. Gautos nuosėdos pakartotinai ekstrahuotos 0,9 % NaCl tirpalu (pH 2,0) 30 min ir centrifuguota (3000 g, 5 min). Gautos nuosėdos perplautos 50 ml 0,9 % NaCl tirpalu (pH 7,0), ekstrahuotos 30 min ir centrifuguotos (2000 g, 5 min). Nuosėdos pakartotinai plautos 30 ml H₂O ir centrifuguotos, o gauti centrifugatai sujungti ir išdžiovinti (105 °C temperatūroje) krosnelėje. Mineralinių medžiagų nustatymas atliktas pagal aukščiau aprašytą AACC metodą 40-70 [257].

2.2.7. Terpės ir fermentacijos sąlygų įtakos pieno rūgšties bakterijų aktyvumui nustatymas

Vertinant mitybinių terpių ir pradinio inokulianto kiekio įtaką PRB augimui ir BPM susidarymui, pirmam tyrimų etape pasirinktos mMRS ir MRS terpės ir 0,01 ir 2 % PRB inokuliatas. PRB dauginamos 48 val. termostate (2.1 lent.). Spektrofotometru kas 3 val. matuota 600 nm bangos ilgio monochromatinio spindulio sugertis tiriamąja terpe ir lygiagrečiai ruošti PRB supernatantų mėginiai BPM antimikrobinio aktyvumo nustatymui difuzijos į agarą metodu (2.2.1 skyrius).

Vertinant mitybinės terpės komponentų ir fermentavimo sąlygų (terpės pH verčių ir temperatūros) įtaką, BPM aktyvumas išreikštas aktyvumo vienetais, tenkančiais vienam mililitrui supernatantų (AV/ml) pagal Altuntas ir bendraautorius [109]. Aktyvumo vienetas apibrėžiamas kaip didžiausias dviejų matavimų praskiedimas, kuriam esant dar nustatomas aiškus antimikrobinis aktyvumas prieš indikatorinį mikroorganizmą, ir apskaičiuojamas pagal 2.1 formulę:

$$AV / ml = \frac{KS \cdot 1000}{50} \quad 2.1$$

čia: KS – kritinis dviejų matavimų vidutinis skiedimas, kuriam dar esant pasireiškė aiškus antimikrobinis poveikis; 50 – kiekis, naudotas antimikrobiniam poveikiui vertinti (μl); 1000 – perskaičiavimas į mililitrus.

Vertinant azoto šaltinio įtaką BPM antimikrobiniam aktyvumui tirtas triptono, peptono, mėsos ir mielių ekstrakto poveikis, koncentracijų ribose 0–20 g/l. Nagrinėjant anglies šaltinio įtaką BPM aktyvumui vertintas cukrų: gliukozės, fruktozės bei maltozės poveikis koncentracijų ribose 0–21 g/l. Vertinant mineralinių medžiagų poveikį BPM aktyvumui, tyrimams naudota $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (1,6–10 g/l); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,05–0,5 g/l); $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (0,025–0,2); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0–0,4 g/l). Be to, tirtas kitų terpių komponentų: natrio gliukonato (1–10 g/l); natrio acetato trihidrato (2,5–15 g/l); cisteino-HCl·H₂O (0,25–5 g/l); tween 80 (0,5–5 ml/l); vitaminų: tiamino hidroklorido, kobalamino, folio rūgšties ir D,L-6,8-tioktinės rūgšties (1 mg/l) poveikis BPM aktyvumui. Vertinta temperatūros (auginant PRB 20, 25, 30 ir 35 °C) ir pH verčių (prieš fermentaciją su 1 M HCl pH vertes suregulavus iki 4,5, 5,5 ir 6,5) įtaka BPM aktyvumui.

Pieno rūgšties ir jos izomerų kiekio nustatymas. Pieno rūgšties ir jos izomerų kiekis nustatytas naudojant fermentinį testą K-DLATE 08/11 (Megazyme International Ireland Limited, Airija) pagal gamintojų rekomendacijas. Tam pasverta 2 g mėginio, praskiesta distiliuotu vandeniu iki 50 ml, maišyta 10 min ir ekstraktas filtruotas per popierinį filtrą. Filtratas perneštas į 100 ml matavimo kolbą ir praskiestas iki žymės distiliuotu vandeniu. Tokiu būdu paruošti mėginiai naudoti pieno rūgšties ir jos izomerų nustatymui.

2.2.8. Bioproducto reologinių savybių tyrimas

Bioproducto reologinės savybės (kietumas, tirštumas ir lipnumas) tirtos TA.XT. plus tekstūros analizatoriumi (Stable Micro Systems Ltd., Jungtinė Karalystė). Tam 46 g masės bioproducto mėginiai įdėti į cilindro formos 59 mm skersmens indelį ir spausti iki 10 mm mėginio suspaudimo, spaudimo jėga – 5 g, greitis – 1 mm/sek., naudotas 35 mm skersmens cilindrinis plastmasinis plunžeris. Kiekvienas tyrimas kartotas du kartus.

2.2.9. Pieno rūgšties bakterijų bioproducto išbandymas grūdų sėklų biologinės taršos mažinimui ir sveikatingumo didinimui

Grūdų apvėlimo PRB suspensijomis testai. PRB antigrybinio aktyvumo įvertinimui kviečių grūdai apvėlti (apdoroti) padaugintomis PRB kultūromis MRS terpėje (2.1 lent.) ir technologinėje bulvių sulčių terpėje, papildytoje 5 % ekstruduočių ryžių ir 0,2, 0,1 ir 2 g/l atitinkamai $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ir cisteino-HCl·H₂O priedais. Kontrolinis mėginys ruoštas vandeniu apvėlus grūdus. Visi laboratoriniai tyrimai atlikti trim etapais.

I etape kviečių grūdų sėklų ‘Grami’ apvėlimui naudota 10 ml PRB bioproducto (ruošto iš MRS) 100 g grūdų sėklų. Vertinta PRB bioproducto įtaka tokiems kriterijams: *Fusarium* genties infekcijos lygiui sėklose skirtingose inkubavimo sąlygose: 10, 15, 20 ir 25 °C temperatūrose (agarizuotų terpių metodas); daigų ir šaknų ligotumui (rulonų metodas), sėklų daigumui, daigų aukščiui, šaknų ilgiui (kiuvečių metodas).

II etape kviečių grūdų sėklos ‘Grami’ buvo apdorotos skirtingu PRB bioproducto (ruošto iš MRS) kiekiu: 10, 20 ir 30 ml 100-ui g sėklos. Vertinta PRB

bioproducto įtaka *Fusarium* genties infekcijos lygiui sėklose inkubuojant 20 °C temperatūroje (agarizuotų terpių metodas).

III etape, atsižvelgiant į pirminius rezultatus, kviečių grūdų sėklų 'Triso' apdorojimui atrinkta *P. pentosaceus* KTU05-10 padermė ir sudaryti du PRB padermių mišiniai: 1 – KTU05-7 ir KTU05-10; 2 – KTU05-6, KTU05-7 ir KTU05-10, išbandyti bioproducto gamyboje dauginant PRB MRS mitybinėje terpėje ir technologinėje bulvių sulčių terpėje, papildytoje 5 % ryžių ekstrudatais, 0,2 g/l MgSO₄·7H₂O, 0,1 g/l MnSO₄·4H₂O ir 2 g/l cisteino-HCl·H₂O priedais. Kontrolinis variantas – sėklos, apveltos vandeniu. Vertinta PRB bioproductų (20 g/100 g grūdų sėklų) įtaka *Fusarium*, *Alternaria*, *Cochliobolus sativus* mikroskopiniams grybams (agarizuotų terpių metodas); daigų ir šaknų ligotumui, sėklų pažeidimui *Fusarium* genties ir *Cochliobolus sativus* grybais (rulonų metodas).

Praskiedimo metodu nustatytas mikroskopinių grybų kolonijas sudarančių vienetų kiekis viename grame grūdų (KSV/g), pasėjus ant bulvių dekstrozės agarą (BDA) terpės. Petri lėkštelės su paruoštais mėginiais inkubuotos termostate 25±2°C temperatūroje. Išaugusios grybų kolonijos vertintos po 7 parų.

Agarizuotų mitybinių terpių metodu pagal Mathur ir Kongsdal [259], *Fusarium* genties grybų infekcijos lygio nustatymui grūdai buvo išdėlioti Petri lėkštelėse ant BDA agarą terpės. Kiekvienoje lėkštelėje išdėliota po 10 sėklų, iš viso po 12 lėkštelių kiekvienam tyrimo variantui. Petri lėkštelės su analizuojamais grūdais buvo inkubuotos termostate 7 paras. *Fusarium* grybais pažeistų grūdų kiekis procentais įvertintas po 7 parų pagal morfologinius grybų ir konidijų požymius naudojant literatūroje pateiktus apibūdiniojus [259, 260, 261].

Rulonų metodas. Tam ant sudrėkinto filtrinio popieriaus juostos, 5–6 cm nuo viršutinio krašto, 1,5–2 cm atstumu viena nuo kitos išdėliota 50 vasarinių kviečių grūdų sėklų. Iš viršaus sėklos pridengtos drėgna 7–8 cm pločio filtrinio popieriaus juosta. Juostos su sėklomis susuktos į rulus, kurie galais pamerkti į atskirus stiklinius indus su vandeniu ir laikyti 15–18 °C temperatūroje 14 dienų [121, 262]. Pasibaigus inkubacijos periodui, rulonai išvynioti ir nustatytas sveikų ir įvairiais ligų sukėlėjais pažeistų, sudygusių ir nesudygusių sėklų procentas. Atskirai suskaičiuoti sveiki ir pašaknio ligomis pažeisti daigai bei šaknys. Pažeidimo intensyvumas įvertintas pagal 0–3 balų skalę, kur: 0 balų – augalai sveiki; 1 balas – augalai silpnai pažeisti, dėmės apima mažiau nei 50 % stiebo; 2 balai – augalai vidutiniškai pažeisti, dėmės apima daugiau nei 50 % stiebo, audiniai tvirti; 3 balai – augalai stipriai pažeisti, dėmės apima 100 % stiebo, audiniai supuvę. Pašaknio ligų intensyvumas apskaičiuotas pagal 2.2 formulę:

$$P = \frac{\sum(ab)}{NK} \times 100 \quad 2.2$$

čia: *P* – ligos intensyvumo indeksas, %; *ab* – pažeistų daigų arba stiebų skaičiaus ir atitinkamo skalės balo sandaugų suma; *N* – bendras sveikų ir pažeistų daigų arba stiebų skaičius pavyzdyje; *K* – didžiausias skalės balas.

Kiuvečių metodu pagal Dabkevičių ir bendraautorius [263] atlikti dinaminiai stebėjimai: kiekvieną dieną vertinant sėklų sudygimo procentą, daigų aukštį (mm) ir

šaknų ilgį (mm). Analizės eiga: kiuvetės prieš analizę užpildytos sudrėkintu smėliu, liniuote ar mentele nubraukiant smėlio likučius, kad jis būtų lygiai su smėliui skirtos ertmės kraštais. Ant jo viršaus prispaustas sudrėkintas juodas filtrinis popierius. Sėklos išdėliotos 0,5–1,0 cm atstumu nuo smėliu užpildytos ertmės viršaus, po 10 vienetų kiekvienoje kiuvetėje. Kiekvienam tyrimo variantui naudotos keturios kiuvetės (pakartojimai). Kiuvetės su sėklomis inkubuotos 25 °C temperatūroje tol, kol šaknelės pasiekė kiuvetės apačią (5–6 dienos).

2.2.10. Bioproduktų panaudojimas ir jų antimikrobinio poveikio vertinimas kepinuose

Atliekant PRB fermentuotų produktų veikimo prieš *B. subtilis* vertinimą, kvietinė duona ruošta naudojant 10, 15 ir 20 % *P. pentosaceus* KTU05-9 fermentuoto bioprodukto (65 % drėgnio) nuo miltų masės. Kontrolinis kvietinės duonos mėginys ruoštas tik su presuotomis mielėmis ir *B. subtilis* (teigiama kontrolė). *B. subtilis* sporų suspensija (10^4 sporų/g) pridėta pirmojo maišymo metu, kartu su visais receptūriniais komponentais. Receptūra ir kepimo parametrai pateikti 2.1.3. skyriuje. Iškepti kepiniai patalpinti į plastikinį maišelį ir laikyti 23 ir 30 °C temperatūroje šešias dienas. Nustatyta trukmė iki kepinų bulvinės ligos pirmųjų požymių.

Tiriant antigrybinį PRB efektą kvietinių kepinų paviršiui, atvėšę kepiniai apipurkšti šviežia PRB ląstelių suspensija ($\sim 5 \cdot 10^4$ KSV/cm²). Kontroliniai mėginiai apipurkšti nebuvo. Mėginiai saugoti 8 dienas 15–16 °C temperatūroje polietileniniuose maišuose. Mėginiai vertinti vizualiai: (-) ant paviršiaus nėra mikroskopinių grybų kolonijų; (+) mažos ir retos kolonijos; (++) plačios kolonijos.

2.2.11. Bakteriofagų išskyrimas ir gryninimas

Bakteriofagų paieška atlikta pagal Kopenhagos universitete (Danija), Gamtos mokslų fakultete, Maisto mokslo katedroje sudarytą schemą. Mėginiai bakteriofagų paieškai buvo paruošti homogenizavus 10 g raugo ir 10 ml buferio (5,8 g/l NaCl, 2 g/l MgSO₄·7H₂O, 50 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5) ir centrifugavus (10 min, 5000 g, 4 °C). Gauti raugų supernatantai steriliai filtruoti pro 0,45 μm membraninius celiuliozės filtrus. Bakteriofagų paieška atlikta dvisluoksnio agarų metodu pagal Clokie ir bendraautorius [264], atlikus keletą pakeitimų. Skysta mMRS terpė, papildyta 15 g/l agaru, naudota kaip apatinis sluoksnis, o kaip viršutinis sluoksnis naudota mMRS terpė, papildyta 4 g/l agarozės. Šviežiai padaugintos PRB ląstelės sumaišytos su ištirpinta agarozės terpe ir užlietos ant pirmojo mMRS agarų sluoksnio. Antrajam sluoksniui sustingus, dozuota po 3 μl paruoštų raugų supernatantų. Lėkštelės išlaikytos 22–48 val. kambario temperatūroje, o lėkštelės su PRB, išskirtomis iš lietuviško ruginio raugo GL, inkubuotos 37 °C temperatūroje. Išskirti bakteriofagai gryninti mažiausiai keturis kartus. Bakteriofagų gryninimas ir koncentravimas atliktas pagal Sambrook [265], su keletu pakeitimų. Bakteriofagai po dauginimo dideliame tūryje (500 ml terpės) koncentruoti, naudojant 1 M NaCl ir išlaikant 1 val. 4 °C temperatūroje. Supernatantai atskirti centrifugavus (8500 g, 10 min, 4 °C), nuosėdos pašalintos, o supernatantai papildyti 10 % polietilenoglikoliu 6000. Ištirpinus polietilenoglikolį, supernatantai išlaikyti per naktį 4 °C

temperatūroje, po to centrifuguota (12500 g, 15 min, 4 °C). Po centrifugavimo gautos nuosėdos ištirpintos buferyje (5,8 g/l NaCl, 2 g/l MgSO₄·7H₂O, 50 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5). Bakteriofagų gryninimas atliktas sudarius dviejų etapų CsCl koncentracijos gradientą. Tam bakteriofagų suspensija perpilta į ultracentrifuginius mėgintuvėlius (16x202 mm). Po to, naudojant Pastero pipetę, į mėgintuvėlio apačią supilti tirpalai šia tvarka: 2 ml 20 % sacharozės tirpalas, po 1 ml CsCl tirpalai: 1,3 g/ml; 1,5 g/ml ir 1,7 g/ml tankio. Mėginiai centrifuguoti 25000 g 5 val., 15 °C temperatūroje (Beckman Coulter Optima L-80 XP ultracentrifuga). Centrifugavimo metu bakteriofagai atskiriami pagal tankio skirtumus, nustatytas jų titras. Surinkti bakteriofagai naudoti antrame gryninimo CsCl koncentracijos gradientu etape. Mėginiai perpilti į ultracentrifuginius mėgintuvėlius (13x51 mm). Į mėgintuvėlio apačią naudojant Pastero pipetę įpiltas 2,5 ml 1,5 g/ml CsCl tirpalas. Kaip trečias sluoksniškas naudojamas 1,3 g/ml CsCl tirpalas. Mėginiai centrifuguoti 38000 g 18–22 val. 15 °C temperatūroje. Nustatytas sukonzentruotų ir išgrynintų bakteriofagų titras, išskirta jų DNR ir atliktas mikroskopavimas transmisiniu elektroniniu mikroskopu (FEI, Eindhoven, Olandija). Bakteriofagai fotografuoti Megaiiew G2 CCD fotoaparatu (Olympus SIS, Miunsteris, Vokietija).

Bakteriofagų DNR ekstrakcija atlikta klasikiniu metodu. 500 µl išgrynintos ir sukonzentruotos bakteriofago suspensijos sumaišyta su 20 µl 0,5 M etilendiaminotetraacto rūgšties, 1,25 µl (20 mg/ml) proteinazės K ir 25 µl 10 % natrio dodecilsulfato ir inkubuota 1 val. 56 °C temperatūroje. Susidaręs skaidrus lizatas ekstrahuotas fenolio, chloroformo, izoamilo alkoholiu ir vėl chloroformu. DNR išsodinta 3M natrio acetato (pH=7) ir lediniu 96 % etanolio tirpalu. Plauta 70 ir 96 % etanolio tirpalais, džiovinta ir suspenduota 100 µl išplovimo tirpale (Sigma GenElute™ Bacterial Genomic Kit).

2.2.12. Statistinis duomenų apdorojimas

Eksperimentai buvo kartoti 2-3 kartus, iš gautų rezultatų išvesti vidurkiai ir apskaičiuoti standartiniai nuokrypiai naudojant Excel programinę įrangą, be esminiai skirtumai įvertinti statistiniais metodais pagal Dunkano kriterijų ($p \leq 0,05$), naudojant STATISTICA 11 kompiuterinę programinę įrangą.

Agarozės gelio spektrai analizuoti BioNumerics 7.1 kompiuterine programa (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgija), apskaičiuojant Dice koeficientą. Sudarytos dendrogramos pagal nesvertinės poros grupės metodą, aritmetinių vidurkių klasterizacijos algoritmą (angl. unweighted pair group method with arithmetic averages clustering algorithm, UPGMA).

Grūdų pažeidimo patogeniniais grybais duomenų statistiniam įvertinimui naudotas Fišerio testas, palyginimas atliktas su kontroliniu variantu, skirtumų tarp vidurkių esmingumas nustatytas pagal mažiausią patikimumo skirtumo ribą (R), taikant 0,01 ir 0,05 tikimybės lygį, F_{fakt} ir P reikšmes [266].

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. IŠSKIRTŲ IŠ DUONOS RAUGŲ BAKTERIOCINUS GAMINANČIŲ PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ ANTIMIKROBINIS POVEIKIS

Fermentacijos metu PRB gamina įvairius junginius, kurie ne tik suteikia pageidautiną produkto skonį ar aromatą [267, 268], bet ir pasižymi antimikrobinio poveikiu įvairiems maisto gedimus ir ligas sukeliantiems mikroorganizmams [27, 61]. Dėl to ilgėja produkto vartojimo trukmė ir padidėja jo sauga. Plečiant PRB pritaikymo sritį maisto pramonėje bei ekologinėje žemdirbystėje, svarbu iširti jų antimikrobinį poveikį ir veikimo mechanizmą įvairiems grūdų ir maisto gedimą bei ligas sukeliantiems mikroorganizmams. Tam buvo tiriama: PRB ląstelių antimikrobinis poveikis; PRB metabolizmo produktų/supernatantų (MP) antimikrobinis poveikis; ir neutralizuotų iki pH verčių 6,5 metabolizmo produktų (NMP) antimikrobinis poveikis įvairiems mikroorganizmams, atkreipiant dėmesį į bakteriocinus panašių medžiagų susidarymą (BPM).

3.1.1. Pieno rūgšties bakterijų metabolizmo produktų antimikrobinis poveikis

Fermentacijos metu PRB gamina ir į terpę išskiria įvairius junginius, pasižyminčius antimikrobinio poveikiu kai kuriems mikroorganizmams. Vertinant iš raugų išskirtų PRB *L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 panaudojimo galimybes kitų maisto produktų gamyboje buvo tirtas jų metabolizmo produktų (supernatantų), susidariusių fermentacijos metu, poveikis įvairioms bakterijoms ir mikroskopiniams grybams.

PRB metabolizmo produktų (MP) antimikrobinis poveikis bakterijoms. Vertinant PRB MP antibakterinį aktyvumą nustatyta, kad PRB sintetinami MP efektyviai slopino įvairias patogenines bakterijas, išskirtas iš įvairių daržovių, grūdų, maisto produktų, vandens ir ligonių patologinės medžiagos.

PRB MP antimikrobinis poveikis bakterijoms pateiktas 3.1 lentelėje. PRB pasižymėjo baktericidiniu poveikiu prieš gramteigiamas *B. subtilis* ssp. *subtilis* ir *B. subtilis* ssp. *spizizenii* padermes (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje kito nuo 15,8±0,4 iki 22,5±0,6 mm) ir gramneigiamas bakterijas *Ps. gladioli* pv. *aliicola*, *Ps. cepacia*, *Ps. fluorescens* biovar. V, *Ps. marginalis*, *Ps. facilis*, *Ps. aureofaciens* biovar. III, *Ps. cichorii*, *Ps. fluorescens* biovar. III (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje buvo nuo 6,5±0,6 iki 22,5±0,6 mm). *Ps. pseudoalcaligenes* 11 buvo slopinama tik *P. pentosaceus* KTU05-9 ir KTU05-10 padermių gaminamų MP, tuo tarpu *Ps. fluorescens* biovar. I augimą slopino tik *P. pentosaceus* KTU05-10 padermė. *L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-9 ir KTU05-10 padermės efektyviai slopino *Ps. cepacia* 7.2 augimą (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje buvo nuo 15±0 iki 27,5±0,7 mm). 100 μl PRB MP antimikrobinis aktyvumas prieš *Ps. cepacia* ir *Ps. marginalis* padermes buvo 1,6–2,3 karto didesnis, lyginant su 10 μg streptomycinu, kuris slopino visas tirtas bakterijas, išskyrus *Listeria* genties, išskirtas iš ligonių patologinės medžiagos. Tuo tarpu 30 μg tetraciklinas slopino augimą 21 iš 28 tirtų bakterijų padermių. Vertinant PRB MP antimikrobinį poveikį

List. monocytogenes padermėms, kurios buvo išskirtos iš žuvies, ištirta, kad tik *P. acidilactici* slopino *List. monocytogenes* 1.1, o prieš *List. monocytogenes* 1.5 PRB MP antimikrobinis poveikis nepasirūmėjo. Vertinant PRB MP antimikrobinį poveikį *E. coli* 1.10, nustatyta, kad *P. acidilactici* ir *L. sakei* pasirūmėjo antimikrobinis poveikis. *E. coli* ATCC 25922 buvo slopinama *P. acidilactici*, *L. sakei* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 MP (slopinimo zonos skersmuo agarų terpėje buvo atitinkamai 8,3±0,5, 7,0±0 ir 8,8±0,5 mm). *S. typhimurium* ATCC 14028, išskirta iš gyvūninių audinių, buvo slopinama visų tirtų PRB MP. Testuotos PRB nepasirūmėjo antimikrobinis poveikis prieš *St. aureus* ATCC 25923, bet *P. acidilactici* pasirūmėjo antimikrobinis poveikis prieš *B. cereus* ATCC 10876.

PRB MP buvo antimikrobiškai aktyvūs prieš įvairias iš ligonių patologinės medžiagos išskirtas patogenines bakterijas (*E. coli*, *Ent. faecalis*, *St. aureus*, *B. macerans*, *S. enteritidis*, *Micrococcus* genties, *Y. enterocolitica*, *Listeria* genties, *Ps. aeruginosa*), sukeliančias maisto apsinuodijimus ir įvairias ligas, pavojingas žmogaus sveikatai. *P. acidilactici* pasirūmėjo baktericidiniu poveikiu visoms tyrimams naudotoms indikatorinėms bakterijoms (slopinimo zonos skersmuo agarų terpėje buvo nuo 10±0 iki 24,5±0,7 mm). Didžiausias PRB MP antimikrobinis poveikis pasireiškė *Micrococcus* genties bakterijoms (iki 25±0 mm). *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-9 pasirūmėjo baktericidiniu poveikiu *E. coli* augimui (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje buvo atitinkamai 14,5±0,7 ir 10,5±0,7 mm), o kitos PRB pasirūmėjo bakteriostatiniu poveikiu *E. coli* augimui. Baktericidiniu poveikiu *Ent. faecalis* augimui pasirūmėjo tik *P. acidilactici*, o bakteriostatiniu poveikiu pasirūmėjo *P. pentosaceus* KTU05-10 padermė.

100 µl *L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 padermių MP baktericidinis poveikis *St. aureus* augimui sudarė atitinkamai 82, 70, 85 ir 76 % 10 µg streptomicino poveikio, o lyginant su 30 µg tetraciklino poveikiu buvo atitinkamai 27, 9, 31 ir 18 % didesnis PRB antimikrobinis poveikis. 100 µl *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-9 ir *P. pentosaceus* KTU05-10 MP baktericidinis poveikis *S. enteritidis* prilygo 10 µg streptomicino poveikiui ir sudarė atitinkamai 45, 50 ir 45 % 30 µg tetraciklino antimikrobinio poveikio. 100 µl PRB MP efektyviai slopino *Ps. aeruginosa* (baktericidinis poveikis, lyginant su 30 µg tetraciklinu, buvo nuo 32 iki 41 % didesnis, o lyginant su 10 µg streptomycinu – 2 kartus didesnis).

Papildomai įvertintas PRB mišinių sinergetinis poveikis antimikrobiniam jų aktyvumui prieš patogeninius mikroorganizmus (3.2 lent.) Plačiausiu antimikrobinio poveikio spektru pasirūmėjo PRB mišinys, sudarytas iš *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 mikroorganizmų (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje buvo nuo 10±0 iki 22,5±3,5 mm). Kiti mišiniai efektyviai slopino indikatorinius mikroorganizmus, išskyrus *Ent. faecalis* bakteriją, kuri buvo slopinama tik *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 padermių mišinio MP. Nors *P. acidilactici* slopino *Ent. faecalis*, tačiau kultivuojant ją mišinyje su *L. sakei* ir visomis penkiomis PRB kartu, šis antimikrobinis poveikis nepasireiškė. Tai patvirtina, kad kultivuojant PRB mišiniuose gali susidaryti kiti junginiai arba būti išskiriamos kitos jų koncentracijos. Naudojant sudarytus PRB mišinius PRB MP sinergetinis antimikrobinis poveikis indikatorinėms bakterijoms nepasireiškė.

3.1 lentelė. Antimikrobinis PRB MP (100 µl) poveikis prieš gram-/+ bakterijas

Indikatorinis mikroorganizmas	Slopinimo zonų skersmuo agaro terpėje, mm						Streptomicinas 10 µg	Tetraciklinas 30 µg
	<i>L. sakei</i> KTU05-6	<i>P. acidilactici</i> KTU05-7	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-8	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-9	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-10			
Iš maisto produktų ir vandens išskirtos padermės								
			Gramteigiamos					
<i>B. thuringiensis</i> 1.1	14,2±0,4	17,3±0,5	14,7±0,5	17,2±0,4	15,7±0,5	18,7±0,5	–	
<i>B. subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>	17,5±0,6	18,8±0,5	21,5±0,6	21,5±0,6	22,5±0,6	15,5±0,5	8,2±0,4	
<i>B. subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i>	15,8±0,4	16,5±0,6	18,5±0,6	18,5±0,6	18,5±0,6	15,3±0,6	14,7±0,6	
<i>List. monocytogenes</i> 1.1	–	17±0	–	–	–	18±0	36±0	
<i>List. monocytogenes</i> 1.5	–	–	–	–	–	17±0	35±0	
			Gramneigiamos					
<i>Ps. gladioli</i> pv. <i>aliicola</i> 3.1	16±0	15,3±0,5	14,3±0,5	14,5±0,5	16,5±0,5	17,3±1,0	7,5±0,6	
<i>Ps. cepacia</i> 1.1	17±0	14,2±0,4	14,7±0,8	15,5±0,5	15,0±0,6	7,5±0,6	–	
<i>Ps. fluorescens</i> biovar. V3.3	14,5±0,5	14,8±1,0	15,2±0,4	14,7±0,5	14,0±0	21,0±1,2	–	
<i>Ps. marginalis</i> 3.5	17,5±0,5	12,8±0,4	15,8±0,8	13,0±0,9	12,2±0,4	7,5±0,7	–	
<i>Ps. fluorescens</i> biovar. V1.2	10,2±0,4	12,2±0,4	13,7±0,5	9,8±0,4	10,3±0,5	12,5±0,6	–	
<i>P. facilis</i> 4.1	13±0	13,2±0,4	12,5±0,5	11,7±0,5	13,3±0,5	17,8±1,7	8,0±0	
<i>Ps. aureofaciens</i> biovar. III2.4.1	14,2±1,0	14,8±0,8	13,8±0,4	16,0±0,6	17,0±0,6	30,0±0,8	11,5±0,6	
<i>Ps. marginalis</i> 4.2	8,7±0,5	11,5±0,5	10,2±0,4	8±0	10,5±0,5	22,7±2,9	10,7±1,9	
<i>Ps. cichorii</i> 7.3.1	12,2±0,4	11,5±0,5	9,2±0,4	12,3±0,5	12,2±0,8	15,8±1,0	–	
<i>Ps. fluorescens</i> biovar III2.1.1.1	12,3±0,5	14,5±0,5	12,7±0,5	16,7±0,5	13,0±0,6	17,8±2,4	–	
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i> 11	–	–	–	11±0	24,0±0,7	21±0	31±0,7	
<i>Ps. cepacia</i> 7.2	15,3±0,5	15±0	–	27±0	27,5±0,7	19±0	30±0	
<i>Ps. fluorescens</i> biovar. I	–	–	–	–	12±0	22±0	35±0	
<i>E. coli</i> 1.10	13±0	14,3±0,6	–	–	–	17±0	16,5±0,7	
ATCC kolekcijos padermės								
			Gramteigiamos					
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	–	9,5±0,6	–	–	–	17,3±1,0	n	
<i>St. aureus</i> ATCC 25923	–	–	–	–	–	20±0	n	
			Gramneigiamos					
<i>E. coli</i> ATCC25922	7±0	8,3±0,5	–	–	8,8±0,5	18,0±0,8	n	
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	8,5±0,6	7,8±0,5	9,5±0,6	8±0,8	6,5±0,6	11,5±0,6	n	

n – netirta; – – poveikis nepasireiškė; antimikrobinis poveikis pateiktas įskaitant šulinėlio ir antibiotikų diskelio diametrus (6 mm)

3.1 lentelė (tęsinys). Antimikrobinis PRB MP (100 µl) poveikis prieš gram-/+ bakterijas

Indikatorinis mikroorganizmas	Slopinimo zonų skersmuo agaro terpėje, mm						Streptomicinas 10 µg	Tetraciklinas 30 µg	
	<i>L. sakei</i> KTU05-6	<i>P. acidilactici</i> KTU05-7	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-8	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-9	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-10				
Iš ligonių pataloginės medžiagos išskirtos padermės			Gramteigiamos						
<i>Micrococcus</i> genties	19±1,4	24,5±0,7	23,5±3,5	22±5,7	25±0		18	30	
<i>Ent. faecalis</i>	–	13±1,4	–	–	11±1,4*		10*	29*	
<i>St. aureus</i>	14±0	12±0	14,5±2,1	13±0,7	14,5±0,7*		17	11	
<i>B. macerans</i>	14,5±0,7	13±0	14,5±0,7	13,5±0,7	12±0*		18*	22	
<i>Listeria</i> genties	10±0*	13±1,4	12,5±0,7	15±1,4	10±1,4		–	26	
			Gramneigiamos						
<i>Ps. aeruginosa</i>	14,5±0,7	15±0	15,5±0,7	15±2,8	15±2,8		7	11	
<i>Y. enterocolitica</i>	14,5±0,7	13,5±0,7	13,5±0,7	15±1,4	14±0		12	19	
<i>S. enteritidis</i>	14±0*	10±0	–	10±0	11±1,4		10	20	
<i>E. coli</i>	10,5±0,7*	14,5±0,7	11±0*	10,5±0,7	14,5±0,7*		13	17	

* bakteriostatinis poveikis; n – netirta; – - poveikis nepasireiškė; antimikrobinis poveikis pateiktas įskaitant šulinėlio ir antibiotikų diskelio diametrus (6 mm)

3.2 lentelė. Antimikrobinis PRB mišinių MP (100 µl) poveikis prieš gram-/+ bakterijas

Indikatorinis mikroorganizmas	Slopinimo zonų skersmuo agaro terpėje, mm			
	<i>L. sakei</i> ir <i>P. acidilactici</i>	<i>L. sakei</i> , <i>P. acidilactici</i> ir <i>P. pentosaceus</i> KTU05-10	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10	<i>L. sakei</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10
Gramteigiamos				
<i>Micrococcus</i> genties	25,5±0,7	22,5±3,5	24,5±0,7	27,5±2,1
<i>Ent. faecalis</i>	–	12,5±0,7	–	–
<i>St. aureus</i>	15±0	15±1,4	12±0	15±1,4
<i>B. macerans</i>	11,5±0,7	11,5±0,7	11±1,4	10±0
<i>Listeria</i> genties	13±1,4	13,5±0,7	12±0	12,5±0,7
Gramneigiamos				
<i>Ps. aeruginosa</i>	15,5±0,7	14,5±2,1	16±1,4	19±0
<i>Y. enterocolitica</i>	14±2,8	17,5±0,7	16,5±0,7	18±0
<i>S. enteritidis</i>	10,5±0,7	10±0	11±1,4	10,5±2,1
<i>E. coli</i>	10±0	11,5±0,7	10±0	10,5±0,7

– - antimikrobinis poveikis nepasireiškė; antimikrobinis poveikis pateiktas įskaitant šulinėlio diametrą (6 mm)

PRB MP *antigrybinis poveikis.* PRB MP poveikis mikroskopiniams grybams pateiktas 3.3 lentelėje. Papildomai atliki antigrybinių preparatų (50 µg itrakonazolio, 100 AV nistatino ir 1 µg flucitozino) tyrimai. Stipriausiu antigrybiniu poveikiu pasižymėjo nistatinas, kurio poveikis priklausė nuo indikatorinio mikroorganizmo rūšies, o flucitozinas fungicidiniu poveikiu pasižymėjo tik prieš *Penic. expansum*.

PRB MP antigrybinis poveikis priklausė nuo padermės ir indikatorinio mikroorganizmo. Visų tirtų PRB MP pasižymėjo fungicidiniu poveikiu prieš *F. culmorum* I ir II (slopinimo zonos skersmuo agarą terpėje sudarė nuo 9,0±0,8 iki 13,5±1,4 mm). Didžiausiu fungicidiniu poveikiu prieš *F. culmorum* I pasižymėjo *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 MP (slopinimo zonos skersmuo agarą terpėje buvo po 12,0±0,8 mm) ir sudarė 67 % nistatino antimikrobinio poveikio. PRB rūšis neturėjo reikšmingos įtakos MP antigrybiniam poveikiui prieš *F. culmorum* II. Išlaikius lėkšteles su pasėliais 10 parų, fungicidinis PRB MP poveikis *F. culmorum* išliko.

Kiti mokslininkai, tyrinėdami PRB, išskirtų iš duonos raugų, antimikrobinį poveikį mikroskopiniams grybams taip pat gavo teigiamus rezultatus. Lavermicocca ir bendraautorių [56] tyrimai pademonstravo, kad *L. plantarum* 21B, auginta viso grūdo dalių kvietinių miltų terpėje, sintetino fenilpieno ir 4-hidroksi-fenilpieno rūgštis, kurios slopino mikroskopinių grybų, priklausančių *Eurotium*, *Penicillium*, *Fusarium* gentims, augimą. Hassan ir Bullerman [269] tyrinėta *L. paracasei* ssp. *tolerans*, išskirta iš duonos raugų, slopino *F. proliferatum* M 5689, M 5991 ir *F. graminearum* R 4053, tačiau nepasižymėjo antimikrobinio poveikiu prieš *A. niger*. Tuo tarpu iš lietuviškų spontaninių duonos raugų išskirtos PRB *L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* slopino *A. niger* augimą ir sporų susidarymą. PRB padermių antimikrobinio aktyvumo skirtumai gali būti paaiškinami dėl skirtingų fermentacijos metu susidariusių produktų ir jų koncentracijų.

L. sakei, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-8 padermių gaminami MP pasižymėjo fungicidiniu poveikiu *F. poae* (slopinimo zonos skersmuo agarą terpėje buvo atitinkamai 9,3±1,0, 10,0±0,8 ir 9,0±0,8 mm), o *P. pentosaceus* KTU05-9 ir KTU05-10 padermių MP pasižymėjo fungistatininiu poveikiu prieš šį mikroskopinį grybą. 100 µl *P. acidilactici* MP fungicidinis poveikis *F. poae* augimui sudarė 74 % nistatino (100 AV) poveikio.

P. acidilactici MP pasižymėjo fungicidiniu poveikiu prieš *F. solani* (slopinimo zonos skersmuo agarą terpėje buvo 9,0±0,8 mm), o kitų PRB padermių MP pasižymėjo fungistatininiu poveikiu. Mandal su bendraautoriais [57] taip pat tyrinėjo *P. acidilactici* antimikrobinį poveikį mikroskopiniams grybams. Jie nustatė, kad *P. acidilactici* LAB5 gamina fenolinius junginius, pasižyminčius plačiu antimikrobinio poveikio spektru prieš mikroskopinius grybus. Be fenolinių junginių dauguma PRB aerobinėmis sąlygomis gamina vandenilio peroksidą [270], pasižymintį antimikrobinio poveikiu. Ponts su bendraautoriais [271] paskelbė, kad *F. graminearum* sporų dygimas galėjo būti slopinamas būtent vandenilio peroksido. Tačiau literatūroje yra duomenų, kad grybai augimo metu gali suskaldyti vandenilio peroksidą. Gild ir Mayer [272] nustatė, kad *Botrytis cinerea* gali greitai suskaldyti vandenilio peroksidą, ir dėl to gali pasireikšti tik fungistatinis, o ne fungicidinis poveikis. Mikroskopiniai grybai augimo metu galėjo suskaldyti tirtų PRB *L. sakei*,

P. acidilactici ir *P. pentosaceus* MP tam tikrus junginius, pasižymėjusius antimikrobinio poveikiu. Dėl to galėjo pasireikšti PRB *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermių MP fungistatinis (bet ne fungicidinis) poveikis *A. versicolor*, *Penic. chrysogenum*, *F. avenaceum*, *Penic. expansum* ir *A. niger* mikroskopiniams grybams.

Visų tirtų PRB MP nepasižymėjo nei fungistatinio, nei fungicidinio poveikiu *Penic. verrucosum*, *Alt. alternata*, *Penic. cyclopium* ir *A. terreus* mikroskopinių grybų augimui.

Vertinant PRB MP antimikrobinį poveikį įvairių genčių mielėms (3.4 lent.), nustatyta, kad *P. pentosaceus* KTU05-9 pasižymėjo fungistatinio poveikiu *C. pelliculosa* mielių augimui (slopinimo zonos skersmuo agarą terpėje buvo $11,5 \pm 1,3$ mm), o *L. sakei*, *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-10 padermių MP pasižymėjo fungistatinio poveikiu *Pi. farinosa* augimui (slopinimo zonų skersmuo agarą terpėje buvo atitinkamai $11,3 \pm 1$, $10,0 \pm 0,8$ ir $11,0 \pm 0,8$ mm). Be to, nustatytas *L. sakei* fungistatinis poveikis *Pi. membranifaciens* mielėms (slopinimo zonos skersmuo agarą terpėje buvo $10,0 \pm 0$ mm). Iš antigrybinių preparatų aktyviausias buvo nistatinas, kuris pasižymėjo fungicidiniu poveikiu prieš visas testuotas mieles. PRB MP nebuvo antimikrobiškai aktyvūs prieš *Aure. pullulans*, *C. kruisii*, *D. vanrijiae*, *G. fermentans*, *K. lodderae*, *Pi. fermentans*, *R. rubra* ir *Sc. cerevisiae* mieles. Tyrimų rezultatai parodė, kad PRB MP buvo labiau aktyvūs prieš pelėsinis grybus, nei prieš mieles. Magnusson ir Schnürer [274] taip pat nustatė, kad iš siloso išskirtos *L. coryniformis* antimikrobinis poveikis prieš mieles buvo gerokai mažesnis ir siauresnio veikimo spektro, nei prieš įvairius pelėsinis grybus.

Vertinant sudarytus PRB mišinius sinergetinis antimikrobinis PRB MP poveikis prieš mikroskopinius grybus pasireiškė vieninteliu atveju ir tik prieš indikatorinį mikroorganizmą *Alt. alternata*. Nustatyta, kad PRB mišinio (sudaryto iš *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermių) MP pasižymėjo fungistatinio poveikiu *Alt. alternata* augimui (slopinimo zonos skersmuo agarą terpėje buvo $10,0 \pm 1,4$ mm), o pavienės PRB nepasižymėjo antigrybiniu poveikiu prieš šį mikroorganizmą. Antigrybinis PRB mišinių MP poveikis prieš mikroskopinius grybus pateiktas I priedo 1 lentelėje. PRB padermių antimikrobinio aktyvumo skirtumai prieš įvairius mikroorganizmus gali pasireikšti dėl skirtingų fermentacijos metu susidariusių produktų ir jų koncentracijų.

Tyrimų rezultatai įrodė PRB (*L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10) MP antimikrobinį aktyvumą ir platų jų veikimo spektrą tiek prieš bakterijas, tiek prieš mikroskopinius grybus. Ir patvirtino šių PRB panaudojimo tinkamumą, ne tik duonos raugų, bet ir kitų maisto produktų gamyboje, ypač ekologinėje žemdirbystėje grūdų sėklos biologinės taršos mažinimui, kur dideles problemas sukelia *Fusarium* genties grybai.

3.3 lentelė. PRB MP (100 µl) ir antigrybinių preparatų antigrybinis poveikis

Indikatorinis mikroorganizmas	Slopinimo zonų skersmuo agaro terpėje, mm						Nistatinas, 100 AV	Flucitozinas, 1 µg	Itrakonazolis, 50 µg
	<i>L. sakei</i> KTU05-6	<i>P. acidilactici</i> KTU05-7	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-8	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-9	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-10				
<i>Penic. verrucosum</i>	–	–	–	–	–	6,5±0,7	–	–	
<i>F. culmorum</i> I	9,5±1,3	12,0±0,8	9,5±0,6	9,0±0,8	12,0±0,8	18,0±0	–	–	
<i>F. culmorum</i> II	13,5±1,4	12,9±2,1	12,3±0,6	13,4±2,4	11,9±2,1	19,4±0,7	–	–	
<i>A. versicolor</i>	8,8±1,0*	7,5±0,6*	9,0±0,8*	8,5±0,6*	8,5±0,6*	19,5±0,7	–	7,0±0	
<i>F. poae</i>	9,3±1,0	10,0±0,8	9,5±0,6	14,3±1,0*	13,5±1,3*	13,5±2,1	–	9,5±0	
<i>Penic. chrysogenum</i>	13,5±1,3*	19,5±1,0*	20,0±1,8*	19,8±1,3*	21,0±1,2*	31,0±1,4	–	7,5±0,7	
<i>Alt. alternata</i>	–	–	–	–	–	18,0±0	–	–	
<i>Penic. cyclopium</i>	–	–	–	–	–	19,5±0,7	–	7,0±0	
<i>F. avenaceum</i>	11,8±0,5*	12,5±0,6*	12,3±0,5*	13,0±0,8*	14,5±0,6*	27,0±0	–	–	
<i>F. solani</i>	13,8±0,5*	9,0±0,8	13,8±1,0*	16,0±1,4*	14,5±3,5*	14,5±0,7	–	13,5±0	
<i>A. terreus</i>	–	–	–	–	–	11,0±1,4	–	–	
<i>Penic. expansum</i>	7,5±0,6*	13,0±0,8*	6,5±0,6*	7,0±0,0*	7,8±0,5*	29,5±0,7	–	11,5±0,7	
<i>A. niger</i>	14,8±1,3*	11,0±1,8*	10,8±1,0*	8,3±1,0*	11,0±1,2*	16,3±0,4	–	–	
<i>Rh. stolonifer</i> 2-KA	–	–	–	–	–	–	–	–	
<i>Penic. expansum</i> 23L	+	+	+	+	–	18±1,9	6,5±0,5	–	
<i>A. niger</i> MD-029	+	+	+	+	+	21±1	–	–	
<i>A. versicolor</i> MI-130	+	–	+	+	–	21±0,5	–	8±0	
<i>A. fumigatus</i> KO-5	–	–	+	–	+	15±0,5	–	9±0,5	
<i>Penic. chrysogenum</i> 48-L	–	+	+	+	+	21±0,5	–	8±0	
<i>Alt. alternata</i> 1-4U	–	–	–	–	–	33±0,5	–	9±0,5	
<i>Penic. cyclopium</i> 21AL	–	–	–	–	–	29±0,5	–	8±0,5	
<i>A. terreus</i> S-1	–	–	–	–	–	11±0,5	–	11±0	
<i>F. culmorum</i> L-2	+++	+++	+++	+++	+++	21±0,5	–	–	
<i>F. solani</i> 4-SA	–	–	–	–	–	14±0,5	–	–	

* fungistatinis poveikis; antimikrobinis poveikis įskaitant šulinėlio diametrą 6 mm;

(–) poveikiu nepasizymėjo, (+) fungistatinis poveikis, (++) fungistatinis poveikis ir silpnas fungicidinis poveikis, (+++) fungicidinis poveikis.

3.4 lentelė. PRB MP (100 µl) ir antigrybinių preparatų antimikrobinis poveikis prieš mieles

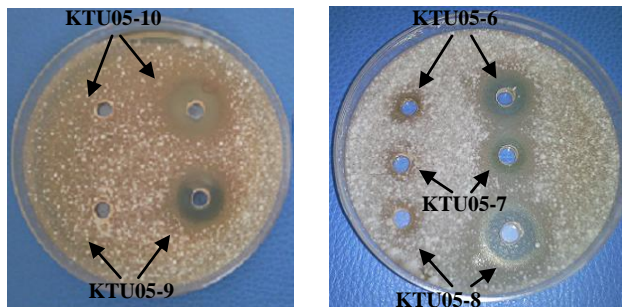
Mielės	Slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje, mm					Itrakonazolis, 50 µg	Nistatinas, 100 AV	Flucitozinas, 1 µg
	<i>L. sakei</i> KTU05-6	<i>P. acidilactici</i> KTU05-7	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-8	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-9	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-10			
<i>Aure. pullulans</i>	–	–	–	–	–	15±0	35±0	–
<i>C. kruisii</i>	–	–	–	–	–	13,5±0,7	26±1,4	–
<i>C. pelliculosa</i>	–	–	–	11,5±1,3*	–	11,5±0,7	25,5±0,7	–
<i>D. vanriijiae</i>	–	–	–	–	–	7,5±0,7	15,5±0,7	–
<i>G. fermentans</i>	–	–	–	–	–	–	20±0	–
<i>K. lodderae</i>	–	–	–	–	–	10±0*	23±0	15±0*
<i>K. marxianus</i>	–	–	–	–	–	8,5±0,7	22,5±0,7	13,5±0,7
<i>Pi. farinosa</i>	11,3±1*	–	10,0±0,8*	–	11,0±0,8*	9,5±0,7	25,5±0,7	–
<i>Pi. fermentans</i>	–	–	–	–	–	6,5±0,7	29±1,4	–
<i>Pi. membranifaciens</i>	10±0*	–	–	–	–	–	30±0	–
<i>R. rubra</i>	–	–	–	–	–	–	30,5±0,7	–
<i>Sc. cerevisiae</i>	–	–	–	–	–	8±1,4	32,5±0,7	–
<i>Pi. burtonii</i> P.3	–	–	–	–	–	–	15,5±0,5	–
<i>Sach. capsularis</i> S.1	–	–	–	–	–	–	33,3±0,8	–
<i>Z. bailii</i> Z.1(T)	–	–	–	–	–	–	22,±2,5	–
<i>K. marxianus</i> K.7.1(T)	–	–	–	–	–	13±0,5	22±0,5	–
<i>Sc. cerevisiae</i> Sa.1.5(T)	–	–	–	–	–	8,7±0,7	30,0±0	–
<i>C. parapsilosis</i> C.7.2	12,0±0,8*	–	11,0±0*	10,4±0,8*	–	19±0,5	25±0,4	–
<i>Y. lipolytica</i> Y.C.6.1	–	–	–	–	–	–	28±1	–
<i>D. hansenii</i> Deb.4(T)	8,0±0*	–	–	–	8,5±0*	10±0	19±0	–

* fungistatinis poveikis; antimikrobinis poveikis įskaitant šulinėlio diametrą 6 mm;

– antimikrobinio poveikio nepasirūmėjo.

3.1.2. Pieno rūgšties bakterijų gaminamų į bakteriocinus panašių medžiagų antimikrobinis poveikis

Be organinių rūgščių, kai kurios PRB gamina baltyminius mažos molekulinės masės antimikrobinio aktyvumu pasižyminčius junginius, pvz., ciklinius dipeptidus, bakteriocinus ar į bakteriocinus panašias medžiagas [47, 50, 51]. Siekiant eliminuoti susidariusių rūgščių poveikį ir įvertinti į bakteriocinus panašių medžiagų antibakterinį aktyvumą, PRB MP buvo neutralizuoti iki pH 6,5. Baltyminės kilmės antimikrobinio komponentų – bakteriocinų patvirtinimui buvo atliktas testas su proteolitiniais fermentais patvirtino, kad PRB gaminami antibakteriniai junginiai yra jautrūs šiems proteolitiniais fermentams. Pvz., PRB gaminamų BPM antimikrobinis poveikis prieš *B. subtilis* sudarė nuo $15,8\pm 0,4$ iki 20 ± 0 mm skersmens skaidrias mikroorganizmų augimo slopinimo zonas, o paveikus proteinaze K, BPM antimikrobinis poveikis nepasireiškė (3.1 pav.). Tai įrodo, kad tirtos medžiagos yra baltyminės prigimties, kas būdinga bakteriocinams. Be to, palyginamasis kontrolinis antimikrobinio aktyvumo testas buvo atliktas su pagrindiniais PRB metabolizmo produktais – acto, pieno, gintaro, benzenkarboksirūgšties tirpalais ir neutralizuotais iki pH verčių 6,5 tirpalais. Tyrimų rezultatai parodė, kad acto, pieno, gintaro rūgštys ir benzenkarboksirūgštis pasižymėjo antibakteriniu poveikiu, o jas neutralizavus antimikrobinis poveikis nepasireiškė (I priedo 2 lentelė).



3.1 pav. PRB gaminamų BPM (Petri lėkštelių dešinėje) ir paveiktų proteinaze (Petri lėkštelių kairėje) antimikrobinis poveikis *B. subtilis* ssp. *subtilis* sporoms

Nustatyta, kad *L. sakei* gaminamos BPM yra plataus veikimo spektro ir slopina tiek gramteigiamas, tiek gramneigiamas bakterijas, o *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 gaminamos BPM yra siauro veikimo spektro ir antimikrobinio poveikiu pasižymėjo tik prieš gramteigiamas bakterijas (3.5 lent.). *L. sakei* BPM slopino abi *B. subtilis* padermes: *B. subtilis* ssp. *subtilis* ir *B. subtilis* ssp. *spizizenii* (slopinimo zonos skersmuisi agarą terpėje buvo atitinkamai $15,8\pm 0,4$ ir $13,5\pm 0,5$ mm). 8 iš 14 *Pseudomonas* genties bakterijos buvo slopinamos *L. sakei* gaminamų BPM (slopinimo zonos skersmuisi agarą terpėje buvo nuo 7 ± 0 iki $13,5\pm 0,5$ mm), tarp jų *Ps. aeruginosa*, sukelianti infekcijas. Be to, *L. sakei* BPM slopino *E. coli*, išskirtą iš ligonių patologinės medžiagos (slopinimo zonos skersmuisi agarą terpėje buvo 7 ± 0 mm). *L. sakei* MP ir BPM antimikrobinis poveikis prieš *Ps. gladioli* pv. *aliicola* 3.1, *Ps. fluorescens* biovar. V 3.3 ir *B. thuringiensis* pateiktas 3.2 paveiksle.

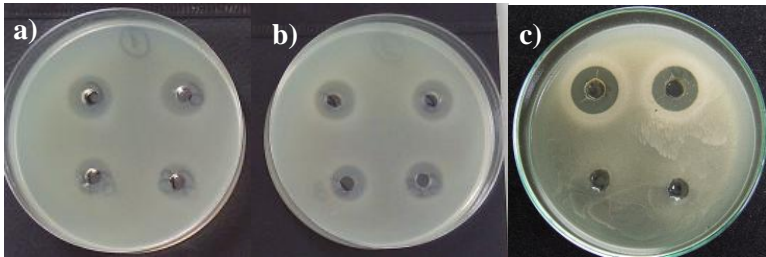
3.5 lentelė. Antimikrobinis PRB BPM (100 µl) poveikis gram +/- bakterijoms

Indikatorinis mikroorganizmas	Augimo slopinimo zonos skersmuo agarų terpėje, mm				
	<i>L. sakei</i> KTU05-6	<i>P. acidilactici</i> KTU05-7	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-8	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-9	KTU05-10
Iš maisto produktų ir vandens išskirtos padermės					
Gramteigiamos					
<i>B. thuringiensis</i> 1.1	–	–	–	–	–
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	15,8±0,4	17,5±0,6	19,3±0,5	19,5±0,6	20±0
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> **	15,4±0,5	16,3±0,4	18,1±0,6	18,5±0,5	19,5±0,5
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	13,5±0,5	13,8±0,5	14±0	16,2±0,5	16,3±0,5
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> **	12,8±0,4	13,1±0,5	13,2±0,4	15,4±0,4	15,3±0,4
<i>List. monocytogenes</i> 1.1	–	–	–	–	–
<i>List. monocytogenes</i> 1.5	–	–	–	–	–
Gramneigiamos					
<i>Ps. gladioli</i> pv. <i>aliicola</i> 3.1	12,5±0,5	–	–	–	–
<i>Ps. cepacia</i> 1.1	7,3±0,5	–	–	–	–
<i>Ps. fluorescens</i> biovar. V3.3	13±0	–	–	–	10±0
<i>Ps. marginalis</i> 3.5	13,2±0,8	–	–	–	–
<i>Ps. fluorescens</i> biovar. V1.2	–	–	–	–	–
<i>Ps. facilis</i> 4.1	7,3±0,5	–	–	–	–
<i>Ps. aureofaciens</i> biovar. III	13,5±0,5	–	–	–	–
<i>Ps. marginalis</i> 4.2	–	–	–	–	–
<i>Ps. cichorii</i> 7.3.1	10,2±0,4	–	–	–	–
<i>Ps. fluorescens</i> biovar. III	–	–	–	–	–
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i> 11	–	–	–	–	–
<i>Ps. cepacia</i> 7.2	–	–	–	–	–
<i>Ps. fluorescens</i> biovar. I	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i> 1.10	–	–	–	–	–
ATCC kolekcijos padermės					
Gramneigiamos					
<i>E. coli</i> ATCC25922	–	–	–	–	–
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	–	–	–	–	–
Gramteigiamos					
<i>St. aureus</i> ATCC 25923	–	–	–	–	–
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	–	–	–	–	–
Iš Santariškių klinikų gautos padermės					
Gramteigiamos					
<i>Micrococcus</i> genties	–	–	–	–	–
<i>Ent. faecalis</i>	–	–	–	–	–
<i>St. aureus</i>	–	–	–	–	–
<i>Listeria</i> genties	–	–	8±0*	–	–
<i>B. macerans</i>	–	–	–	–	–
Gramneigiamos					
<i>Ps. aeruginosa</i>	7±0*	–	–	–	–
<i>Y. enterocolitica</i>	–	–	–	–	–
<i>S. enteritidis</i>	–	–	–	–	7,5±0,4*
<i>E. coli</i>	9±0	–	–	–	12,5±0,4*

* bakteriostatinis poveikis; – antimikrobinio poveikio nepasirūmėjo; antimikrobinis poveikis įskaitant 6 mm šulinėlio diametrą; ** antimikrobinis poveikis prieš bakterijų sporas

P. pentosaceus KTU05-10 sintetinės BPM slopinimo zonos skersmuo agarų terpėje buvo nuo 16,3±0,5 iki 20±0 mm), bet ir gramneigiamas *P. fluorescens* biovar. V3.3, *E. coli* ir *S. enteritidis*

bakterijas (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje buvo atitinkamai $10,0 \pm 0$, $12,5 \pm 0,4$ ir $7,5 \pm 0,4$ mm). Visų tirtų PRB sintetinės BPM pasižymėjo baktericidiniu poveikiu ne tik prieš *B. subtilis* ląsteles, bet ir jų sporas (slopinimo zonos skersmuo agarų terpėje buvo nuo $12,8 \pm 0,4$ iki $19,5 \pm 0,5$ mm).



3.2 pav. Antimikrobinis *L. sakei* MP (viršuje) ir BPM (apačioje) poveikis bakterijoms: a – *Ps. gladioli pv. aliicola* 3.1; b – *Ps. fluorescens* biovar. V 3.3; c – *B. thuringiensis*

L. sakei BPM pasižymėjo baktericidiniu poveikiu prieš *E. coli* ir bakteriostatininiu poveikiu prieš *Ps. aeruginosa*, tačiau PRB mišinių NMP, kurių sudėtyje buvo *L. sakei*, antimikrobinis poveikis prieš šiuos mikroorganizmus nepasireiškė. Tai patvirtina skirtingų junginių ir ar jų koncentracijų susidarymą fermentuojant PRB mišiniuose. *P. pentosaceus* KTU05-8 BPM pasižymėjo bakteriostatininiu poveikiu prieš *Listeria* genties bakteriją, o dauginant *P. pentosaceus* KTU05-8 mišiniuose kartu su *P. pentosaceus* KTU05-9 ir KTU05-10 padermėmis nustatytas baktericidinis poveikis prieš šią padermę (baktericidinio poveikio skersmuo agarų terpėje buvo 10 ± 0 mm).

Nustatytas bakteriostatinis *P. pentosaceus* KTU05-10 padermės poveikis *E. coli* ir *S. enteritidis* augimui, tačiau kultivuojant *P. pentosaceus* KTU05-10 mišiniuose kartu su kitomis PRB padermėmis antimikrobinis BPM poveikis prieš *S. enteritidis* išliko tik dauginant kartu su *L. sakei* ir *P. acidilactici*, o prieš *E. coli* nepasireiškė. Tačiau, dauginant PRB *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermes kartu, nustatytas baktericidinis poveikis prieš *Listeria* genties bakteriją, išskirtą iš ligonių pataloginės medžiagos, prieš kurią grynų PRB BPM antimikrobinis poveikiu nepasireiškė.

Tyrimų rezultatai parodė, kad iš ruginių duonos raugų išskirtos PRB *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* gamina BPM, kurių antimikrobinis poveikis priklauso nuo PRB rūšies: *L. sakei* ir *P. pentosaceus* gaminamos BPM slopina tiek gramteigiamas, tiek gramneigiamas bakterijas, o *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 padermių sintetinės BPM slopina tik gramteigiamas bakterijas. Antimikrobinio aktyvumo tyrimų rezultatai patvirtina, kad fermentuojant PRB mišinius susidaro skirtingu aktyvumu ir platesnio poveikio spektru pasižymintys antimikrobiniai junginiai.

3.1.3. Pieno rūgšties bakterijų neutralizuotų metabolizmo produktų antigrybinis poveikis

Vertinant PRB NMP antigrybinį poveikį (3.6 lent.), nustatyta, kad visų penkių tyrimams naudotų PRB NMP pasižymėjo fungicidiniu poveikiu *F. culmorum* augimui (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje buvo nuo $7,5 \pm 0,6$ iki $12,3 \pm 0,6$

mm), o NMP poveikis prieš *F. poae*, *Penic. chrysogenum*, *F. avenaceum*, *F. solani* ir *A. niger* mikroskopinius grybus nustatytas fungistatinis. *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-9 pasižymėjo fungistatinium poveikiu prieš *Penic. expansum*, o dviejų *P. pentosaceus* KTU05-9 ir KTU05-10 padermių NMP antimikrobinium poveikiu prieš šį mikroskopinį grybą nepasižymėjo. NMP nepasižymėjo nei fungicidiniu, nei fungistatinium poveikiu prieš *Penic. verrucosum*, *A. versicolor*, *Alt. alternata*, *A. terreus*. Paveikus proteazėmis, PRB ir jų mišinių NMP antigrybinis poveikis *Fusarium* genties grybams išliko, tai rodo, kad PRB NMP antimikrobiškai aktyvūs prieš *Fusarium* ir *Penicillium* genties grybus nėra baltyminės prigimties ir negali būti priskirti bakteriocinams ar BPM. Visiškai kitokie rezultatai gauti vertinant PRB NMP antimikrobinį poveikį prieš *A. niger*, t.y. proteazėmis paveiktų PRB NMP antimikrobinis poveikis nepasireiškė. Tai patvirtina, kad antimikrobinis poveikis prieš *A. niger* buvo sąlygotas baltyminės prigimties medžiagų.

3.6 lentelė. PRB NMP (100 µl) antigrybinis poveikis

Indikatorinis mikroorganizmas	Augimo slopinimo zonos skersmuo, mm				
	<i>L. sakei</i> KTU05-6	<i>P. acidilactici</i> KTU05-7	KTU05-8	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-9	KTU05-10
<i>Penic. verrucosum</i>	–	–	–	–	–
<i>F. culmorum</i> I	9,0±1,8	10,5±0,6	8,5±0,6	7,5±0,6	8,0±0,8
<i>F. culmorum</i> II	12,3±0,6	11,6±3,0	10,4±0,3	11,7±1,0	8,5±2,1
<i>A. versicolor</i>	–	–	–	–	–
<i>F. poae</i>	14,8±0,5*	14,5±0,6*	13,3±1,3*	13,0±0,8*	11,3±1,0*
<i>Penic. chrysogenum</i>	10,8±1,0*	15,8±1,5*	14,3±0,5*	16,0±1,8*	15,3±0,5*
<i>Alt. alternata</i>	–	–	–	–	–
<i>Penic. cyclopium</i>	–	–	–	–	–
<i>F. avenaceum</i>	11,5±0,6*	7,5±0,6*	9,5±0,6*	8,3±0,5*	10,5±2,9*
<i>F. solani</i>	12,5±0,6*	13,5±1,3*	11,8±1,3*	12,3±0,5*	12,5±1,9*
<i>A. terreus</i>	–	–	–	–	–
<i>Penic. expansum</i>	6,5±0,6*	10,5±1,3*	–	6,5±0,6*	–
<i>A. niger</i>	11,5±0,6*	11,0±1,2*	8,0±0,8*	8,0±0,8*	8,0±0,8
<i>Rh. stolonifer</i> 2-KA	–	–	–	–	–
<i>Penic. expansum</i> 23L	+	+	+	+	–
<i>A. niger</i> MD-029	+	+	+	+	+
<i>A. versicolor</i> MI-130	+	+	+	–	+
<i>A. fumigatus</i> KO-5	–	–	+	–	+
<i>Penic. chrysogenum</i> 48-L	–	+	+	+	+
<i>Alt. alternata</i> 1-4U	–	–	–	–	–
<i>Penic. cyclopium</i> 21AL	–	–	–	–	–
<i>A. terreus</i> S-1	–	–	–	–	–
<i>F. culmorum</i> L-2	+++	+++	+++	+++	+++
<i>F. solani</i> 4-SA	–	–	–	–	–

* bakteriostatinis poveikis; antimikrobinis poveikis įskaitant 6 mm šulinėlio diametrą;

(–) poveikiu nepasižymėjo; (+) fungistatinis poveikis, (++) fungistatinis poveikis ir silpnas fungicidinis poveikis; (+++) fungicidinis poveikis.

Kitų autorių tyrimų duomenimis PRB *Lact. lactis* ssp. *lactis* [55], *L. casei* ssp. *pseudoplantarum* [273] ir *P. pentosaceus* [45] gaminami metabolitai buvo jautrūs proteolitiniams fermentams, pvz., antigrybinis *L. casei* ssp. *pseudoplantarum* poveikis, sukeltas peptido, kurio molekulinė masė yra 1 kDa, buvo nuslopintas paveikus tripsinu arba chimotripsinu [273]. Magnusson ir Schnürer [274] tyrimai

atskleidė, kad *L. coryniformis* ssp. *coryniformis* Si3 padermė gamina mažos molekulinės masės (~3 kDa), aukštai temperatūrai atsparų, antigrybinių poveikiu pasižymintį peptidą, kuris buvo jautrus proteolitiniams fermentams ir pasižymėjo hidrofobiškumu bei greita adsorbcija.

Dauginant PRB *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* mišiniuose, sinergetinis antimikrobinis jų poveikis prieš testuotus indikatorinius mikroorganizmus naudotomis sąlygomis nepasireiškė.

Vertinant PRB ir jų mišinių NMP antigrybinį poveikį įvairių genčių mielėms, nustatyta, kad *P. pentosaceus* KTU05-9 padermės ir PRB *L. sakei* ir *P. acidilactici* padermių mišinys pasižymėjo fungistatinium poveikiu *C. pelliculosa* mielių augimui – slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje buvo atitinkamai 11,3±1,0 ir 11,3±0,5 mm. *L. sakei*, *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-10 NMP, kaip ir MP, pasižymėjo fungistatinium poveikiu *Pi. farinosa* augimui (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje buvo nuo 9,8±0,5 iki 10,5±1 mm). Tuo tarpu, *L. sakei*, *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 NMP, kaip ir MP, pasižymėjo fungistatinium poveikiu *C. parapsilosis* augimui (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje buvo nuo 10±0 iki 11±0,4 mm). Antimikrobinis PRB mišinio, sudaryto iš *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 NMP, kaip ir MP, poveikis pasireiškė prieš *Pi. membranifaciens*, nors pavienių PRB NMP prieš šį mikroorganizmą nebuvo antimikrobiškai aktyvūs. Proteazės testas patvirtino, kad antimikrobinis poveikis prieš mieles pasireiškė ne dėl baltyminių junginių poveikio.

Nei grynų PRB NMP, nei jų mišinių NMP neslopino *Aure. pullulans*, *C. kruisii*, *D. vanrijiae*, *G. fermentans*, *K. lodderae*, *K. marxianus*, *Pi. fermentans*, *R. rubra*, *Pi. burtonii*, *Sach. capsularis*, *Z. bailii*, *Sc. cerevisiae*, *Y. lipolytica* ir *D. hansenii* mielių augimo.

Tyrimo rezultatai rodo, kad ne tik PRB MP, bet ir NMP pasižymi antigrybiniu poveikiu. PRB NMP antigrybinis poveikis prieš *Fusarium* ir *Penicillium* genties mikroskopinius grybus pasireiškė ne dėl baltyminės prigimties junginių, dėl to jie negali būti priskirti bakteriocinams ar BPM (išskyrus *A. niger*).

3.1.4. Pieno rūgšties bakterijų ląstelių antimikrobinis poveikis

Vertinant PRB ląstelių, kurios buvo gautos atskyrus supernatantus centrifuguojant, antimikrobinį poveikį indikatoriniams mikroorganizmams, nustatyta, kad PRB ląstelės, augintos po vieną ir mišiniuose, nepasižymėjo antimikrobinium poveikiu nei prieš bakterijas, nei prieš mikroskopinius grybus. Gauti rezultatai patvirtina, kad PRB antimikrobinis poveikis pasireiškia dėl fermentacijos metu sintetinamų metabolizmo produktų pieno ir acto rūgščių (pagrindiniai metabolizmo produktai), o taip pat kitų organinių rūgščių tokių kaip benzenkarboksirūgštis, 3-fenilpieno rūgštis, D-gliukurono rūgštis, 3-fenil-propano rūgštis, *p*-kumarino rūgštis, 2-hidroksi-benzenkarboksirūgštis [41, 42]. Be organinių rūgščių antimikrobinium poveikiu pasižymi bakteriocinai ar BPM [48]. Taigi PRB ląstelių priedai į terpes, nepalankias PRB augimui, neturės teigiamos įtakos antimikrobiniam poveikiui.

3.2. PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ FITAZINIS AKTYVUMAS

Dauguma mineralinių medžiagų grūdinėje žaliavoje yra fitatų sudėtyje ir jų įsisavinimas žmogaus organizme galimas tik suardžius fitatų kompleksus [157]. Paveikus fermentais – fitazėmis suardomi fitatų kompleksai iki laisvo neorganinio fosforo, metalų katijonų bei žemesnės eilės *mio*-inozitolio fosfato esterio. Kai kurie mikroorganizmai fermentacijos metu gamina mikrobinės kilmės fitazes, gebančias ardyti šiuos kompleksus. Taigi, fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB panaudojimas fermentuotų produktų gamyboje galėtų turėti svarbią reikšmę viso grūdo dalių kepinių maistinės vertės didinimui, praturtinant juos biologiškai pasisavinama mineralinių medžiagų forma [183, 200, 201]. Tačiau literatūroje sutinkamos prieštaringos nuomonės dėl PRB fitazinio aktyvumo. Šiuo metu nėra išskirtos PRB, pasižyminčios dideliu fitaziniu aktyvumu, kurias būtų galima panaudoti duonos gamyboje. Todėl jų paieška ir išskyrimas iš fermentuotų produktų bei tolesnis pritaikymas vystant naujus bioproduktus yra aktualus, sprendžiant mineralinių medžiagų pasisavinamumo problemą.

Ieškant fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB, šio tyrimo etapo metu, iš pramoninių raugų išskirtos ir atrinktos PRB, įvertinant jų dauginimosi galimybes įvairiose minimalaus maistingumo mitybinėse terpėse, panaudojant skirtingą fosforo šaltinį ir be jo. Fitaziniu aktyvumu pasižymėjusios PRB padermės identifikuotos ir nustatytas jų fitazinis aktyvumas. Be to, fitazinis aktyvumas ištirtas ir penkių bakteriocinus gaminančių PRB, priklausančių *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* rūšims.

PRB išskyrimui naudotų raugų charakteristika. Devyni raugai, surinkti iš įvairių Lietuvos kepyklų ir naudoti PRB išskyrimui (3.7 lent.), pasižymėjo skirtingomis pH vertėmis. Žemo aktyviojo rūgštingumo (pH vertės 3,05–3,61) B, E, F, G, H, I rauguose PRB kiekis buvo didžiausias ($(7,5-29,5) \cdot 10^8$ KSV/g); vidutinio aktyviojo rūgštingumo (pH vertė 3,91) A rauge nustatytas mažesnis PRB kiekis ($18 \cdot 10^6$ KSV/g); mažiausi PRB kiekiai ir aukšta pH vertė, palyginus su kitais tirtais raugais, nustatyta C ir D rauguose – atitinkamai $4,5 \cdot 10^5$ KSV/g (pH=5,2) ir $3 \cdot 10^5$ KSV/g (pH=4,17).

Pasak Lonner [275], raugų sudėtyje turėtų būti daugiau, nei $5 \cdot 10^8$ KSV/g metabolitiškai aktyvių PRB, ir raugo pH vertės turėtų būti mažesnės, nei 4,5. Kiti autoriai [8, 9, 10] pažymi, kad galutinės raugų pH vertės daugelyje kvietinių ir ruginių raugų turėtų būti 3,5–3,8.

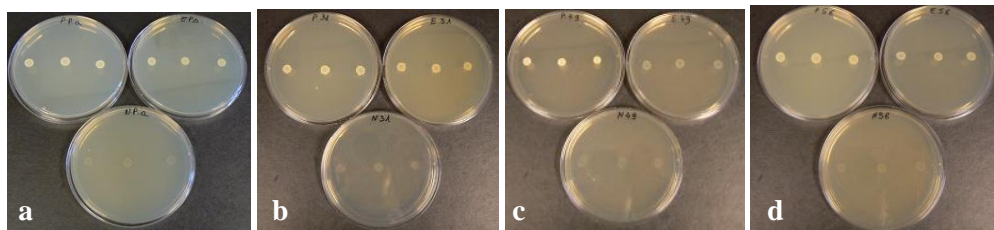
3.7 lentelė. Raugų charakteristikos

Raugo mėginys	Kepykla	pH	BTR, °N	PRB skaičius, KSV/g
A	UAB „1“	3,91±0,1	29,6±0,3	$(18,0±1) \cdot 10^6$
B		3,61±0,1	34,8±0,1	$(14,5±0,5) \cdot 10^8$
C	UAB „2“	5,20±0,1	11,3±0,3	$(4,5±0,5) \cdot 10^5$
D		4,17±0,1	23,1±0,6	$(3,0±0,5) \cdot 10^5$
E	UAB „3“	3,05±0,1	21,7±0,6	$(17,5±0,5) \cdot 10^8$
F		3,10±0,1	42,2±0,4	$(29,5±0,5) \cdot 10^8$
G		3,16±0,1	35,3±0,6	$(13,0±1) \cdot 10^8$
H		3,20±0,1	40,6±0,0	$(13,0±1) \cdot 10^8$
I		3,27±0,1	37,8±0,1	$(7,5±0,5) \cdot 10^8$

Fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB atranka. Šio etapo tikslas buvo atrinkti fitaziniu aktyvumu pasižyminčias PRB identifikavimui ir fermentinio aktyvumo nustatymui, įvertinant PRB fitaziniį aktyvumą kaip PRB galimybę augti skystoje mitybinėje terpėje ir ant mitybinio agarų, papildyto fito rūgšties dikalio druska kaip vieninteliu fosforo šaltiniu.

Visi testuoti 168 PRB izoliatai gerai augo ant minimalaus maistingumo mitybinės agarų terpės (MMT), kurios sudėtyje buvo neorganinio fosforo KH_2PO_4 pavidalu. Labai silpnas arba vos matomas PRB augimas buvo stebimas ant minimalaus maistingumo mitybinės agarų terpės, kurios sudėtyje visiškai nebuvo naudota fosforo (MMT-P), reikalingo PRB dauginimuisi. Tuo tarpu ant minimalaus maistingumo agarų terpės, papildytos fito rūgšties dikalio druska (MMT+FIT) kaip vieninteliu fosforo šaltiniu, stebėtas skirtingas PRB dauginimasis – tik 16 PRB padermių augo ant MMT+FIT agarų lėkštelių 30 °C temperatūroje. Keturių bakterijų padermės iš 16 fitaziniu aktyvumu pasižyminčių panašiai augo ant abiejų MMT+P ir MMT+FIT agarų terpių, o gerokai mažesnės bakterijų kolonijos ant MMT+FIT agarų lėkštelių buvo nustatytos likusioms dvylikai fitaziniu aktyvumu pasižymėjusių bakterijų. Labai silpnas visų testuotų PRB augimas buvo stebėtas ant MMT-P agarų lėkštelių.

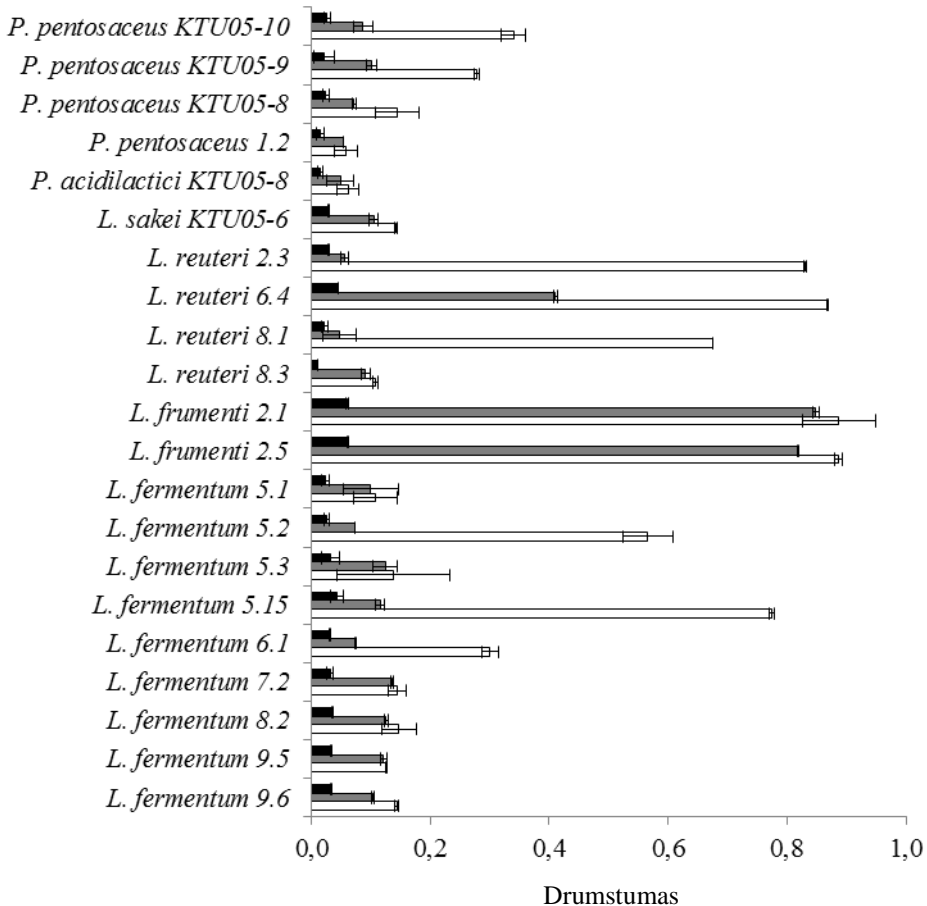
Penkios PRB (*L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermės), anksčiau išskirtos iš spontaninių ruginių raugų, taip pat gerai augo ant abiejų MMT+P ir MMT+FIT agarų terpių. *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermių augimas ant mitybinio agarų terpių pateiktas 3.3 paveiksle. Trijų iš penkių PRB ląstelių augimo intensyvumas ant skirtingų MMT+P ir MMT+FIT agarų terpių buvo labai panašus, o *L. sakei* ir *P. pentosaceus* KTU05-9 buvo šiek tiek mažesnis ant MMT+FIT, lyginant su kolonijų dydžiu ant MMT+P agarų terpės. Tai galima paaiškinti tuo, kad PRB kultūros, pasižyminčios fitaziniu aktyvumu, mitybinėje terpėje skaldė fitatų kompleksus, vystymuisi panaudodamos atskeltą fosforą.



3.3 pav. PRB: a – *P. acidilactici*; b – *P. pentosaceus* KTU05-8; c – *P. pentosaceus* KTU05-9; d – *P. pentosaceus* KTU05-10, augimas ant mitybinio agarų terpių: MMT+P (kairėje), MMT+FIT (dešinėje) ir MMT-P (apačioje)

PRB augimas skystoje mitybinėje terpėje buvo vertintas matuojant terpės drumstumą mikro lėkštelėse 48 val. (3.4 pav.). 7 iš 21 bakterijų kultūros labai gerai augo MMT+FIT skystoje terpėje. Jų terpės drumstumas sudarė 90–97 %, lyginant su MMT+P terpės drumstumu. Atsižvelgiant į PRB augimą skystoje MMT+FIT ir ant MMT+FIT agarų lėkštelių buvo atrinkta 16 PRB iš 168 padermių, pasižymėjusių fitaziniu aktyvumu. Taip pat fitaziniu aktyvumu pasižymėjo ir penkios PRB,

esančios KTU Maisto mokslo ir technologijų katedros mikroorganizmų kolekcijoje (*P. pentosaceus* KTU05-8, *P. pentosaceus* KTU05-9, *P. pentosaceus* KTU05-10, *P. acidilactici* ir *L. sakei*).



3.4 pav. Terpės drumstumas (MSS₆₀₀) auginant PRB ląsteles skystose terpėse: □ – MMT+P; ■ – MMT+FIT; ■ – MMT-P, po 48 val. 30 °C temperatūroje

Atrinktų fitazinių aktyvumu pasižyminčių PRB identifikavimas. Pagal PRB augimo rezultatus, 16 padermių, geriausiai augusių ant MMT+FIT terpės, buvo analizuotos *ps*-PGR metodu. Pagal klasterio analizės rezultatus padermės buvo sugrupuotos į keturias grupes pagal jų paliktus atspaudus agarozės gelyje (3.8 lent.). Iš kiekvienos grupės išrinktos 9 padermės buvo sekvenuotos 16S rDNR geno sekos amplifikacijos PGR metodu (MacroGen, Pietų Korėja) PRB rūšies nustatymui. Po sekvenavimo gautos PRB ląstelių 16S rDNR sekos palygintos su Nacionalinio biotechnologijos informacijos centro (*angl.* National Center for Biotechnology Information (NCBI)) bakterijų banko sekomis. Pagal sekvenavimo rezultatus buvo identifikuotos keturios PRB rūšys: *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. frumenti* ir *P. pentosaceus*.

3.8 lentelė. PRB rūšių identifikavimas 16S rDNR geno sekos metodu

Grupė ^c	Izoliato Nr.	16S rDNR geno sekos identifikavimas			PRB rūšis
		Ilgis	Sutapimas	panašumas GenBank sekoms, %	
I	1.2	1501	1491/1493	99,9	^a <i>P. pentosaceus</i>
II	2.1	1370	1369/1370	99,9	^b <i>L. frumenti</i>
	2.5	1370	1369/1370	99,9	<i>L. frumenti</i>
III	2.3	1371	1369/1371	99,9	^c <i>L. reuteri</i>
	8.1	1512	1512/1512	99,9	<i>L. reuteri</i>
IV	5.1	1444	1444/1444	100,0	^d <i>L. fermentum</i>
	5.2	1518	1513/1515	99,9	<i>L. fermentum</i>
	6.1	1485	1484/1485	99,9	<i>L. fermentum</i>
	7.2	1508	1507/1509	99,9	<i>L. fermentum</i>

^a*P. pentosaceus* (bendras izoliatų kiekis 1); ^b*L. frumenti* (bendras izoliatų kiekis 2); ^c*L. reuteri* (bendras izoliatų kiekis 4); ^d*L. fermentum* (bendras izoliatų kiekis 9); ^eRemiantis 16S rDNR sekvenavimo rezultatais izoliatai suskirstyti į keturias grupes

Identifikuotų PRB fitazinio aktyvumo nustatymas. Eksperimento metu nustatytas 9 skirtingų PRB padermių, išskirtų iš pramoninių duonos raugų, ir 5 PRB, gautų iš KTU Maisto mokslo technologijų katedros, intra- ir ekstraląsteliniai tūriniai ir specifiniai fitaziniai aktyvumai (3.9 lent.).

3.9 lentelė. PRB tūrinis (AV/ml) ir specifinis (AV/10¹⁰ KSV) fitaziniai aktyvumai

Rūšis	Padermė	Fitaziniai aktyvumai ^a			
		Ekstraląstelinis		Intraląstelinis	
		AV/ml	AV·10 ³ /10 ¹⁰ KSV	AV/ml	AV·10 ³ /10 ¹⁰ KSV
<i>L. sakei</i>	KTU05-6	25±0	24±3	14±1	0,72±0,07
<i>P. acidilactici</i>	KTU05-7	11±1	13±3	17±0	1,05±0,11
<i>P. pentosaceus</i>	KTU05-10	21±4	23±4	12±2	0,70±0,04
	KTU05-8	32±1	30±3	8±3	0,34±0,10
	KTU05-9	54±6	25±4	28±3	0,68±0,05
	1.2	43±2	28±3	7±3	0,19±0,07
<i>L. frumenti</i>	2.1	56±8	13±2	13±2	0,29±0,05
	2.5	60±3	16±1	16±1	0,32±0,04
<i>L. reuteri</i>	2.3	6±1	12±4	13±2	1,54±0,36
	8.1	19±2	7±1	61±4	1,17±0,12
<i>L. fermentum</i>	5.1	46±7	10±3	10±3	0,18±0,04
	5.2	3±0	1±0	35±10	0,71±0,26
	6.1	11±3	3±1	52±6	0,83±0,02
	7.2	16±9	6±3	61±9	1,24±0,25

^aFitazinis aktyvumas (AV) išreikštas nmol neorganinio fosforo, išlaisvinto per min matavimo sąlygomis

Didžiausias ekstraląstelinis tūrinis aktyvumas, nustatytas dviejų *L. frumenti* padermių (2.1 ir 2.5) ir *P. pentosaceus* KTU05-9, buvo atitinkamai 56±8, 60±3 ir 54±6 AV/ml. Didžiausiu ekstraląstelinio specifiniu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo

visos tirtos *P. pentosaceus* (23–30 AV·10³/10¹⁰ KSV) rūšies bakterijos, taip pat dideliu ekstraląsteliniu specifiniu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo *L. sakei* (24 AV·10³/10¹⁰ KSV). Vidutiniu ekstraląsteliniu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo *P. acidilactici* (13 AV·10³/10¹⁰ KSV), *L. frumenti* 2.1 ir 2.5 padermės (atitinkamai 13 ir 16 AV·10³/10¹⁰ KSV), taip pat *L. reuteri* 2.3 ir 8.1 padermės (atitinkamai 12 ir 7 AV·10³/10¹⁰ KSV). Mažiausias ekstraląstelinis fitazinis aktyvumas buvo nustatytas *L. fermentum* 5.2 ir 6.1 padermių (atitinkamai 1 ir 3 AV·10³/10¹⁰ KSV). Ekstraląstelinis tūrinis ir specifinis aktyvumai tarp keturių *L. fermentum* padermių nustatyta atitinkamai nuo 3 iki 46 AV/ml ir nuo 1 iki 10 AV·10³/10¹⁰ KSV. Tiek tūrinis, tiek specifinis ekstraląsteliniai aktyvumai didesni nustatyti *L. fermentum* 5.1, lyginant su kitomis *L. fermentum* padermėmis.

Intraląstelinis fermentinis aktyvumas priklausė nuo PRB padermės. Didžiausiomis šio aktyvumo vertėmis pasižymėjo *L. fermentum* 7.2, išskirta iš ruginio raugo. Jos tūrinis aktyvumas buvo 61±9 AV/ml, o specifinis aktyvumas buvo 1,24±0,25 AV·10³/10¹⁰ KSV. Visų kitų tirtų PRB padermių intraląstelinis fitazinis aktyvumas buvo ženkliai mažesnis. Taip pat nustatyta, kad intraląstelinio fitazinio aktyvumo dydis nepriklauso nuo ekstraląstelinio aktyvumo.

Raugų fermentacijos metu PRB ekstraląstelinis fitazinis aktyvumas yra svarbesnis nei intraląstelinis dėl į terpę išskirtų fermentų, kurie raugų fermentacijos metu gali ardyti fitatus, atlaisvindami fosforą ir mineralines medžiagas iš fitatų kompleksų ir, tokiu būdu, praturtindami kepinius biologiškai pasisavinama jų forma. Efektyvus fitatų kiekio sumažinimas duonos gamybos metu gali būti pasiektas raugų fermentacijos arba prailgintos raugų fermentacijos metu, naudojant šiame darbe atrinktas *P. pentosaceus* rūšies PRB gaminančias ekstraląstelines fitazes. Nors PRB vaidina svarbų vaidmenį maisto produktų gamyboje, nedaug duomenų rasta apie jų fitazinį aktyvumą. Palacios su bendraautorais [276] įvardino *L. reuteri* L-M15, kaip pasižyminčią dideliu fitaziniu aktyvumu. Zamudio su bendraautorais [205] nustatė, kad *P. pentosaceus* NRRL B-14009 ir *L. fermentum* NRRL B-4524 pasižymi ekstraląsteliniu fitaziniu fermentiniu aktyvumu. Tačiau, pasak šių autorių, išvardintos PRB nepasižymi intraląsteliniu fitaziniu aktyvumu. Kitokius tyrimų rezultatus gavo De Angelis su bendraautorais [184], tyrę bakterijų intraląstelinius fermentus ir nustatę *L. fermentum* gebėjimą gaminti fitazes. Anastasio su bendraautorais [277] nustatė, kad *Ent. faecium* A86 (0,74 AV/ml) ir *L. plantarum* H5 (0,71 AV/ml) pasižymėjo fitaziniu aktyvumu, tačiau mūsų atveju iš raugų išskirtos PRB pasižymėjo didesniu aktyvumu.

Gauti tyrimų rezultatai parodė, kad didžiausiu ekstraląsteliniu fitaziniu aktyvumu pasižymėjo *P. pentosaceus* rūšiai priklausančios PRB padermės.

Atrinkus fitaziniu aktyvumu pasižyminčias PRB (*P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10), svarbu įvertinti jų gebėjimą skaldyti fito rūgštis ir mineralinių medžiagų kompleksus realiose sistemose ir praturtinti kvietinius viso grūdo kepinius biologiškai pasisavinama mineralinių medžiagų forma. Todėl kito tyrimų etapo metu buvo vertintos biologiškai pasisavinamų mineralinių medžiagų susidarymo galimybės, organizmui galima įsisavinti forma, viso grūdo dalių kvietiniuose kepinuose, imituojant virškinamojo trakto terpės pH vertes (3.4.2 skyrius).

3.3. VEIKSNIAI, AKTYVINANTYS IR SLOPINANTYS PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ AKTYVUMĄ

3.3.1. Fermentacinės terpės ir pieno rūgšties bakterijų kultivavimo sąlygų įtaka į bakteriocinus panašių medžiagų aktyvumui

Antimikrobinių komponentų susidarymą lemia ne tik PRB padermė, bet ir fermentacijai naudotos mitybinės terpės sudėtis. Todėl vertinant PRB gaminamų BPM antimikrobinį aktyvumą, svarbu nustatyti mitybinių terpių ir jų komponentų įtaką, taip pat – auginimo temperatūros ir terpės pH verčių poveikį PRB gaminamų BPM aktyvumui.

3.3.1.1 Pieno rūgšties bakterijų fermentacija MRS ir mMRS terpėse

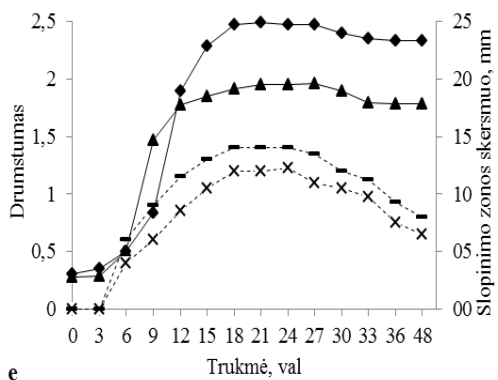
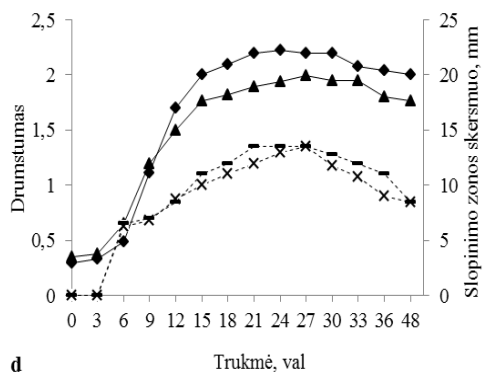
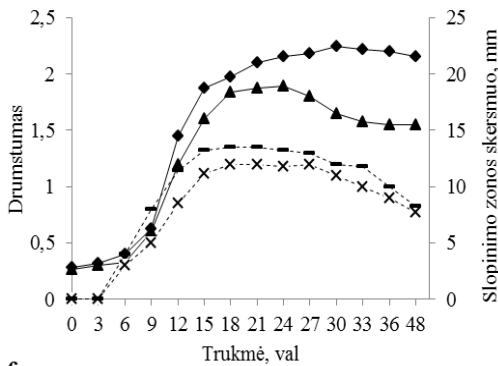
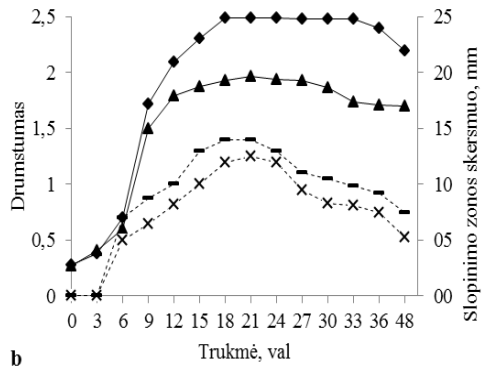
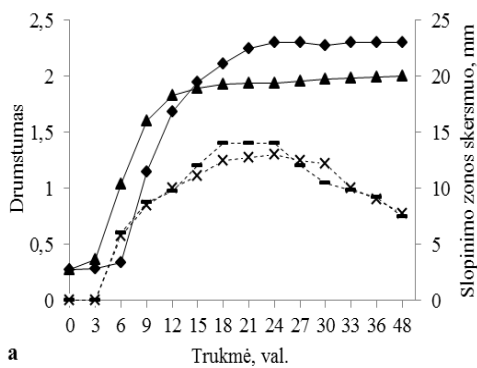
Šio etapo metu vertinta dažniausiai PRB kultivavimui naudojamų MRS ir mMRS mitybinių terpių įtaka PRB ląstelių augimui ir BPM antimikrobiniam aktyvumui prieš *B. subtilis* ssp. *subtilis*. PRB augimas skystose MRS ir mMRS terpėse ir produkuojamų BPM antimikrobinis poveikis *B. subtilis* augimui pateiktas 3.5 paveiksle.

Gauti tyrimų rezultatai parodė, kad BPM aktyvumas pasireiškė jau po 6 val. kultivavimo MRS terpėje. Tai patvirtina, kad *L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermių sintetinės BPM yra pirminiai metabolizmo produktai. Kad bakteriocinai yra pirminiai metabolizmo produktai, patvirtino ir kitų autorių publikuoti tyrimų rezultatai [100, 101, 104, 278, 279, 280].

Gauti rezultatai parodė, kad intensyviau visų tirtų PRB ląstelės dauginosi MRS terpėje, o susidariusių BPM antimikrobinis poveikis nustatytas kiek didesnis, kultivuojant PRB padermes mMRS terpėje. Skirtingų pramoninių terpių poveikį bakteriocinų susidarymui tyrinėjo Todorov ir Dicks [100] ir nustatė, kad *L. pentosus* ST151BR sintetinių bakteriocinų didžiausias aktyvumas buvo kultivuojant PRB MRS terpėje, o smegenų širdies infuziniame buljone ir M17 terpėje bakteriocinų aktyvumas buvo labai mažas, nepaisant gero bakterijų augimo. Tai galėjo sąlygoti šių terpių sudėtyje naudojami maži mitybinių komponentų kiekiai, lyginant su MRS terpe. Tokius pat rezultatus gavo ir Todorov [278], vertindamas *L. plantarum* AMA-K sintetinio bakteriocino aktyvumą.

Didžiausias bakteriocinų antimikrobinis poveikis *B. subtilis* augimui nustatytas ankstyvoje stacionarioje PRB augimo fazėje: *L. sakei* ir *P. acidilactici* BPM – 18–24 val. laikotarpyje; *P. pentosaceus* KTU05-10 18–27 val. laikotarpyje; *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 – stacionarioje augimo fazėje, atitinkamai 15–27 ir 21–30 val. laikotarpyje. Kiti autoriai didžiausius bakteriocinų kiekius nustatė taip pat ankstyvoje stacionarioje fazėje [101, 104, 278].

Gauti tyrimų rezultatai rodo, kad antimikrobinio aktyvumu pasižyminčių į bakteriocinus panašių medžiagų aktyvumas priklauso nuo PRB kultivavimo terpės. Todėl sekančio etapo metu tirta įvairių terpės komponentų įtaka PRB gaminamų BPM aktyvumui.



e

3.5 pav. Terpės drumstumas (MSS_{600}) auginant PRB: a – *L. sakei*; b – *P. acidilactici*; c – *P. pentosaceus* KTU05-8; d – KTU05-9; ir e – KTU05-10 terpėse: ◆ – MRS; ▲ – mMRS. Ir susidariusių BMP antimikrobinis poveikis terpėse: × – MRS; – – mMRS

3.3.1.2. Mitybinės terpės komponentų įtaka į bakteriocinus panašių medžiagų aktyvumui

Įsitikinus, kad PRB gaminamų BMP poveikis priklauso nuo terpės, sekančio etapo metu buvo tiriama mitybinių terpių komponentų, turinčių įvairius anglies, azoto šaltinius, bei vitaminų ir mineralinių medžiagų įtaka BMP susidarymui.

PRB BMP aktyvumai prieš *B. subtilis* ssp. *subtilis* kultivuojant PRB 21 val. ir keičiant mitybinės terpės sudėtį pateikta 3.10 lentelėje.

3.10 lentelė. Terpės komponentų įtaka BPM aktyvumui prieš *Bacillus subtilis*

Komponentai	Koncentracija, g/l	Aktyvumas, AV/ml			
		<i>P. pentosaceus</i>			<i>P. acidilactici</i>
		KTU05-10	KTU05-9	KTU05-8	KTU05-7
Azoto šaltinis					
Triptonas (T)	20	310±14	280±28	260±28	220±28
Mėsos ekstraktas (ME)	20	230±14a	180±0a	170±14a	150±14a
Mielių ekstraktas (YE)	20	250±14a	180±0a	160±28a	150±14a
T+ME+YE	10+5+5	310±14	270±14	250±14	200±28
T+ME+YE	5+10+5	260±0a	200±28a	180±0a	150±14a
T+ME+YE	5+5+10	260±28a	210±14a	190±14a	170±14
T	5	180±0a	140±14a	150±14a	110±14a
T	10	230±14a	200±0a	190±14a	130±14a
T	15	270±14a	230±14a	220±0	170±14
T	25	300±0	280±0	250±14	200±0
Peptonas+ME+YE	10+5+5	230±14a	170±14a	180±0a	160±0a
Anglies šaltinis					
G+F+M	7+7+7	310±14	270±14	250±14	200±28
Gliukozė (G)	21	330±14	280±28	250±14	210±14
G	5	170±14a	150±14a	140±0a	100±0a
G	10	220±28a	190±14a	180±0a	130±14a
G	15	250±14a	240±0	230±14	190±14
G	25	300±0	270±14	260±0	190±14
Fruktozė (F)	21	190±14a	190±14a	170±14a	120±14a
Maltozė (M)	21	250±14a	200±0a	190±14a	140±14a
Glicerolis	0	310±14	270±14	250±14	200±28
	1	310±14	260±0	240±0	200±0
	5	280±28	240±28	230±14	180±0
	10	270±14a	240±0	220±0	180±0
Mineralinės medžiagos					
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1,6	290±14	260±0	240±0	190±14
	2,6	310±14	270±14	250±14	200±28
	5	300±0	260±0	240±0	180±0
	10	280±0	250±14	220±0	180±28
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,05	290±14	260±28	240±28	190±42
	0,1	310±14	270±14	250±14	200±28
	0,2	350±14a	320±0a	270±14	230±14
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,5	360±0a	340±14a	330±14a	180±0
	0,025	290±14	260±0	240±0	200±0
	0,05	310±14	270±14	250±14	200±28
	0,1	360±0a	320±0a	290±14a	250±14
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,2	360±0a	320±0a	300±0a	230±14
	0	310±14	270±14	250±14	200±28
	0,1	290±14	270±14	240±0	190±14
	0,2	290±14	260±0	240±0	190±14
	0,4	270±14a	250±14	230±14	180±28
Aminorūgštis					
Cisteino-HCl · H ₂ O	0,25	290±14	240±0	220±0	170±14
	0,5	310±14	270±14	250±14	200±28
	1	330±14	280±28	290±14a	210±14
	2	360±0a	340±0a	300±0a	260±0a

3.10 lentelė (tęsinys). Terpės komponentų įtaka BPM aktyvumui prieš *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*

Medžiaga	Koncen- tracija, g/l	Aktyvumas, AV/ml			
		<i>P. pentosaceus</i>			<i>P.</i>
		KTU05-10	KTU05-9	KTU05-8	<i>acidilactici</i> KTU05-7
Kiti terpės komponentai					
Na-gliukonatas	1	290±14	260±0	230±14	190±28
	2	310±14	270±14	250±14	200±28
	5	300±0	270±14	250±14	180±28
	10	270±14a	240±0	220±28	170±14
Na-acetatas · 3H ₂ O	2,5	300±0	250±14	240±0	180±28
	5	310±14	270±14	250±14	200±28
	10	300±28	240±0	220±28	170±14
	15	280±28	230±14a	220±28	170±14
Tween 80, (ml/l)	0	300±28	260±28	240±28	200±0
	1	310±14	270±14	250±14	200±14
	2	290±14	270±14	240±0	190±14
	5	270±14a	240±0	230±14	180±10
Vitaminai					
Tiaminas	0,001	320±28	280±28	260±14	210±28
Ciano kobalaminas	0,001	310±14	260±0	260±0	200±28
Folio rūgštis	0,001	300±0	260±0	260±0	200±28
D,L-6,8-tioktinė rūgštis	0,001	320±28	270±14	260±0	200±28
Terpės					
MRS terpė		260±0a	220±0a	200±0a	160±0a
mMRS terpė		310±14	270±14	250±14	200±0

Vidutinių verčių reikšmės pažymėtos raide a parodo, kad yra esminiai skirtumai tarp kontrolinio (auginant PRB mMRS terpėje) ir tiriamojo mėginio vertinant pagal Dunkano kriterijų ($p \leq 0,05$)

Tyrimų rezultatai parodė, kad fermentacinės terpės sudėtis turi reikšmingą įtaką BPM aktyvumui. Naudojant triptoną (20 g/l) kaip vienintelį azoto šaltinį, nustatyti didesni (310, 280, 260 ir 220 AV/ml, atitinkamai *P. pentosaceus* KTU05-10, KTU05-9, KTU05-8 ir *P. acidilactici*) BPM aktyvumai, nei naudojant peptoną, mielių ar mėsos ekstraktus. Be to, mažinant azoto šaltinio – triptono kiekį iki 15 g/l ir mažiau, nustatyti mažesni aktyvumai *P. pentosaceus* KTU05-10, KTU05-9 sintetinamų BPM, tuo tarpu *P. pentosaceus* KTU05-8 ir *P. acidilactici* sintetinamų BPM aktyvumo sumažėjimai nustatyti reikšmingai mažesni naudojant 10 g/l ir mažesnius triptono kiekius. BPM antimikrobinio poveikio aktyvumas naudojant azoto šaltinio mišinį sudarytą iš triptono, mielių ekstrakto ir mėsos ekstrakto (atitinkamai 10, 5 ir 5 g/l) prilygo aktyvumui naudojant 20 g/l triptono. Taigi, triptonas yra svarbus azoto šaltinis, reikalingas BPM susidarymui. Panašius tyrimų rezultatus paskelbė ir kiti autoriai. Todorov [278] didžiausius bakteriocino AMA-K aktyvumus gavo, kai PRB kultivavimui naudojo 20 g triptono, ir 20 g mišinio, sudaryto iš triptono, mielių ekstrakto ir mėsos ekstrakto (atitinkamai 10, 5 ir 5 g/l). Tuo tarpu *L. plantarum* sintetinamo bakteriocino ST414BZ didžiausias aktyvumas buvo pasiektas, kai PRB kultivavimui buvo naudota kaip tik 20 g/l triptono [102].

Naudojant gliukozę (20 g/l) kaip vienintelį anglies šaltinį, nustatyti didesni *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermių sintetinamų

BPM aktyvumai, nei analogiškai naudojant maltozę ar fruktozę, o mažiausi aktyvumai nustatyti mažinant gliukozės (anglies šaltinio) kiekį iki 5 ar 10 g/l. Be to, *P. pentosaceus* KTU05-10 sintetinamų BPM aktyvumai nustatyti reikšmingai mažesni naudojant 15 g/l gliukozės. Padidinus gliukozės kiekį iki 25 g/l reikšminga įtaka BPM aktyvumui nenustatyta. Pagal literatūros duomenis, bakteriocinų sintezė priklauso nuo PRB padermės, angliavandenių koncentracijos ir jų šaltinio. Šiame darbe gauti tyrimų rezultatai neprieštarauja kitų autorių publikuotiems duomenims, kurie nustatė, kad gliukozė kaip anglies šaltinis labiau stimuliuoja BPM gamybą, o fruktozės panaudojimas vietoj gliukozės ženkliai sumažina bakteriocinų aktyvumą [101, 104, 281]. Tuo tarpu Todorov ir Dicks [102], tyrinėję *L. plantarum* ST414BZ ir ST664BZ sintetinamus bakteriocinus, nustatė, kad jų aktyvumas buvo du kartus didesnis, kai vietoj gliukozės buvo naudota maltozė. Skirtingas anglies šaltinio poreikis gali priklausyti nuo mikroorganizmų rūšies ir netgi padermės.

1, 5 ir 10 g/l glicerolio priedas mMRS terpėje neturėjo reikšmingos įtakos BPM *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 padermių gaminamų BPM aktyvumai, tuo tarpu 10 g/l glicerolio priedas reikšmingai sumažino *P. pentosaceus* KTU05-10 padermės gaminamų BPM aktyvumą. Glicerolio neigiamas poveikis taip pat nustatytas bakteriocinui ST151BR, kurį sintetino *L. pentosus* ST151BR [100].

2 g/l cisteino hidrochlorido priedas reikšmingai padidino *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermių gaminamų BPM antimikrobinį aktyvumą iki 25 %, be to 1 g/l cisteino priedas padidino *P. pentosaceus* KTU05-8 gaminamų BPM aktyvumą 16 %. Tai gali būti paaiškinama svarbiu cisteino vaidmeniu daugumos baltymų struktūroje.

5 ml/l Tween 80 priedas sumažino *P. pentosaceus* KTU05-10, gaminamų BPM aktyvumą 10 %, tuo tarpu kitų PRB sintetiniams BPM Tween 80 priedas reikšmingos įtakos neturėjo. Priešingus duomenis apie Tween 80 poveikį bakteriocinų aktyvumui paskelbė Nel su bendraautoriais [282], nustatę, kad padidintos jo koncentracijos teigiamai stimuliuojo pediocino PA-1 aktyvumą, kuris pasiektas didžiausias naudojant 3 % Tween 80. Tuo tarpu Todorov ir Dicks [104, 283] nustatė, kad Tween 80 priedas sumažino bakteriocinų aktyvumą daugiau kaip 50 %.

Iki 0,2 g/l padidinti $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ kiekiai reikšmingai padidino *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 produkuojamų BPM aktyvumą, atitinkamai iki 360, 320 ir 300 AV/ml. Padidinus $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ koncentraciją 2,5 karto, t. y. iki 0,5 g/l, *P. pentosaceus* produkuojamų BPM aktyvumas padidėjo iki 32 %, o *P. acidilactici* BPM aktyvumas padidėjo 15 %, kai $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ kiekis buvo padidintas iki 0,2 g/l. Apie teigiamą Mg^{2+} ir $MnSO_4$ poveikį savo tyrimuose taip pat paskelbė ir Biswas [284], ir Nel su bendraautoriais [282]. Be to, iš terpės pašalinus magnio ir mangano sulfatus, reikšmingai sumažėjo bakteriocino AMA-K aktyvumas [278]. Gauti ir priešingi duomenys: Juarez su bendraautoriais [285] nustatė, kad, nors $MnSO_4$ ir buvo privalomas optimaliam *L. salivarius* CRL 1328 augimui, tačiau neigiamai veikė bakteriocinų susidarymą, o teigiamas poveikis jų aktyvumui buvo pasiektas naudojant natrio acetato ir $MgSO_4$ priedo kombinaciją, netgi sudėtyje

naudojant Mn^{2+} . Tai patvirtina, kad druskų mišiniai taip pat gali turėti įtakos bakteriocinų susidarymui.

Keturis kartus ir daugiau padidinti kalio ir natrio druskų kiekiai terpėje sumažino *P. pentosaceus* KTU05-10 BPM aktyvumą 13 %. Literatūros duomenimis, kalio druskų poveikis bakteriocinų aktyvumui labai priklauso nuo bakteriocino prigimties. K_2HPO_4 priedai nuo 2 iki 100 g/l neturėjo įtakos *L. plantarum* sintetinamo bakteriocino ST414BZ aktyvumui, o 2 g/l KH_2PO_4 priedas sumažino šio bakteriocino aktyvumą perpus. *L. plantarum* sintetinamo bakteriocino ST664BZ aktyvumą 2 g/l KH_2PO_4 priedas padidino du kartus, o 20 ir 50 g/l priedai padidino šių bakteriocinų aktyvumą 4 kartus [281]. Taigi mineralinių medžiagų priedų poveikis priklauso nuo bakteriocinų prigimties ir turi būti parinktas kiekvienai PRB padermei.

Vertinant vitaminų poveikį *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermių sintetinamų BPM aktyvumui, nustatyta, kad folio rūgšties, tiamino hidroklorido, cianokobalamino ir D,L-6,8-tioktinės rūgšties 1 mg/l priedai neturėjo reikšmingos įtakos BPM aktyvumui. Literatūros duomenimis, vitaminų poveikis bakteriocinų susidarymui labai priklauso nuo bakteriocinų prigimties. Todorov ir Dicks [102] atlikti tyrimai rodo, kad tiamino, D,L-6,8-tioktinės rūgšties ir L-askorbo rūgšties 1 mg/l priedai sumažino bakteriocino ST414BZ aktyvumą, o cianokobalaminas neturėjo jokios įtakos šių bakteriocinų aktyvumui. Bakteriocino ST664BZ aktyvumui askorbo rūgšties priedas turėjo neigiamą įtaką ir sumažino aktyvumą perpus, o D,L-6,8-tioktinės rūgšties 1 mg/l priedas du kartus padidino bakteriocino ST664BZ aktyvumą.

Apibendrinant tyrimų rezultatus, galima teigti, kad BPM antimikrobinį aktyvumą didino azoto šaltiniu PRB kultivavimui naudojant 20 g/l triptono, o anglies šaltiniu – 20 g/l gliukozės. Padidinti iki 0,2 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ir iki 0,1 g/l $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, o taip pat iki 2 g/l cisteino- $HCl \cdot H_2O$ priedai didino BPM aktyvumą prieš *B. subtilis*.

Nustačius, kad terpės sudėtis turi reikšmingą įtaką PRB sintetinamų BPM aktyvumui, kitame tyrimo etape svarbu įvertinti ir fermentavimo sąlygų – temperatūros, terpės pH verčių ir pradinio PRB ląstelių inokulianto kiekio – įtaką PRB sintetinamų BPM susidarymui.

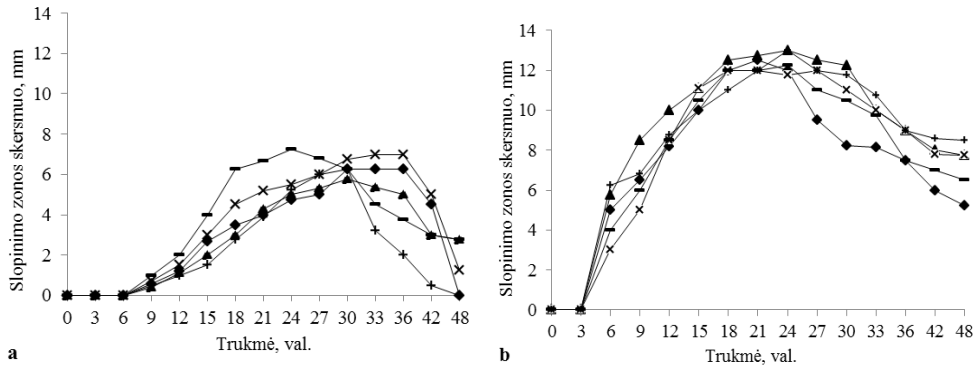
3.3.1.3. Fermentacijos sąlygų įtaka į bakteriocinus panašių medžiagų aktyvumui

Šio etapo tikslas buvo įvertinti fermentacijos sąlygų (terpės pH verčių, temperatūros ir inokulianto kiekio) įtaką BPM aktyvumui.

Nustatyta, kad, inokuliuojant 2 % PRB ląstelių suspensijos į šviežią terpę, antimikrobinis bakteriocinų aktyvumas yra ženkliai didesnis, negu inokuliuojant 0,01 % (3.6 pav.). 2 % inokulianto padidino antimikrobinio poveikio zonos susidarymą nuo 5 iki 13 mm. Apie didesnio kiekio (2 %) PRB pradinio inokulianto teigiamą poveikį paskelbė ir kiti tyrėjai [286], be to, kad bakteriocinų aktyvumas ne visada koreliuoja su PRB ląstelių augimu, yra paskelbę ir Kim su bendraautoriais [287], ir Bogovic-Matijasic ir Rogelj [288].

Vertinant temperatūros įtaką BPM susidarymui, didžiausi BPM aktyvumai nustatyti kultivuojant PRB žemesnėse nei optimalios jų augimo temperatūros: *P.*

pentosaceus KTU05-10, *P. acidilactici* ir *L. sakei* 30 °C temperatūroje (atitinkamai 320; 220 ir 310 AV/ml), o *P. pentosaceus* PRB KTU05-9 ir KTU05-8 25 °C (atitinkamai 270 ir 250 AV/ml) (3.11 lent.). Literatūroje taip pat sutinkama duomenų apie temperatūros poveikį bakteriocinų aktyvumui [109, 289, 290], pvz., Zhang su bendraautorais [290] nustatė, kad *P. acidilactici* PA003 sintetinių bakteriocinų aktyvumas pasiektas didžiausias prie 35 °C temperatūros, o Todorov ir Dicks [291] tyrė *P. pentosaceus* AT44AM gaminamų bakteriocinų aktyvumus 26, 30 ir 37 °C temperatūrose ir nustatė, kad šios kultūros kultivavimo temperatūra neturėjo reikšmingos įtakos bakteriocinų aktyvumui.



3.6 pav. Susidariusių BPM antimikrobinis aktyvumas, išreikštas slopinimo zonos skersmeniu (šulinėlio diametras neįskaičiuotas): a – kai inokuluota 0,01 %; ir b – 2 % PRB ląstelių: ▲ – KTU05-6; ◆ – KTU05-7; × – KTU05-8; + – KTU05-9; – – KTU05-10 kultūrų

3.11 lentelė. Kultivavimo temperatūros ir pH įtaka BPM aktyvumui

Auginimo sąlygos		Aktyvumas, AV/ml				
		<i>P. pentosaceus</i>			<i>P. acidilactici</i> KTU05-7	<i>L. sakei</i> KTU05-6
		KTU05-10	KTU05-9	KTU05-8		
Temperatūra, °C	20	200±28ab	200±0a	210±14a	130±28ab	260±0ab
	25	230±14cd	270±28acd	250±14bcd	160±14c	300±14ac
	30	320±0ac	200±14c	210±0c	220±14ac	310±14bd
	35	310±14bd	180±14d	200±14d	200±0b	260±0cd
pH	4,5	300±14	200±0ab	200±0ab	130±14ab	240±14ab
	5,5	320±0	270±14a	250±14a	200±14a	300±14a
	6,5	320±14	270±28b	250±14b	220±0b	310±0b

Vidutinių verčių reikšmės pažymėtos tokiomis pat raidėmis: a, b ir c parodo, kad yra esminiai skirtumai įvertinti pagal Dunkano kriterijų ($p \leq 0,05$) lyginant augimo sąlygas atskirai

Vertinant pH verčių įtaką PRB *L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 gaminamų BPM aktyvumui (3.11 lent.), nustatyta, kad didžiausias šių medžiagų antimikrobinis poveikis pasireiškė terpėse, kurių pH vertės buvo 5,5 ir 6,5, o terpės pH vertė 4,5 ženkliai sumažino BPM aktyvumą. pH įtaka bakteriocinų aktyvumui taip pat gali priklausyti nuo PRB padermės, pvz., Todorov ir Dicks [104] nustatė, kad *L. plantarum* ST28MS sintetinių bakteriocinų didžiausi aktyvumai nustatyti, kai PRB daugintos terpėse, kurių pH vertės buvo 6,0 ir 6,5, o bakteriocino ST26MS kai kerpės pH vertės buvo

5,0 ir 5,5. *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* bakteriocino ST33LB didžiausias aktyvumas susidarė, kai terpės pH vertė buvo 6 [101]. *L. plantarum* sintetinamų bakteriocinų AMA-K didžiausi aktyvumai nustatyti pH vertei esant 5,5 ir 6,0 [278].

Gauti tyrimų rezultatai patvirtino, kad *L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* BPM susidarymas priklauso nuo PRB padermės, temperatūros, inokulianto kiekio ir terpės pH verčių. Didžiausias PRB BPM antibakterinis poveikis prieš *B. subtilis* pasireiškė 15–30 val. laikotarpyje ir priklausė nuo PRB padermės, terpės pH verčių ir kultivavimo temperatūros. Optimaliausia temperatūra *P. pentosaceus* KTU05-10, *P. acidilactici* ir *L. sakei* BPM susidarymui yra 30 °C, o *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 padermių BPM – 25 °C. Tinkamiausia terpės pH vertė yra 6,5.

3.3.2. Įvairios kilmės augalinių produktų panaudojimo galimybės pieno rūgšties bakterijų kultivavimui ir metabolizmo produktų susidarymui

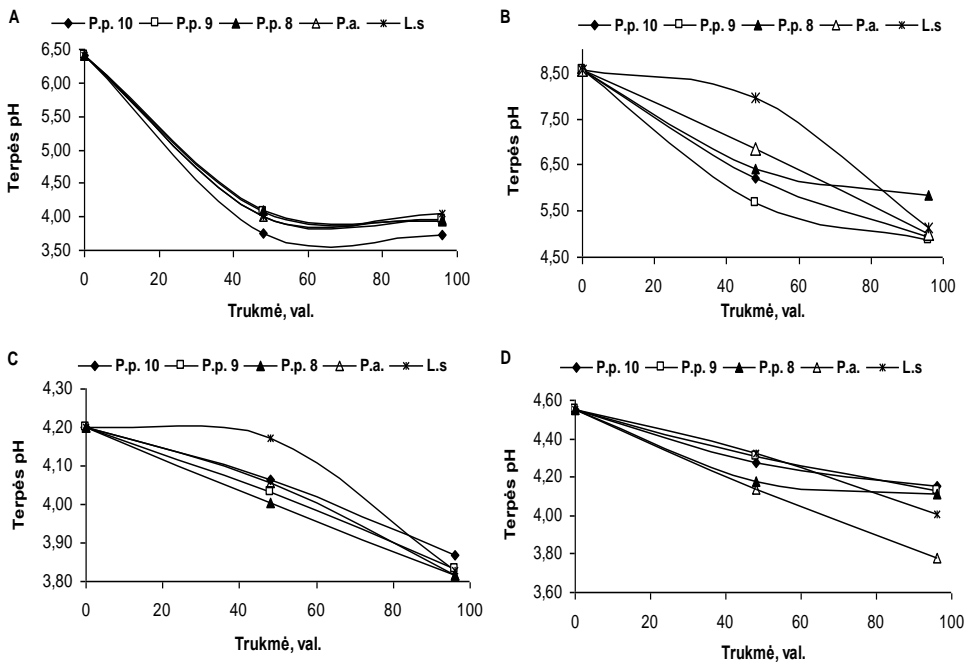
3.3.2.1. Maisto gamybos šalutiniai produktai

Pagrindinis PRB fermentacijos produktas, pasižymintis antimikrobiniu poveikiu, yra pieno rūgštis. Nors fermentacija yra seniai žinomas ir taikomas maisto pramonėje procesas, tačiau, tobulėjant tyrimų technikai, išaiškinama vis naujų faktų, į kuriuos reikėtų atkreipti dėmesį, pvz., nepageidautinų junginių formavimąsi pienarūgštės fermentacijos metu. Vienas iš pavojingiausių junginių, susidarančių taikant šias technologijas, yra D(-) pieno rūgšties izomeras, kuris negali būti metabolizuojamas žmonių virškinamajame trakte, o suvartojus didelį jo kiekį – gali sukelti acidozes, t. y. rūgščių ir šarmų pusiausvyros kraujyje sutrikimus. Pieno rūgšties D(-) izomero toksiškumas kelia ypatingą susirūpinimą, nes jis ypač pavojingas nusilpusiems ir sergantiems vaikams [292]. Dėl šių priežasčių labai svarbu užtikrinti, kad, parenkant fermentacijos technologijos sąlygas, galutiniame produkte būtų kuo mažesnis šio metabolito kiekis.

Šio tyrimo metu buvo įvertinta įvairių maisto gamybos šalutinių produktų panaudojimo galimybės pieno rūgšties ir D(-) izomero gamybai. Fermentuojant melasą, žlaugtus, salyklojus ir kviečių sėlenas, bioproduktų pH verčių priklausomybė nuo fermentacijos trukmės pateikta 3.7 paveiksle. Fermentuojant melasą, didžiausias pH verčių pokytis nustatytas naudojant *P. pentosaceus* KTU05-9 padermę, kai pH vertės sumažėjo nuo 8,56 iki 4,86. Fermentuojant sėlenas, terpės pH vertės sumažėjo nuo pradinės vertės 6,41 iki 3,73. Didžiausias pH verčių sumažėjimas sėlenų terpėje nustatytas po 48 val., fermentuojant su *P. pentosaceus* KTU05-10. Mažesni terpės pH pokyčiai nustatyti, fermentuojant žlaugtus ir salyklojus, atitinkamai nuo 4,20 iki 3,82 ir nuo 4,55 iki 3,75.

Vertinant PRB panaudojimo galimybes įvairių maisto gamybos šalutinių produktų fermentavimui ir pieno rūgšties gamybai, nustatyta, kad pieno rūgšties susidarymas priklausė tiek nuo terpės, tiek nuo PRB padermės. Nepaisant to, kad PRB skaičius kviečių sėlenų terpėje nustatytas ribose nuo 10,2 iki 10,8 log₁₀ KSV/g (3.8 pav.), tačiau pieno rūgšties kiekiai sėlenų terpėje buvo nuo 6,3 (*L. sakei*) iki 78,1 (*P. pentosaceus* KTU05-9) g/kg ir priklausė nuo PRB padermės (3.9 pav.). Fermentuotuose maisto gamybos šalutiniuose produktuose – melasoje, žlaugtuose, salyklojuose ir sėlenose pagrindinis pieno rūgšties izomeras buvo L(+), o D(-) izomero kiekiai nustatyti labai maži (iki 0,06 g/l). Nustatytas *P. pentosaceus*

KTU05-9 tinkamumas pieno rūgšties gamybai, fermentuojant ne tik kviečių sėlenų terpę, bet ir melasos, ir salyklojų terpes, kuriose pieno rūgšties kiekiai nustatyti atitinkamai 62,1 ir 65,6 g/kg. Su kitomis PRB padermėmis, fermentuojant melasą ir salyklojus, pieno rūgšties kiekiai buvo ženkliai mažesni. Tuo tarpu fermentuojant žlaugtus nustatytas *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8 ir *P. pentosaceus* KTU05-9 tinkamumas šių terpių fermentacijai, kadangi pieno rūgšties kiekiai nustatyti didžiausi ir sudarė atitinkamai 66,5, 74,6 ir 63,0 g/kg. Be to, žlaugtų terpėje gerai dauginosi visos tyrime naudotos PRB, jų skaičius nustatytas ribose nuo 9,0 iki 9,2 log₁₀ KSV/g. Koreliacija tarp PRB skaičiaus ir pieno rūgšties kiekio nenumatyta, t. y. pieno rūgšties susidarymas fermentacijos metu priklausė nuo fermentacijos terpės ir nepriklausė nuo PRB pajėgumo daugintis terpėse. Tai gali būti paaiškinama skirtinga sacharidų sudėtimi ir PRB gebėjimu juos asimiliuoti. Pieno rūgšties kiekis taip pat buvo įvertintas bulvių sulčių ir bulvių sulčių su ekstruduotais ryžiais terpėje. Didžiausias L(+) pieno rūgšties kiekis nustatytas fermentuojant bulvių sultis su *L. sakei* (24,3 g/l). Maisto gamybos šalutiniuose produktuose melasoje, žlaugtuose, salyklojuose ir sėlenose pagrindinis pieno rūgšties izomeras buvo L(+), o bulvių sulčių terpėse D(-) izomero kiekiai nustatyti didesni. Didžiausią D(-) pieno rūgšties kiekį bulvių sulčių terpėje gamino *L. sakei* (5,4 g/l), o mažiausią – *P. pentosaceus* KTU05-10 (1,6 g/l). Ekstruduočių ryžių priedai sumažino D(-) pieno rūgšties kiekį. Mažiausi D(-) pieno rūgšties kiekiai nustatyti bulvių sulčių terpėje su ekstrudatu priedais buvo naudojant *P. acidilactici* (0,5 g/l).



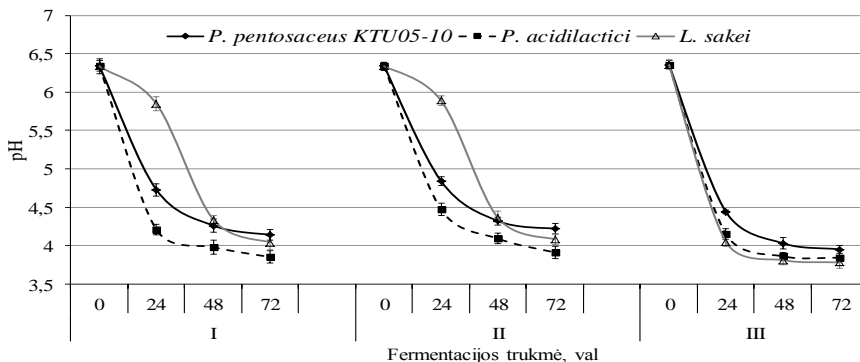
3.7 pav. pH verčių priklausomybė nuo fermentacijos trukmės terpėse: a – sėlenų; b – melasos; c – žlaugtų; d – salyklojų, fermentuojant su: L.s. – *L. sakei*; P.a. – *P. acidilactici*; P.p. 8 – *P. pentosaceus* KTU05-8; P.p. 9 – KTU05-9; P.p. 10 – KTU05-10 padermėmis

kiekiai ženkliai sumažėjo ir buvo labai nedideli (nuo 4 iki 23 % ir priklausė nuo PRB padermės), todėl bioproduktų, skirtų grūdų sėklos biologinės taršos mažinimui naudoti tinkantys.

3.3.2.2. *Krakmolingi augaliniai produktai*

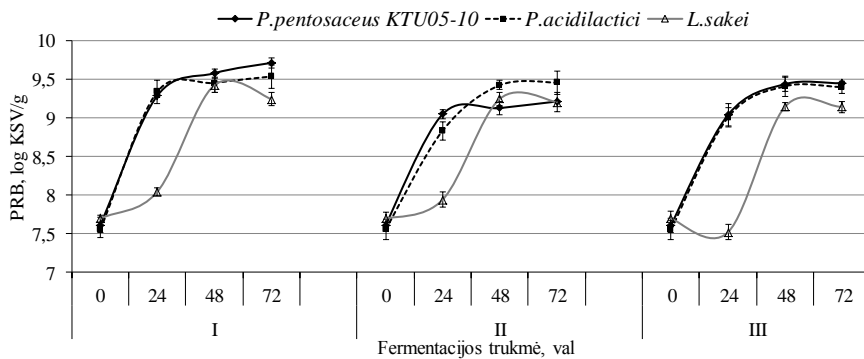
Kuriant PRB bioproduktą ekologiškai žemdirbystei, svarbu iširti pigių žaliavų panaudojimo galimybes jo gamyboje. Ieškant pigios žaliavos PRB dauginimui, svarbu atkreipti dėmesį į Lietuvoje gausiai auginamas daržoves. Vienos iš tokių yra bulvės. Šių tyrimų etapo metu buvo įvertinta skirtingai paruoštų bulvių terpių panaudojimo PRB dauginimui galimybės. Tam buvo tirtas didžiausiu antimikrobiniu aktyvumu prieš *Fusarium* genties grybus pasižymėjusių PRB *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 augimo galimybės įvairiose bulvių sulčių terpėse ir aktyviojo rūgštingumo priklausomybė nuo fermentacijos trukmės.

Bulvių terpės įtaka pH verčių pokyčiams fermentacijos metu. pH verčių priklausomybė nuo fermentacijos trukmės įvairiai paruoštose bulvių terpėse: bulvių sulčių terpėje; bulvių sulčių terpėje, atskyrus nusistovėjusį krakmolą; ir tarkuotų bulvių masėje, fermentuojant su *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10, pateikta 3.10 paveiksle. Nustatyta *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 padermių greita adaptacija bulvių sulčių terpėse tiek su krakmolu, tiek atskyrus nusistovėjusį krakmolą – intensyviausi pH verčių pokyčiai vyko per pirmąsias 24 val., o *L. sakei* intensyviausi pH pokyčiai įvyko per 48 val. Vertinant pH verčių pokyčius fermentacijos metu tarkuotų bulvių terpėje, pastebėtos panašios tendencijos, kaip ir bulvių sulčių terpėse, išskyrus *L. sakei* fermentuojamų terpių pH verčių pokyčius – čia nustatytas intensyvus pH verčių sumažėjimas per pirmąsias fermentacijos 24 val. Po 48 val. fermentacijos žemiausios pH vertės pasiektos terpėse su *P. acidilactici* buvo 3,96, 4,09 ir 3,81 atitinkamai bulvių sulčių terpėje, bulvių sulčių terpėje, atskyrus nusistovėjusį krakmolą ir tarkuotų bulvių masėje, o po 72 val. fermentacijos nustatytos pH vertės buvo lygios atitinkamai 3,85, 3,91 ir 3,78. Ilgesnė fermentacija (72 val.) reikšmingai sumažino terpės rūgštingumą, fermentuojant su *L. sakei* bulvių sulčių terpėje ir bulvių sulčių terpėje atskyrus krakmolą, atitinkamai 6,9 ir 6,4 %.



3.10 pav. pH verčių priklausomybė nuo trukmės bulvių sulčių terpėse: I – neatskyrus krakmolo; II – atskyrus krakmolą; III – tarkuotų bulvių terpėje, fermentuojant su PRB

Bulvių terpės įtaka PRB augimui fermentacijos metu. PRB augimo priklausomybė nuo trukmės skirtingose bulvių sulčių terpėse pateikta 3.11 paveiksle. Tyrimo rezultatai parodė, kad 72 val. fermentacijos metu, bulvių sulčių terpėse *P. pentosaceus* KTU05-10 ir *P. acidilactici* bakterijų skaičius didėjo. Didžiausi *P. pentosaceus* KTU05-10 ir *P. acidilactici* bakterijų kiekiai nustatyti po 72 val. fermentacijos buvo 9,71 ir 9,53 log₁₀ KSV/ml bulvių sulčių terpėje, neatskyrus krakmolo, ir 9,21 ir 9,45 log₁₀ KSV/ml bulvių sulčių terpėje, atskyrus krakmolą. *L. sakei*, didžiausias bakterijų skaičius nustatytas po 48 val. fermentacijos bulvių sulčių terpėje, neatskyrus krakmolo buvo 9,42 log₁₀ KSV/ml, ir bulvių sulčių terpėje su atskirtu krakmolu buvo 9,02 log₁₀ KSV/ml. Rezultatai parodė, kad bakterijų augimo intensyvumas priklauso nuo terpės sudėties, PRB rūšies ir fermentavimo trukmės. Gauti tyrimų rezultatai patvirtino, kad bulvių terpė yra tinkama ir gali būti naudojama PRB dauginimui.

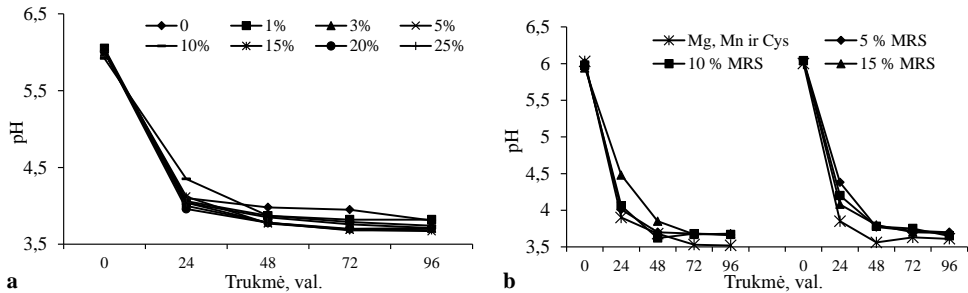


3.11 pav. PRB augimo priklausomybė nuo trukmės bulvių sulčių terpėse: I – neatskyrus krakmolo; II – atskyrus krakmolą; III – tarkuotų bulvių, fermentuojant su PRB

Ekstrudatų priedo įtaka fermentuoto produkto pH vertėms, bendram titruojamajam rūgštingumui, reologinėms savybėms ir PRB augimui. Šių tyrimų etapo metu įvertinta ekstruduotų ryžių, magnio ir mangano druskų ir cisteino priedų poveikis antimikrobiniui aktyvumu pasižymėjusių PRB *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 mišinio dauginimui, panaudojant įvairius ekstruduotų ryžių produkto kiekius (1, 3, 5, 10, 15, 20 ir 25 % bulvių masės). pH verčių priklausomybė nuo fermentacijos trukmės pateikta 3.12 paveiksle. Fermentacijos metu terpės pH vertės visais atvejais mažėjo. Sparčiausias pH verčių mažėjimas nustatytas po 24 val. fermentacijos. Naudojant ekstrudatų priedus terpės pH vertės nustatytos mažesnės lyginant su bulvių sulčių terpe be ekstrudatų priedo. Didinant ekstruduotų ryžių kiekį terpės pH nežymiai mažėjo. Žemiausias terpės pH nustatytas naudojant 5 ir 10 % ekstruduotų ryžių ir MgSO₄·7H₂O, MnSO₄·4H₂O ir cisteino-HCl·H₂O priedą po 48–72 val. fermentacijos (atitinkamai 3,5–3,7 ir 3,5–3,6) (3.12 b pav.). Mažiausios pH vertės nustatytos ilgesnės fermentacijos metu (48–72 val.) terpėse su ekstrudatų priedais.

Bioproduktų reologinės savybės, tokios kaip kietumas, tirštumas ir lipnumas, nustatytos prieš fermentaciją ir po 72 val. fermentacijos, pateiktos II priedo 1 lentelėje. Ekstruduotų ryžių priedas didino tiek terpės prieš fermentaciją, tiek ir

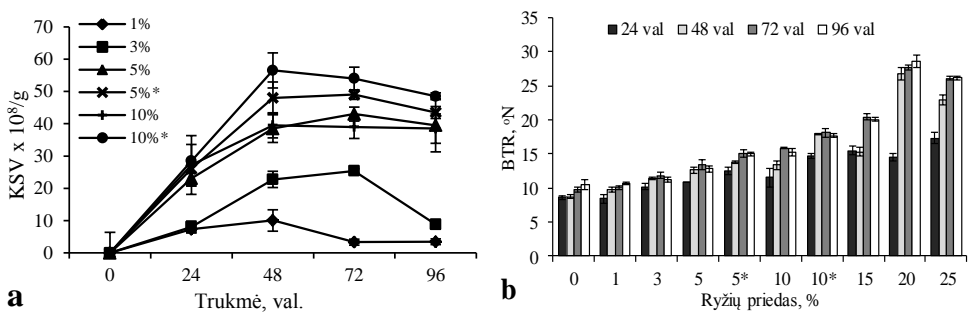
bioproducto kietumą, tirštumą ir lipnumą. Po fermentacijos išryškėjo bioproducto kietumo ir tirštumo sumažėjimas, ypač naudojant didesnį ekstrudatų priedo kiekį. Didesnis ekstrudatų priedo kiekis sąlygojo didesnę bioproducto kietumą ir tirštumą.



3.12 pav. pH verčių priklausomybė nuo fermentacijos trukmės bulvių sulčių terpėse: a – su įvairiais ekstrudatų priedais; b – su MRS terpės, magnio, mangano ir cisteino priedais, naudojant 5 % (b, kairėje) ir 10 % (b, dešinėje) ekstruduotų ryžių produkto

PRB mišinio, sudaryto iš *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10, augimo priklausomybė nuo fermentacijos trukmės bioproducto gamybos metu iki 96 val. fermentacijos, naudojant 1, 3, 5 ir 10 % ekstruduotų ryžių priedą bei magnio, mangano druskų ir cisteino priedus, kultivuojant 35 °C temperatūroje pateikta 3.13 a paveiksle. PRB intensyviausiai augo iki 48 val. fermentacijos naudojant 5 ir 10 % ekstruduotų ryžių bei magnio, mangano druskų ir cisteino priedus, o 48–72 val. laikotarpyje PRB skaičius kito nežymiai. Mažiausias PRB ląstelių skaičius nustatytas terpėse su 1 ir 3 % ekstruduotais ryžiais. Visais atvejais pastebėtas PRB ląstelių skaičiaus mažėjimas po 96 val. fermentacijos.

Nustatyta, kad ekstruduotų ryžių ir bulvių terpė tinkama PRB dauginimui, todėl gali būti naudojama bioproducto gamybai. Optimaliam fermentacijos procesui pasiekti rekomenduojama 48–72 val. fermentacija.



3.13 pav. a – PRB augimo priklausomybė nuo trukmės; b – terpės BTR pokyčiai, (*naudoti magnio, mangano druskų ir cisteino priedai)

Bioproductų su įvairiais ekstruduotų ryžių priedais BTR vertės pateiktos 3.13 b paveiksle. Ekstruduotų ryžių priedas ir magnio, mangano druskų ir cisteino priedai didina terpės BTR vertes. Didžiausios BTR vertės nustatytos naudojant 20 ir 25 % ekstruduotų ryžių produktų priedą (atitinkamai 27,8 ir 26,0 °N) po 72 val.

fermentacijos. Ženkiausias BTR padidėjimas nustatytas iki fermentacijos 72 val., o ilgėjant fermentacijos trukmei iki 96 val. BTR vertės nekito. Didinant ekstrudatų priedo kiekį terpės drėgnis mažėjo. Nustatytas vidutinio stiprumo koreliacinis ryšys ($R^2 = 0,825, 0,737$ ir $0,878$ atitinkamai po 24, 48 ir 72 val. fermentacijos) tarp terpės drėgnio ir bioproducto BTR verčių, fermentuojant bulvių terpę su PRB mišiniu (II priedo 1 pav.).

3.3.3. Temperatūrų įtaka pieno rūgšties bakterijų rūšiniams pokyčiams duonos raugų fermentacijos gamybinėse sąlygose metu

Dauginant raugus kepyklose ne visada yra užtikrinama pastovi temperatūra. Kai kurie duonos raugai, ypač termofilinių bakterijų, kepyklose dauginami fermentatoriuose griežtai kontroliuojant fermentacijos temperatūrą. Tačiau daugumoje kepyklų raugai ruošiami kubiluose kepyklos patalpose neužtikrinant pastovios temperatūros. Taip dauginant raugus kepykloje temperatūra kinta priklausomai nuo metų laikotarpio, o temperatūros pokyčiai skirtingų sezono laikotarpių metu gali turėti įtakos PRB rūšių sudėčiai rauguose.

Šių tyrimų etapo tikslas buvo įvertinti temperatūros pokyčių kepyklose, skirtingų metų laikotarpiu įtaką PRB populiacijai. Tam buvo rinkti raugų mėginiai iš kepyklos žiemos metu vieno mėnesio laikotarpyje (tuo metu raugų dauginimo patalpose buvo 18 °C temperatūra). Po to, papildomai raugai buvo dauginami 25 °C temperatūroje imituojant vasaros laikotarpio temperatūrą kepykloje.

Dominuojanti PRB mikroflora pirmą eksperimento dieną ir po 10 savaičių fermentacijos buvo vertinta pagal *ps*-PGR elektroforezės spektrus agarozės gelyje. Pagal paliktus pėdsakus agarozės gelyje PRB izoliatai suskirstyti į grupes, iš kurių po vieną atsitiktinai atrinktos PRB genetiškai identifikuotos, kad būtų galima nustatyti PRB rūšį. *ps*-PGR elektroforezės ir sekvenavimo rezultatų suvestinė pateikta 3.12 lentelėje. Pagal iš pirmos raugų fermentacijos dienos gautus rezultatus buvo išskirtos ir identifikuotos PRB rūšys: *L. sanfranciensis*, *L. crustorum*, *L. curvatus* ir *L. plantarum / pentosus*. Tuo tarpu po 10 savaičių fermentacijos, kai raugai 6 savaites dauginami imituojant vasaros sezono temperatūrą kepykloje (25 °C), išskirtos ir identifikuotos kitos PRB rūšys: *L. paraalimentarius*, *L. brevis*, *L. spicheri*, *L. fabifermentans*, *L. plantarum / pentosus / paraplantarum*, *L. crustorum* ir *L. sanfranciensis*.

Palyginamasis dominuojančios PRB rūšinės sudėties įvertinimas, dauginant raugus 18 °C temperatūroje ir imituojant vasaros laikotarpio temperatūrą (dauginant 25 °C) pateiktas 3.13 lentelėje. Ruginiame ir kvietiniame rauguose (fermentuotuose ~18 °C) dominavo *L. sanfranciscensis*, atitinkamai 78,1 ir 93,1 % išskirtų izoliatų. Be to, iš kvietinio raugo išskirtos *L. curvatus* sudarė 6,9 %, o iš ruginio raugo išskirtos *L. crustorum* ir *L. plantarum* rūšies bakterijos sudarė atitinkamai 16,6 ir 6,3 %. Pakėlus temperatūrą iki 25 °C, imituojant vasaros laikotarpio temperatūrą kepyklose, ruginiuose rauguose dominuojanti PRB rūšinė sudėtis stipriai pasikeitė: PRB 16S rDNR geno sekos metodu ruginiame rauge identifikuotos *L. sanfranciscensis* sudarė 14,8 %, o naujai išskirtos *L. paraalimentarius*, *L. spicheri*, *L. fabifermentans* ir *L. brevis* sudarė atitinkamai 37,0, 18,5, 14,8 ir 3,7 %. Kvietiniame rauge PRB rūšių pokyčiai nebuvo ryškūs. Pagrindinė dominuojanti *L. sanfranciscensis* išliko ir

sudarė didžiąją dalį PRB izoliatų, o vietoj *L. curvatus* rastos dvi naujos padermės, *L. paraalimentarius* ir *L. crustorum*, sudarė vos po 3,2 % išskirtų izoliatų.

3.12 lentelė. PRB identifikavimas 16S rDNR geno sekos metodu rauguose, dauginuose 18 ir 25 °C temperatūrose

Pirma eksperimento diena – fermentacija kepykloje 18 °C temperatūroje			Paskutinė eksperimento diena - po 10 savaičių fermentacijos, iš jų paskutinės 6 savaitės 25 °C temperatūroje		
Grupė ^e	Padermė	PRB rūšis	Grupė ^h	Padermė	PRB rūšis
I	MR9	^a <i>L. sanfranciensis</i>	I	W2	^a <i>L. sanfranciensis</i>
	MR25.4	<i>L. sanfranciensis</i>		R1	<i>L. sanfranciensis</i>
	MR29	<i>L. sanfranciensis</i>	II	R7	^b <i>L. paraalimentarius</i>
	MW4	<i>L. sanfranciensis</i>		III	R26
	MW23	<i>L. sanfranciensis</i>	IV	R11	^d <i>L. spicheri</i>
II	MW5	^b <i>L. curvatus</i>	V	R25	^e <i>L. fabifermentans</i>
	MW11	<i>L. curvatus</i>	VI	R5	^f <i>L. plantarum/ pentosus/ paraplantarum</i>
III	MR6	^c <i>L. nantensis / crustorum</i>	VII	W19	^g <i>L. crustorum</i>
	MR19	<i>L. nantensis / crustorum</i>		R21	<i>L. crustorum</i>
	MR26	<i>L. nantensis / crustorum</i>		R26	<i>L. crustorum</i>
	MR28	<i>L. nantensis / crustorum</i>			
IV	MR24	^d <i>L. plantarum / pentosus</i>			

^a*L. sanfranciensis* (bendras izoliatų kiekis 68);
^b*L. curvatus* (bendras izoliatų kiekis 2); ^c*L. nantensis* ar *L. crustorum* (bendras izoliatų kiekis 5); ^d*L. plantarum* ar *L. pentosus* (bendras izoliatų kiekis 2); ^eRemiantis sekvenavimo rezultatais izoliatai suskirstyti į keturias grupes.

^a*L. sanfranciensis* (bendras izoliatų kiekis 33);
^b*L. paraalimentarius* (bendras izoliatų kiekis 11);
^c*L. brevis* (bendras izoliatų kiekis 10); ^d*L. spicheri* (bendras izoliatų kiekis 5); ^e*L. fabifermentans* (bendras izoliatų kiekis 4); ^f*L. plantarum/pentosus/paraplantarum* (bendras izoliatų kiekis 1); ^g*L. nantensis* ar *L. crustorum* (bendras izoliatų kiekis 3); ^hRemiantis sekvenavimo rezultatais izoliatai suskirstyti į septynias grupes.

3.13 lentelė. PRB rūšinės sudėties pokyčiai duonos rauguose, %

Raugų dauginimo temperatūra	PRB rūšinė sudėtis, %	
	~18 °C	25 °C
Ruginis raugas		
<i>L. sanfranciscensis</i>	78,1	14,8
<i>L. crustorum</i>	15,6	7,4
<i>L. plantarum/pentosus/ paraplantarum</i>	6,3	3,7
<i>L. paraalimentarius</i>	-	37,0
<i>L. spicheri</i>	-	18,5
<i>L. fabifermentans</i>	-	14,8
<i>L. brevis</i>	-	3,7
Kvietinis raugas		
<i>L. sanfranciscensis</i>	93,1	93,6
<i>L. curvatus</i>	6,9	-
<i>L. crustorum</i>	-	3,2
<i>L. paraalimentarius</i>	-	3,2

PRB rūšies pokyčius ruginiame rauge dešimties savaičių fermentacijos metu imituojuojant vasaros laikotarpio temperatūrą kepykloje įrodė taip pat polimerazės

grandininės reakcijos ir denatūruojančio gradiento gelio elektroforezės metodus (PGR-DGGE). PGR-DGGE analizės rezultatai parodė, kad, pakėlus raugų fermentacijos temperatūrą iki 25 °C ruginiuose rauguose fermentacijos metu, pagal PGR-DGGE gautus spektrų pokyčius aptikti nauji atspaudai, kurie ir atitinka naujas PRB rūšis. Nustatyta, kad temperatūros pokyčiai skirtingų sezono laikotarpių metu gali turėti įtakos PRB rūšių sudėčiai rauguose. Pagal PGR-DGGE elektroforezės rezultatus galime teigti, kad dominuojančios PRB kvietiniame rauge buvo *L. sanfranciscensis*. Ruginiame rauge *L. sanfranciscensis* rūšies PRB dominavo tik rauguose, dauginuose 18 °C temperatūroje. Be to, ruginiame rauge nustatytos *L. curvatus*, *L. crustorum* ir *L. plantarum* arba *L. pentosus* rūšies PRB, kurios neaptiktos kvietiniame rauge.

Vertinant PRB populiacijos pokyčius lietuviškuose duonos rauguose M, GH ir GL, surinktuose iš kepyklų žiemos sezono metu vieno mėnesio laikotarpyje, nenustatyta PRB rūšių pasikeitimų. Vieno mėnesio laikotarpyje rauge GH dominavo *L. frumenti*, *L. panis*, *L. amylovorus*; rauge GL dominavo *L. amylovorus*, *L. rossiae*, o rauge M – *L. crustorum* ir *L. rossiae* bakterijų rūšys. PRB populiacijos stabilumui įtakos galėjo turėti pastovi fermentacijos temperatūra kepykloje.

Apibendrinant tyrimų rezultatus galima teigti, kad temperatūros pokyčiai skirtingų sezonų metu gali turėti įtakos PRB populiacijai. Nustatyta, kad pakeitus fermentacijos temperatūrą iš 18 °C (būdinga žiemos laikotarpiui kepyklose) į 25 °C (būdinga vasaros laikotarpiui kepyklose) ruginiuose rauguose pasikeitė PRB populiacija: sumažėjo tipinė raugų mikroflora – *L. sanfranciscensis*, *L. crustorum* – ir atsirado naujos PRB rūšys – *L. brevis*, *L. fabifermentans*, *L. spicheri*, *L. paraalimentarius*. PRB populiacijos pokyčiai priklausė ne tik nuo fermentacijos temperatūros, bet ir nuo naudotos raugų ruošimui žaliavos; ir labiau kito raugų gamybai naudojant ruginę žaliavą, nei kvietinę.

3.3.4. Bakteriofagai ir jų įtaka pieno rūgšties bakterijų pokyčiams raugų dauginimo gamybinėse sąlygose metu

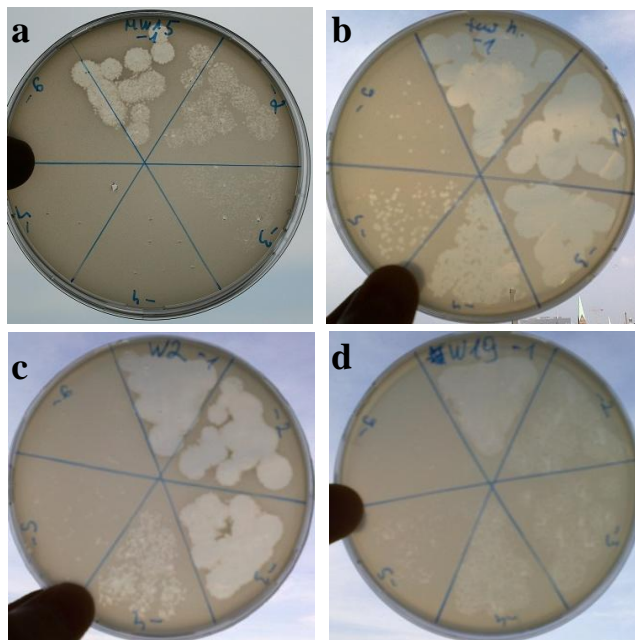
Duonos raugai stipriai įtakoja kepinų kokybę – suteikia kepinui pageidautiną skonį, aromatą, tekstūros savybes, pasižymi antimikrobiniu poveikiu. Raugų kokybę lemia rauge dominuojantys mikroorganizmai, t.y. mielės ir PRB, o taip pat jų sudėtis ir kiekis. Taigi norint gauti pastovią kepinio kokybę, svarbu užtikrinti pastovią pradinių kultūrų populiaciją rauguose. Tačiau raugų dauginimo metu į terpę gali patekti bakteriofagai – bakterijas infekuojantys virusai. Šie mikroorganizmai fermentacijos procesą gali pakreipti nepageidautina linkme, dėl to nebus gautas pageidautinų savybių kokybiškas produktas.

Siekiant įvertinti PRB populiacijos pokyčius duonos raugų dauginimo metu ir išskirti bei genetiškai identifikuoti rauguose vyraujančius bakteriofagus, o taip pat nustatyti jų įtaką PRB, iš Lietuvos kepyklų mėnesio laikotarpyje surinkti duonos raugų (GL, GH ir M) mėginiai (iš viso – 84 mėginiai). Be to, mėnesio laikotarpyje rinkti dviejų rūšių raugai (kvietinis ir ruginis) iš Danijos kepyklos (iš viso – 40 mėginių), kurie vėliau papildomai dar šešias savaites dauginami laboratorijoje (iš viso – 60 mėginių) pagal kepykloje naudojamą receptūrą.

PRB kiekis kvietiniuose ir ruginiuose rauguose, dauginuose tiek kepykloje, tiek laboratorijoje, buvo 10^9 – 10^{10} KSV/g ribose. Vertinant PRB kolonijų ant agarų paviršiaus išvaizdą (formą, dydį, atspalvį), pastebėta, kad išaugusių PRB išvaizda skyrėsi visu fermentacijos laikotarpiu, netgi fermentuojant toje pačioje temperatūroje. Tai patvirtino, kad ilgos fermentacijos metu dominuojančios PRB padermės neišliko ir buvo pakeistos kitomis, todėl bendras PRB skaičius liko nepakitęs. Tai gali būti paaiškinama tuo, kad duonos raugų fermentacijos metu vyrauja įvairių rūšių ir padermių PRB. Dėl to jautrios PRB ląstelės pakeičiamos kitomis padermėmis, patekusiomis į terpę daugiausia su žaliavomis.

Norint surasti ir išskirti bakteriofagą, reikia turėti jam jautrią bakterinę ląstelę, todėl iš raugų pirmos fermentacijos (eksperimento) dienos išskirti 77 PRB izoliatai ir iš paskutinės fermentacijos dienos buvo išskirti 69 PRB izoliatai, kurie buvo naudoti bakteriofagų paieškai mėginiuose, kaip jiems jautrios PRB ląstelės. Naudojant dvisluoksnio agarų metodą, iš viso iš daniškų duonos raugų buvo išskirti keturi bakteriofagai Φ MR29, Φ MW15, Φ W2 ir Φ W19, infekuojantys keturias skirtingas PRB padermes, priklausančias *L. sanfranciscensis* ir *L. crustorum* rūšims. Iš jų dvi išskirtos iš fermentuotų raugų 18 °C temperatūroje (*L. sanfranciscensis* MR29 ir MW15 padermės) ir dvi PRB – iš raugų, fermentuotų 25 °C temperatūroje (*L. sanfranciscensis* W2 ir *L. crustorum* W19). Bakteriofagų kolonijų morfologinis vaizdas ant agarų lėkštelių pateiktas 3.14 paveiksle.

Bakteriofagai Φ MR29 ir Φ W2 formuoja ~1–1,5 mm skersmens skaidrias bakterijų slopinimo zonas, o bakteriofagai Φ MW15 ir Φ W19 ant agarų lėkštelių formuoja labai mažas – mikro zonas, ~0,2 mm skersmens.



3.14 pav. Bakteriofagų: a – Φ MW15; b – Φ MR29; c – Φ W2; d – Φ W19, kolonijų morfologinė išvaizda ant agarų lėkštelių

Vertinant bakteriofagų koncentraciją duonos rauguose, nustatyta, kad bakteriofagai, atakuojantys *L. sanfranciscensis* MR29 ląsteles, rasti tik ruginiame rauge ir gyvybingi išliko 8 dienų fermentacijos laikotarpyje; jų titras buvo 10^3 – 10^6 KSV/g ribose. Bakteriofagai, atakuojantys *L. sanfranciscensis* MW15 ląsteles, aptikti ir ruginiuose ir kvietiniuose daniškuose duonos rauguose. Kvietiniame rauge šie bakteriofagai gyvavo devynias fermentacijos dienas, o jų titras buvo 10^2 – 10^6 KSV/g ribose, o ruginiame rauge – keturiolika fermentacijos dienų ir jų titras neviršijo 10^3 KSV/g. Didžiausia bakteriofagų koncentracija, nustatyta mėginyje W29/1, buvo $8 \cdot 10^5$ KSV/g ir tokia išliko tik 1 dieną. Tuo tarpu bakteriofagų, atakuojančių *L. sanfranciscensis* W2 ląsteles, titras rauguose buvo 10^2 – 10^3 KSV/g. *L. sanfranciscensis* W2 padermės nebuvo dominuojančios pirmomis fermentacijos dienomis, jos buvo išskirtos tik po 10 savaičių fermentacijos. Bakteriofagai, atakuojantys *L. sanfranciscensis* W2 ląsteles, aptikti tik ruginiuose daniškuose duonos rauguose, kur jie gyvavo dvylika fermentacijos dienų; jų titras rauguose buvo 10^2 – 10^3 KSV/g ribose. Bakteriofagai, atakuojantys PRB W19 ląsteles, buvo aptikti tik kvietiniame rauge, mažomis koncentracijomis, dviejų fermentacijos dienų laikotarpyje 10^2 – 10^3 KSV/g ribose. Gali būti, kad bakteriofagai Φ W19 yra profagai, kurie integruojasi į ląstelės-šeimininkės vidų, jos nesuardydami auga kartu su ląstele ir tik esant tam tikriems aplinkos poveikiams išsilaisvina į terpę, suardydami ląstelę.

Vertinant bakteriofagams jautrių bakterinių ląstelių spektrą nustatyta, kad *L. sanfranciscensis* MR29 ląstelės jautrios tik bakteriofagai Φ MR29, o *L. crustorum* W19 ląstelės jautrios tik bakteriofagai Φ W19. Tuo tarpu *L. sanfranciensis* MW15 ląstelės jautrios bakteriofagai Φ MW15 ir Φ W19 (3.14 lent.). Nustatyta, kad *L. sanfranciensis* W2 ląstelės yra jautrios visiems keturiems bakteriofagams – Φ W2, Φ W19, Φ MR29 ir Φ MW15. Bakteriofagai Φ MW15 jautri *L. sanfranciscensis* MW15 padermė, pirmą raugų vertinimo dieną kvietiniame rauge sudarė 21 % PRB izoliatų, o po 10 savaičių fermentacijos nebuvo rasta tarp išskirtų PRB izoliatų. Be to, lyginant PRB *ps*-PGR elektroforezės spektrus iš pirmos ir paskutinės fermentacijos dienos, nustatyta, kad bakteriofagai MR29 jautri *L. sanfranciscensis* MR29 padermė, išskirta iš pirmos ruginio raugo fermentacijos dienos buvo dominuojanti padermė ruginiame rauge ir sudarė 72 %, o po dešimt savaičių fermentacijos nebebuvo aptikta tarp PRB izoliatų.

3.14 lentelė. PRB ląstelių jautrumas bakteriofagams

PRB padermės	Bakteriofagai			
	Φ MR29	Φ MW15	Φ W2	Φ W19
<i>L. sanfranciensis</i> MR29	+	-	-	-
<i>L. sanfranciensis</i> MW15	-	+	-	+
<i>L. sanfranciensis</i> W2	+	+	+	+
<i>L. crustorum</i> W19	-	-	-	+
<i>L. sakei</i> KTU05-6	-	-	-	-
<i>P. acidilactici</i> KTU05-7	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> KTU05-8	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> KTU05-9	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> KTU05-10	-	-	-	-

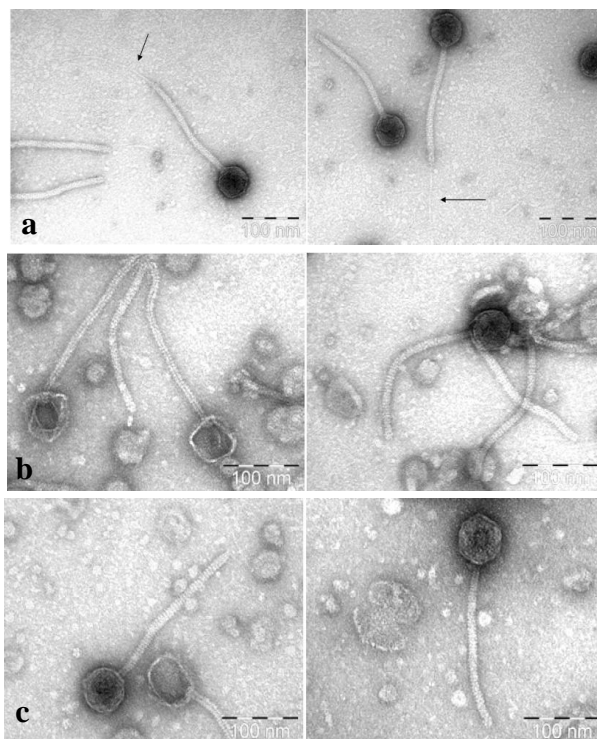
+ Jautrios bakteriofagams PRB; - bakteriofagų slopinamasis poveikis PRB nepasireiškė

Lyginant padermių pokyčius fermentacijos metu, buvo sudarytos dendrogramos BioNumerics 7.1 kompiuterine programa (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgija) pagal PRB *ps*-PGR produkto elektroforezės spektrus agarozės gelyje (III priedo 1 pav.). Nustatyta, kad dešimt savačių trukmės fermentacijos laikotarpyje įvyko žymūs PRB populiacijos pokyčiai.

Vertinant bakteriofagų neigiamą poveikį PRB *L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10, išskirtoms iš duonos raugų ir pasižymėjusioms plačiu antimikrobinio poveikio spektru bei fitaziniu aktyvumu, nustatyta, kad šių PRB ląstelės nebuvo jautrios iš raugų išskirtiems bakteriofagams Φ MW15, Φ MR29, Φ W2 ir Φ W19.

Sukoncentruoti ir išgryninti bakteriofagai, mikroskopuoti transmisiniu elektroniniu mikroskopu (3.15 pav.). Bakteriofagai Φ MW15, Φ MR29 ir Φ W2 atakuojantys *L. sanfranciscensis*, priklauso *Siphoviridae* šeimai ir pagal morfologiją priskirti B1 tipui. Bakteriofagų Φ MR29 ir Φ MW15 uodegėlės ilgis – po 360 nm. Tuo tarpu bakteriofagas Φ W2 turi uodegėlę, sudarytą iš storosios jos dalies, kurios ilgis 190 nm, ir labai plonytės uodegėlės, kurios ilgis 160 nm. Bendras šio bakteriofago uodegėlės ilgis 350 nm.

Buvo rasta daugybė tuščių bakteriofagų Φ MR29 ir Φ MW15 galvų (3.15 b ir c pav.), galimai dėl jautrumo ir mažo stabilumo naudotoms koncentravimo ir gryninimo sąlygoms. Deja, bakteriofago Φ W19 nepavyko sukoncentruoti dideliais kiekiais, reikalingais jo išgryninimui naudojant CsCl gradientą, todėl jis nebuvo identifikuotas.



3.15 pav. Iš duonos raugų išskirti bakteriofagai: a – Φ W2; b – Φ MR29; c – Φ MW15

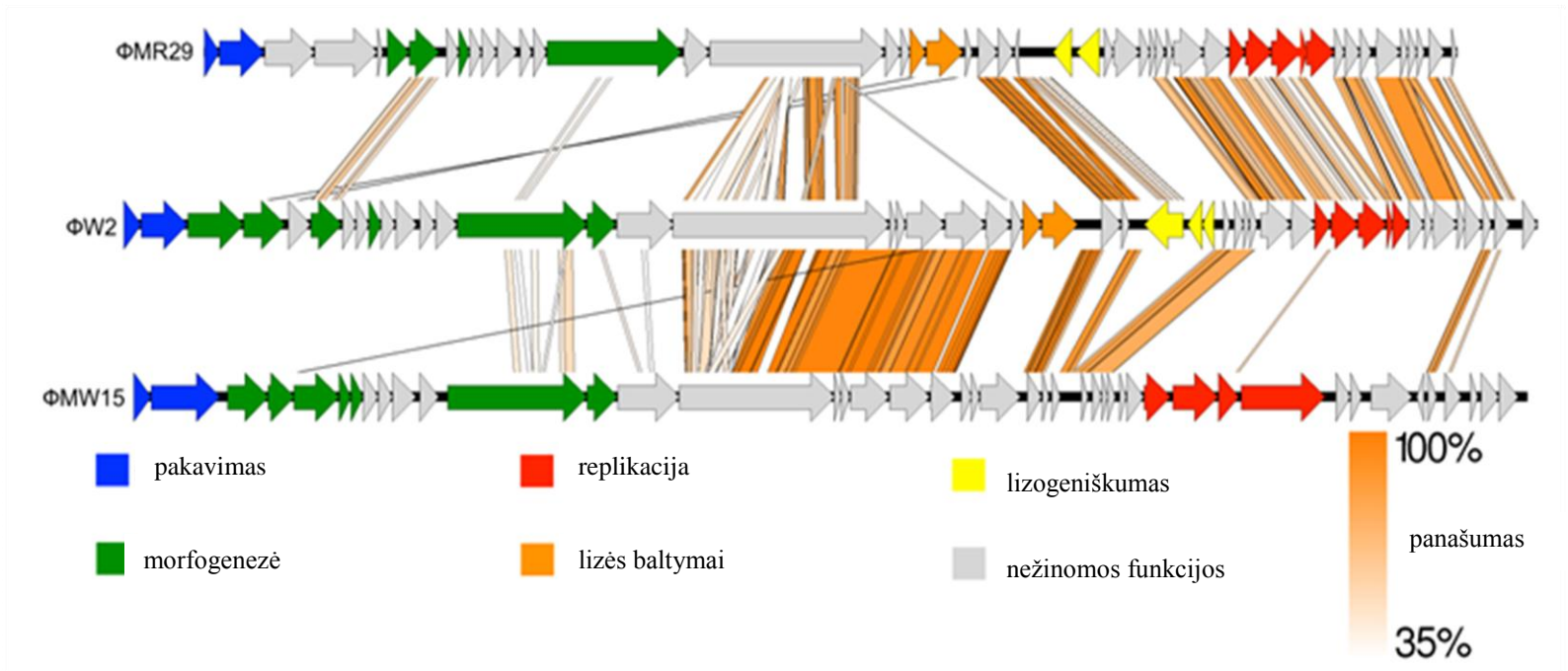
Sekvenuotų bakteriofagų pagrindinės genomo savybės, tokios kaip dydis, citozino ir guanino kiekis pateiktos 3.15 lentelėje. Bakteriofagų genomų dydžiai nustatyti nuo 34896 iki 39375 bp. Bakteriofagų ΦW2 ir ΦMR29 genomai turi po 49 koduojančias sekas, o bakteriofago ΦMW15 genomas sudarytas iš 45 koduojančių sekų.

3.15 lentelė. Sekvenuotų bakteriofagų genomų savybės

Bakteriofagas	Genomo dydis, bp	Guanino ir citozino kiekis	Koduojančių sekų skaičius
ΦW2	39375	40,8%	49
ΦMR29	34896	37,2%	49
ΦMW15	38820	37,1%	45

Atliktas schematinis sekvenuotų bakteriofagų DNR genomų koduojančių sekų palyginimas pateiktas 3.16 paveiksle. Atpažintos penkios koduojančios sekos atsakingos už bakteriofagų DNR susipakavimą, morfogenezę, replikaciją, lizės baltymus, lizogeniškumą, o taip pat aptikta daugybė kitas funkcijas koduojančių genų sekų, kurios nėra atpažintos. Lyginant, iš duonos raugų išskirtų, bakteriofagų genomų koduojančių sekų funkcijas tarpusavyje išryškėja skirtumai tarp bakteriofagų genomų, kas patvirtina jų savitumą. Nustatyta, kad bakteriofagų ΦW2, ΦMR29 ir ΦMW15 genomų koduojančios sekos tarpusavyje labai skiriasi, be to skiriasi genų išsidėstymas ir dydis. Tai nulemia jų selektyvumą, skirtingą vystymąsi, jautrumą gryninimo sąlygoms, bakterinių ląstelių-šeimininkų spektrą, konkurencingumą tarp kitų fagų ir kitas funkcijas. Atpažintos bakteriofagų ΦW2 ir ΦMR29 lizogeniškumo funkcijos atsakingos už bakteriofago nukleino rūgšties įterpimą į bakterinę ląstelę ir lizogeninį ciklą, tuo tarpu bakteriofago ΦMW15 genome šios funkcijos nenustatytos. Schematinis sekvenuotų bakteriofagų DNR genomų palyginimo vaizdas parodo, kad bakteriofagų ΦW2 ir ΦMR29 genominės DNR sekos yra panašesnės nei bakteriofago ΦMW15.

Gauti tyrimai patvirtina, kad duonos raugų mikroorganizmai yra ne tik mielės, PRB, bet ir maži mikroorganizmai – bakteriofagai, galintys infekuoti PRB ir tokiu būdu pakeisti jų populiaciją ilgalaikės duonos raugų fermentacijos metu. Taigi ilgalaikės raugų fermentacijos metu pradinės PRB kultūros gali nebeišlikti ir būti pakeistos kitomis padermėmis, kurios gali sąlygoti visiškai kitas galutinio produkto savybes, todėl svarbu šį technologinio proceso etapą kontroliuoti ir prireikus ruošti naujus raugus su pageidautinomis pradinėmis PRB kultūromis, kad pavyktų išlaikyti produkto pastovias savybes.



3.16 pav. Schematinis sekvenuotų bakteriofagų DNR genomų palyginimo vaizdas. Genomai nurodyti plona juoda linija. Rodyklės vaizduoja spėjamą koduotą DNR seką. Rodyklių spalva parodo spėjamą geno funkciją. Oranžinė spalva, jungianti du genomus, vaizduoja panašumo lygį, gautą naudojant tblastx palyginimą

3.4. PIENO RŪGŠTIES BAKTERIJŲ PANAUDOJIMAS NAUJŲ BIOPRODUKTŲ GAMYBOJE

Ankstesniuose tyrimų etapuose, nustatyta, kad PRB *L. sakei* KTU05-6, *P. acidilactici* KTU05-7, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 pasižymi antimikrobinio poveikiu įvairiems mikroskopiniams grybams, ypač *Fusarium* genties. Todėl šių PRB panaudojimas galėtų būti puiki alternatyva cheminiams sėklų apdorojimo metodams ir rasti pritaikymą ekologinėje žemdirbystėje. Be to, PRB bioproduktai galėtų būti pritaikyti ir duonos kepinų gamyboje ne tik mikrobiologinei taršai mažinti, bet ir mineralinių medžiagų biologiniam pasisavinamumui didinti, panaudojant dideliu fitaziniu aktyvumu pasižyminčias PRB *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermes kvietinių viso grūdo dalių kepinų maistinei vertei didinti.

3.4.1. Pieno rūgšties bakterijų bioproduktų panaudojimo galimybės sėklinių vasarinių kviečių grūdų biologinės taršos mažinimui ir sveikumo didinimui

Ekologinės žemdirbystės sistema labai apriboja sudėtinių sintetinių trąšų, pesticidų, herbicidų, augimo reguliatorių naudojimą. Kol kas bioproduktai dar itin retai naudojami lauko augalų apsaugai. Labai menkas alternatyvių priemonių ir biologinių augalų apsaugos produktų pasirinkimas Lietuvoje yra viena iš priežasčių, ribojančių efektyvią kenksmingųjų organizmų kontrolę ekologiniuose ūkiuose. Vertinant problemos aktualumą svarbu sukurti antimikrobiškai aktyvių PRB bioproduktą sėkliniams grūdams apdoroti prieš sėją ir išbandyti jo efektyvumą prieš daugiausia problemų ekologinėje žemdirbystėje sukeliančius *Fusarium* ir *Cochliobolus sativus* fitopatogenus.

Pirmame šių tyrimų etape antimikrobinio aktyvumu pasižymėjusios PRB *L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermės buvo daugintos MRS terpėje. Gauti PRB bioproduktai išbandyti kviečių grūdų 'Grami' sėklų paviršiaus taršos mažinimui ir sveikumo didinimui.

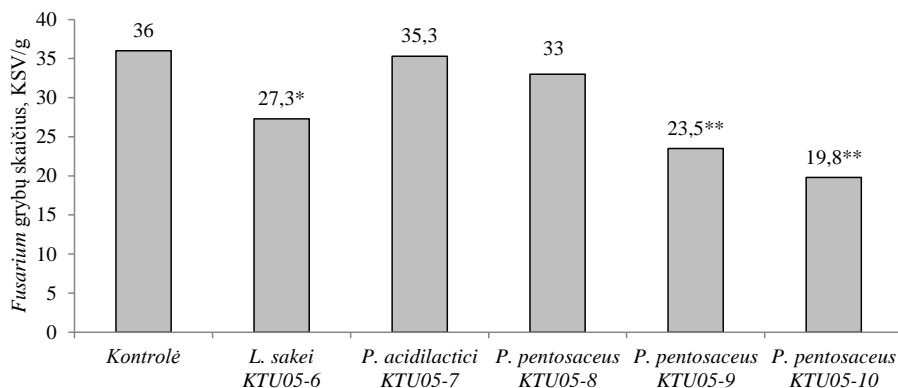
PRB, daugintų MRS terpėje, poveikis kviečių grūdų sėklų paviršiaus biologinės taršos mažinimui ir sveikumo didinimui

Tyrimai atlikti naudojant gausiai *Fusarium* genties mikroskopiniais grybais užsikrėtusius vasarinių kviečių grūdus. Pradinę informaciją apie sėklų mikologinę būklę suteikia paviršinio sėklų užsiteršimo įvertinimas, todėl pradžioje nustatyta PRB *L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 bioproduktų įtaka šiam rodikliui. Pirmoji analizė buvo atlikta po 4 val. ekspozicijos, 100-ai g grūdų apdorojus 10 ml PRB bioprodukto.

Gauti rezultatai parodė, kad PRB *L. sakei*, *P. pentosaceus* KTU05-9 ir KTU05-10 padermių bioproduktai reikšmingai mažino mikroskopinių grybų kolonijas suformuojančių vienetų skaičių viename grame sėklų (3.17 pav.).

Vertinant PRB efektyvumą prieš *Fusarium* genties mikroskopinius grybus, buvo naudoti 100 % šiais grybais užsikrėtę vasarinių kviečių grūdai. Pirmoji analizė atlikta siekiant įvertinti PRB bioprodukto įtaką grūdų pažeidimui šios genties grybais, esant įvairioms temperatūroms. Geriausi rezultatai gauti inkubuojant Petri

lėkšteles 15, 20 ir 25 °C temperatūrose, kur net vizualiai buvo galima įžvelgti skirtumus (IV priedo 1 ir 2 pav.).



3.17 pav. *Fusarium* genties mikroskopinių grybų skaičius ant vasarinių kviečių ‘Grami’ (kontrolinis mėginys) ir apdorotų PRB bioproduktais (* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 ir 99 % tikimybės lygiui)

Rezultatai rodo, kad visų apdorojimui panaudotų PRB bioproduktai stipriai mažina *Fusarium* genties mikroskopinių grybų infekciją vasarinių kviečių grūduose (3.16 lent.). Lyginant skirtingų PRB bioproduktų įvairiose temperatūrose įtaką su kontroliniu mėginiu, tik *P. pentosaceus* KTU05-8 prie 25 °C temperatūros neturėjo poveikio šios genties grybams, tačiau žemesnėse temperatūrose šios PRB bioproduktas pastebimai mažina *Fusarium* infekciją. Vertinant temperatūrų poveikį PRB veiksmingumui, gautas mažesnis PRB bioprodukto antimikrobinis poveikis didėjant temperatūrai. Tai gali būti paaiškinama tuo, kad 25 °C temperatūra *Fusarium* genties mikroskopiniams grybams augti yra palankesnė, negu žemesnė (20 ar 15 °C) temperatūra, kas ir sąlygoja didesnę mėginių užterštumą. Vertinant PRB bioproduktų poveikį *Fusarium* genties mikroskopinių grybų taršos mažinimui, nustatytas stiprus *L. sakei* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 bioproduktų antimikrobinis poveikis, netgi 25 °C temperatūroje. *L. sakei* bioproduktų poveikis grūdų užterštumui ant agaro lėkštelių 25 °C temperatūroje pateiktas IV priedo 2 paveiksle.

Antrame tyrimo etape įvertinta skirtingų PRB bioproduktų ir jų kiekių įtaka *Fusarium* genties mikroskopinių grybų infekcijai vasarinių kviečių grūduose. Visos grūdų apvėlimui naudotos PRB stipriai mažina *Fusarium* genties infekciją 20 °C temperatūroje (3.17 lent.). Panaudojus grūdų apdorojimui 20 ir 30 ml PRB bioprodukto 100 g grūdų, *Fusarium* genties mikroskopinių grybų tarša buvo daug mažesnė, nei panaudojus 10 ml/100 g grūdų. Reikšmingas skirtumas tarp 20 ir 30 ml bioprodukto kiekio nenustatytas.

PRB antimikrobinis poveikis *Fusarium* genties grybams pasireiškia dėl fermentacijos metu susidariusių antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių metabolizmo produktų pieno, acto rūgščių ir kitų junginių. Kiti autoriai taip pat nustatė, kad mikroskopiniai grybai yra jautrūs fermentacijos produktams, ypač pieno ir acto rūgštims [296]. Be to, propiono rūgštis sumažina grybų augimą, ypač prie

žemesnių pH verčių [297], stabdo aminorūgščių pasisavinimą [298]. Schnürer ir Magnusson [299] tyrimai įrodė, kad antigrybiniu poveikiu pasižymintys metabolizmo produktai, tokie kaip peptidai, fenilpieno rūgštis, baltyminiai junginiai ir 3-hidroksiribebalų rūgštys, buvo taip pat sintetinami PRB fermentacijos metu.

3.16 lentelė. PRB bioproduktų (10 ml/100 g grūdų) poveikis *Fusarium* genties mikroskopiniams grybams, inkubuojant septynias dienas kviečių grūdus ‘Grami’ Petri lėkštelėse ant BDA skirtingose temperatūrose

<i>Fusarium</i> genties mikroskopiniais grybais užterštų grūdų kiekis, %			
PRB padermė	Temperatūra, °C		
	15	20	25
Kontrolė	74,2	88,3*	90,8*
KTU05-6	60,8	56,7*	36,7**
KTU05-7	38,3**	62,5	56,7*
KTU05-8	48,3**	49,2**	95,8
KTU05-9	65,0	74,2	79,2
KTU05-10	51,7**	50,8**	45,0**
R ₀₅	8,43	5,961	14,601
R ₀₁	11,236	7,945	19,461

* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 ir 99 % tikimybės lygiui

3.17 lentelė. PRB bioproduktų skirtingų koncentracijų įtaka *Fusarium* genties mikroskopiniams grybams, inkubuojant kviečių grūdus ‘Grami’ septynias dienas Petri lėkštelėse ant BDA, 20 °C temperatūroje

<i>Fusarium</i> genties mikroskopiniais grybais užterštų grūdų kiekis, %			
PRB padermė	Naudotas PRB suspensijos kiekis 100 g grūdų, ml		
	10	20	30
Kontrolė	84,2	84,2	84,2
KTU05-6	35,0**	15,0**	17,5**
KTU05-7	32,5**	18,3**	19,2**
KTU05-8	30,0**	18,3**	13,3**
KTU05-9	33,3**	24,2**	22,5**
KTU05-10	35,8**	17,5**	22,5**
R ₀₅	2,964	2,096	5,133
R ₀₁	3,95	2,793	6,841

* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 ir 99 % tikimybės lygiui

PRB įtaka vasarinių kviečių daigų ligotumui. PRB bioproduktų įtaka vasarinių kviečių daigų pašaknio puvinių išplitimui ir intensyvumui buvo vertinta rulonų metodu. Nustatytas apatinės stiebo dalies ir daigų šaknelių ligotumas. PRB įtaka šaknų ligotumui nenustatyta (3.18 lent.), tačiau kviečių daigų ligotumas apdorojus grūdus 10 ml/100 g grūdų *L. sakei* ir *P. acidilactici* bioproduktais sumažėjo atitinkamai 33,2 ir 29,1 %. Be to, apdorojus *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 bioproduktais, daigų apatinė stiebo dalis buvo atitinkamai 33,7, 23,6 ir 15,6 % mažiau pažeista pašaknio puvinių, o *L. sakei*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-10 padermių bioproduktai sumažino kviečių šaknų puvinį atitinkamai 6,0, 11,0, 7,9 ir 11,5 %.

3.18 lentelė. PRB bioproduktų (10 ml/100 g grūdų) įtaka vasarinių kviečių ‘Grami’ daigų ir šaknų ligotumui

PRB padermė	Daigų ligotumas, %		Šaknų ligotumas, %	
	pažeista daigų	ligos indeksas	pažeista šaknų	ligos indeksas
Kontrolė	54,6	24,7	96,8	47,5
KTU05-6	36,2	16,5	91,0	60,3
KTU05-7	41,7	17,5	86,2	47,2
KTU05-8	54,1	26,8	89,2	42,3
KTU05-9	52,5	21,4	95,9	42,2
KTU05-10	46,1	22,2	85,7	51,5
<i>R₀₅</i>	22,848	11,497	10,976	16,843
<i>R₀₁</i>	31,587	15,895	15,174	23,285

* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 ir 99 % tikimybės lygiui

Bioprodukto įtakos grūdų dygimo gebai nustatymas. Vasarinių kviečių sėklų daigumas, daigų aukštis, šaknų ilgis vertinti keturias dienas po sėklų pasėjimo. Daugeliu atveju pastebėtos aktyvinimo tendencijos, kurios atskirais atvejais buvo reikšmingos, lyginant su kontroliniu mėginiu. Atlikta analizė parodė, kad PRB bioproduktai šiek tiek didino sėklų daigumą, o *L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 bioproduktai pirmąją vertinimo dieną parodė ženklų teigiamą poveikį (3.19 lent.). Beveik visais atvejais pastebėtos teigiamos tendencijos ir daigų aukščiui, kur stipriausiu teigiamu poveikiu išsiskyrė *P. acidilactici* bioproduktai. Tam įtakos galėjo turėti padidėjęs grūdų sveikumas, sumažinus jų paviršiaus taršą. Teigiamas PRB bioproduktų poveikis šaknų ilgiui labiausiai pasireiškė antrąją augimo dieną, kai buvo nustatyta, kad visos PRB, išskyrus *P. pentosaceus* KTU05-10, ženkliai didino šaknų ilgį. Ypač išsiskyrė *P. acidilactici* bioproduktas, kurio teigiamo poveikio tendencija išliko viso tyrimo metu. PRB įtaka vasarinių kviečių šaknų skaičiui bei daigelių svoriui nepastebėta.

3.19 lentelė. PRB bioproduktų (10 ml/100 g grūdų) įtaka vasarinių kviečių sėklų ‘Grami’ daigumui, daigų aukščiui ir šaknų ilgiui

PRB padermė	Vasarinių kviečių sėklų daigumas, %			
	Po 3 dienų	Po 4 dienų	Po 5 dienų	Po 6 dienų
Kontrolė	37,5	57,5	72,5	80,0
KTU05-6	60,0*	65,0	72,5	80,0
KTU05-7	80,0**	80,0	82,5	82,5
KTU05-8	57,5	77,5	80,0	85,0
KTU05-9	52,5	72,5	82,5	92,5
KTU05-10	65,0*	75,0	82,5	87,5
<i>R₀₅</i>	20,143	22,056	23,764	19,89
<i>R₀₁</i>	27,847	30,493	32,854	27,498
Daigų aukštis, mm				
Kontrolė	3,9	13,2	25,1	39,1
KTU05-6	5,9	18,1	31,1	42,7
KTU05-7	6,0	20,0	37,5*	60,6*
KTU05-8	5,3	12,5	24,3	41,7
KTU05-9	5,2	14,1	31,1	50,2
KTU05-10	4,7	13,8	29,7	49,4
<i>R₀₅</i>	2,574	6,858	12,256	15,979
<i>R₀₁</i>	3,559	9,482	16,944	22,091

3.19 lentelė (tęsinys). PRB bioproduktų (10 ml/100 g grūdų) įtaka vasarinių kviečių sėklų 'Grami' daigumui, daigų aukščiui ir šaknų ilgiui

Tyrimo variantai	Šaknų ilgis, mm				
	Po 2 dienų	Po 3 dienų	Po 4 dienų	Po 5 dienų	Po 6 dienų
Naudotos PRB					
Kontrolė	1,8	16,2	41,3	51,0	65,3
KTU05-6	4,8	25,2**	45,8	53,0	65,0
KTU05-7	4,9	29,5**	56,4	70,4	83,4
KTU05-8	3,5	24,2*	45,4	52,8	74,6
KTU05-9	3,4	22,7*	42,1	47,5	72,1
KTU05-10	3,6	17,1	41,3	56,4	77,5
R_{05}	2,116	6,262	12,795	15,841	16,711
R_{01}	2,925	8,657	17,689	21,901	23,103

* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 ir 99 % tikimybės lygiui

Pagal šio tyrimų etapo eksperimento duomenis buvo atrinkta *P. pentosaceus* KTU05-10 padermė ir sudaryti PRB padermių mišiniai: I – KTU05-7 ir KTU05-10 padermių; II – KTU05-6, KTU05-7 ir KTU05-10 padermių, kurie išbandyti bioprodukto gamyboje dauginant MRS mitybinėje terpėje ir technologinėje bulvių sulčių terpėje, papildytoje 5 % ryžių ekstrudatais, 0,2 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g/l $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ir 2 g/l cisteino-HCl·H₂O priedais. Gauti bioproduktai sekančio tyrimų etapo metu išbandyti vasarinių kviečių grūdų 'Triso' sveikatingumo tyrimuose.

Atrinktų PRB ir jų mišinių, daigintų MRS terpėje ir bulvių sulčių terpėje, poveikis kviečių grūdų sėklų paviršiaus biologinės taršos mažinimui ir sveikumo didinimui.

Bioprodukto gamybai technologinėje bulvių terpėje naudota 5 % ekstruduotų ryžių ir parinkti $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ir cisteino-HCl·H₂O priedai, taip pat atsižvelgiant į pradinius tyrimus sudaryti PRB mišiniai.

Šiame tyrimų etape nustatyta PRB bioproduktų, ruoštų iš grynų PRB ir jų mišinių, įtaka vasarinių kviečių grūdų 'Triso' sveikumui (*in vitro* tyrimai). *Fusarium* grybų infekcijos lygį vasarinių kviečių sėklose efektyviai mažino visų tyrimuose naudotų PRB bioproduktai (3.20 lent.). Bioproduktas, ruoštas naudojant *P. pentosaceus* KTU05-10 padermę bei bioproduktas, ruoštas fermentuojant *P. pentosaceus* KTU05-10, *P. acidilactici* ir *L. sakei* bakterijų mišiniu, taip pat labai efektyviai mažino ir *Cochliobolus sativus*, ir *Alternaria* genties mikroskopinių grybų infekciją vasarinių kviečių grūdų sėkloje. Nustatytas bioprodukto, ruošto naudojant bulvių terpę ir PRB *P. pentosaceus* KTU05-10, *P. acidilactici* ir *L. sakei* mišinį, teigiamas poveikis prieš *Fusarium* genties mikroskopinius grybus. Vertinant bioprodukto antimikrobinį poveikį *Coch. sativus* mikroskopiniams grybams didžiausiu efektyvumu išsiskyrė bioproduktai, ruošti naudojant MRS terpę (visi tyrimo variantai) ir bulvių sulčių terpę fermentuojant su *P. pentosaceus* KTU05-10 paderme ir PRB *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 padermių mišiniu. Reikšmingas *Alternaria* genties mikroskopinių grybų taršos sumažėjimas nustatytas naudojant bioproduktus ruošus tiek iš MRS terpės, tiek iš bulvių sulčių terpės, išskyrus atvejį, kai bioprodukto paruošimui naudota bulvių sulčių terpė ir PRB *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10 padermių mišinys (teigiamas poveikis pasireiškė tik iki penktos eksperimento dienos 10 °C temperatūroje).

3.20 lentelė. PRB bioproduktų (20 ml/100 g produkto) įtaka *Fusarium*, *Alternaria* ir *Cochliobolus sativus* mikroskopiniams grybams (vasarinių kviečių 'Triso'), esant skirtingai mėginių inkubavimo temperatūrai ir trukmei

Tyrimo variantai (naudotos PRB padermės ir jų mišiniai)	<i>Fusarium</i> genties mikroskopiniais grybais užterštų grūdų sėklų kiekis, %							
	Po 5 dienų		Po 10 dienų		Po 15 dienų		Po 20 d.	
	10 °C	15 °C	10 °C	15 °C	10 °C	15 °C	10 °C	10 °C
Kontrolė	0,0	10,8	16,7	56,7	17,5	56,7	18,3	
KTU05-10	0,0	0,8**	4,2**	12,5**	5,8**	12,5**	5,8**	
KTU05-7 ir KTU05-10	0,0	0,0**	5,8**	7,5**	8,3*	7,5**	10,0	
KTU05-6, KTU05-7 ir KTU05-10	0,8	0,8**	4,2**	15,0**	5,8**	15,0**	6,7*	
KTU05-10T	0,0	0,0**	4,2**	35,0**	13,3	38,3**	15,8	
KTU05-7 ir KTU05-10T	0,0	0,8**	5,0**	10,0**	10,0	12,5**	10,8	
KTU05-6, KTU05-7 ir KTU05-10T	0,0	0,8**	2,5**	6,7**	5,0**	10,0**	5,0**	
<i>R₀₅</i>		4,36	7,47	11,51	7,93	12,84	8,77	
<i>R₀₁</i>		5,97	10,23	15,77	10,86	17,59	12,01	
	<i>Cochliobolus sativus</i> mikroskopiniais užterštų grūdų sėklų kiekis, %							
Kontrolė	5,8	20,0	10,8	23,3	18,3	25,0	20,0	
KTU05-10	0,0**	3,3**	0,8**	9,2**	6,7**	10,8**	7,5**	
KTU05-7 ir KTU05-10	0,0**	1,7**	3,3**	3,3**	10,0*	6,7**	10,0*	
KTU05-6, KTU05-7 ir KTU05-10	0,0**	1,7**	0,0**	8,3**	7,5**	10,8**	9,2**	
KTU05-10T	0,0**	1,7**	1,7**	6,7**	6,7**	15,0**	10,0*	
KTU05-7 ir KTU05-10T	0,0**	3,3**	0,8**	13,3**	5,8**	15,8**	7,5**	
KTU05-6, KTU05-7 ir KTU05-10T	0,0**	0,8**	1,7**	19,2	8,3*	20,0	15,0	
<i>R₀₅</i>	2,36	6,42	4,69	6,74	7,39	6,29	7,46	
<i>R₀₁</i>	3,23	8,79	6,43	9,24	10,12	8,61	10,22	
	<i>Alternaria</i> genties mikroskopiniais grybais užterštų grūdų sėklų kiekis, %							
Kontrolė	22,5	53,3	60,0	68,3	63,3	75,0	67,5	
KTU05-10	0,0**	9,2**	20,0**	25,8**	27,5**	30,8**	30,0**	
KTU05-7 ir KTU05-10	1,7**	9,2**	17,5**	30,0**	26,7**	35,0**	30,0**	
KTU05-6, KTU05-7 ir KTU05-10	0,8**	9,2**	20,0**	26,7**	30,0**	33,3**	34,2**	
KTU05-10T	1,7**	10,8**	32,5**	37,5**	40,8**	51,7**	49,2*	
KTU05-7 ir KTU05-10T	2,5**	45,0	55,8	65,0	66,7	68,3	70,0	
KTU05-6, KTU05-7 ir KTU05-10T	2,5**	20,0**	38,3**	41,7**	50,8*	46,7**	53,3*	
<i>R₀₅</i>	7,031	12,34	13,34	14,89	10,43	14,00	13,43	
<i>R₀₁</i>	9,633	16,90	18,27	20,39	14,29	19,18	18,40	

* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 ir 99 % tikimybės lygiui;

T – bioproduktas ruoštas iš bulvių sulčių terpės, naudojant 5 % ekstraktų, magnio, mangano druskų ir cisteino priedus

PRB bioproduktų poveikis vasarinių kviečių daigų ligotumui nepasireiškė, tačiau *P. pentosaceus* KTU05-10 bei dvikomponentis PRB mišinys, sudarytas iš *P. acidilactici* KTU05-7 ir *P. pentosaceus* KTU05-10 padermių, daugintų MRS terpėje; ir *P. pentosaceus* KTU05-10, dauginta technologinėje bulvių terpėje, bei trikomponentis mišinys *L. sakei* KTU05-6 ir *P. acidilactici* KTU05-7 ir *P. pentosaceus* KTU05-10, daugintas technologinėje bulvių terpėje, efektyviai mažino šaknų ligotumą (3.21 lent.). *P. pentosaceus* KTU05-10 ir trikomponentis mišinys *L. sakei* ir *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus* KTU05-10, daugintas tiek technologinėje

bulvių terpėje, tiek MRS terpėje, taip pat efektyviai mažino *Cochliobolus sativus* infekciją sėklose.

3.21 lentelė. PRB bioproduktų (20 ml/100 g produkto) įtaka vasarinių kviečių ‘Triso’ šaknų ir daigų ligotumui bei sėklų pažeidimui *Fusarium* ir *Coch. sativus* mikroskopiniais grybais

Tyrimo variantai (naudotos PRB padermės ir jų mišiniai)	Daigų ligotumas, %		Šaknų ligotumas, %		Pažeista sėklų, %	
	pažeista daigų	ligos indeksas	pažeista šaknų	ligos indeksas	<i>Fusarium</i> genties	<i>Coch.</i> <i>sativus</i>
Kontrolė	58,5	23,8	73,0	27,4	7,5	30,0
KTU05-10	51,6	20,2	36,1**	12,9**	8,5	11,5**
KTU05-7 ir KTU05-10	57,6	21,6	48,7*	17,9*	4,0	17,0
KTU05-6, KTU05-7 ir KTU05-10	67,3	25,3	62,3	21,6	11,0	11,5**
KTU05-10T	57,5	20,0	39,1**	13,0**	1,0	16,0*
KTU05-7 ir KTU05-10T	77,0	28,2	71,0	24,8	3,0	27,5
KTU05-6, KTU05-7 ir KTU05-10T	45,7	17,3	39,1**	13,5**	3,5	15,0*
<i>R₀₅</i>	25,00	10,55	22,73	9,24	10,84	13,27
<i>R₀₁</i>	34,25	14,46	31,14	12,66	14,86	18,19

* ir ** – esminiai skirtumai, palyginti su kontroliniu variantu, esant 95 ir 99 % tikimybės lygiui;

T – bioproduktas ruoštas iš bulvių sulčių terpės, naudojant 5 % ekstrudatų, magnio, mangano druskų ir cisteino priedus

Gauti tyrimų rezultatai parodė, kad PRB bioproduktai, ruošti iš MRS terpės efektyviai mažino *Fusarium*, *Alternaria* genčių ir *Cochliobolus sativus* mikroskopinius grybus grūdų paviršiuje, o *P. acidilactici* reikšmingai padidino daigų aukštį. Sukurti PRB bioproduktai iš bulvių sulčių taip pat mažino vasarinių kviečių grūdų sėklos biologinę taršą: *Fusarium* genties mikroskopinių grybų sumažėjo 73 %, *Alternaria* genties – 27 %, o *Cochliobolus sativus* – 63 %. Bioproduktai sumažino šaknų ligotumą 46 % bei sėklų pažeidimą *Fusarium* genties ir *Cochliobolus sativus* grybais atitinkamai 87 ir 50 %.

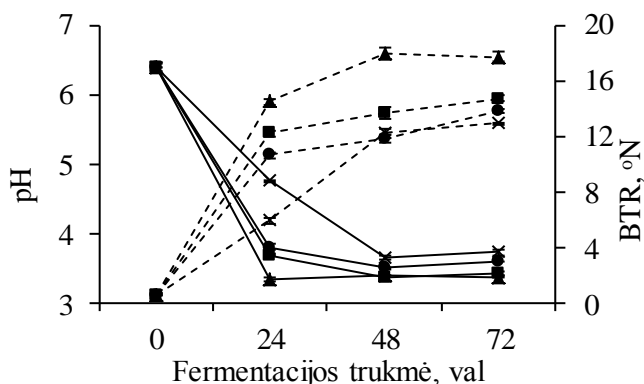
3.4.2. Fitaziniu aktyvumu pasižyminčių pieno rūgšties bakterijų panaudojimo galimybės kvietinių viso grūdo dalių kepinų maistinės vertės ir saugos didinimui

Atrinkus aukštu fitaziniu aktyvumu pasižyminčias PRB, svarbu įvertinti jų panaudojimo galimybes kvietinių viso grūdo dalių kepinų maistinės vertės didinimui, vertinant biologiškai pasisavinamų (tirpių) mineralinių medžiagų junginių kiekį. Siekiant įvertinti PRB galimybę skaldyti fito rūgšties ir mineralinių medžiagų kompleksus viso grūdo dalių kvietinės duonos gamybos metu, buvo paruošti PRB bioproduktai, naudojant atrinktas aukštu fitaziniu aktyvumu pasižyminčias *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermes.

Fermentuotų bioproduktų pagrindinių kokybės parametrų BTR ir pH vertės pateiktos 3.18 paveiksle. BTR vertės PRB dauginimo metu viso grūdo dalių kvietinių miltų terpėje nustatytos didžiausios su *P. pentosaceus* KTU05-9 paderme ir sudarė 17,9 ir 17,7 °N atitinkamai po 48 ir 72 val. fermentacijos, o kontrolinio mėginio, kurio fermentacijai nebuvo naudotos pradinės kultūros, tesudarė 12,3 ir 12,9 °N atitinkamai po 48 ir 72 val. Vertinant *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9

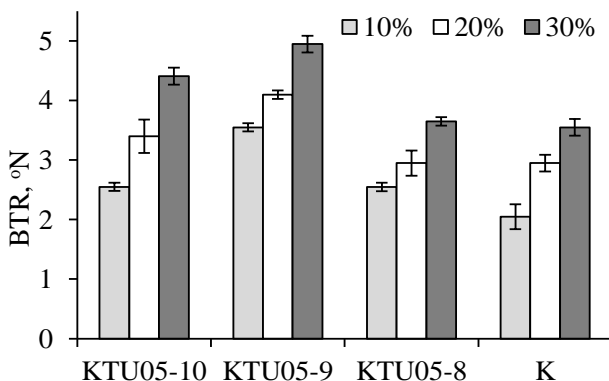
padermių BTR verčių pokyčius fermentacijos metu, nustatytos mažesnės šio rodiklio vertės, lyginant su produktais, fermentuotais su *P. pentosaceus* KTU05-9 paderme.

Vertinant bioproducto pH verčių pokyčius fermentacijos metu, nustatytas staigus pH verčių sumažėjimas per pirmąsias fermentacijos 24 val. produktuose su *P. pentosaceus* padermėmis, pH verčių reikšmės kito ribose 3,3–3,8, o, nenaudojant pradinių bakterijų kultūrų, pH vertė tepasiekė 4,75. Ilgesnės fermentacijos metu (po 48 ir 72 val.) bioproducto, kurio gamybai nebuvo naudotos pradinės kultūros, pH vertės sumažėjo iki 3,65.



3.18 pav. Bioproductų ruošų su PRB: ● – *P. pentosaceus* KTU05-8; ▲ – KTU05-9; ■ – KTU05-10; ir × – be pradinių PRB kultūrų, BTR (punktyrinė linija) ir pH (linija) verčių priklausomybė nuo fermentacijos trukmės

Vertinant kvietinių viso grūdo dalių kepininių BTR vertes, nustatyta, kad didinant raugo kiekį visais atvejais kepininių BTR vertės didėjo (3.19 pav.). Gautos analogiškos kepininių BTR verčių tendencijos raugų BTR vertėms – didžiausios kepininių BTR vertės (nuo 3,35 iki 4,95 °N) nustatytos fermentuojant viso grūdo dalių kvietinius miltus su *P. pentosaceus* KTU05-9.



3.19 pav. Viso grūdo dalių kvietinių kepininių, ruošų su skirtingomis PRB, BTR vertės

Nustatyti mineralinių elementų (kalcio, geležies, cinko, fosforo ir mangano) kvietiniuose viso grūdo dalių miltų kepinuose kiekiai pateikti 3.22 lentelėje.

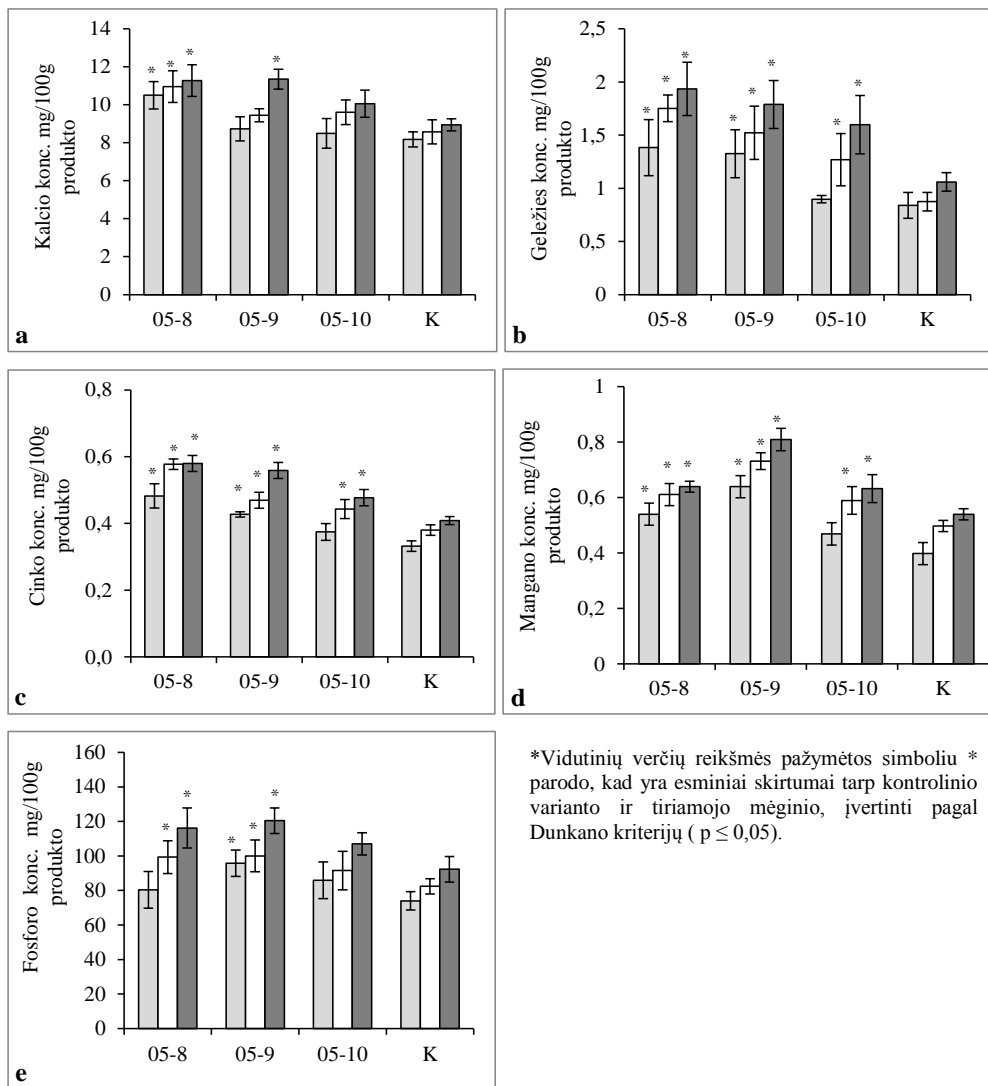
Nustatyta tendencija, kad kepinų gamyboje naudojant didesnę raugo kiekį, tirpių ir biologiškai pasisavinamų mineralinių medžiagų junginių viso grūdo kvietiniuose kepinuose didėjo (3.20 pav.). Išsekstrahuotų, imituojant virškinamo trakto terpės pH vertes, tirpių mineralinių medžiagų junginių koncentracijos viso grūdo kvietinėje duonoje visais atvejais nustatytos didžiausios naudojant 30 % bioproducto. Nustatyti didesni tirpių kalcio, geležies, cinko ir mangano junginių kiekiai kepinuose, ruošiuose su fitaziniu aktyvumu pasižymėjusiomis PRB, priklausančiomis *P. pentosaceus* rūšiai, lyginant su kepiniais, kurių gamybai nenaudotos pradinės kultūros. Didėniu fitaziniu poveikiu kepinuose ypač išsiskyrė *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 padermės.

3.22 lentelė. Mineralinių medžiagų kiekis viso grūdo dalių kvietiniuose kepinuose

	Koncentracija, mg/100 g produkto				
	fosforas	kalcis	geležis	cinkas	manganas
Kvietiniai viso grūdo kepiniai	313,95±6,79	27,77±3,29	3,74±0,35	1,51±0,10	1,48±0,10

Tirpūs kalcio junginiai kepinuose be pradinių kultūrų sudarė 29,4–32,0 %, o kepinuose, ruošiuose su 30 % *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermių fermentuotais bioproductais buvo atitinkamai 40,0, 40,8 ir 36,9 % daugiau bendro kalcio kiekio. Tirpaus kalcio koncentracija kepinuose, ruošiuose su fermentuotais *P. pentosaceus* KTU05-10, KTU05-9 ir KTU05-8 padermių bioproductais, buvo atitinkamai 3,9, 6,8 ir 28,5 % didesnė, duonos gamybai naudojant 10 % PRB bioproducto; 12,0, 10,2 ir 27,8 % didesnė, duonos gamybai naudojant 20 % PRB bioproducto, ir 12,4, 26,9 ir 26,0 % didesnė, naudojant 30 % PRB bioproducto, lyginant su tirpių kalcio junginių koncentracija, kai nebuvo naudotos atrinktos aukštu fitaziniu aktyvumu pasižyminčios pradinės kultūros. Nustatytas reikšmingas tirpių kalcio junginių viso grūdo dalių kvietiniuose kepinuose padidėjimas, kai buvo naudota 10 ir 20 % *P. pentosaceus* KTU05-8 paderme fermentuoto bioproducto (atitinkamai 10,5 ir 11,0 mg/100g) lyginant su kepiniais ruoštais iš 10 ir 20 % raugo be atrinktų fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB (atitinkamai 8,2 ir 8,6 mg/100g) (3.20 a pav.). Be to, reikšmingas tirpių kalcio junginių padidėjimas buvo naudojant 30 % fermentuoto bioproducto ruošto su *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 padermėmis (atitinkamai 11,3 ir 13,4 mg/100g) lyginant su kontroliniu variantu, kai nebuvo naudotos fitaziniu aktyvumu pasižyminčios PRB (8,9 mg/100g). Vertinant skirtingų PRB įtaką, nustatytas reikšmingas skirtumas tarp *P. pentosaceus* KTU05-9 ir KTU05-10 padermių naudojant 30 % fermentuoto bioproducto, kitais atvejais reikšmingas skirtumas tarp tirtų PRB nebuvo nustatytas.

Tirpūs geležies junginiai kepinuose be pradinių kultūrų buvo 22,5–28,3 % bendro geležies kiekio, o kepinuose, ruošiuose su 30 % *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermėmis fermentuotu bioproductu buvo didesnis tirpių geležies junginių kiekis, kuris sudarė atitinkamai 51,6, 47,9 ir 42,8 % bendro kiekio.



3.20 pav. Tirpių mineralinių medžiagų junginių koncentracijos, imituojant virškinamo trakto terpės pH vertes, iš viso grūdo dalių kvietinių kepinų, panaudojant: □ – 10 %; ◻ – 20 % ir ■ – 30 % fermentuoto PRB bioproducto (05-8 – *P. pentosaceus* KTU05-8; 05-9 – *P. pentosaceus* KTU05-9; 05-10 – *P. pentosaceus* KTU05-10; K – kontrolė, be atrinktų PRB)

Tirpios geležies junginių koncentracija kepinuose, ruoštuose su fermentuotu *P. pentosaceus* KTU05-10, KTU05-9 ir KTU05-8 padermių bioproductu, buvo atitinkamai 6,8, 57,8 ir 64,6 % didesnė, duonos gamybai naudojant 10 % PRB bioproducto; 45,0, 74,0 ir 100,2 % didesnė, duonos gamybai naudojant 20 % PRB bioproducto; ir 50,8, 68,7 ir 82,5 % didesnė; naudojant 30 % PRB bioproducto, lyginant su tirpių geležies junginių koncentracija, kai nebuvo naudotos atrinktos aukštu fitaziniu aktyvumu pasižyminčios pradinės kultūros. Nustatytas reikšmingas tirpių geležies junginių koncentracijos viso grūdo dalių kvietiniuose kepinuose padidėjimas, kai buvo naudota 10 % *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9

padermėmis fermentuoto bioproducto (atitinkamai 1,4 ir 1,3 mg/100g) lyginant su kepiniais ruoštais iš 10 % raugo be atrinktų fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB (0,8 mg/100g) (3.20 b pav.). Be to, reikšmingas tirpių geležies junginių koncentracijos padidėjimas nustatytas naudojant 20 ir 30 % fermentuoto bioproducto ruošto su *P. pentosaceus* KTU05-8 (atitinkamai 1,8 ir 1,9 mg/100g), KTU05-9 (atitinkamai 1,5 ir 1,8 mg/100g) ir KTU05-10 (atitinkamai 1,3 ir 1,6 mg/100g) padermėmis lyginant su kontroliniu variantu, kai nebuvo naudotos fitaziniu aktyvumu pasižyminčios PRB (atitinkamai 0,9 ir 1,1 mg/100g).

Tirpių cinko junginių kepinuose be pradinių kultūrų buvo 22,5–28,3 %, o kepinuose, ruošuose su 30 % *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermėmis fermentuoto bioproducto, nustatytas didesnis tirpių cinko junginių kiekis sudarė atitinkamai 38,4, 37,1 ir 31,8 % bendro cinko kiekio. Tirpių cinko junginių koncentracija kepinuose, ruošuose su fermentuotu *P. pentosaceus* KTU05-10, KTU05-9 ir KTU05-8 padermių bioproductu, nustatyta atitinkamai 12,7, 28,5 ir 45,2 % didesnė, duonos gamybai naudojant 10 % PRB bioproducto; 16,6, 23,6 ir 52,0 % didesnė, duonos gamybai naudojant 20 % PRB bioproducto ir 16,8, 36,7 ir 41,9 % didesnė, naudojant 30 % PRB bioproducto, lyginant su tirpių cinko junginių koncentracija, kai nebuvo naudotos atrinktos aukštu fitaziniu aktyvumu pasižyminčios pradinės kultūros. Nustatytas reikšmingas tirpių cinko junginių koncentracijos viso grūdo dalių kvietiniuose kepinuose padidėjimas, kai buvo naudota 10 % *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 padermėmis fermentuoto bioproducto (atitinkamai 0,48 ir 0,43 mg/100g) lyginant su kepiniais ruoštais iš 10 % raugo be atrinktų fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB (0,33 mg/100g) (3.20 c pav.). Be to, reikšmingas tirpių cinko junginių koncentracijos padidėjimas nustatytas naudojant 20 ir 30 % fermentuoto bioproducto ruošto su *P. pentosaceus* KTU05-8 (po 0,58 mg/100g), KTU05-9 (atitinkamai 0,47 ir 0,56 mg/100g) ir KTU05-10 (atitinkamai 0,44 ir 0,48 mg/100g) padermėmis lyginant su kontroliniu variantu, kai nebuvo naudotos fitaziniu aktyvumu pasižyminčios PRB (atitinkamai 0,38 ir 0,41 mg/100g).

Tirpūs mangano junginiai kepinuose be pradinių kultūrų sudarė 27,0–36,5 % bendro mangano kiekio, o kepinuose, ruošuose su 30 % *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermėmis fermentuoto bioproducto, nustatytas didesnis tirpių mangano junginių kiekis buvo atitinkamai 43,2; 54,7 ir 42,6 %. Tirpių mangano junginių koncentracija kepinuose, ruošuose su fermentuotu *P. pentosaceus* KTU05-10, KTU05-9 ir KTU05-8 padermių bioproductu, nustatyta atitinkamai 13,2, 44,7 ir 26,3 % didesnė, duonos gamybai naudojant 10 % PRB bioproducto; 15,1, 38,4 ir 18,6 % didesnė, duonos gamybai naudojant 20 % PRB bioproducto ir 14,6, 42,2 ir 15,6 % didesnė, naudojant 30 % PRB bioproducto, lyginant su tirpių mangano junginių koncentracija, kai nebuvo naudotos atrinktos aukštu fitaziniu aktyvumu pasižyminčios pradinės kultūros. Nustatytas reikšmingas tirpių mangano junginių koncentracijos viso grūdo dalių kvietiniuose kepinuose padidėjimas, kai buvo naudota 10 % *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 padermėmis fermentuoto bioproducto (atitinkamai 0,54 ir 0,64 mg/100g) lyginant su kepiniais ruoštais iš 10 % raugo be atrinktų fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB (0,40 mg/100g) (3.20 d pav.). Be to, reikšmingas tirpių mangano junginių

koncentracijos padidėjimas nustatytas naudojant 20 ir 30 % fermentuoto bioproducto ruošto su *P. pentosaceus* KTU05-8 (atitinkamai 0,61 ir 0,64 mg/100g), KTU05-9 (atitinkamai 0,73 ir 0,81 mg/100g) ir KTU05-10 (atitinkamai 0,59 ir 0,63 mg/100g) padermėmis lyginant su kontroliniu variantu, kai nebuvo naudotos fitaziniu aktyvumu pasižyminčios PRB (atitinkamai 0,50 ir 0,54 mg/100g). Vertinant tirpių mangano junginių koncentraciją, nustatyti reikšmingi skirtumai tarp *P. pentosaceus* KTU05-9 ir kitų PRB padermių. Didžiausi tirpių mangano junginių kiekiai nustatyti naudojant bioproductus ruoštus su *P. pentosaceus* KTU05-9 paderme.

Lyginant bendrą fosforo kiekį viso grūdo kvietiniuose kepinuose su tirpia jo junginių forma, nustatyta, kad šių mineralinių medžiagų tirpių junginių forma kepinuose be pradinių kultūrų buvo 23,6–29,4 % (priklausomai nuo naudoto raugo kiekio) bendro fosforo kiekio, o kepinuose, ruoštuose su 30 % *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermėmis fermentuoto bioproducto, nustatytas tirpaus fosforo kiekis buvo atitinkamai 37,0, 38,4 ir 34,1 %. Tirpių fosforo junginių koncentracija kepinuose, ruoštuose su fermentuotu *P. pentosaceus* KTU05-10, KTU05-9 ir KTU05-8 bioproductu, nustatyta atitinkamai 16,2, 29,5 ir 8,56 % didesnė, duonos gamybai naudojant 10 % PRB bioproducto; 11,1, 21,4 ir 20,5 % didesnė, duonos gamybai naudojant 20 % PRB bioproducto; ir 16,0, 30,5 ir 25,9 % didesnė; naudojant 30 % PRB bioproducto, lyginant su tirpių fosforo junginių koncentracija kai nebuvo naudotos atrinktos aukštu fitaziniu aktyvumu pasižyminčios pradinės kultūros. Nustatytas reikšmingas tirpių fosforo junginių koncentracijos viso grūdo dalių kvietiniuose kepinuose padidėjimas, kai buvo naudota 10 % *P. pentosaceus* KTU05-9 fermentuoto bioproducto (95,8 mg/100g) lyginant su kepiniais ruoštais iš 10 % raugo be atrinktų fitaziniu aktyvumu pasižyminčių PRB (74,0 mg/100g) (3.20 e pav.). Be to, reikšmingas tirpių fosforo junginių koncentracijos padidėjimas nustatytas naudojant 20 ir 30 % fermentuoto bioproducto ruošto su *P. pentosaceus* KTU05-9 (100,0 ir 120,4 mg/100g) ir KTU05-8 (99,3 ir 116,2 mg/100g) padermėmis lyginant su kontroliniu variantu, kai nebuvo naudotos fitaziniu aktyvumu pasižyminčios PRB (82,4 ir 92,3 mg/100g). Bioproducto ruošto su *P. pentosaceus* KTU05-10 tirpių fosforo junginių koncentracija nustatyta didesnė, lyginant su kontroliniu variantu, tačiau esminiai skirtumai tarp kontrolinio varianto vertinant 95 % tikimybės lygiu buvo nereikšmingi.

Kvietinės viso grūdo dalių duonos gamyboje naudojant rekomenduojamą raugo kiekį – 20 %, fermentuoto su *P. pentosaceus* KTU05-8, tirpių kalcio, geležies, cinko, mangano ir fosforo junginių, padidėjo atitinkamai 27,8, 100,2, 52,0, 18,6 ir 20,5 %, lyginant su kepiniais, kurių gamyboje nebuvo naudotos aukštu fitaziniu aktyvumu atrinktos PRB, o fermentuotas PRB raugas su *P. pentosaceus* KTU05-9 padidino tirpių mineralinių medžiagų junginių atitinkamai 10,2, 74,0, 23,6, 38,4 ir 21,4 %.

Literatūroje nėra duomenų apie *P. pentosaceus* gaminamų PRB poveikį kepinų maistinės vertės didinimui. Tačiau sutinkama duomenų apie kitų PRB poveikį fitatams, pvz., Reale su bendraautorais [212] nustatė, kad fitatų kiekis sumažėjo tešloje, paruoštoje su pradinių kultūrų *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. curvatus*

mišiniu, apie 80–90 % po 12 val. fermentacijos, lyginant su kontroliniu mėginiu (nenaudojant PRB). Panašius rezultatus paskelbė De Angelis su bendraautoriais [184], nustatę, kad *L. sanfranciscensis* CB1 fermentuojant tešlą 8 val., natrio fitatų kiekis sumažėjo 64–74 %, lyginant su raugu, ruoštu be pradinių PRB. Šių autorių atlikti tyrimai parodė, kad tarpusavyje derinant raugų mikroorganizmus (PRB ir mieles) duonos raugo fermentacijos metu gali būti pasiektas didesnis fitazių aktyvumas ir, tuo pačiu, fitatų suardymo laipsnis. Chaoui su bendraautoriais [213] parinko mikroorganizmų kombinaciją (*Sc. cerevisiae*, *L. plantarum*, *Leuc. mesenteroides*), kuri padidino fitatų skaldymo efektyvumą ir duonos maistinę vertę. Didar [300] taip pat nustatė, kad, didinant raugo kiekį, fitatų kiekis mažėja, *L. plantarum* 30 % raugo priedas sumažino fito rūgšties kiekį 45 % (nuo 894,7 iki 507,3 mg/100g kepinio). Palacios su bendraautoriais [202] nustatė *Bifidobacterium breve* ir *Bifidobacterium longum* aukštą gebėjimą hidrolizuoti fitatus iki žemesnės eilės inozitolio fosfatų ir rekomendavo šias medžiagas naudoti kvietinių kepinų maistinės vertės didinimui, tačiau duonos gamybai geriausia naudoti PRB, išskirtas iš duonos raugų, nes jos yra prisitaikiusios vystytis šioje terpėje.

In vitro tyrimai, atlikti imituojant virškinamojo trakto terpės pH vertes, įrodė, kad fitaziniu aktyvumu pasižyminčių bakteriocinus gaminančių PRB bioproduktai padidino tirpių geležies, cinko, mangano, kalcio ir fosforo junginių kiekį viso grūdo dalių kvietiniuose kepinuose vidutiniškai 30 %.

Fitaziniu ir antimikrobiniu aktyvumu pasižyminčių PRB įtaka B. subtilis ir mikroskopinių grybų vystymuisi kvietinės duonos laikymo metu. *B. subtilis* sukeliama bulvinė liga labiau būdinga kvietiniams kepinams dėl mažesnio jų rūgštingumo, todėl ypač aktualu tokių kepinų gamyboje naudoti produktus, galinčius apsaugoti galutinius produktus nuo šio gedimo. Dirbtinai *B. subtilis* užkrėsti kvietinės duonos kepiniai su 10, 15 ir 20 % *P. pentosaceus* KTU05-9 fermentuoto bioprodukto (miltų masės) bei kontrolinis kepinys be fermentuoto produkto buvo laikyti 23 ir 30 °C temperatūrose iki pirmųjų bulvinės ligos požymių (būdingo nemalonus sugedusių vaisių kvapo) pasirodymo. Gauti rezultatai pateikti 3.23 lentelėje. PRB fermentuotas produktas turėjo teigiamos įtakos duonos bulvinės ligos eigos slopinimui laikant tiek 23, tiek 30 °C temperatūroje. Kepiniai su 10 % fermentuoto produkto priedu pirmuosius ligos požymius parodė jau antrą laikymo parą, o kepinuose su 15 % fermentuoto produkto priedu būdingas nemalonus vaisių kvapas buvo jaučiamas tik trečią parą, laikant 23 °C temperatūroje ir antrą parą, laikant kepinus aukštesnėje temperatūroje (30 °C temperatūroje). Didžiausias teigiamas poveikis pastebėtas laikant kepinį su 20 % fermentuoto bioprodukto 23 °C temperatūroje – pirmieji požymiai pasireiškė, praėjus šešioms paroms po kepimo. Tuo tarpu laikant kepinį su 20 % fermentuoto bioprodukto 30 °C temperatūroje, pirmieji požymiai pasireiškė, praėjus 4 paroms po kepimo. Galima daryti išvadą, jog aukštesnė temperatūra skatina ligos sukėlėjų vystymąsi ir slopina teigiamą fermentuoto produkto efektą. Gauti rezultatai parodė, jog PRB fermentuotus produktus galima sėkmingai taikyti kvietinių kepinų bulvinės ligos prevencijai.

3.23 lentelė. PRB fermentuoto bioproducto įtaka duonos bulvinės ligos eigai, laikant *B. subtilis* užkrėstus kepinius skirtingose temperatūrose

<i>P. pentosaceus</i> KTU05-9 fermentuoto produkto kiekis, %	Trukmė iki pirmųjų bulvinės ligos požymių pasirodymo atitinkamoje temperatūroje, paromis	
	23 °C	30 °C
10	2	2
15	3	2
20	6	4
Kontrolė be PRB (<i>B. subtilis</i> + <i>Sc. cerevisiae</i>)	1,5	1

Tiriant antigrybinį PRB efektą kvietinių kepinų paviršiui, gauti teigiami rezultatai – PRB slopino mikroskopinių grybų augimą kvietinės duonos paviršiuje iki 8 dienų (3.24 lent.). Ant kepinų, apdorotų PRB bioproducto suspensija, paviršiaus mikroskopiniai grybai pradėjo augti vėliau ir jų kolonijos buvo mažesnės, lyginant su PRB bioproductu neapdorotais kepinų paviršiais. Didesniu antigrybiniu aktyvumu pasižymėjo *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-10, o *L. sakei* ir *P. pentosaceus* KTU05-9 apdorotų kepinų paviršiuje po aštuonių dienų išlaikymo stebėti tik mikroskopinių grybų augimo pėdsakai.

3.24 lentelė. PRB bioproducto įtaka kvietinių kepinų pelėjimo intensyvumui

PRB padermė naudota bioproducto gamyboje	Mikroskopinių grybų augimo intensyvumas
<i>P. acidilactici</i> KTU05-7	-
<i>L. sakei</i> KTU05-6	+
<i>P. pentosaceus</i> KTU05-8	-
<i>P. pentosaceus</i> KTU05-9	+
<i>P. pentosaceus</i> KTU05-10	-
Kontrolinis kepinys be PRB	++

*Pastaba. Mikroskopinių grybų augimo intensyvumas: „-“ kolonijų nėra; „+“ retos mažos kolonijos; „++“ retos didesnės kolonijos

Gauti tyrimų rezultatai įrodė, kad fitaziniu aktyvumu pasižyminčių bakteriocinus gaminančių PRB *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10 padermių bioproductai padidino tirpių mineralinių medžiagų junginių kiekį viso grūdo dalių kvietiniuose kepinuose, be to *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-10 padermių bioproductai sulėtino kvietinių kepinų mikrobiologinį gedimą iki 8 parų.

IŠVADOS

1. Ištyrus bakteriocinus gaminančių pieno rūgšties bakterijų (PRB) ir jų metabolizmo produktų antimikrobinį aktyvumą, nustatyta:
 - 1.1. PRB ląstelės neslopino mikroskopinių grybų, o susidarę fermentacijos metabolizmo produktai (MP) ir neutralizuoti metabolizmo produktai (NMP) pasižymėjo savitu antigrybiniu poveikiu: MP išsiskyrė fungicidiniu poveikiu daugiausiai slopindami *Fusarium culmorum* ir *Fusarium poae* vystymąsi, o NMP veikimas buvo silpnesnis nei MP ir jis buvo fungicidinis bei fungistatinis.
 - 1.2. PRB ląstelės nepasižymėjo antibakteriniu aktyvumu, tačiau išryškėjo stiprus jų MP antibakterinis poveikis maisto produktų gedimą sukeliantiems mikroorganizmams, įskaitant *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* rūšies, *Bacillus* ir *Pseudomonas* genties patogenus. Į bakteriocinus panašių medžiagų (BPM) antimikrobinis poveikis priklausė nuo PRB rūšies: *Lactobacillus sakei* KTU05-6 ir *Pediococcus pentosaceus* KTU05-10 gaminamos BPM slopino tiek gramteigiamas, tiek gramneigiamas bakterijas, o *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 padermių sintetinės BPM slopino tik gramteigiamas.
2. Didžiausias PRB BPM antibakterinis poveikis prieš *Bacillus subtilis* pasireiškė 15–30 val. laikotarpyje ir priklausė nuo PRB padermės, terpės pH verčių ir kultivavimo temperatūros. Optimaliausia temperatūra *P. pentosaceus* KTU05-10, *P. acidilactici* ir *L. sakei* BPM susidarymui yra 30 °C, o *P. pentosaceus* KTU05-8 ir KTU05-9 padermių BPM – 25 °C. Tinkamiausia terpės pH vertė yra 6,5. BPM antimikrobinį aktyvumą didino azoto šaltiniu PRB kultivavimui naudojant 20 g/l triptono, o anglies šaltiniu – 20 g/l gliukozės. Padidinti iki 0,2 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ir iki 0,1 g/l $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, o taip pat iki 2 g/l cisteino- $HCl \cdot H_2O$ priedai didino BPM aktyvumą prieš *B. subtilis*.
3. Tirtos bakteriocinus gaminančios PRB pasižymėjo vidutiniškai 33 kartus didesniu ekstraląsteliniu fitaziniu aktyvumu nei intraląsteliniu ir, priklausomai nuo PRB padermės, kito ribose nuo 23–30 $AV \cdot 10^3 / 10^{10}$ KSV (*P. pentosaceus* rūšies bakterijos) iki 13 $AV \cdot 10^3 / 10^{10}$ KSV (*P. acidilactici* KTU05-7). Šiems aktyvumams prilygo kai kurių iš pramoninių raugų išskirtų PRB (*P. pentosaceus* 1.2) aktyvumai (28 $AV \cdot 10^3 / 10^{10}$ KSV), tačiau kitų PRB jie buvo daug mažesni (nuo 1 iki 16 $AV \cdot 10^3 / 10^{10}$ KSV).
4. *In vitro* tyrimai, atlikti imituojant virškinamojo trakto terpės pH vertes, įrodė, kad fitaziniu aktyvumu pasižyminčių bakteriocinus gaminančių PRB bioproduktai padidino tirpių geležies, cinko, mangano, kalcio ir fosforo junginių kiekį viso grūdo dalių kvietiniuose kepiniuose vidutiniškai 30 %. PRB bioproduktai pritaikyti viso grūdo dalių kvietinių kepinių gamyboje sulėtino kepinių mikrobiologinį gedimą.
5. Iš duonos raugų išskirti keturi bakteriofagai $\Phi MR29$, $\Phi MW15$, $\Phi W2$ ir $\Phi W19$ infekuojantys *Lactobacillus sanfranciscensis* ir *Lactobacillus crustorum* rūšims priklausančias PRB. Bakteriofagai $\Phi MW15$, $\Phi MR29$ ir

ΦW2 lizuojantys *L. sanfranciscensis* rūšiai priklausančias PRB, priklauso *Siphoviridae* šeimai ir pagal morfologiją priskiriami B1 tipui. Tirtosios bakteriocinus gaminančios ir fitaziniu aktyvumu pasižyminčios PRB nebuvo jautrios išskirtiems bakteriofagams. Tyrimai patvirtino, kad bakteriofagų infekcija gali pakeisti raugų PRB populiaciją.

6. Nustatyta, kad pakeitus fermentacijos temperatūrą iš 18 °C (būdinga žiemos laikotarpiui kepyklose) į 25 °C (būdinga vasaros laikotarpiui kepyklose) ruginiuose rauguose pasikeitė PRB populiacija: sumažėjo tipinė raugų mikroflora – *L. sanfranciscensis*, *L. crustorum* – ir atsirado naujos PRB rūšys – *L. brevis*, *L. fabifermentans*, *L. spicheri*, *L. paraalimentarius*. PRB populiacijos pokyčiai priklausė, ne tik nuo fermentacijos temperatūros, bet ir nuo naudotos raugų ruošimui žaliavos ir labiau kito raugų gamybai naudojant ruginę žaliavą, nei kvietinę.
7. Sukurti PRB bioproduktai iš bulvių sulčių sumažino vasarinių kviečių grūdų sėklos biologinę taršą: *Fusarium* genties mikroskopinių grybų sumažėjo 73 %, *Alternaria* genties – 27 %, o *Cochliobolus sativus* – 63 %. Bioproduktai sumažino šaknų ligotumą 46 % bei sėklų pažeidimą *Fusarium* genties ir *Cochliobolus sativus* grybais atitinkamai 87 ir 50 %. Įrodyta, kad maisto gamybos šalutiniai produktai (kviečių sėlenos, salyklojai, melasa, žlaugtai) yra tinkama terpė PRB dauginimui ir antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčios pieno rūgšties, įskaitant jos L(+) izomerą, susidarymui.

LITERATŪRA

1. Lopez, H. W., *et al.* Strains of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs degrade phytic acid and improve calcium and magnesium solubility from whole wheat flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48(6), p. 2281–2285.
2. Lopez, H. W., *et al.* Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49(5), p. 2657–2662.
3. Lopez, H. W., *et al.* Making bread with sourdough improves mineral bioavailability from reconstituted whole wheat flour in rats. *Nutrition*. 2003, 19(6), p. 524–530.
4. Juodeikienė, G., *et al.* Naujų fermentuotų produktų įtaka kvietinių kepinių mikrobiologiniams rodikliams ir žiedėjimui. *Maisto Chemija ir Technologija*. 2009, 43(2), p. 36–45.
5. Hansen, A. 2004. Sourdough bread. In *Handbook of food and beverage fermentation technology*. Marcel Dekker, Inc. 729–755 p.
6. Spicher, G.; Stephan, H. *Handbuch Sauerteig, Biologie, Biochemie, Technologie*, BEHR'S Verlag, Hamburg. 1999. 223–403 p.
7. Kulp, K.; Lorenz, K. *Handbook of dough fermentations*. Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A, 2003. 97–144 p.
8. Bruemmer, J. M.; Lorenz, K. European developments in wheat sourdoughs. *Cereal Foods World*. 1991, 36, p. 310–312.
9. Lund, B.; Hansen, A.; Lewis, M. J. The influence of dough yield on acidification and production of volatiles in sourdoughs. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 1989, 22(4), p. 150–153.
10. Hansen, B.; Hansen, A. Volatile Compounds in Wheat Sourdoughs Produced by Lactic-Acid Bacteria and Sourdough Yeasts. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung Und Forschung*. 1994, 198(3), p. 202–209.
11. Hansen, A.; Hansen, B. Influence of wheat flour type on the production of flavour compounds in wheat sourdoughs. *Journal of Cereal Science*. 1994, 19(2), p. 185–190.
12. Pot, B.; Tsakalidou, E. Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. In Ljungh, Ä.; Wadström, T. *Lactobacillus molecular biology: From genomics to probiotics*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2009. 3–59 p.
13. Kandler, O.; Weiss, N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 190 I. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. 1986, vol. 2, 1209–1234 p.
14. Papagianni, M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2012, 3(4).
15. Rattanachaikunsopon, P.; Phumkhachorn, P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*. 2010, 1(4), p. 218–228.
16. Sánchez-Maldonado, A. F.; Schieber, A.; Gänzle, M. G. Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria; structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2011, 111(5), p. 1176–1184.

17. Svanström, Å., *et al.* The lactic acid bacteria metabolite phenyllactic acid inhibits both radial growth and sporulation of filamentous fungi. *BMC Research Notes*. 2013, 6(1), p. 1–9.
18. Riley, M. A.; Chavan, M. A. *Bacteriocins – ecology and evolution*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. 2007. 45–83 p.
19. Yang, E. J.; Chang, H. C. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, 139(1-2), p. 56–63.
20. Yang, E., *et al.* Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*. 2012, 12:48.
21. Balciunas, E. M., *et al.* Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*. 2013, 32(1), p. 134–142.
22. Meignen, B., *et al.* Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. *Food Microbiology*. 2001, 18 (3), p. 239–245.
23. Czerny, M.; Schieberle, P. Important Aroma Compounds in Freshly Ground Wholemeal and White Wheat Flour Identification and Quantitative Changes during Sourdough Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50(23), p. 6835–6840.
24. Katina, K.; Poutanen, K.; Karin, A. Influence and interaction of processing condition and starter culture on formation of acids, volatile compounds, and amino acids in wheat sourdoughs. *Cereal Chemistry*. 2004, 81(5), p. 598–610.
25. Juodeikienė, G., *et al.* Antimikrobiškai aktyviomis *Pediococcus acidilactici* fermentuotų raugų įtaka kvietinių kepinių kokybei ir pelėjimui. *Maisto Chemija ir Technologija*. 2008, 42 (2), p. 42–54.
26. Salmekallio-Marttila, M.; Katina, K.; Autio, K. Effect of bran fermentation on quality and microstructure of high-fibre wheat bread. *Cereal Chemistry*. 2001, 78(4), p. 429–435.
27. Gerez, C. L., *et al.* Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*. 2009, 20(2), p. 144–148.
28. Valerio, F., *et al.* Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* rosy spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, 122(3), p. 328–332.
29. Pepe, O., *et al.* Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, 69(4), p. 2321–2329.
30. Rosenquist, H.; Hansen, A. The antimicrobial effect of organic acids, sour dough and nisin against *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* isolated from wheat bread. *Journal of Applied Microbiology*. 1998, 85(3), p. 621–631.
31. Corsetti, A.; Gobbetti, M.; Smacchi, E. Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiology*. 1996, 13(6), p. 447–456.
32. Todorov, S. D., *et al.* Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, 48(3), p. 167–177.
33. Digaitienė, A. Fermentuoti produktai kvietinei plikytai duonai: pieno rūgšties bakterijų antimikrobinis aktyvumas. Kauno technologijos universitetas. Disertacijos tezės 2006.

34. Narbutaite, V. Fermentation of extruded material by lactic acid bacteria and its products in bread making. *Daktaro disertacija* 2010, KTU.
35. Makaravičius, T. Influence of enzyme composition on formation of oligosaccharides in beverages from extruded cereals in beverages from extruded cereals. *Daktaro disertacija* 2011, KTU.
36. Juodeikiene, G., et al. Solid-state fermentation of *Silybum marianum* L. seeds used as additive to increase the nutritional value of wheat bread. *Food Technology and Biotechnology*. 2013, 51(4), p. 528–538.
37. Juodeikienė, G., et al. The impact of novel fermented products containing extruded wheat material on the quality of wheat bread. *Food Technology and Biotechnology*. 2011, 49(4), p. 502–510.
38. Axelsson, L. *Lactobacillus reuteri* a member of the gut bacterial flora. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. 1990.
39. Piard, J. C.; Desmazeaud, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. 1991, 71(5), p. 525–541.
40. Kabara, J.; Eklund, T. Organic acid and esters. In N. J. Russel & G. W. Gould (Eds.), *Food preservatives*. London: Blackie. 1991. 44–71 p.
41. Corsetti, A., et al. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998, 50(2), p. 253–256.
42. Niku-Paavola, M. L., et al. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 1999, 86(1), p. 29–35.
43. Ogunbanwo, S. T., et al. Effects of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* co-cultures used as starters on the nutritional contents and shelf life of cassava-wheat bread. *Journal of Applied Biosciences*. 2008, 12(1), p. 612–622.
44. Magnusson, J., et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, 219(1), p. 129–135.
45. Rouse, S., et al. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, 104(3), p. 915–923.
46. Yang, E. J.; Kim, Y. S.; Chang, H. C. Purification and Characterization of Antifungal δ -Dodecalactone from *Lactobacillus plantarum* AF1 Isolated from Kimchi. *Journal of Food Protection*. 2011, 74(4), p. 651–657.
47. Ryan, L. A. M., et al. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 146(3), p. 276–283.
48. Sawa, N., et al. Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* D98. *Journal of Applied Microbiology*. 2013, 115(1), p. 61–69.
49. Hu, M., et al. Purification and Characterization of Plantaricin 163, a Novel Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* 163 Isolated from Traditional Chinese Fermented Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 61(47), p. 11676–11682.
50. Ammor, S., et al. I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*. 2006, 17(6), p. 454–461.

51. Garneau, S.; Martin, N. I.; Vederas, J. C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*. 2002, 84(5–6), p. 577–592.
52. De Vuyst, L.; Leroy, F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2007, 13(4), p.194–199.
53. Jack, R. W.; Tagg, J. R.; Ray, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*. 1995, 59(2), p. 171–200.
54. Vandenberg, P. A.; Kanka, B. S. 1989. Antifungal product. United States Patent. 4,877,615.
55. Roy, U., *et al.* Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. *International Journal Food Microbiology*. 1996, 32(1-2), p. 27–34.
56. Lavermicocca, P., *et al.* Purification and characterization of novel antifungal compounds by sourdough *Lactobacillus plantarum* 21B. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66(9), p. 4084–4090.
57. Ström, K., *et al.* *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3 phenyllactic acid. *Applied and Environment Microbiology*. 2002, 68(1), p. 4322–4327.
58. Mandal, V.; Sen., S. K.; Mandal, N. C. Detection, isolation and partial characterization of antifungal compound(s) produced by *Pediococcus acidilactici* LAB 5. *Natural product Communications*. 2007, 2, p. 671–674.
59. Rizzello, C. G., *et al.* Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chemistry*. 2011, 127(3), p. 952–959.
60. Coda, R., *et al.* Antifungal Activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during Sourdough Fermentation: Identification of Novel Compounds and Long-Term Effect during Storage of Wheat Bread. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(10), p. 3484–3492.
61. Muhialdin, B. J.; Hassan, Z.; Sadon, S. K. Antifungal Activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004 and *L. paracasi* D5 on Selected Foods. *Journal of Food Science*. 2011, 76(7), p. 493–499.
62. Muhialdin, B. J., *et al.* Effect of pH and Heat Treatment on Antifungal Activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Lactobacillus pentosus* G004 and *Pediococcus pentosaceus* Te010. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 2011, 8, p. 41–53.
63. Muhialdin, B. J.; Hassan, Z. Screening of Lactic Acid Bacteria for Antifungal Activity against *Aspergillus oryzae*. *American Journal of Applied Science*. 2011, 8, p. 447–451.
64. Wang, H., *et al.* Production and Characterization of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLOS ONE*, 2012b, 7(1), p. e29452. doi:10.1371/journal.pone.0029452.
65. Axelsson, L. T., *et al.* Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1989, 2(2), p. 131–136.
66. Lambert, R.J.; Stratford, M. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*. 1999, 86(1), p. 157–164.
67. Stratford, M.; Rose, A. H. Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*. 1986, 132(1), p. 1–6.

68. Krebs, H. A., *et al.* Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemical Journal*. 1983, 214(3), p. 657–663.
69. Forsythe, S. J. 2010. The microbiology of safe food. Chichester, U.K.; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Pub., 176–180 p.
70. Russell, N. J.; Grahame, W. Food preservative. Springer, 2003.
71. Benthin, S.; Villadsen, J. Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *Journal of Applied Bacteriology*. 1995, 78(6), p. 647–654.
72. Ahmad, N.; Marth, E. H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35 degree in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. *Journal of Food Protection*. 1989, 52, p. 688–695.
73. Richards, R. M. E.; Xing, D. K. L.; King, T.P. Activity of p-aminobenzoic acid compared with other organic acids against selected bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 1995, 78(3), p. 209–215.
74. Wong, H. C.; Chen, Y. L. Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988, 54(9), p. 2179–2184.
75. Adams, M. R.; Hall, C. J. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science and Technology*. 1988, 23(3), p. 287–292.
76. Eklund, T. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology*. 1984, 1(4), p. 179–185.
77. Devlieghere, F.; Debevere, J. Influence of dissolved carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 2000, 33(8), p. 531–537.
78. Cords, B. R.; Dychdala, G. R. Sanitizers: halogens, surface-active agents, and peroxides. In Davidson, P. M.; Branen, A. L. Antimicrobials in Foods (2nd edition). Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1993, 469-537 p.
79. Jay, J. M. Effect of diacetyl on foodborne microorganisms. *Journal of Food Science*. 2006, 47(6), p. 1829–1831.
80. Jay, J. M. Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982, 44(3), p. 525–532.
81. Cogan, T. M. Les levains lactiques mésophiles. Une revue. *Le Lait*. 1980, 60(597), p. 397–425.
82. Ogawa, J., *et al.* Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005, 100(4), p. 355–364.
83. Desbois, A. P.; Smith, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 85(6), p. 1629–1642.
84. Kabara, J. J.; Marshall, D. L. Medium-Chain Fatty Acids and Esters. In Davidson, P. M.; Sofos, J. N.; Branen, A. L. Antimicrobials in Food (3rd edition). Taylor & Francis Group, LLC, FL, USA. 2005, 327–361 p.

85. Arqués, J. L., *et al.* Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain. *Journal of Dairy Science*. 2008, 91(1), p. 70–75.
86. Cleusix, V., *et al.* Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiology*. 2007, 7:101.
87. Schaefer, L., *et al.* The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*. 2010, 156(6), p. 1589–1599.
88. Dalić, D. K. D.; Deschamps, A. M.; Richard-Forgeta, F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*. 2010, 21(4), p. 370–380.
89. Chung, T. C., *et al.* In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology and Health and disease*. 1989, 2(2), p. 137–144.
90. Mozzi, F.; Raya, R. R.; Vignolo, G. M. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria– Novel Applications. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell Pub., USA. 2010. 89–111 p.
91. Al-Allaf, M. A. H.; Al-Rawi, A. M. M.; Al-Mola, A. T. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from minced beef meat against some pathogenic bacteria. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. 2009, 23(1), p. 115–117.
92. Riley, M. A.; Wertz, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*. 2002, 56(1), p. 117–137.
93. Nes, I.F., *et al.* Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1996, 70(2–4), p. 113–128.
94. Nes, I. F.; Holo, H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*. 2000, 55(1), p. 50–61.
95. Šušković, J., *et al.* Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. 2010, 48(3), p. 296–307.
96. Zacharof, M. P.; Lovittb, R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria A Review Article. *APCBEE Procedia*. 2012, 2(7-8), p. 50–56.
97. Oppegård, C., *et al.* The Two-Peptide Class II Bacteriocins: Structure, Production, and Mode of Action. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 2007, 13(4), p. 210–219.
98. Desriac, F., *et al.* Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: Inventory and Potential Applications as an Aquaculture Probiotic. *Marine Drugs*. 2010, 8(4), p. 1153–1177.
99. Klaenhammer, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, 12(1-3), p. 39–85.
100. Todorov, S. D; Dick, L. M. T. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2004, 20(6), p. 643–650.
101. Todorov, S. D; Dicks, L. M. T. Production of bacteriocin ST33LD, produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, as recorded in the presence of different medium components. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2005, 21(8-9), p. 1585–1590.

102. Todorov, S. D.; Dicks, L. M. T. Medium components effecting bacteriocin production by two strains of *Lactobacillus plantarum* ST414BZ and ST664BZ isolated from boza. *Biologia*. 2006, 61(3), p. 269–274.
103. Larsen, A. G.; Vogensen, F. K.; Josephsen, J. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Journal of Applied Microbiology*. 1993, 75(2), p. 113–122.
104. Todorov, S. D.; Dicks L. M. T. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005, 36(2-3), p. 318–326.
105. Anastasiadou, S., *et al.* Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation: Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008, 43(6), p. 448–454.
106. Cabo, M. L., *et al.* Effects of aeration and pH gradient on nisin production.: A mathematical model. *Enzyme and Microbial Technology*. 2001, 29(4-5), p. 264–273.
107. Anastasiadou, S., *et al.* Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL 1832: production conditions and characterization. *Bioresource Technology*. 2008, 99(13), p. 5384–5390.
108. Amiali, M. N; Lacroix, C.; Simard, R. E. High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 1998, 14(6), p. 887–894.
109. Altuntas, E. G.; Cosansu, S.; Ayhan K. Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, 141(1-2), p. 28–31.
110. Boivin-Jahns, V., *et al.* Comparison of Phenotypical and Molecular Methods for the Identification of Bacterial Strains Isolated from a Deep Subsurface Environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995, 61(9), p. 3400–3406.
111. Mullis, K. B. The Unusual origin of the Polymerase chain- reaction. *Scientific American*. 1990, 262(4), p. 56–61.
112. Van der Meulen R., *et al.* Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73(15), p. 4741–4750.
113. Tůma, Š.; Kučerová, K.; Plocková, M. Isolation of anticlostridially active lactobacilli from semi-hard cheese. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, 27(2), p. 12–17.
114. Mohammed, M., *et al.* Rep-PCR characterization and biochemical selection of lactic acid bacteria isolated from the Delta area of Egypt. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, 128 (3), p. 417–423.
115. Jensen, M. P.; Ardo, Y.; Vogensen, F. K. Isolation of cultivable thermophilic lactic acid bacteria from cheeses made with mesophilic starter and molecular comparison with dairy-related *Lactobacillus helveticus* strains. *Letters in Applied Microbiology*. 2009, 49 (3), p. 396–402.
116. Kingston, J. J., *et al.* Molecular characterization of lactic acid bacteria recovered from natural fermentation of beet root and carrot Kanji. *Indian Journal of Microbiology*. 2010, 50(3), p. 292–298.

117. Reale, A., *et al.* Identification of lactobacilli isolated in traditional ripe wheat sourdoughs by using molecular methods. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011, 27(2), p. 237–244.
118. Patel, J. B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2001, 6(4), p. 313–321.
119. Petti, C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*. 2007, 44(8), p. 1108–1114.
120. Green, S. J.; Leigh, M. B.; Neufeld J. D. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. 2010, p. 4137–4158. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) for Microbial Community Analysis.
121. Dabkevičius, Z.; Brazauskienė, I. Augalų ligų apskaita. Augalų patologija, 2007. 160–166 p.
122. Babalola, O. O., Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*. 2010, 32(11), p. 1559–1570.
123. Song, D.; Ibrahim, S.; Hayek, S. Probiotics. Edited by Everlon C. Rigobelo, In. *Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science*, INTECH, 2012.
124. Pekarskas, J. Augimo aktyvatoriaus Penergetic-p įtaka ekologiškai auginamiems vasariniam kviečiams. *Žemės ūkio mokslai*. 2012, 19(3), p. 151–160.
125. Patentas. Biocontrol for plants with *Paenibacillus macerans*, *Pseudomonas putida* and *Sporobolomyces roseus*. U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/053,310, filed July 22, 1997. Prieiga per internetą <http://www.google.com/patents/EP0998554A4?cl=en> žiūrėta 2014 rugpjūčio 9.
126. Tahvonon, R.; Hannukkala, A.; Avikainen, H. Effect of seed dressing treatment of *Streptomyces griseoviridis* on barley and spring wheat in field experiments. *Agricultural Science in Finland*. 1995, 4 (4), p. 419–427.
127. Valiuškaitė, A.; Survilienė, E.; Raudonis, L. Effect of Mycostop on *Fusarium* root-rot agents of raspberry. *Sodininkystė ir Daržininkystė*. 2008, 27(1), p. 47–51.
128. Liu, J., *et al.* Biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato and growth-promoting effect of bacteria isolated from recycled substrates of soilless crops. *Phytopathologia Mediterranea*. 2010, 49(2), p. 163–171.
129. Martin, C., *et al.* Can Research on Plants Contribute to Promoting Humans Health? *Plant Cell*. 2011, 23(5), p. 1685–1699.
130. Iemma, F., *et al.* Synthesis and Antioxidant Efficiency of a New Copolymer Containing Phosphorylated Myo-Inositol. *Macromolecular Bioscience*. 2005, 5(11), p. 1049–1056.
131. Hemery, Y., *et al.* Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science*. 2007, 46(3), p. 327–347.
132. Posner, E. S. Wheat. In Handbook of Cereals Science and Technology. Marcel Dekker, Inc, New York. 2009. 1–29 p.
133. Smith, M. M.; Hartley, R. D. Occurrence and Nature of Ferulic acid Substitution of cell-Wall Polysaccharides in Gramineous Plants. *Carbohydrate Research*. 1983, 118(16), p. 65–80.
134. Reddy, N. R.; Sathe, S. K. Food Phytates. 2002.
135. Kent, N. L.; Evers, D. Technology of cereals. fourth,. Great Britain, Pergamon. 1994. 29–52 p.

136. Fardet, A. New hypotheses for the Health – protective Mechanism of Whole-Grain cereals: What Is Beyond Fibre? *Nutrition Research Reviews*. 2010, 23(1), p. 65–134.
137. Young, T. E.; Gallie, D. R. Programed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology*. 2000, 44, p. 283–301.
138. Pommeranz, Y. Wheat: Chemistry and technology, Volume Edited by American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA. 1988. 514 p.
139. MacMasters, M. M.; Hinton, J. J. C.; Bradbury, D. Microscopic structure and composition of wheat kernel. In *Wheat: Chemistry and Technology*, 2nd ed. Y. Pomeranz. ed. Am. Assos. Cereal Chem. St. Paul. MN, 1991. 51–111 p.
140. Hidvegi, M.; Lasztity, R. Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins. *Periodica Polytechnica ser. Chemical Engineering*. 2002, 46(1–2), p. 59–64.
141. McGuire, M.; Kathy, A. B. Nutrition Sciences, From Fundamentals to Food. Wadsworth Cengage Learning., 2nd. ed. Physical Description Belmont, Calif. Wadsworth Cengage Learning. 2011.
142. Slavin, J.; Jacobs, D.; Marquart, L. Whole-Grain Consumption and Chronic Disease: Protective Mechanisms. *Nutrition and Cancer-An International Journal*. 1997, 27(1), p. 14–21.
143. Hosney, R. C. Principles of cereal science and technology. Minesota, USA, AACC, Inc., St. Paul, 1994. 1–28 p.
144. Pedersen, B.; Knudsen, K. E.; Eggum, B. O. Nutritive value of cereal products with emphasis on the effect of milling. *World review of nutrition and dietetics*. 1989, 60, p. 1–91.
145. Kumara, V.; Sinhab, A. K.; Makkara, H. P.S. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*. 2010, 120(4), p. 945–959.
146. Xu, Q. J., *et al.* Electrochemical and photoelectrochemical study of the self-assembled monolayer phytic acid on cupronickel B30. *Anti-Corrosion Methods and Materials*. 2009, 56 (2), p. 95–102.
147. Turner, B. L., *et al.* Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 2002, 357(1420), p. 449–469.
148. Reddy, N. R., *et al.* Phytates in cereals and legumes. CRC Press. Boca Raton, Fla. 1989.
149. Ali, M., *et al.* Phytic acid: How far have we come? *African Journal of Biotechnology*. 2010, 9(11), p. 1551–1554.
150. Lolos, G. M.; Palamidis, N.; Markakis, P. Phytic acid total phosphorus relationship in barely, oats, soybeans, and eheat. *Cereal Chemistry*. 1976, 53(6), p. 867–871.
151. Garcia-Estepa, R. M.; Guerra-Hernandez, E.; Garcia-Villanova, B. Phytic acid content in milled cereal products and breads. *Food Research International*. 1999, 32(3), p. 217–221.
152. Harland, B. F.; Oberleas, D. Anion-Exchange method for determination of phytate in foods: Collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*. 1986, 69(4), p. 667–670.

153. Graf, E.; Dintzis, F. R. Determination of phytic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1982, 30(6), p. 724–727.
154. Harland, B. F. Phytate contents of foods. In G. A. Spiller, CRC Handbook of dietary fiber in human nutrition (2nd ed). Boca Raton, USA: CRC Press. 1993.
155. Požrl, T., *et al.* Phytate Degradation during Breadmaking: The Influence of Flour Type and Breadmaking Procedures. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009, 27(1), p. 29–38.
156. Anjum, F. M., *et al.* Phytate and mineral content in different milling fractions of some Pakistani spring wheats. *International Journal of Food Science and Technology*. 2002, 37(1), p. 13–17.
157. Greiner, R.; Konietzny, U. Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, 44(2), p. 125–140.
158. Reddy, N. R.; Sathe, S. K.; Salunkhe, D. K. Phytates in Legumes and Cereals. *Advances in Food Research*. 1982, 28, p. 1–92.
159. Iqbal, T. H.; Lewis, K. O.; Cooper, B. T. Phytase activity in the human and rat small intestine. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 1994, 35(9), p. 1233–1236.
160. Harinarayan, C. V., *et al.* High prevalence of low dietary calcium, high phytate consumption, and vitamin D deficiency in healthy south Indians. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007, 85(4), p. 1062–1067.
161. Hallberg, L. Wheat fiber, phytates and iron absorption. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1987, 22(129), p. 73–79.
162. Siener, R.; Heynck, H.; Hesse, A. Calcium-Binding Capacities of Different Brans under Simulated Gastrointestinal pH Conditions. In Vitro Study with ⁴⁵Ca. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49(9), p. 4397–4401.
163. Persson, H., *et al.* Binding of Mineral Elements by Dietary Fibre Components in Cereals. In vitro (III). *Food Chemistry*. 1991, 40(2), p. 169–183.
164. Knuckles, B. E.; Betschart, A. A. Effect of Phytate and other Myoinositol Phosphate-Esters on Alpha-Amylase Digestion of Starch. *Journal of Food Science*. 1987, 52(3), p. 719–721.
165. Deshpande, S. S.; Cheryan. M. Effects of Phytic Acid, Divalent Cations and Their Interactions on Alpha-Amylase Activity. *Journal of Food Science*. 1984, 49(2), p. 516–520.
166. Knuckles, B. E. Effect of Phytate and other Myoinositol Phosphate-Esters on Lipase Activity. *Journal of Food Science*. 1988, 53(1), p. 250–252.
167. Deshpande, S. S.; Damodoran S. Effect of Phytate on Solubility, Activity and Conformation of Trypsin and Chymotrypsin. *Journal of Food Science*. 1989, 54(3), p. 695–699.
168. Brune, M., *et al.* Iron-Absorption From Bread in Humans – Inhibiting Effects of Cereal Fiber, Phytate and Inositol Phosphates With Different Numbers of Phosphate Groups. *Journal of Nutrition*. 1992, 122(3), p. 442–449.
169. Hallberg, L.; Brune, M.; Rossander L. Iron-Absorption in Man – Ascorbic-Acid and Dose-Dependent Inhibition by Phytate. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1989, 49(1), p. 140–144.

170. Mendonza, C., et al. Effect of Genetically Modified, Low-Phytic Acid Maize on Absorption of Iron From Tortillas. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1998, 68(5), p.1123–1127.
171. Sandstrom, B.; Sandberg, A. S. Inhibitory Effects of Isolated Inositol Phosphates on Zinc-Absorption in Humans. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*. 1992, 6(2), p. 99–103.
172. Kivisto, B. et al. Effect of Meal Composition and Phytate Content on Zinc-Absorption in Humans From An Extruded Bran Product. *Journal of Cereal Science*. 1989, 10(3), p. 189–197.
173. Navert, B.; Sandstrom, B.; Cederblad A. Reduction of the Phytate Content of Bran by Leavening in Bread and Its Effect on Zinc-Absorption in Man. *British Journal of Nutrition*. 1985, 53(1), p. 47–53.
174. Rimbach, G., et al. Effect of Phytic Acid Microbial Phytase on Cd Accumulation, Zn Status, Apparent Absorption of Ca, P, Mg, Fe, Zn, Cu, and Mn in Growing Rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 1995, 39(6), p.361–370.
175. Lonnerdal, B., et al. Inhibitory Effects of Phytic Acid and other Inositol Phosphates on Zinc and Calcium-Absorption in Suckling Rats. *Journal of Nutrition*. 1989, 119(2), p. 211–214.
176. Bohn, T., et al. Phytic Acid Added to White-Wheat Bread Inhibits Fractional Apparent Magnesium Absorption in Humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, 79(3), p. 418–423.
177. Reinhold, J. G., et al. Decreased Absorption of Calcium, Magnesium, Zinc, and Phosphorus by Humans Due to Increased Fiber and Phosphorus Consumption as Wheat Bread. *Journal of Nutrition*. 1976, 106(4), p. 493–503.
178. Davidsson, L., et al. Manganese Absorption in Humans – the Effect of Phytic Acid and Ascorbic-Acid in Soy Formula. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1995, 62(5), p. 984–987.
179. Sandberg, A. S.; Svanberg, U. Phytate hydrolysis by phytase in cereals. Effects on in vitro estimation of iron availability. *Journal of Food Science*. 1991, 56(5), p.1330–1333.
180. Larsson, M.; Sandberg, A. S. Phytate reduction in oats during malting. *Journal of Food Science*. 1992, 57(4), p. 994–997.
181. Bergman, E. L., et al. Hydrothermal processing of barley (Cv Blenheim): Optimisation of phytate degradation and increase of free myo-inositol. *Journal of Cereal Science*. 1999, 29(3), p. 261–272.
182. Towo, E.; Matuschek, E.; Svanberg, U. Fermentation and enzyme treatment of tannin sorghum gruels: Effects on phenolic compounds, phytate and in vitro accessible iron. *Food Chemistry*. 2006, 94(3), p. 369–376.
183. Shobirin, M. H.; Farouk, A.; Greiner, R. Potential phytate-degrading enzyme producing bacteria isolated from Malaysian maize plantation. *African Journal of Biotechnology*. 2009, 8(15), p. 3540–3546.
184. De Angelis, M., et al. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, 87(3), p. 259–270.
185. Nuobariene, L., et al. Phytase-active yeasts from grain-based food and beer. *Journal of Applied Microbiology*. 2011, 110(6), p. 1370–1380.

186. Nuobariene, L.; Hansen, A.S.; Arneborg, N. Isolation and identification of phytase-active yeasts from sourdoughs. *LWT – Food Science and Technology*. 2014, 48(2), p. 190–196.
187. Graf, E. Applications of Phytic Acid. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1983, 60(11), p. 1861–1867.
188. Casey, A.; Walsh, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *Journal of Biotechnology*. 2004, 110(3), p. 313–322.
189. Scott, J. J. Alkaline Phytase Activity in Nonionic Detergent Extracts of Legume Seeds. *Plant Physiology*. 1991, 95(4), p. 1298–1301.
190. Centeno, C., *et al.* Effect of several germination conditions on total P, phytate P, phytase, and acid phosphatase activities and inositol phosphate esters in rye and barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49(7), p. 3208–3215.
191. Lei, X. G.; Porres, J. M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters*. 2003, 25(21), p. 1787–1794.
192. Steiner, T., *et al.* Distribution of phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar. *Animal Feed Science and Technology*. 2007, 133(3–4), p. 320–334.
193. Azeke, M. A., *et al.*, Effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), millet (*Panicum miliaceum*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Food Science and Technology*. 2011, 48(6), p. 724–729.
194. Delia, E.; Tafaj, M.; Männer, K. Total Phosphorus, Phytate and Phytase Activity of Some Cereals Grown in Albania and used in Non-Ruminant Feed Rations. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2011, 25(4), p. 2587–2590.
195. Greiner, R.; Konietzny, U.; Jany, K. D. Purification and properties of a phytase from rye. *Food Technology and Biotechnology*. 1998, 22(2), p. 143–161.
196. Greiner, R.; Egli, I. Determination of the activity of acidic phytate degrading enzymes in cereal seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51, (4), p. 847–850.
197. Fretzdorff, B.; Weipert, D. Phytic Acid in Cereals .1. Phytic Acid and Phytase in Rye and Rye Products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*. 1986, 182(4), p. 287–293.
198. Peers, F. G. The Phytase of Wheat. *Biomedical Journal*. 1957, 53(1), p. 102–110.
199. Nielsen, M. M.; Damstrup, M. L.; Hansen, A. An optimised micro-titer plate method for characterisation of endogenous rye phytase under industrial rye bread making conditions. *European Food Research and Technology*. 2008, 227(4), p. 1009–1015.
200. Zotta, T.; Ricciardi, A.; Parente, E. Enzymatic activities of lactic acid bacteria isolated from Cornetto di Matera sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, 115(2), p. 165–172.
201. Valcheva, R., *et al.* Proteolytic and phytase activity in sourdough lactic acid bacteria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2009, 23(1), p. 666–668.
202. Palacios, M. C., *et al.* Phytate degradation by *Bifidobacterium* on whole wheat fermentation. *European Food Research and Technology*, 2008, 226(4), p. 825–831.
203. Türk, M., *et al.* Inositol hexaphosphate hydrolysis by baker's yeast. Capacity, kinetics, and degradation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48(1), p. 100–104.

204. Oh, N.S.; In, M. J. Phytate degradation by *Leuconostoc mesenteroides* KC51 cultivation in soymilk. *African Journal of Biotechnology*. 2009, 8(13), p. 3023–3026.
205. Zamudio, M.; Gonzalez, A.; Medina, J. A. *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Letters in Applied Microbiology*. 2001, 32(3), p. 181–184.
206. Bohn, L., *et al.* Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55(18), p. 7547–7552.
207. Lim, P. E.; Tate, M. E. The phytases. II. Properties of phytase fractions F1 and F2 from wheat bran and the myo-inositol phosphates produced by fraction F2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*. 1973, 302(2), p. 316–328.
208. Greiner, R. K. D.; Janya, M. L. Almingerb. Identification and Properties of myo - Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases (Phytases) from Barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Cereal Science*. 2000, 31(2), p. 127–139.
209. Sung, H. G., *et al.* Effect of germination temperature on characteristics of phytase production from barley. *Bioresource Technology*. 2005, 96(11), p. 1297–303.
210. Reale, A., *et al.* The importance of lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55(8), p. 2993–2997.
211. Nielsen, M. N., *et al.* Phytase activity and degradation of phytic acid during rye bread making. *European Food Research and Technology*. 2007, 225(2), p. 173–181.
212. Reale, A., *et al.* Phytate degradation by lactic acid bacteria and yeasts during the wholemeal dough fermentation: a³¹P NMR study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52(20), p. 6300–6305.
213. Chaoui, A.; Fais, M.; Belhacen, R. Effect of natural starters used for sourdough bread in Morocco on phytate biodegradation. *East Mediterranean Health Journal*. 2003, 9(1-2), p. 141–147.
214. Sreeramulu, G., *et al.* *Lactobacillus amylovorus* as a phytase producer in submerged culture. *Letters in Applied Microbiology*. 1996, 23(6), p. 385–388.
215. Twort, F. W. An investigation on the nature of ultra- microscopic viruses. *The Lancet*. 1915, 186(4814), p. 1241–1243.
216. d’Herelle, F. An invisible microbe that is antagonistic to the dysentery *bacillus*. *Comptes Rendus de l’Académie des Sciences*. 1917, 165, p. 373–375.
217. Kuchment, A. *The Forgotten Cure: The Past and Future of Phage Therapy*. Springer New York, New York, NY, 2011.
218. Whitehead, H. R.; Cox, G. A Bacteriophage Phenomena in Cultures of Lactic Streptococci. *Journal of Dairy Research*. 1936, 7(1), p. 55–62.
219. Sherman, J. M. The streptococci. *Bacteriological Reviews*. 1937, 1(1), p. 3–97.
220. Garneau, J. E; Moineau, S. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories*. 2011, 10(1), S20.
221. Marcó, M. B.; Moineau, S.; Quiberoni, A. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*. 2012, 2(3), p. 149–158.
222. Ackermann, H. W. Phage Classification and Characterization. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions*. Springer. 2009, Vol. 501, 127–140 p.

223. Ackermann, H. W. Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*. 2011. p. 90–94.
224. Ackermann, H. W.; Prangishvili, D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of Virology*. 2012, 157(10), p. 1843–1849.
225. Jung, J. Y., *et al.* Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(7), p. 2264–2274.
226. Von Wright, A.; Axelsson, L. Lactic acid bacteria: An Introduction. Florida, CRC Press, 2012.
227. Rousseau, G. M.; Moineau, S. Evolution of *Lactococcus lactis* Phages within a Cheese Factory. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(16), p. 5336–5344.
228. Mills, S., *et al.* Bacteriophage and Anti-Phage Mechanisms in Lactic Acid Bacteria. Lactic acid bacteria: An introduction, CRC Press. 2011. 165–186 p.
229. Ismail, E. A., *et al.* 2009. Characterization of temperate *Lactobacillus gasseri* phages Lgal and its impact as prophage on autolysis of its lysogenic host strains. *Current Microbiology*. 2009, 58(6), p. 648–653.
230. Deveau, H., *et al.* Biodiversity and Classification of lactococcal Phages. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72(6), p. 4338–4346.
231. Atamer, Z., *et al.* Thermal resistance of bacteriophages attacking flavour-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *International Dairy Journal*. 2011, 21(5), p. 327–334.
232. Atamer, Z., *et al.* Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *International Dairy Journal*. 2009, 19(4), p. 228–235.
233. Marviga, C. L., *et al.* Heat tolerance of dairy lactococcal c2 phages. *International Dairy Journal*. 2011, 21(8), p. 556–560.
234. Reyrolle, J., *et al.* Lysogenic Strains of Lactic Acid Streptococci and Lytic Spectra of Their Temperate Bacteriophages. *Applied Environmental Microbiology*. 1982, 43(2), p. 349–356.
235. Shin, C.; Sato, Y. Isolation of *Leuconostoc* Bacteriophages from Dairy Products Japanese. *Journal of Zootechnical Science*. 1979, 50(6), p. 419–422.
236. Sozzi, T., *et al.* Isolation of a Bacteriophage of *Leuconostoc mesenteroides* from Dairy Products. *Journal of Applied Bacteriology*. 1978, 44(1), p. 159–161.
237. Lu, Z., *et al.* Sequence analysis of *Leuconostoc mesenteroides* bacteriophage Phi1-A4 isolated from an industrial vegetable fermentation. *Applies and Environmental Microbiology*. 2010, 76(6), p. 1955–1966.
238. Jang, S. H.; Hwang, M. H; Chang, H. I. Complete genome sequence of MH1, a *Leuconostoc* temperate phages. *Archives of virology*. 2010, 155(11), p. 1883–1885.
239. Kleppen, H. P.; Nes, I. F.; Holo, H. Characterization of a *Leuconostoc* Bacteriophage Infecting Flavor Producers of Cheese Starter Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(18), p. 6769–6772.
240. Ali, Y., *et al.* Classification of Lytic Bacteriophages Attacking Dairy *Leuconostoc* Starter Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79(12), p. 3628–3636.
241. Mills, S., *et al.* A new phage on the ‘Mozzarella’ block: Bacteriophage 5093 shares a low level of homology with other *Streptococcus thermophilus* phages. *International Dairy Journal*. 2011, 21(12), p. 963–969.

242. Capra, M. L., *et al.* Characterisation of three temperate phages released from the same *Lactobacillus paracasei* commercial strain. *International Journal of Dairy Technology*. 2010, 63(3), p. 396–405.
243. Mercantia, D. J., *et al.* Resistance of two temperate *Lactobacillus paracasei* bacteriophages to high pressure homogenization, thermal treatments and chemical biocides of industrial application. *Food Microbiology*. 2012, 29(1), p. 99–104.
244. Nagai, T. Bacteriophages of *Bacillus subtilis* (natto) and Their Contamination in Natto Factories, Bacteriophages, Dr. Ipek Kurtboke (Ed.), ISBN: 978-953-51-0272-4, InTech., 2012. 95–110 p.
245. Foschino, R.; Castiglioni, E.; Galli A. Characterization of *Lactobacillus fermentum* Bacteriophage Z63-B2. *Annali Di Microbiologiaed Enzimologia*. 1998, 48(2), p. 151–159.
246. Foschino, R.; Picozzi, C.; Galli, A. Comparative study of nine *Lactobacillus fermentum* bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, 91(3), p. 394–403.
247. Foschino, R.; Perrone, F.; Galli, A. Characterization of two virulent *Lactobacillus fermentum* bacteriophages isolated from sour dough. *Journal of applied microbiology*. 2008, 79 (6), p. 677–683.
248. Foschino, R.; Venturelli, E.; Picozzi C. Isolation and Characterization of a Virulent *Lactobacillus sanfranciensis* Bacteriophage and Its Impact on Microbial Population in Sourdough. *Current Microbiology*. 2005, 51(6), p. 413–418.
249. Yazar, G.; Tavman, Ş. Functional and Technological Aspects of Sourdough Fermentation with *Lactobacillus sanfranciensis*. *Food Engineering Reviews*. 2012, 4(3), p. 171–190.
250. Digaitiene, A., *et al.* Microbial population in Lithuanian spontaneous rye sourdoughs. *Ekologia i Technika*. 2005, 13(5), p. 193–198.
251. Schillinger, U.; Lücke, F. K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, 55(8), p. 1901–1906.
252. Herbert, E. M.; Raya, R. R.; De Giori G. S. Evaluation of minimal nutritional requirements of lactic acid bacteria used in functional foods. *Methods in Biotechnology*. 2004, 16, p. 139–148.
253. Versalovic, J., *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Science*. 1994, 2, p. 25–40.
254. Christiansen, P., *et al.* Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurised milk. *International Dairy Journal*. 2006, 16(10), p. 1196–1204.
255. Tuma, S., *et al.* Isolation of antifungally active lactobacilli from Edam cheese. *Acta Alimentaria*. 2007, 36(4), p. 405–414.
256. Olstrop, M.; Schnurer, J.; Passoth, V. Screening of yeast strains for phytase activity. *Fems Yeast Research*. 2009, 9(3), p. 478–488.
257. AACC Method 40-70. Elements by atomic Absorption spectrophotometry.
258. Žiaukienė, V. Mineraliniai elementai Lietuvoje auginamuose duoninių javų grūduose ir jų produktuose. Doktoro disertacija 2009, KTU.
259. Mathur, S. B.; Kongsdal, O. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi 102-137, 176-177, 234-255. Copenhagen. 2003.

260. Lugauskas, A.; Paškevičius, A.; Repečkienė, J. Patogeniški ir toksiški mikroorganizmai žmogaus aplinkoje. Vilnius. 2002. 20-26, 44-78, 166-180, 260-294 p.
261. International Rules for Seed Testing (ISTA) 2003. Seed Health Testing Methods. - Bassersdorf.
262. Mathre, D. E.; Johnston, R. H.; Grey, W. E. Diagnosis of common root rot of wheat and barley. Online. Plant Health Progress. 2003. doi:10.1094/PHP-2003-0819-01-DG.
263. Dabkevicius, Z., *et al.* The effect of thermal treatment on spring barley seed infection and germination. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2008, 95(4), p. 172–182.
264. Clokie, M. R. J.; Kropinski, A. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. Humana Press. 2009. 77–80 p.
265. Sambrook, J. The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual. Protocol 8: Purification of Bacteriophage lambda Particles by Isopycnic Centrifugation through CsCl Gradients. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.
266. Tarakanovas, P.; Raudonius, S. Agronominių tyrimų duomenų statistinė analizė taikant kompiuterines programas Anova, Stat, Split-plot iš paketo Selekcija. Akademija. 2003. 6-26 p.
267. Wang, H. E., *et al.* Quality of white bread made from lactic acid bacteria enriched dough. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2012, 36(6), p. 553–559.
268. Steele, J., Broadbent, J., Kok, J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Current Opinion in Biotechnology*. 2013, 24(2), p. 135–141.
269. Hassan, Y. I.; Bullerman, L. B. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, 121(1), p. 112–115.
270. Kandler, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antoine van Leuwenhoek*. 1983, 49(3), p. 202–224.
271. Ponts, N., *et al.* Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters*. 2006, 258(1), p. 102–107.
272. Gild, N. L.; Mayer, A. M. Evidence for rapid breakdown of hydrogen peroxide by *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters*. 1999, 176(2), p. 455–461.
273. Gourama, H.; Bullerman, L. B. Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *International Journal of Food Microbiology*. 1997, 34(2), p. 131–143.
274. Magnusson, J.; Schnürer, J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, 67(1), p. 1–5.
275. Lonner, C.; Preve, A. K. Acidification properties of lactic acid bacteria in rye sourdoughs. *Food Microbiology*. 1988, 5(1), p. 43–58.
276. Palacios, M. C., *et al.* Selection of lactic acid bacteria with high degrading activity for application in whole wheat breadmaking. *Journal of Food Science and Technology*. 2008, 41(1), p. 82–92.

277. Anastasio, M., *et al.* Selection and Use of Phytate-Degrading LAB to Improve Cereal-Based Products by Mineral Solubilization During Dough Fermentation. *Journal of Food Science*. 2010, 75(1), p. 28–35.
278. Todorov, S. D. Bacteriocin production by AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K TOsp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008, 39(1), p. 178–187.
279. Nieto-Lozano, J.C., *et al.* Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Science*. 2002, 62(2), p. 237–243.
280. Atanassova, M., *et al.* Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, 87(1-2), 63–73.
281. Todorov, S. D.; Dicks, L. M. T. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Research in Microbiology*. 2006, 161(2), p. 102–108.
282. Nel, H. A., *et al.* Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, 91(6), p. 1131–1138.
283. Todorov, S. D.; Dicks, L. M. T. Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from boza. *Food Technology and Biotechnology*. 2005, 43(2), p. 165–173.
284. Biswas, S. R., *et al.* Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991, 57(4), p. 1265–1267.
285. Juarez, T., M. S.; Bru, E.; Nader-Macías, M. E. Different combinations of salts affect the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2010, 85(1), p. 91–99.
286. Nilsson, L., *et al.* Role of Acetate in Production of an Autoinducible Class IIa Bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* A9b. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68(5), p. 2251–2260.
287. Kim, W. S.; Hall, R. J.; Dunn, N. W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997, 48(4), p. 449–453.
288. Bogovic-Matijasic, B.; Rogelj, I. Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221 – production studies in MRS–media at different pH-values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Process Biochemistry*. 1998, 33(3), p. 345–352.
289. Sharma, S.; Garg, A. P.; Sing, G. Optimization of fermentation conditions for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* CCSULAC1 on Modified MRS Medium. *International Journal of dairy Science*. 2010, 5(1), p. 1–9.
290. Zhang, J., *et al.* Modelling Growth and Bacteriocin Production by *Pediococcus acidilactici* PA003 as a Function of Temperature and pH Value. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, 166(6), p. 1388–1400.
291. Todorov, S. D.; Dicks, L. M. T. Bacteriocin production by *Pediococcus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *International Journal of food microbiology*. 2009, 132(2-3), p. 117–126.

292. Motarjemi, Y.; Nout, M. J. R. On behalf of the Joint FAO/WHO Workshop on Assessment of Fermentation as a Household Technology for Improving Food Safety. Food fermentation: a safety and nutritional assessment. Bulletin of the World Health Organization. 1996, 74 (6). p. 553–559.
293. Kotzanmanidis, C.; Roukas, T.; Skaracis, G. Optimization of lactic acid production from beet molasses *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2002, 18(5), p. 442–448.
294. Hofvendahl, K.; Hahn-Hägerdal, B. L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997, 20(4), p. 301–307.
295. Xiaodong, W.; Xuan, G.; Rakshit, S. K. Direct fermentative production of lactic acid on cassava and other starch substrates. *Biotechnology Letters*. 1997, 19(9), p. 841–843.
296. Bonestroo, M. H., *et al.* Inhibition of the growth of yeasts in fermented salads. *International Journal of Food Microbiology*. 1993, 17(4), p. 311–320.
297. Woolford, M. K. The antimicrobial spectra of some salts of organic acids and glutaraldehyde in respect to their potential as silage additives. *Grass and Forage Science*. 1984, 39(1), p. 53–57.
298. Eklund, T. Organic acids and esters. Mechanisms of action of food preservation procedures, Elsevier Applied Sciences, New York, USA 1989. 161–200 p.
299. Schnürer, J.; Magnusson, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*. 2005, 16(1-3), p. 70–78.
300. Didar, Z. Effect of Sourdough on Phytic Acid Content and Quality of Iranian Sangak Bread. *Journal of Nutrition & Food Sciences*. 2011, 1(5), p. 1416–1421.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Straipsniai susiję su disertacijos tema mokslinės informacijos instituto (Thomson Reuters Web of Knowledge) duomenų bazėse referuojamuose leidiniuose

1. Supronienė, Skaidrė; Semaškienė, Roma; Juodeikienė, Gražina; Mankevičienė, Audronė; Čižeikienė, Dalia; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Sakalauskas, Simonas. Seed treatment with lactic acid bacteria against seed-borne pathogens of spring wheat // *Biocontrol Science and Technology*. 2015, Vol. 25, no. 2. p. 144-154 (ISI Web of Science IF 0,731).
2. Juodeikienė, Gražina; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Černauskas, Darius; Bartkienė, Elena; Čižeikienė, Dalia. Green metrics for sustainability of biobased lactic acid from starchy biomass vs chemical synthesis // *Catalysis Today*. 2014, Vol. 239, no. 1. p. 11-16 (ISI Web of Science IF 3,309).
3. Čižeikienė, Dalia; Juodeikienė, Gražina; Paškevičius, Algimantas; Bartkienė, Elena. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread // *Food Control*. ISSN 0956-7135. 2013, Vol. 31, iss. 2, p. 539-545 (ISI Web of Science, IF 2,819).
4. Digaitienė, Agnė; Hansen, Ase; Juodeikienė, Gražina; Eidukonytė, Dalia; Josephsen, J. Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi // *Journal of Applied Microbiology*. ISSN 1364-5072. 2012, Vol. 112, iss. 5, p. 732-742 (ISI Web of Science, IF 2,196).

Kiti straipsniai mokslinės informacijos instituto (Thomson Reuters Web of Knowledge) duomenų bazėse referuojamuose leidiniuose

1. Stimbirys, Artūras; Bartkienė, Elena; Šiugždaitė, Jūratė; Augenienė, Dovilė; Juodeikienė, Gražina; Vidmantienė, Daiva; Maruška, Audrius; Stankevičius, Mantas; Čižeikienė, Dalia. Safety and quality parameters of ready-to-cook minced pork meat products supplemented with *Helianthus tuberosus* L. tubers fermented by BLIS producing lactic acid bacteria // *Journal of Food Science and Technology*. Published online on June 2, 2014. DOI: 10.1007/s13197-014-1328-4 (ISI Web of Science IF 2,024).
2. Juodeikienė, Gražina; Čižeikienė, Dalia; Češkevičiūtė, Vaida; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Akuneca, Ieva; Stankevičius, Mantas; Maruška, Audrius; Bartkienė, Elena; Ragažinskienė, Ona; Petrauskas, Algimantas. Solid-state fermentation of *Silybum marianum* L. seeds used as additive to increase the nutritional value of wheat bread // *Food Technology and Biotechnology*. ISSN 1330-9862. 2013, Vol. 51, no. 4, p. 528-538 (ISI Web of Science, IF 0,977).
3. Bartkienė, Elena; Juodeikienė, Gražina; Vidmantienė, Daiva; Zdunczyk, Zenon; Zdunczyk, Przemyslaw; Juskiewicz, Jerzy; Čižeikienė, Dalia; Matusevičius, Paulius. Influence of diets to Wistar rats supplemented with soya, flaxseed and lupine products treated by lactofermentation to improve their gut health // *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. ISSN 0963-7486. 2013, Vol. 64, no. 6, p. 730-739 (ISI Web of Science, IF 1,202).
4. Juodeikienė, Gražina; Šalomskienė, Joana; Eidukonytė, Dalia; Vidmantienė, Daiva; Narbutaitė, Vilma; Vaičiulytė-Funk, Lina. The impact of novel fermented products containing extruded wheat material on the quality of wheat bread // *Food*

Straipsniai referuojamuose konferencijų leidiniuose

1. Čižeikienė, Dalia; Juodeikienė, Gražina; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Supronienė, Skaidrė; Semaškienė, Roma; Mankevičienė, Audronė; Bartkienė, Elena. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and their application on wheat seeds decontamination // Proceedings of the 7th international congress Flour-Bread '13, 9th Croatian Congress of cereal technologists: Brašno–Kruh '13, Opatija, Croatia, October 16-18, 2013, p. 50-58. ISSN 1848-2562.

Kitų tarptautinių duomenų bazių leidiniuose

1. Bartkienė, Elena; Vidmantienė, Daiva; Juodeikienė, Gražina; Čižeikienė, Dalia; Bašinskienė, Loreta; Valatkevičienė, Žydronė. Alternatyvus plikinio, fermentuoto skirtingomis pieno rūgšties bakterijomis, įtaka pusruginės duonos kokybei ir saugai // Maisto chemija ir technologija. ISSN 1392-0227. 2012. T 46. Nr. 2. p. 5-13.
2. Juodeikiene, Grazina; Bartkiene, Elena; Viskelis, Pranas; Urbonaviciene, Dalia; Eidukonyte, Dalia; Bobinas, Ceslovas. Fermentation processes using lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products // Advances in Applied Biotechnology //Ed. by M. Petre. Rijeka: InTech, ISBN 9789533078205. 2012. p. 63-100.
3. Mankevičienė, Audronė; Supronienė, Skaidrė; Semaškienė, Roma; Juodeikienė, Gražina; Čižeikienė, Dalia; Bašinskienė, Loreta; Vidmantienė, Daiva; Grigiškis, Saulius; Ančenko, Olga. Naujas antimikrobinis pieno rūgšties bakterijų bioproduktas ekologiškai auginamų grūdų sveikatingumui didinti // Agrariniai ir miškininkystės mokslai: naujausi tyrimų rezultatai ir inovatyvūs sprendimai. Kėdainiai: Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras. ISSN 2029-6878. 2014, nr. 4. p. 95-98.

Tarptautinių konferencijų pranešimų medžiagoje

1. Juodeikienė, Gražina; Bašinskienė, Loreta; Bartkienė, Elena; Vidmantienė, Daiva; Čižeikienė, Dalia; Selina, Marina. Application of biotools for recycling of agro-industrial waste/byproducts to lactic acid // 8th International congress of food technologists, biotechnologists and nutritionists, 21-24 October 2014, Opatija, Croatia : book of abstracts / University of Zagreb. ISBN 9789539972552. p. 34.
2. Juodeikienė, Gražina; Čižeikienė, Dalia; Černauskas, Darius; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Supronienė, Skaidrė; Semaškienė, Roma; Mankevičienė, Audronė. Novel antifungal lactic acid bacteria bioproducts for health of cereal grains // 7th International Congress Flour - Bread'13. 9th Croatian Congress of Cereal Technologists : Brašno-Kruh'13, Opatija, Croatia, October 16-18, 2013 : book of abstracts / Faculty of Food Technology Osijek University of Osijek, ICC - International Association for Cereal Science and Technology. Osijek : University of Osijek. ISSN 1848-2554. 2013. p. 21.
3. Juodeikienė, Gražina; Bašinskienė, Loreta; Bartkienė, Elena; Vidmantienė, Daiva; Čižeikienė, Dalia; Černauskas, Darius. Enzymatic hidrolisis of agro-industrial wastes to C6–C5 sugars for biotechnological production of lactic acid // UBIOCHEM IV : Utilization of Biomass for Sustainable Fuels & Chemicals : 4th International Workshop of COST Action CM0903, October 14-16, 2013, Valencia, Spain : book of abstracts. Valencia : Institute of Chemical Technology, 2013. p. 52.

4. Matusevičius, Paulius; Juodeikienė, Gražina; Čižeikienė, Dalia; Českevičiūtė, Vaida; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Akunceva, Ieva; Stankevičius, Mantas; Maruška, Audrius; Bartkienė, Elena; Ragažinskienė, Ona. The advantages of solid state fermentation to developed products of *Silybum marianum* L. seeds with higher nutrition value and safety for wheat bread // European Biotechnology Congress 2013, Vol.24, Supp. 1, July 2013, Pages S58, Poster presentations / Current Opinion in Biotechnology 24S (2013) S48–S143.
5. Čižeikienė, Dalia; Kot, Witold; Muhammed, Musemma K.; Neve, Horst; Hansen, Lars H.; Sørensen, Søren J.; Heller, Knut J.; Juodeikiene, Grazina; Nielsen, Dennis S.; Vogensen, Finn K. Isolation and characterization of bacteriophages from Danish sourdough // Conference and exhibition“. Bacteriophages 2013: bacteriophages in medicine, food and biotechnology, 10-12 September 2013, Sant Hildas college, Oxford, UK, p. 24.
6. Juodeikienė, Gražina; Čižeikienė, Dalia; Bašinskienė, Loreta. Antimicrobial activities of BLIS producing lactic acid bacteria against undesirable microorganisms in food industry // COST FAO804 Workshop, 6-8 February 2013, Rostock, Germany : abstract. Rostock : COST European Cooperation in Science and Technology, 2013. p. 12.
7. Juodeikienė, Gražina; Čižeikienė, Dalia; Maruška, Audrius Sigitas; Bartkienė, Elena; Bašinskienė, Loreta; Ragažinskienė, Ona; Vidmantienė, Daiva. „Solid state fermentation of the winter savory (*Satureja montana* L) plant: changes of chemical composition and antimicrobial activity // 61st International Congress and Annual Meeting of the Society of Medicinal Plant and Natural Product Research ; Planta Medica. Stuttgart : George Thieme Verlag. ISSN 0032-0943. 2013, Vol. 79, PI50. p. 1192.
8. Čižeikienė, Dalia; Juodeikienė, Gražina. Growth factors influence for lactic acid bacteria produced BLIS // Foodbalt - 2013 : 8th Baltic conference on food science and technology "Food, health and well-being", May 23-24, 2013, Tallinn, Estonia : conference program and abstracts / Tallinn University of Technology. Tallinn : Tallinn University of Technology, ISBN 978-963-642-517-3. 2013. p.19.
9. Stankevičius, Mantas; Akuneca, Ieva; Drevinskas, Tomas; Kaškonienė, Vilma; Mickienė, Rūta; Bimbraitė-Survilienė, Kristina; Juodeikienė, Gražina; Čižeikienė, Dalia; Bartkienė, Elena; Ragažinskienė, Ona; Maruška, Audrius. Increased biological value and safer food product developmentv using solid state fermentation of plant material with bacteriocins-producing lactic acid bacteria: comparative phytochemical analysis of fermented and non-fermented samples // CECE 2013. 10th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, University of Pécs. Pécs. Hungary. 2013 April 25-27, 2013 Pécs, Hungary, program and abstract book. ISBN 978-963-642-517-3. p 51.
10. Juodeikienė, Gražina; Bartkiene, Elena; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Eidukonytė, Dalia. The use of combined fermentation for increasing efficiency of bioethanol production from Jerusalem artichoke // COST Action CM0903: Utilization of biomass for sustainable fuels and chemical (UBIOCHEM) : Sustainable production of fuels /energy, materials and chemicals from biomass : UBIOCHEM-III workshop, November 1-3, 2012, Thessaloniki, Greece : book of abstracts / Chemical Process and Energy Resources Institute, Centre for Research and Technology Hellas, Aristotle University of Thessaloniki, COST Action CM0903. 2012. p. 72.
11. Eidukonytė, Dalia; Juodeikienė, Gražina; Paškevičius, Algimantas. Antimicrobial activity of *Pediococcus acidilactici* against undesirable microorganism in the food

- industry // Foodbalt-2012 : Innovate and healthy food for consumers : 7th Baltic Conference on Food Science and Technology, Kaunas, May 17-18 : conference program and abstracts / Kaunas University of Technology. Department of Food Technology. Kaunas : Technologija. ISBN 9786090204153. 2012. p. 60.
12. Juodeikienė, Gražina; Českevičiūtė, Vaida; Eidukonytė, Dalia; Vidmantienė, Daiva; Bašinskienė, Loreta; Maruška, Audrius Sigitas; Ragažinskienė, Ona; Kaškonienė, Vilma; Bartkienė, Elena; Petrauskas, Algimantas. The advantages of solid state fermentation to develop plant products with a higher nutritional value and safety // Foodbalt-2012 : Innovate and healthy food for consumers : 7th Baltic Conference on Food Science and Technology, Kaunas, May 17-18 : conference program and abstracts / Kaunas University of Technology. Department of Food Technology. Kaunas : Technologija. ISBN 9786090204153. 2012. p. 61-62.
 13. Juodeikienė, Gražina; Mankevičienė, Audronė; Eidukonytė, Dalia; Vidmantienė, Daiva; Černauskas, Darius; Bašinskienė, Loreta; Supronienė, Skaidrė; Semaškienė, Roma. Novel antifungal bio-product for the health of cereal grains // Foodbalt-2012 : Innovate and healthy food for consumers : 7th Baltic Conference on Food Science and Technology, Kaunas, May 17-18 : conference program and abstracts / Kaunas University of Technology. Department of Food Technology. Kaunas : Technologija. ISBN 9786090204153. 2012. p. 63.
 14. Eidukonytė, Dalia; Juodeikienė, Gražina; Paškevičius, Algimantas. *Lactobacillus sakei* as an Alternative for Synthetic Preservatives against Foodborne Pathogens // European Symposium on Food Safety, 21-23 May, 2012, Warsaw, Poland : programme. Des Moines : International Association for Food Protection, 2012.
 15. Eidukonytė, Dalia; Nuobarienė, Lina; Vogensen, Finn. K.; Juodeikienė, Gražina; Hansen, Ase. S. Screening of lactic acid bacteria, isolated from Lithuanian sourdoughs, for phytase activity // 6th International Congress Flour - Bread '11. 8th Croatian Congress of Cereal Technologists : Opatija, Croatia, October 12-14, 2011 : book of abstracts / organised by Faculty of Food Technology Osijek University of Osijek, ICC-International Association for Cereal Science and Technology. Osijek : University of Osijek. ISSN 1848-2554. 2011. p. 108.
 16. Eidukonytė, Dalia; Juodeikienė, Gražina; Hansen, Ase S.; Nuobarienė, Lina; Vogensen, Finn K. Phytase activity of lactic acid bacteria strains, isolated from Lithuanian sourdoughs // FOODBALT - 2011 : 6th Baltic Conference on Food Science and Technology "Innovations for Food Science and Production", May 5-6, 2011, Jelgava, Latvia : abstract book / Latvia University of Agriculture. Jelgava : LLU. ISBN 9789984480466. 2011. p. 84.

Lietuvos konferencijų pranešimų medžiagoje

1. Čižeikienė, Dalia; Juodeikienė, Gražina; Vogensen, Finn. Bakteriofagų, išskirtų iš duonos raugų charakteristika, jų ir temperatūros pokyčių įtaka pieno rūgšties bakterijų populiacijai rauguose // Doktorantų stažuotės užsienio mokslo centruose 2012-2013 : konferencijos pranešimų santraukos. Vilnius : Lietuvos mokslo taryba, 2013. ISBN 978-9955-613-64-0. p. 31-33.
2. Skabeikytė, Erika; Bartkienė, Elena; Juodeikienė, Gražina; Vidmantienė, Daiva; Eidukonytė, Dalia; Bašinskienė, Loreta; Maruška, Audrius; Ragažinskienė, Ona. Bakteriocinus produkuojančių pieno rūgšties bakterijų taikymas kietafazei augalinių produktų fermentacijai // Jaunieji mokslininkai - žemės ūkio pažangai : jaunųjų mokslininkų konferencijos pranešimų tezės. ISBN 978-9955-786-79-5, 2012. p. 53-54.

3. Češkevičiūtė, Vaida; Eidukonytė, Dalia; Juodeikienė, Gražina. Tikrojo margainio *L. sakei* fermentacijos sąlygų įtaka augalinio produkto mikrobiologinės taršoms mažinimui // Chemija ir cheminė technologija : studentų mokslinės konferencijos pranešimų medžiaga, Klaipėdos universitetas, Jūrų technikos fakultetas, 2012 m. gegužės 4 d. / Klaipėdos universitetas, Kauno technologijos universitetas, Vilniaus universitetas. Klaipėda : Klaipėdos universiteto leidykla. ISBN 9789955186519. 2012. p. 29-31.
4. Eidukonytė, Dalia; Paškevičius, Algimantas; Juodeikienė, Gražina. Pieno rūgštis bakterijų antimikrobinis aktyvumas prieš patogenines bakterijas ir mikroskopinius grybus // Mokslas - sveikatai [elektroninis išteklius] : V nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija, 2012 m. balandžio 11 d., Kaunas, [Lietuva] : konferencijos tezių rinkinys. Kaunas : Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai, 2012. ISBN (CD) 978-9955-15-232-3. p.75.
5. Marcinkevičiūtė, Greta; Mankevičienė, Audronė; Supronienė, Skaidrė; Eidukonytė, Dalia. Maistui naudojamų vasarinių kviečių grūdų taršos mažinimas ekologinėmis priemonėmis // Studentų mokslinė praktika 2012 : konferencijos pranešimų santrauka. D. 2. Vilnius : Lietuvos mokslo taryba. ISBN 978-9955-786-79-5. 2012. p. 119-121.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovei prof. habil. dr. Gražinai Juodeikienei už disertacijos temos idėją, nuoširdžias ir vertingas mokslines konsultacijas rengiant publikacijas ir disertaciją, už pasitikėjimą, palaikymą ir visapusišką pagalbą atliekant mokslinį darbą, už paskatinimus beviltiškose situacijose, nuolatinį rūpinimąsi, visos doktorantūros metu ir nuolatinį skatinimą tobulėti. Dėkoju visiems Maisto mokslo ir technologijos katedros kolegoms už kūrybingą nuotaiką, moralinį palaikymą ir supratimą.

Taip pat dėkoju doc. Åse Solvej Hansen ir doc. Finn Kvist Vogensen už suteiktą galimybę stažuotis jų mokslinėse grupėse, mokslines diskusijas ir kūrybingą vadovavimą dirbant mokslinį darbą Kopenhagos universitete, Danijoje. Ypatingai noriu padėkoti docentui Finn Kvist Vogensen už visapusišką paramą, nuoseklų vadovavimą, pasiūlymus ir pagalbą atliekant molekulinės mikrobiologijos tyrimus. Už pagalbą ir mokymus atliekant molekulinės mikrobiologijos tyrimus dėkoju Basheer Yousef Aideh, Musemma Kedir Muhammed ir Witold Piotr Kot. Linai Nuobarienei už vertingas konsultacijas, moralinį palaikymą ir tiesiog, kad buvo puiki draugė ilgų stažuotčių Kopenhagos universitete metu. Noriu padėkoti dr. Algimantui Paškevičiui už gausią mikroorganizmų kolekciją antimikrobinio aktyvumo tyrimams. LAMMC Žemdirbystės instituto darbuotojoms, ypač Audronei Mankevičienei, Skaidrei Supronienei ir Romai Semaškienei, už pagalbą atliekant bioproduktų panaudojimo galimybių, sėklinių vasarinių kviečių grūdų biologinės taršos mažinimui ir sveikumo didinimui, tyrimus.

Dėkinga Lietuvos mokslo tarybai už finansinę paramą.

Šilčiausius padėkos žodžius skiriu mylimiausiems žmonėms: vyrui ir mamai už jų kantrybę, rūpestį, stiprų moralinį palaikymą, supratingumą, meilę ir laukimą.

PRIEDAI

I priedas

1 lentelė. PRB dauginių mišiniuose MP (100 µl) antigrybinis poveikis

Indikatorinis mikroorganizmas	Slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje, mm			
	PRB mišinys <i>L. sakei</i> ir <i>P. acidilactici</i>	<i>L. sakei</i> , <i>P. acidilactici</i> ir <i>P. pentosaceus</i> KTU05-10	<i>P. pentosaceus</i> KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10	<i>L. sakei</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> KTU05-8, KTU05-9 ir KTU05-10
<i>Penic. verrucosum</i>	–	–	–	–
<i>F. culmorum</i>	8,3±1,0	12,5±0,6	8,5±0,6	8,8±1,0
<i>A. versicolor</i>	7,0±1,4*	7,5±0,6*	8,0±0,8*	7,5±0,6*
<i>F. poae</i>	10,3±0,5	8,0±0	7,0±0	10,0±0
<i>Penic. chrysogenum</i>	6,3±0,5	16,0±1,2*	18,5±3,7*	15,0±1,2*
<i>Alt. alternata</i>	–	–	10,0±1,4*	–
<i>Penic. cyclopium</i>	–	–	–	–
<i>F. avenaceum</i>	12,0±0,8*	15,5±0,6*	11,5±0,6*	12,5±0,6*
<i>F. solani</i>	14,8±2,9*	14,5±0,6*	12,0±0,8*	10,8±1,0*
<i>A. terreus</i>	–	–	–	–
<i>Penic. expansum</i>	10,8±7,2*	12,8±1,0*	8,8±1,0*	7,3±0,5
<i>A. niger</i>	14,3±1,3*	10,8±1,5*	9,5±0,6*	12,0±0,8
<i>Aure. pullulans</i>	–	–	–	–
<i>C. kruisii</i>	–	–	–	–
<i>C. pelliculosa</i>	11,8±0,5	–	–	–
<i>D. vanrijiae</i>	–	–	–	–
<i>G. fermentans</i>	–	–	–	–
<i>K. lodderae</i>	–	–	–	–
<i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i>	–	–	–	–
<i>Pi. farinosa</i>	–	–	–	–
<i>Pi. fermentans</i>	–	–	–	–
<i>Pi. membranifaciens</i>	–	10±0*	–	–
<i>R. rubra</i>	–	–	–	–
<i>Sc. cerevisiae</i>	–	–	–	–

– antimikrobinis poveikiu nepasizymėjo; * fungistatinis poveikis; antimikrobinis poveikis įskaitant šulinėlio diametrą (6 mm)

2 lentelė. Rūgščių tirpalų ir neutralizuotų rūgščių antimikrobinis poveikis

Indikatorinis mikroorganizmas	5 % acto r.	Neutraliz. acto r.	5 % pieno r.	Neutraliz. pieno r.	1 % gintaro r	Neutraliz. gintaro r.	0,3 % benzenkarboksirūgštis	Neutraliz. benzenkarboksirūgštis
<i>Y. enterocolitica</i>	29,0±1,4	–	22,8±1,0	–	9,0±0	–	–	–
<i>St. aureus</i>	33,5±0,7	–	24,0±1,8	–	12,8±1,0	–	–	–
<i>Ps. aeruginosa</i>	28,5±0,7	15±2,8	24,3±1,0	–	22,0±3,2*	14,25±1*	9,8±0,5*	9,8±0,5*
<i>Ent. faecalis</i>	29,0±1,4	–	12,0±0,8	–	11,5±0,6*	–	–	–
<i>B. macerans</i>	20,0±1,4	–	12,0±0	–	–	–	–	–
<i>S. enteridicus</i>	26,5±0,7	–	17,8±1,0	–	–	–	–	–
<i>Micrococcus genties</i>	20,0±2,8	–	20,3±1,0	–	9,3±0,5*	–	–	–
<i>E. coli</i>	24,0±0	–	21,5±0,6	–	11,8±1,0*	–	–	–
<i>Listeria genties</i>	24,0±1,4	–	20,3±2,2*	–	–	–	–	–

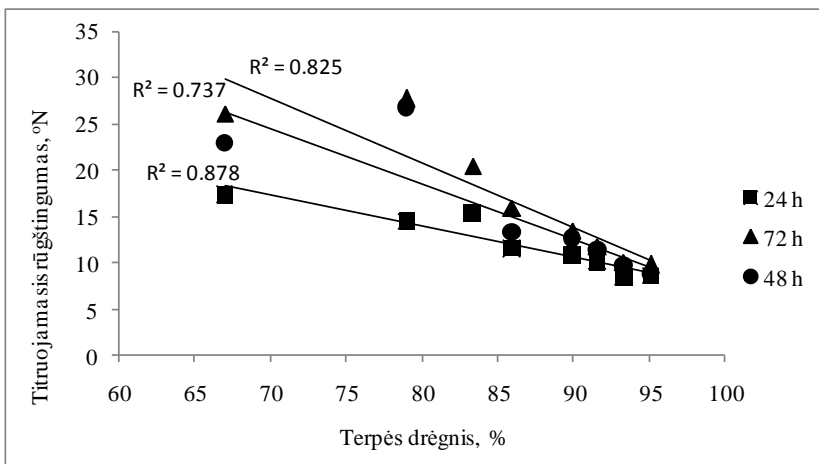
* bakteriostatinis poveikis;

† Antimikrobinis poveikis įskaitant šulinėlio diametrą 6 mm

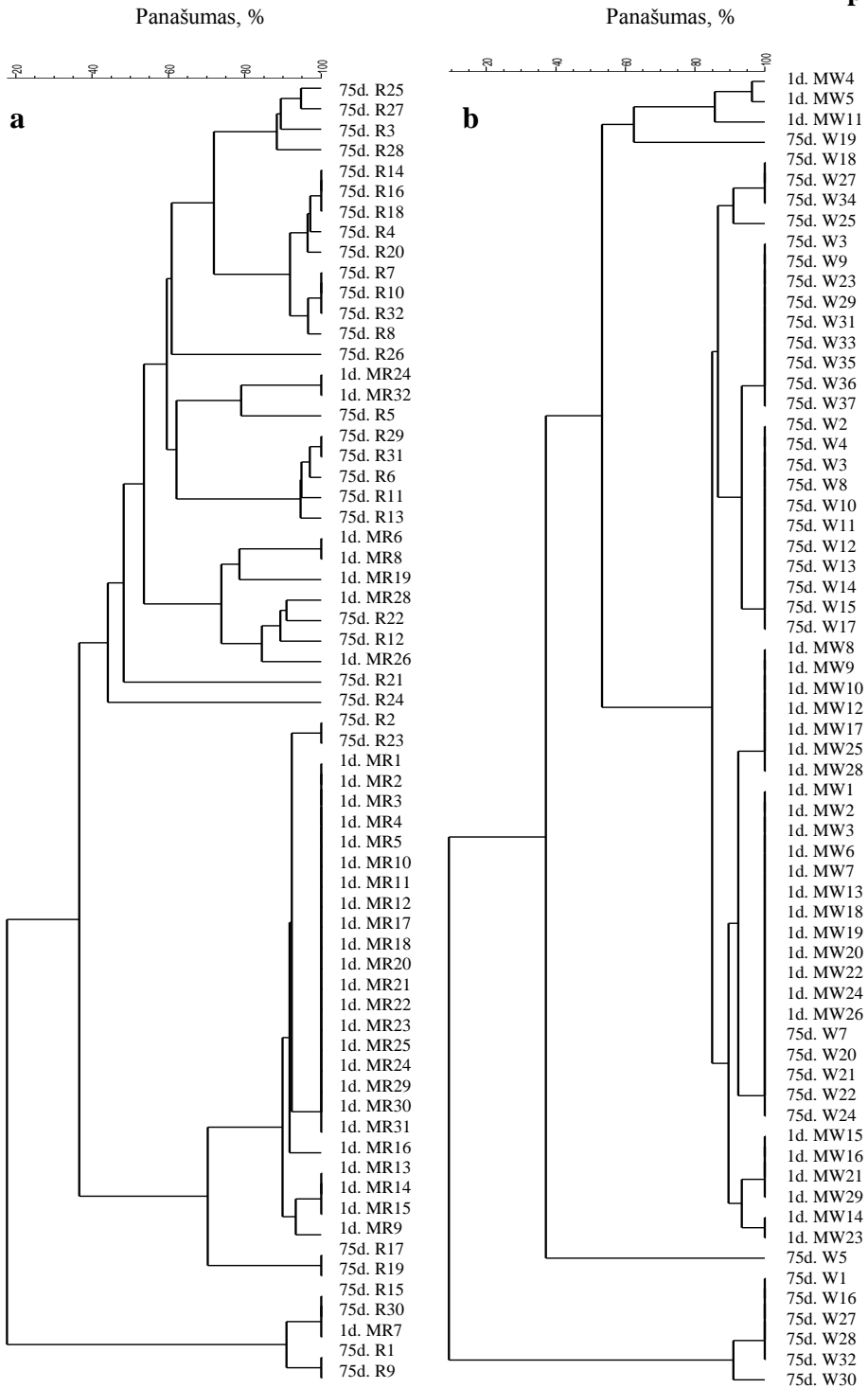
1 lentelė. Bioproduktų reologinės savybės prieš ir po 72 valandų fermentacijos

Ryžių priedas, %	Prieš fermentaciją			Po fermentacijos		
	Kietumas, N	Tirštumas	Lipnumas, N	Kietumas, N	Tirštumas	Lipnumas, N
0	9,58±0,61	63,45±1,76	7,21±0,40	9,26±0,33	61,71±0,62	7,25±0,36
1	12,18±0,23	64,81±1,61	6,92±0,38	10,74±0,25	62,99±0,95	8,00±0,35
3	13,07±0,23	68,36±1,71	8,69±0,41	11,02±0,07	67,56±1,86	7,74±1,16
5	14,08±0,07	72,41±1,79	8,60±0,72	10,69±0,68	68,24±0,30	8,79±0,80
5a	10,49±0,58	66,06±1,89	6,99±0,10	10,06±1,29	64,75±0,39	7,18±1,03
5b	9,92±0,52	68,73±1,50	7,07±0,09	9,57±0,82	68,51±1,04	8,43±0,77
5c	9,26±0,38	66,38±2,47	7,09±0,26	9,42±0,93	63,35±1,44	7,89±0,30
5*	11,01±0,04	69,84±1,81	8,04±0,31	10,87±0,44	68,14±1,43	8,47±1,70
10	24,50±0,84	121,72±1,52	10,18±0,15	9,80±4,20	65,05±1,86	8,95±2,21
10a	26,68±3,97	103,56±1,53	7,69±0,09	16,84±0,83	101,77±1,70	9,59±0,21
10b	12,69±2,24	72,28±2,11	7,32±0,31	11,29±0,27	71,53±0,49	7,83±1,18
10c	11,22±1,12	69,14±1,16	7,80±1,09	10,98±0,40	96,46±0,99	9,78±0,74
10*	23,56±0,63	117,09±2,05	9,67±1,15	9,06±0,74	61,25±1,74	13,45±0,50
15	62,35±1,09	371,47±3,51	40,15±1,21	52,03±1,29	351,13±1,57	42,21±1,12
20	144,81±1,76	445,68±3,26	61,70±0,37	136,57±0,81	405,73±2,47	112,19±2,42
25	162,65±1,27	747,10±2,86	107,73±0,28	147,16±1,60	683,92±2,71	155,84±1,00

* – naudoti MgSO₄·7H₂O 0,2 g/l; MnSO₄·4H₂O 0,1 g/l ir Cisteino-HCl·H₂O 2 g/l priedai;
a, b ir c – naudoti MRS terpės priedai atitinkamai 5, 10 ir 15 ml/100 g terpės

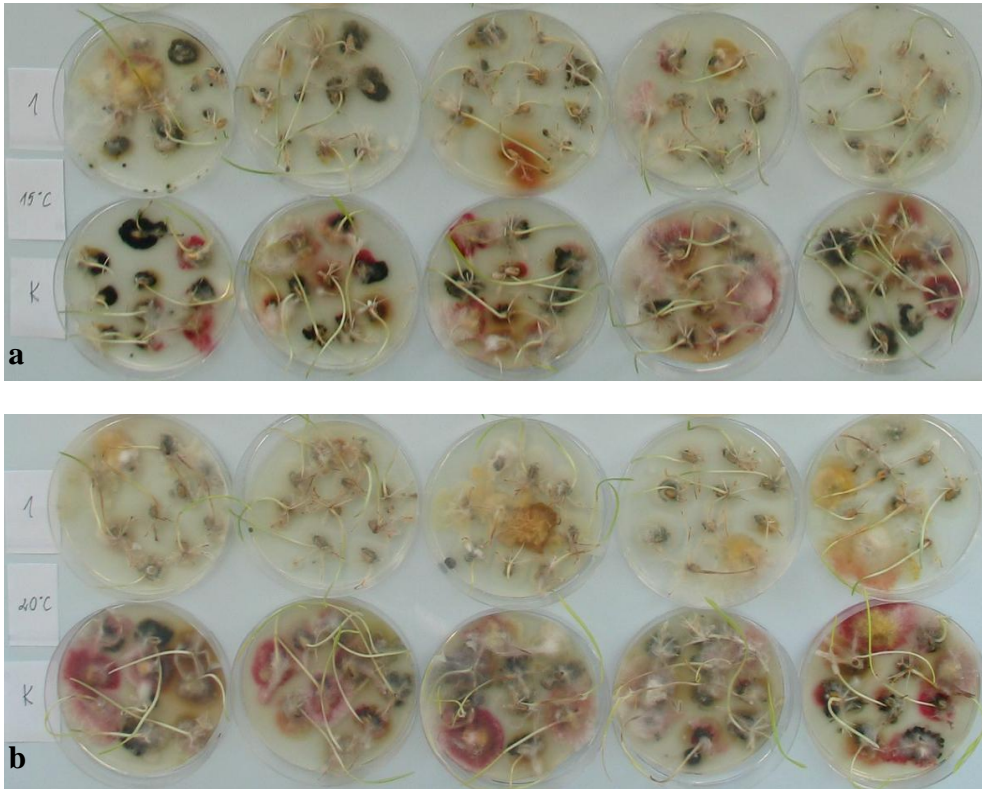


1 pav. Terpės drėgnio įtaka bioprodukto BTR vertėms po 24, 48 ir 72 valandų fermentacijos

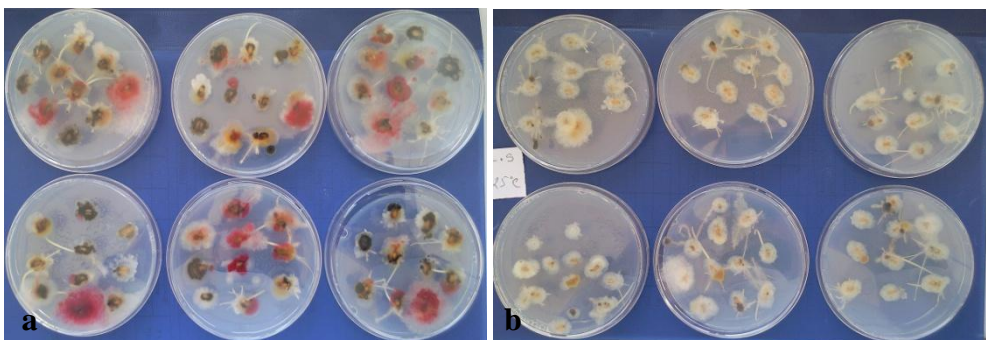


1 pav. Dendrogramos PRB padermių išskirtų iš daniškų ruginių (a) ir kvietinių (b) raugų pirmos (1 d.) ir paskutinės (75 d.) fermentacijos dienos

IV priedas



1 pav. *L. sakei* bioproduktu apdorotų (paveikslų viršuje) ir neapdorotų (paveikslų apačioje) vasarinių kviečių grūdų sėklų 'Grami' vaizdas Petri lėkštelėse inkubuojant: a – 15 °C ; b – 20 °C temperatūroje, 7 paras



2 pav. *Fusarium* užterštų vasarinių kviečių grūdų sėklų 'Grami' vaizdas Petri lėkštelėse ant BDA, 25 °C temperatūroje, po 7 parų: a – kontrolinis variantas; b - apdorojus PRB bioproduktu