



LATVIJAS LAUKSAIMNIECĪBAS UNIVERSITĀTE
LATVIA UNIVERSITY OF AGRICULTURE

PĀRTIKAS TEHNOLOĢIJAS FAKULTĀTE
FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY

Emīls Kozlinskis
Mg. biol.

**MIKROORGANISMU POPULĀCIJU ATTĪSTĪBA
SPONTĀNOS RUDZU MAIZES IERAUGOS**

***DEVELOPMENT OF MICROBIAL POPULATIONS IN
SPONTANEOUS RYE BREAD SOURDOUGHS***

Promocijas darba kopsavilkums
inženierzinātņu doktora zinātniskā grāda iegūšanai
pārtikas zinātnes nozarē

*Summary of Doctoral thesis for acquiring
the Doctor's degree of Engineering Sciences in sector of Food Sciences*

Jelgava
2011

Promocijas darba vadītāja /

Scientific supervisor: prof. *Dr. sc. ing.* **Līga Skudra**

Promocijas darba konsultante /

Scientific advisor: asoc. prof. *Dr. sc. ing.* **Daiga Kunkulberga**

Oficiālie recenzenti / Official reviewers:

Dr. habil. med., profesore **Aija Žilevica** (Latvijas Universitāte / Professor of University of Latvia)

Dr. habil. med., asociētā profesore **Renāte Ligere** (Latvijas Universitāte / Associate professor of University of Latvia)

Dr. sc. ing., asociētā profesore **Anita Blija** (Latvijas Lauksaimniecības universitāte / Associate professor of Latvia University of Agriculture)

Promocijas darba izstrāde un noformēšana ir līdzfinansēta no Eiropas Savienības Sociālā fonda līdzekļiem /

Doctoral thesis has been worked out by financial support of European Social Fund.



Promocijas darba aizstāvēšana notiks LLU Pārtikas zinātnes nozares promocijas padomes atklātajā sēdē 2011. gada 23. septembrī plkst. 11:00 145. auditorijā Pārtikas tehnoloģijas fakultātē, Lielā ielā 2, Jelgavā.

The defence of the thesis in open session of the Promotion Board of Food Science will be held on September 23, 2011, at 11 a.m. in auditorium 145, at the Faculty of Food Technology of LUA, Liela iela 2, Jelgava.

Ar promocijas darbu un kopsavilkumu var iepazīties LLU Fundamentālajā bibliotēkā Lielā iela 2, Jelgavā, LV-3001, un internetā (pieejams: <http://llufb.llu.lv/llu-theses.htm>). Atsauksmes sūtīt Promocijas padomes sekretārei LLU Pārtikas tehnoloģijas fakultātes docentei *Dr. phys.* **L. Markevičai** (Lielā iela 2, Jelgava, LV-3001, e-pasts: lilija.markevica@llu.lv).

*The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of Agriculture, Liela iela 2, Jelgava and <http://llufb.llu.lv/llu-theses.htm>. References are welcome to send to *Dr. phys.* **L. Markevica**, the Secretary of the Promotion Board of Food Science at LUA, Faculty of Food Technology, Liela iela 2, Jelgava, LV-3001, Latvia or e-mail: lilija.markevica@llu.lv.*

SATURS

Pētījuma aktualitāte	4
Zinātniskā darba aprobācija	7
Materiāli un metodes	9
Pētījuma rezultāti un diskusija	14
1. Mikrofloras attīstība spontānos ieraugos, kas gatavoti no skrotētiem (1370. tips) un rupjā maluma (1740. tips) rudzu miltiem	14
2. Spontānie ieraugi ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu un iesala piedevām	17
3. Spontāno ieraugu izmantošanas iespējas atkārtotās ģenerācijās	28
4. Pienskābes baktēriju un raugu identifikācija spontānos rudzu maizes ieraugos un atkārtotās ierauga ģenerācijās	32
5. Liofilizēto spontāno ieraugu izstrāde un kvalitātes izvērtējums	37
Secinājumi	39

CONTENT

Topicality of the research	40
Approbation of the research work	43
Materials and methods	45
Results and discussion	47
1. Development of microflora in spontaneous sourdoughs prepared using peeled (type 1370) and crude (type 1740) rye flour	47
2. Spontaneous sourdoughs with additions of flour made from biologically activated rye grains and malt	49
3. Potential of spontaneous sourdough application in repeated generations	53
4. Identification of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneous sourdoughs and repeated sourdough generations	55
5. Development of lyophilisated spontaneous sourdoughs and its quality evaluation	58
Conclusions	59

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Pēdējo gadu desmitu laikā daudzu Eiropas valstu iedzīvotāju vidū pastiprinājusies interese par maizi, kas gatavota ar ieraugu (*Spicher, Stephan, 1999*). Aizvien vairāk patērētāju dod priekšroku veselīgai maizei, kas ir aromātiska, garšīga, ar labu struktūru un ilgi glabājama. Palielinās arī pieprasījums pēc ekoloģiski tīras pārtikas, bioloģiskās saimniecībās audzētiem graudaugiem un no tiem ražotās maizes. Patērētāji uzturā vairāk izvēlas maizi, kuras ražošanas tehnoloģiskajā procesā lieto ieraugu, kas uzlabo tās kvalitāti un garšas īpašības (*Hui et al., 2004*).

Maize ar spontāno ieraugu ir gatavota gadsimtiem ilgi, bet zinātniskie pētījumi par faktoriem, kas ietekmē spontānā ierauga kvalitāti, uzsākti nesen. Līdz maizes rauga ieviešanai un pieejamībai, iespējams, maize ar ieraugu bija galvenais maizes tips, kas tika patērēts Eiropā un Ziemeļamerikā. Mīkla tika dabīgi raudzēta ar savvaļas pienskābes baktēriju kultūrām, ieskaitot heterofermentatīvos celmus, kuri producēja pietiekamu CO₂ daudzumu, izraisot mīklas rūgšanu. Turklāt bieži spontāno ieraugu sastāvā ietilpst savvaļas raugi, kas vēlāk kļuva neaizstājami raudzēšanas procesā. Šīs savvaļas baktēriju un raugu asociācijas ir viegli uzturamas un lietojamas vairāku gadu garumā (*Hutkins, 2006*). Ilgi izmantotu un uzturētu ieraugu stabilitāte izskaidrojama ar inhibējošas iedarbības savienojumu producēšanos (*Messens, De Vuyst, 2002*), kā arī ar pienskābes baktēriju un raugu mikrobiālo mijiedarbību.

Ierauga gatavošana trīs fāzēs ir viens no senākajiem paņēmieniem, kas attīstījies pamatojoties uz maiznieku praktisko pieredzi. Tomēr šī metode ir darbietilpīga – ierauga pagatavošanai nepieciešamas 30–50 stundas, stingri ievērojot temperatūras režīmus un fāžu ilgumu. Fāžu ilgumi un temperatūras režīmi izstrādāti tā, lai stimulētu pienskābes baktēriju un raugu attīstību ieraugā. Pirmajā fermentācijas fāzē 25–26° C temperatūrā tiek nodrošināti labvēlīgi apstākļi raugu attīstībai, otrajā un trešajā fāzē tā tiek paaugstināta līdz 30° C, lai notiktu aktīva pienskābes baktēriju attīstība (*Kramer, 2002*).

Rudzu maizes gatavošanā ieraugu visvairāk izmanto reģionos, kuros tiek kultivēti rudzi, – Ziemeļu, Centrālajā un Austrumeiropā, ieskaitot Baltijas valstis, kurās rudzu maize aizņem nozīmīgu tirgus daļu. Latvijā patērētāji iecienījuši rudzu maizi, kas gatavota ar spontāno ieraugu.

Rudzu maizes gatavošanas procesā būtiska nozīme ir spontānā ierauga kvalitātei, kuru ietekmē ne tikai miltu ķīmiskais sastāvs un tajos esošie fermenti, bet arī miltu mikroflora un tās attīstības dinamika ierauga gatavošanas fāzēs. Laboratorijas apstākļos fermentēta spontānā ierauga mikrofloru nosaka tikai miltu tips un kvalitāte – tajos sastopamās pienskābes baktērijas īsā laika posmā spēj nodrošināt stabili mikrobioloģisko asociāciju ieraugā (*Van der Meulen et al., 2007*). Savukārt maizes ceptuvēs gatavoto spontāno ieraugu sastāvu ietekmē ne tikai miltos, bet arī uz iekārtām un telpas gaisā

esošie mikroorganismi (*De Vuyst et al*, 2009). Ja ierauga aktivitāte nav pietiekama un mīklai trūkst vajadzīgā skābuma, ražotāji tai pievieno skābuma regulētājus vai arī ierauga gatavošanai izmanto no ārvalstīm iepirktus saldētus vai liofilizētus ieraugus.

Tikai pēdējo gadu desmitu laikā ir identificētas pienskābes baktēriju un raugu sugas, kas piedalās ierauga fermentācijā. Līdz šim no ieraugiem izolētas ap 50 pienskābes baktēriju no *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* un *Weisella* ģintīm, un 20 raugu sugas no *Saccharomyces*, *Candida* un *Torula* ģintīm.

Miltu mikroflorā ietilpst arī *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* dzimtu mikroskopiskās sēnes. Minēto mikroorganismu metabolīti nelabvēlīgi ietekmē spontānā ierauga fermentācijas procesu, tāpēc raugu un heterofermentatīvo pienskābes baktēriju skaits ir viens no faktoriem, kas ietekmē mikroorganismu populāciju attīstību spontānajā ieraugā un veicina fermentācijas procesa norisi.

Atjaunojot ieraugu vairākas reizes var novērot asociāciju veidošanos, kurās parasti nostiprinās vienas vai divu *Lactobacillus* sugu pārstāvji, būtiski – par trijām līdz četrām kārtām – pārsniedzot mezofili aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu skaitu (*Corsetti, Settanni*, 2007).

Latvijā līdz šim nav veikti pētījumi par spontānā rudzu maizes ierauga mikrofloru un tās metabolītiem, kā arī netiek ražots konkurētspējīgs uz spontānā ierauga bāzes gatavots liofilizēts ieraugs.

Promocijas darbā ir izvirzīta šāda **hipotēze**:

spontānā rudzu maizes ierauga aktivitāti paaugstina bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu un pienskābes baktēriju tīrkultūru piedeva.

Promocijas darba hipotēzi pierāda ar **aizstāvamām tēzēm**:

1. skrotēto rudzu miltu (1370. tips) lietošana spontānā ierauga gatavošanā nodrošina pietiekami lielu derīgo mikroorganismu – raugu un pienskābes baktēriju – populāciju bioloģisko pārsvaru;
2. bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedeva veicina pienskābes baktēriju un raugu populāciju vairošanos un vēlamo metabolītu veidošanos spontānajā rudzu maizes ieraugā;
3. ieraugā ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu atkārtotās ģenerācijās ir stabilas pienskābes baktēriju populācijas;
4. no pētāmo ieraugu DNS, iespējams iegūt plašāku informāciju par pienskābes baktēriju celmu spektru nekā no tajos sastopamo pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību DNS, kas izaugušas uz selektīvās MMRS barotnes;
5. liofilizētais spontānais ieraugs ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu un pienskābes baktēriju tīrkultūru piedevām spēj konkurēt ar komerciālo ieraugu.

Promocijas darba **pētījuma objekts** – rudzu maizes spontānais ieraugs

Promocijas darba mērķis – pētīt mikrofloras attīstības dinamiku spontānajos rudzu maizes ieraugos un izstrādāt maizes ražošanā izmantojamu liofilizētu ieraugu.

Promocijas darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi **uzdevumi**:

- pētīt un analizēt mikroorganismu savstarpējo mijiedarbību spontānajos ieraugos, kas gatavoti no rupjā maluma (1740. tips) un skrotētiem rudzu miltiem (1370. tips), un novērtēt rudzu miltu piemērotību spontāno ieraugu gatavošanā;
- noteikt nefermentēta rudzu iesala un bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu ietekmi uz spontānā rudzu ierauga fermentācijas procesu un kvalitātes rādītājiem;
- pētīt ieraugu mikrofloras aktivitāti un daudzveidību atkārtotās ģenerācijas;
- apbūt molekularās bioloģijas metodes ieraugu mikrofloras identificēšanai;
- identificēt dominējošās pienskābes baktēriju un raugu sugas un celmus spontāno ieraugu fermentācijas fāzēs un ieraugu atkārtotās ģenerācijas;
- izstrādāt jaunu liofilizētu rudzu maizes ieraugu un salīdzināt to ar komerciāli pieejamu analogu.

Promocijas darba zinātniskais nozīmīgums.

- Pirmo reizi Latvijā veikti pētījumi par spontānā rudzu maizes ierauga mikrofloru, kā arī izstrādāts liofilizēts ieraugs, kura pamatā ir tradicionālais spontānais ieraugs ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu un pienskābes baktēriju tīrkultūru piedevām. Saņemts patents LV 13899 A – „Spontānā rudzu ierauga gatavošanas paņēmieni”.
- Promocijas darbā ietvertie pētījumu rezultāti pierāda spontānā rudzu maizes ierauga mikrofloras savstarpējo mijiedarbību fermentācijas fāzēs un tās ietekmi uz gatavā ierauga kvalitāti.
- Darbā noteiktas galvenās likumsakarības spontānajā ieraugā, spontānajā ieraugā ar rudzu iesala piedevu un spontānajā ieraugā ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu (mezofili aerobico un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu, pienskābes baktēriju un raugu vairošanās intensitāte, pH, titrējamā skābuma, organisko skābju, ogļhidrātu, aminoskābju un vitamīnu izmaiņas fermentācijas gaitā) pēc kurām veikta ieraugu atlase.
- Lietojot molekularās bioloģijas metodes, pirmo reizi Latvijā veikta pienskābes baktēriju sugu un celmu identifikācija spontānajos rudzu maizes ieraugos.

Promocijas darba tautsaimnieciskā nozīme – Latvijas maizes ceptuvēs rudzu maizes gatavošanas tehnoloģiskajā procesā tiek izmantoti spontānie ieraugi atkārtotās ģenerācijās, kā arī no ārvalstīm iepirkti saldēti vai liofilizēti ieraugi. Autora izstrādāto jauno liofilizēto ieraugu ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu un pienskābes baktēriju tīrkultūru piedevu, var izmantot rudzu maizes gatavošanas tehnoloģiskajā procesā.

ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA

Par rezultātiem ziņots 11 starptautiskās zinātniskās konferencēs un kongresos Latvijā, Lietuvā, Ungārijā, Vācijā, Dienvidāfrikas Republikā, Dānijā, Spānijā, Turcijā, kā arī Starptautiskajā pārtikas izstādē „Rīga food 2008”.

Kozlinskis E., Skudra L., Rakčejeva T., Kunkulberga D. Lyophilisation of traditional Latvian rye sourdough starters. *The International Food Congress "Novel Approaches in Food Industry"*, Cesme, Izmir, Turcija, 2011. g. 26–29 maijs (referāts / oral presentation).

Kozlinskis E., Skudra L., Rakčejeva T., Kunkulberga D. Technological parameters and microbial stability of Latvian traditional rye sourdough. *International Conference on Food Innovation „Foodinnova2010”*, Valensija, Spānija, 2010. g. 25–30. oktobris (stenda referāts / poster presentation).

Kozlinskis E., Skudra L., Rakčejeva T., Kunkulberga D. Technological properties and biochemical composition of spontaneous rye sourdough starters. *22nd International IFCMH Symposium „Food Micro 2010”*, Kopenhāgena, Dānija, 2010. g. 30 augusts – 3. septembris (stenda referāts / poster presentation).

Kozlinskis E., Skudra L., Rakčejeva T., Kunkulberga D. Technological and biochemical parameters of spontaneous rye sourdough starters. *15th World Congress of Food Science and Technology „IUFoST 2010”*, Keiptauna, Dienvidāfrikas Republika, 2010. g. 22–26. augusts (stenda referāts / poster presentation).

Kozlinskis E., Hansen A. S., Vogensen F. K. Lactic acid bacteria in spontaneous sponge fermentation of Latvian traditional rye sourdough. *IV International Symposium on Sourdough: from arts to science*, Freising, Vācija, 2009.g. 14–17. oktobris (stenda referāts / poster presentation).

Kunkulberga D., Kozlinskis E., Gramatina I., Skudra L. Impact of different preparation technologies on properties of spontaneous rye sponge. *„Foodbalt–2009”*, Kauņa, Lietuva, 2009. g. 12–13. maijs (referāts / oral presentation).

Kozlinskis E., Skudra L., Klava D., Kunkulberga D. Influence of modified flour used in spontaneous rye sourdough fermentation. *International Scientific Conference on Cereals – their products and processing*, Debrecen, Ungārija, 2008. g. 27–28. oktobris (stenda referāts / poster presentation).

Kozlinskis E., Skudra L., Klava D., Kunkulberga D., Straumite E. Dynamics of microflora in atypical spontaneous rye sourdoughs. „*Riga Food 2008*”, Rīga, Latvija, 2008. g. 5. septembrī (stenda referāts / *poster presentation*).

Kozlinskis E., Skudra L., Klava D., Kunkulberga D. Lactic acid bacteria in rye sourdough from crude and peeled rye flour. *The annual 14th International Scientific Conference “Research for Rural Development 2008”*, Jelgava, Latvija, 2008.g. 21–23. maijs (referāts / *oral presentation*).

Kozlinskis E., Skudra L., Klava D., Kunkulberga D. Microflora characterization of rye meal sourdough. *7th European Young Cereal Scientists and Technologists Workshop*, Kauņa, Lietuva, 2008.g. 19–21. maijs (referāts / *oral presentation*).

Kozlinskis E., Skudra L., Klava D., Kunkulberga D. Characterization of rye sourdough microflora. *The 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology „FOODBALT-2008”*, Jelgava, Latvija, 2008.g. 17–18. aprīlis (referāts / *oral presentation*).

Par pētījumu rezultātiem sagatavoti un iesniegti publicēšanai recenzējamos zinātniskos izdevumos seši manuskripti un apstiprināts viens Latvijas Republikas patents.

Kozlinskis E., Skudra L., Rakčejeva T., Kunkulberga D. (2011) Lyophilisation of traditional Latvian rye sourdough starters. **In:** *The International Food Congress “Novel Approaches in Food Industry” Conference proceedings, Cesme, Turkey*, pp. 176–179.

Kozlinskis E., Skudra L., Rakčejeva T., Kunkulberga D. (2010) Technological parameters and microbial stability of Latvian traditional rye sourdough. **In:** *International Conference on Food Innovation „Foodinnova2010” Conference proceedings (130), Valencia, Spain*, pp. 1–4 (elektroniskā formātā / CD format).

Kozlinskis E., Skudra L., Rakčejeva T., Kunkulberga D. (2010) Spontāno rudzu maizes ieraugu ķīmisko un mikrobioloģisko rādītāju izmaiņas fermentācijas laikā. **In:** *Proceedings of the Latvia University of Agriculture*, ISSN 1407-4427, 25 (320), 67–77. lpp.

Kozlinskis E., Skudra L., Kunkulberga D., Klava D. (2008) Influence of modified flour used in spontaneous rye sourdough fermentation. **In:** *International Scientific Conference on Cereals – their products and processing – conference proceedings, Debrecen, Hungary*, pp. 257–263 (elektroniskā formātā / CD format).

Kozlinskis E., Skudra L., Klava D., Kunkulberga D. (2008) Characterization of rye sourdough microflora. **In:** *Foodbalt 2008 Conference proceedings*, Jelgava, Latvia, pp. 89–93.

Kozlinskis E., Skudra L., Klava D., Kunkulberga D. (2008) Lactic acid bacteria in rye sourdough from crude and peeled rye flour. **In:** *Research for Rural Development 2008 conference proceedings, Jelgava, Latvia*, pp. 308–313.

Latvijas Republikas patents: Kunkulberga D., Rakčejeva T., Skudra L., **Kozlinskis E., Kļava D.** (2009) Latvijas republikas patents Nr. 13899 A "Spontānā ierauga gatavošanas paņēmieni" – 20.04.2009. *Patenti un Preču Zīmes: Latvijas Republikas Patentu Valdes Oficiālais Vēstnesis*, No. 4, 564. lpp.

MATERIĀLI UN METODEDES

Pētījumu laiks un vieta

Pētījumi veikti Latvijā un Dānijā, laikā no 2007. līdz 2011. gadam.

Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas tehnoloģijas katedras laboratorijās veikti šādi pētījumi:

- Mikrobioloģijas zinātniskajā laboratorijā – gatavoti ieraugi, kultivēti un identificēti mikroorganismi, noteikti fizikāli ķīmiskie rādītāji;
- Iepakojuma materiālu īpašību izpētes laboratorijā – liofilizēti spontānie ieraugi;
- Pārtikas produktu analīžu laboratorijā – noteikts ierauga un maizes mitrums;

Latvijas Universitātē īstenoti šādi pētījumi:

- Bioloģijas institūtā – noteikti B₁, B₂, E vitamīni, pantotēnskābe un aminoskābes;
- Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā – noteikta maltoze, glikoze, fruktoze, pienskābe, etiķskābe un dzintarskābe;

Dānijā, Kopenhāgenas Universitātes Dabas Zinātņu fakultātē realizēti šādi pētījumi:

- Kvalitātes un tehnoloģijas departamenta laboratorijās – gatavoti ieraugi, noteikti to fizikāli ķīmiskie rādītāji;
- Pārtikas departamenta mikrobioloģijas laboratorijās veiktas ieraugu mikrobioloģiskās un ģenētiskās analīzes.

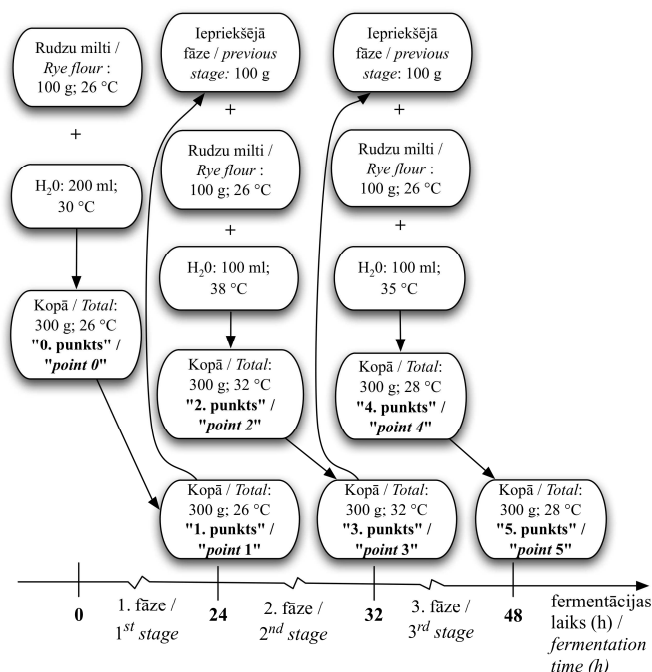
Pētījumā izmantotie materiāli

Pētījumā spontāno ieraugu pagatavošanai izmantoti AS „Jelgavas Dzirnava” skrotētie (1370. tipa) un rupjā maluma (1740. tipa) ‘*Kaupo*’ šķirnes rudzu milti, bioloģiski aktivēti ‘*Voshod*’ šķirnes rudzu graudi, SIA „Naukšēni” rudzu iesals un dzeramais ūdens (atbilstīgi Ministru kabineta 2003. gada 29. aprīļa noteikumiem Nr. 235 „Dzeramā ūdens obligātās nekaitīguma un kvalitātes prasības, monitoringa un kontroles kārtība”). Liofilizēto spontāno ieraugu kvalitātes rādītāji salīdzināti ar komerciālā firmas „*BÖCKER*” rudzu maizes ierauga „*TK- Starter*” kvalitātes rādītājiem.

Pētījuma struktūra

Lai noskaidrotu mikroorganismu populāciju attīstības dinamiku ieraugos, kuru gatavošanai izmantoti rupjā maluma un skrotētie rudzu milti un izvērtētu to piemērotību ierauga gatavošanai, ieraugu atjaunošana veikta ik pa 24 h, fermentācijas temperatūra – 26°C, 32°C un 28°C – un laiks – 72 h.

Spontāno ieraugu ar iesala un bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu gatavošanai izmantots trīs fāžu fermentācijas process, kas kopumā norit 48 stundas, divas reizes ieraugu atjaunojot – pievienojot jaunu ūdens un miltu porciju (1. attēls).



1. att. Spontānā rudzu ierauga trīs fāžu fermentācijas tehnoloģiskais process /

Fig 1. Technological process of a three-stage spontaneous rye sordough fermentation

Spontāno ieraugu pagatavošanā izmantotas šādas izejvielas:

- ieraugā U – 100% skrotēto rudzu miltu (1370. tips) un dzeramais ūdens;
- ieraugā M – 80% skrotēto rudzu miltu (1370. tips) un 20% bioloģiski aktivētu rudzu graudu milti un dzeramais ūdens;

- ieraugā I – 80% skrotēto rudzu miltu (1370. tips) un 20% nefermentēts rudzu iesals un dzeramais ūdens.

Lai pētītu nobriedušā ierauga fermentācijas aktivitāti atkārtotās ģenerācijās, noteikta mikroflora un fizikāli ķīmiskie rādītāji laikā līdz 14 dienām. Veikta divu dažādu atkārtotu ģenerāciju ieraugu fermentācija 14 dienu laikā, izmantojot spontānos ieraugus U un M.

- Atjaunota ierauga U komponenti (% no miltu masas): 10% spontānā ierauga U + 100% rudzu skrotēto miltu (1370. tips) + 80% dzeramā ūdens (32°C).
- Atjaunota ierauga M komponenti (% no miltu masas): 10% spontānā ierauga M + 80% rudzu skrotēto miltu (1370. tips) + 20% bioloģiski aktivēto rudzu graudu miltu + 80% dzeramā ūdens (32°C).

Ņemti paraugi pirms un pēc katras fermentācijas fāzes. Visi ieraugu paraugi inkubēti 25°C temperatūrā. Katrā ierauga atjaunošanas reizē izmanto 10% no iepriekšējā fāzē fermentētā ierauga un tam pievieno jaunu miltu un ūdens porciju. Šo procesu atkārtō ik pēc 24 stundām.

1. tabula / Table 1.

**Ierauga rādītāju noteikšanas metodes /
Determination methods of sourdough properties**

N. p. k. / No.	Ieraugu fizikālie un ķīmiskie rādītāji / <i>Physical and chemical parameters</i>	Metode / <i>Method</i>
1.	pH un titrējamais skābums / <i>pH and titrable acidity</i>	Pēc „Standard-Methoden fur Getreide, Mehl und Brot” (Spicher, Stephen, 1993)
2.	Mitrums / <i>Moisture</i>	Atbilstīgi standartam LVS 272:2000 „Graudu produktu mitruma noteikšana”
3.	Aminoskābju saturs / <i>Content of amino acids</i>	Atbilstīgi standartam AOAC 994.12 „Amino acids in foods” (Aminoskābes pārtikas produktos)
4.	B1 vitamīna saturs / <i>Content of vitamin B₁</i>	Atbilstīgi standartam AOAC 953.17 „Thiamin – Vitamin B ₁ – in grain products” (Tiamīns – B ₁ vitamīns – graudu produktos)

N. p. k. / No.	Ieraugu fizikālie un ķīmiskie rādītāji / <i>Physical and chemical parameters</i>	Metode / <i>Method</i>
5.	B ₂ vitamīna saturs / <i>Content of vitamin B₂</i>	Atbilstīgi standartam AOAC 970.65 „ <i>Riboflavin – Vitamin B₂ – in foods</i> ” (Riboflavīns – B ₂ vitamīns – pārtikā)
6.	Pantotēnskābes (B ₅ vitamīna) saturs / <i>Content of panthothenic acid (vitamin B₅)</i>	Atbilstīgi standartam AOAC 945.74 „ <i>Pantothenic Acid in Vitamin preparations</i> ” (Pantotēnskābes vitamīnu preparātos)
7.	E vitamīna saturs / <i>Content of vitamin E</i>	Atbilstīgi standartam AOAC 971.30 „ <i>α-Tocopherol Vitamin E – in foods</i> ” (α tokoferols – E vitamīns – pārtikā)
8.	Organisko skābju saturs / <i>Content of organic acids</i>	Modificēta standartmetode AOAC 986.13 „ <i>Organic acids in Cranberry Juice and Apple Juice</i> ” (organiskās skābes dzērveņu un ābolu sulā)
9.	Ogļhidrātu saturs / <i>Content of carbohydrates</i>	Atbilstīgi standartam AOAC 982.14 <i>Glucose, Fructose, Sucrose, and Maltose in Cereal products</i> ” (Glikoze, fruktoze, saharoze un maltoze graudaugu produktos)

Ierauga mikrofloras noteikšana. Ieraugi mikrobioloģiski testēti un tiem gatavoti decimālatšķaidījumi. Testa paraugi noņemti atbilstīgi standartam LVS EN ISO 8261:2002 „Vispārīgie norādījumi testa paraugu, sākotnējo suspensiju un decimālatšķaidījumu sagatavošanai mikrobioloģiskai pārbaudei”. Noteikti šādi rādītāji:

- mezofili aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu kopskaits saskaņā ar standartu LVS EN ISO 4833:2003;
- raugi atbilstīgi standartam ISO 21257-2:2008;
- pienskābes baktērijas (PB) saskaņā ar standartu ISO 9332:2003 lietojot MRS barotni un modificētu MRS barotni (MMRS), kuras sastāvā ir vairāk

peptona (20 g/l) un rauga ekstrakta (10 g/l) salīdzinot ar standarta MRS barotni un, kurai pievienota aminoskābe cisteīns (1 g/l). Tīrkultūras pavairotas izmantojot „*Lactobacilli MRS broth*” barotni (Ref. 14202-24).

Mikroorganismu identifikācijai izmantotas selektīvās barotnes (MRS – pienskābes baktērijām, iesala ekstrakta agars – raugiem). Noteiktas mikroorganismu morfoloģiskās īpašības (forma, kustīgums), veikta krāsošana pēc *Grana* metodes, katalāzes tests un identifikācija līdz sugai ar API bioķīmisko testu sistēmu:

- pienskābes baktērijas – 50 CHL;
- *Bacillus spp.* un tai radniecīgās ģints sugas – 50 CHB;
- raugi – ID 32 C.

DNS izdalīšana veikta pēc standartmetodes, lietojot *GenElute™* „*Bacterial Genomic DNA Kit*”.

Polimerāzes ķēdes reakcija veikta izmantojot „*Stratagene RoboCycler Gradient 96*” PCR reakcijā ar karstumizturīgas polimerāzes palīdzību nepieciešamais DNS fragments (16S rDNS V3 vai V1 reģions) tiek pavairots tālākiem mikrobiālās ekosistēmas daudzveidības pētījumiem.

Ieraugu mikrobiālās ekosistēmas daudzveidība un izmaiņas fermentācijas gaitā pētītas, izmantojot amplificētus V3 (PB) un V1 (raugiem) reģionus no 16S ribosomālā DNS. Mikroorganismu ekosistēma identificēta ar denaturējoša gradienta gēla elektroforēzi (DGGE), izmantojot DGGE standartmetodi ar „*INGENYphorU-2*” sistēmas palīdzību.

Ieraugus un tīrkultūru biomasu liofilizē, izmantojot sublimācijas kalti „*Armfield FT 33*”. Paraugus vispirms sasaldē līdz -20°C . Sublimācijas procesā paraugus sasaldē līdz -55°C , sublimācijas laiks – 48–72 h.

Liofilizēto ieraugu pārbaude maizes ražošanas procesā. Liofilizētie ieraugi un komerciāli pieejamais firmas „*Bocker*” ieraugs „*TK-starter*” izmantoti rudzu mīklas gatavošanā rudzu maizes cepšanai.

Datu matemātiskā apstrāde veikta ar matemātiskās statistikas metodēm, lietojot korelācijas analīzi, vienfaktora dispersijas analīzi un Tjūkija testu. Rezultātu vidējie aritmētiskie lielumi, rezultātu ticamības līmenis (p) un standartnovirzes aprēķinātas ar „*Microsoft Excel*” programmas paketi (*Arhipova, Bāliņa, 2003*).

PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

1. Mikrofloras attīstība spontānajos ieraugos, kas gatavoti no skrotētiem (1370. tips) un rupjā maluma (1740. tips) rudzu miltiem

Spontānā ierauga gatavošanā būtiskākie faktori, kas ietekmē mikrobioloģisko procesu norisi, ir miltu tips un tajos sastopamā mikroflora. Rudzu maizes ražošanā spontāno ieraugu gatavo gan no rupjā maluma (1740. tips), gan skrotētajiem (1370. tips) rudzu miltiem. Lai izvērtētu, no kura iepriekš minētā miltu tipa gatavots ieraugs ir aktīvāks, veikta miltu mikrofloras izpēte, nosakot mezofīli aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu, kā arī pienskābes baktēriju un raugu vairošanās dinamiku fermentācijas procesā. Kā zināms no literatūras avotiem, rupjā maluma, skrotētie un bīdelētie milti atšķiras pēc ķīmiskā sastāva. 1370. tipa rudzu miltus ieraugu gatavošanā izmanto augstā ogļhidrātu satura dēļ, jo tas nodrošina barības bāzi pienskābes baktērijām (PB) un raugiem, vienlaicīgi radot optimālus apstākļus fermentācijas procesam.

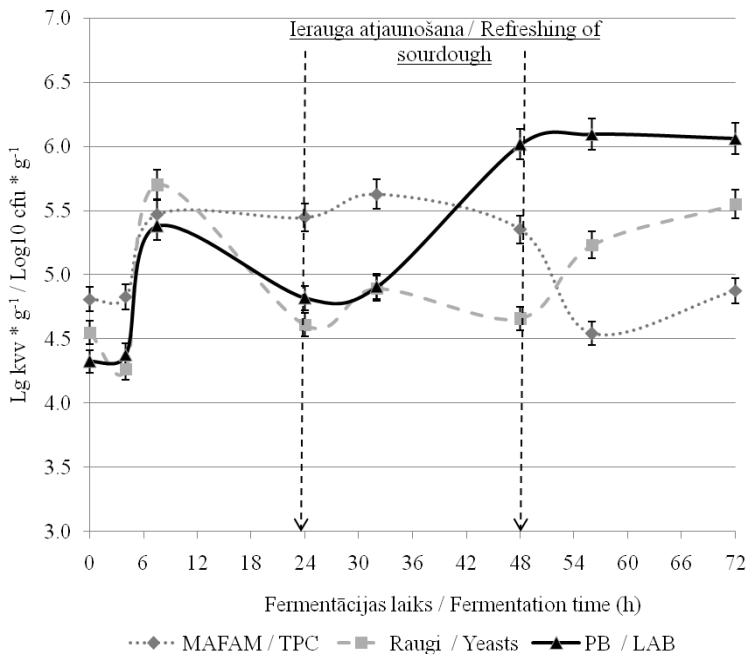
Eksperimentos iegūtie rezultāti liecina, ka no 1370. un 1740. tipa rudzu miltiem trīs pakāpēs gatavotos spontānos ieraugos sākotnējais MAFAM kvv skaits ir attiecīgi $4,81 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$ un $5,05 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$, PB kvv skaits – attiecīgi $4,32 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$ un $3,58 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$, raugu kvv skaits – attiecīgi $4,55 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$ un $4,77 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$ (2. un 3. attēls). Sākotnēji MAFAM skaits ir lielāks par ierauga gatavošanā nozīmīgajiem mikroorganismiem, kā PB un raugiem abos ieraugos, un tas liecina par augstu miltiem raksturīgās mikrofloras koncentrāciju. Kā zināms no literatūras datiem (*Hui et al.*, 2004), α un β amilāžu darbības ietekmē no cietes veidojas monosaharīdi un disaharīdi, kurus savā metabolismā aktīvi izmanto raugi un PB.

Pētījumos iegūtie rezultāti liecina, ka sākotnēji aktīvāk vairojas raugi, jo izvēlētā fermentācijas temperatūra – 26°C – ir optimāla to attīstībai. Atjaunojot ieraugu, pēc 24 h tiek izmainīta substrāta vide, un ierauga mikroorganismiem tai jāpielāgojas, tāpēc to vairošanās intensitāte samazinās.

Otrajā fermentācijas fāzē 32°C temperatūrā ievērojami palielinās PB skaits ieraugā, un tas skaidrojams ar optimāliem vairošanās apstākļiem. Atjaunojot ieraugu pēc 48 h samazinās MAFAM skaits un turpina attīstīties gan raugi, gan PB. Tas skaidrojams ar to, ka miltos sastopamajām grampozitīvajām *Bacillus* un gramnegatīvajām *Enterobacteriaceae* ģints baktērijām PB un raugu metabolītu ietekmē ir izveidojušies to attīstībai nelabvēlīgi vides apstākļi.

Izvērtējot fermentācijas procesu līdz 72. stundai, kā redzams no iegūtajiem rezultātiem (2. attēls.), pēc 54 h būtiska mikroorganismu populāciju attīstība nav novērojama, iespējams, to attīstībā iestājusies stacionārā fāze un izveidojies nobriedis ieraugs, kurā uzkrājušies

mikroorganismu metabolīti – aminoskābes, vitamīni, organiskās skābes –, kā arī savairojusies ieraugā vēlamā mikroflora – PB un raugi.



2. att. Mikroorganismu attīstība 72 h fermentācijas laikā ieraugā, kas gatavots no skrotētiem (1370. tips) rudzu miltiem /

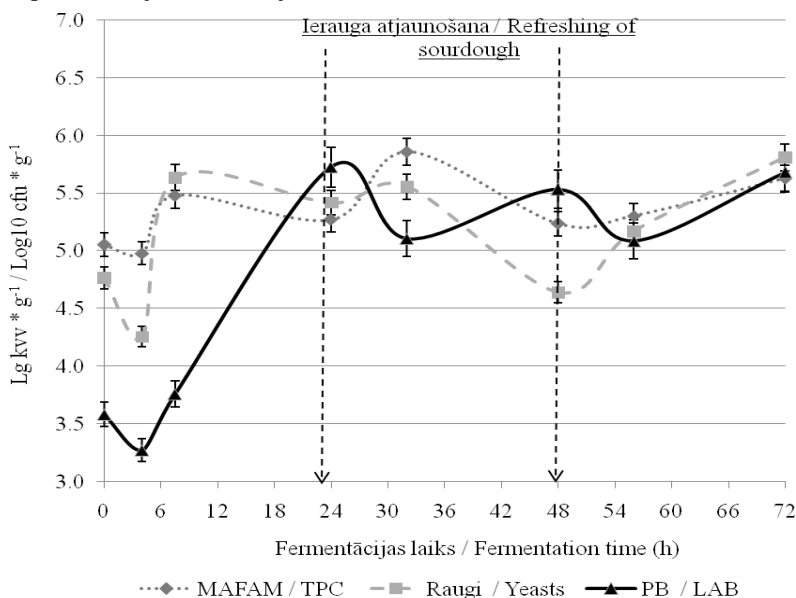
Fig. 2. Growth of microorganisms in sourdough fermentation for 72 h using peeled (type 1370) rye flour

Salīdzinot mikroorganismu skaitu ieraugos, secināms, ka fermentācijas procesā vislabākie rādītāji iegūti 48 stundās ieraugā, kas gatavots no 1370. tipa miltiem, – pienskābes baktēriju skaits palielinājies no 4,32 log₁₀ kvv·g⁻¹ līdz 6,06 log₁₀ kvv·g⁻¹, kas ir ļoti būtiski, jo PB metabolīti ieraugā un mīkla veido vajadzīgo skābuma pakāpi (Loenner, Preve, 1988). Pirmajās četrās fermentācijas stundās notiek miltos esošās mikrofloras pielāgošanās vides apstākļiem, tātad tie atrodas lag fāzes stadijā. Pēc ceturrtās fermentācijas stundas novērojama strauja visu noteikto mikroorganismu attīstība – iestājas eksponenciālā attīstības fāze un līdz ierauga pirmajai atjaunošanai notiek mijiedarbība starp mezofili aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu, pienskābes baktēriju un raugu attīstību.

Kā redzams no iegūtiem datiem, pēc ierauga atjaunošanas aktīvi vairojas PB un raugi, vienlaicīgi nomācot MAFAM attīstību.

Veiktie mikrobioloģiskie pētījumi ieraugā, kas gatavots no rupjā maluma (1740. tipa) miltiem, pierāda, ka sākotnējais MAFAM skaits tajā ir lielāks nekā ieraugā, kas gatavots no skrotētajiem (1370. tipa) miltiem.

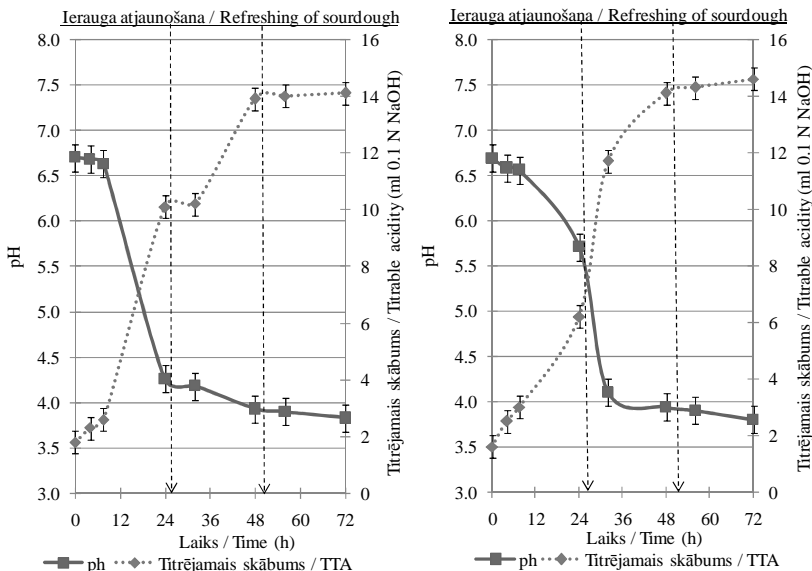
Izvērtējot mikroorganismu populāciju attīstību ieraugā, kas gatavots no rupjā maluma (1740. tipa) miltiem, kopumā, jāsecina, ka fermentācijas laikā līdz 72 h PB un raugi nav pietiekami aktīvi, lai spētu nomākt MAFAM, kuru sastāvā ir miltos sastopamās gramnegatīvās enterobaktērijas un grampozitīvās endosporu veidojošās baktērijas (3. attēls.).



3. att. Mikroorganismu attīstība 72 h fermentācijas laikā ieraugā, kas gatavots no rupjā maluma (1740. tips) rudzu miltiem /

Fig. 3. Growth of microorganisms in sourdough fermentation for 72 h using crude (type 1740) rye flour

Pētot pH un titrējamā skābuma izmaiņas 72 h fermentācijas gaitā (4. attēls), var novērot, ka abos ieraugos ir būtiska korelācija starp pienskābes baktēriju skaita palielināšanos un vides pH izmaiņām (1370. tipam $r = -0,66$; 1740 tipam $r = -0,50$) un likumsakarīgi arī starp pienskābes baktēriju skaita palielināšanos un titrējamā skābuma izmaiņām (1370. tipam $r = 0,79$; 1740. tipam $r = 0,52$). Turklāt arī pH un titrējamā skābuma rezultāti liecina par aktīvu mikroorganismu darbību līdz 48. fermentācijas stundai, kad pH pazeminās līdz 3,93 (1370. tipam) un 3,94 (1740. tipam) un titrējamais skābums palielinās līdz 13,90 (1370. tipam) un 14,10 (1740. tipam).



4. att. Vides pH un titrējamā skābuma izmaiņas ieraugos, kas gatavoti no 1370. (a) un 1740. (b) tipa rudzu miltiem, 72 stundu fermentācijas laikā / Fig. 4. Changes of pH and titratable acidity in sourdoughs prepared using type 1370 (a) and type 1740 (b) rye flour during 72 hours of fermentation

Pēc pēdējās ieraugu atjaunošanas fermentācijas pH un titrējamā skābuma rādītāji būtiski neatšķiras no tiem, kas novērojami pēc 48 stundu fermentācijas. Pamatojoties uz to, turpmākiem pētījumiem izraudzīti skrotētie (1370. tipa) rudzu milti un fermentācijas laiks 48 stundas.

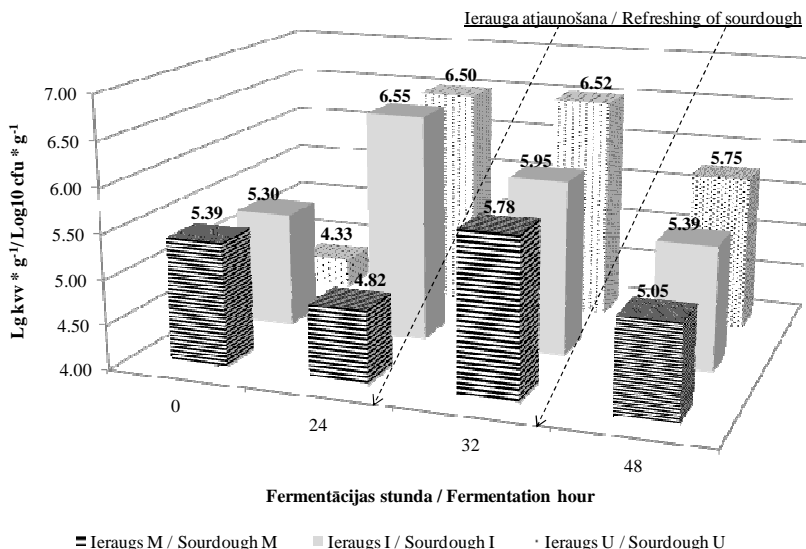
2. Spontānie ieraugi ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu un iesala piedevām

Rudzu maizes ražošanas tehnoloģiskajā procesā ceptuvēs gatavo spontāno ieraugu, kā arī spontāno ieraugu ar nefermentētu rudzu iesala piedevu. Pētījumu gaitā autors izstrādājis jaunu spontānā ierauga gatavošanas paņēmieni, kurā nefermentētais rudzu iesals aizstāts ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu (patents LV 13899 A – „Spontānā rudzu ierauga gatavošanas paņēmieni”).

Spontānā ierauga gatavošanā nefermentētu iesalu lieto kā bioloģiski vērtīgu un aktīvu piedevu fermentācijas procesa veicināšanai, lai iegūtu augstāku pienskābes baktēriju un raugu šūnu koncentrāciju, kā arī ātrāk sasniegtu vides skābumu zem pH 4.0 gatavā ieraugā.

Lai novērtētu, kā rudzu iesals un bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedeva ietekmē spontānā ierauga fermentāciju, veikti vairāki eksperimenti. Priekšmēģinājumos iegūtie rezultāti pierādīja, ka optimālais iepriekš minēto piedevu daudzums ir 20% no kopējā miltu daudzuma ieraugā.

Ieraugu mikrofloras attīstības un vides pH izmaiņu dinamiku 48 stundu fermentācijas laikā raksturo 5., 6., 7. un 8. attēls.



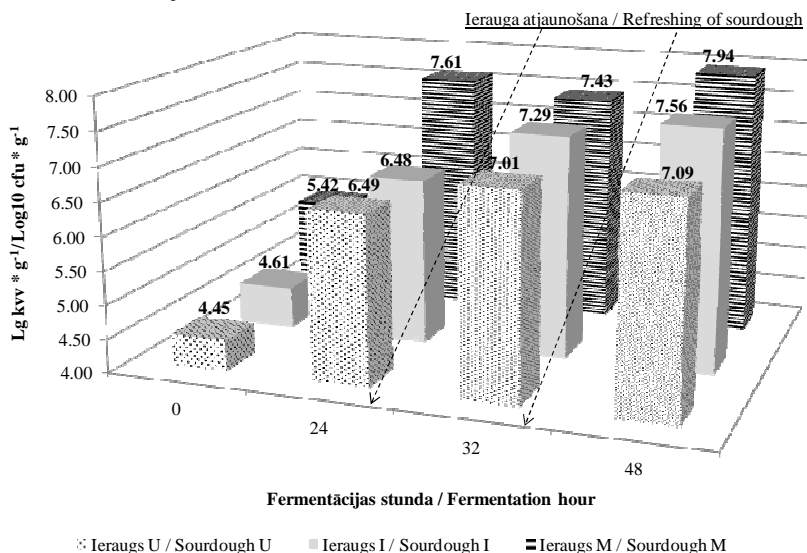
5. att. MAFAM kvv skaita izmaiņas spontāno ieraugu 48 stundu fermentācijas laikā/

Fig. 5. Changes of TVC plate count during 48-hour fermentation of spontaneous sourdoughs

Pētījumu rezultāti pierāda, ka fermentācijas procesā MAFAM skaita izmaiņas ir atkarīgas no pagatavoto ieraugu veida (5. attēls.). Sākotnējais MAFAM skaits ieraugā M (ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu) un ieraugā I (ar iesalu) kļūdas robežās ir identisks – attiecīgi $5,39 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$ un $5,30 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$. Fermentācijas procesa beigās MAFAM skaits ieraugā M ir viszemākais – $5,05 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$ – augstās pienskābes baktēriju aktivitātes dēļ (6. attēls.).

Salīdzinot MAFAM skaita izmaiņas praksē lietotos ieraugos U (bez piedevām – kontroles paraugs) un I (ar iesalu), jāsecina, ka pirmajā fermentācijas fāzē notiek strauja MAFAM attīstība abos ieraugos un tikai pēc pirmās atjaunošanas I ieraugā tā sāk samazināties.

Fermentācijas beigās vislielākais MAFAM skaits ir ieraugā U, jo, nosakot PB (6. attēls.) un raugu (7. attēls.) daudzumu fermentācijas beigās, var secināt, ka to aktivitāte nav pietiekama, lai izkonkurētu mezofili aerobās un fakultatīvi anaerobās baktērijas.



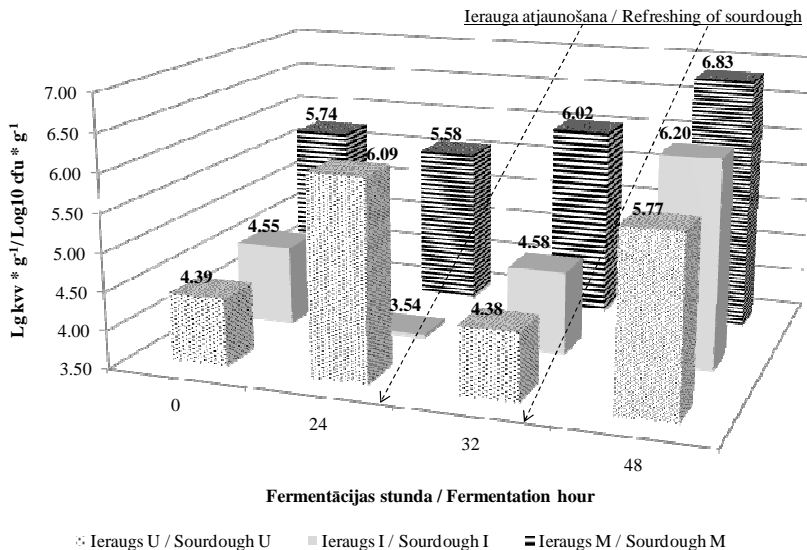
6. att. PB kvv skaita izmaiņas spontāno ieraugu 48 stundu fermentācijas laikā /
Fig. 6. Changes of LAB plate count during 48-hour fermentation of spontaneous sourdoughs

Sākotnējais PB daudzums (6. attēls.) ieraugā ar bioloģiski aktīviem rudzu graudu miltiem (M) ir 5,42 log₁₀ kvv · g⁻¹, un tas būtiski pārsniedz PB skaitu ieraugā ar iesala piedevu (I) un kontroles ieraugā U, kuros sākotnējais PB daudzums ir attiecīgi 4,61 log₁₀ kvv · g⁻¹ un 4,45 log₁₀ kvv · g⁻¹. Tas izskaidrojams ar to, ka miltos, kas iegūti no bioloģiski aktīviem rudzu graudiem, ir vairāk bioloģiski aktīvu vielu – aminoskābju, monosaharīdu, vitamīnu –, kas veidojušies graudu dīģšanas procesā un veicinājuši PB attīstību.

Ar molekulārās bioloģijas metodēm identificējot PB celmus, pētījumos pierādīts, ka sākotnēji ieraugā M atrodami seši dažādi PB celmi – *Pediococcus acidilactici* 2147, *L. curvatus* ssp. *curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646, *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627, *Leuconostoc mesenteroides* 2190 –, turpretim ieraugā U – tikai trīs: *L. coryniformis* 1629, *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627. Līdz ar to, var secināt, ka M ieraugā PB celmu spektrs ir

plašāks, un tas pierāda bioloģiski aktīvētu rudzu graudu miltu piedevas pielietojanas lietderīgumu ierauga gatavošanā.

Visā fermentācijas procesā saglabājas PB daudzuma pārsvars ieraugā M, salīdzinot ar PB skaitu ieraugos U un I.



7. att. Raugu kvv skaita izmaiņas spontāno ieraugu 48 stundu fermentācijas laikā /

Fig. 7. Changes of yeast plate count during 48-hour fermentation of spontaneous sourdoughs

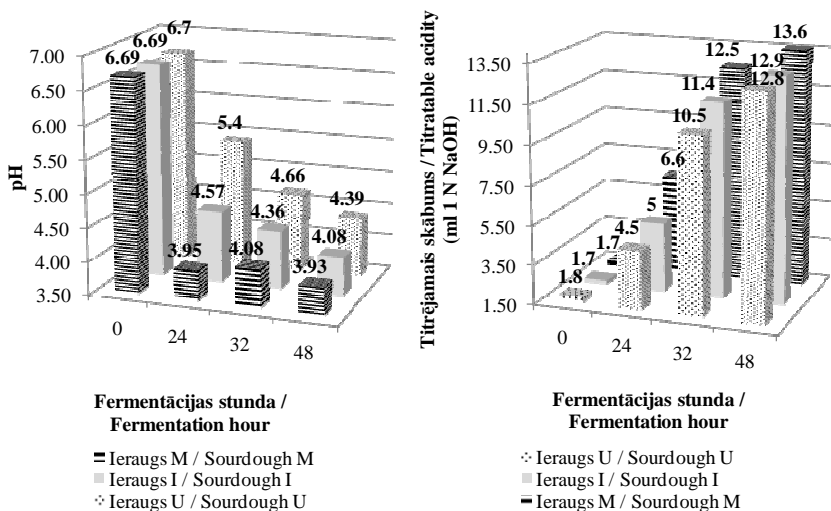
Nosakot raugu attīstības dinamiku ieraugos, redzams, ka to skaits spontānajā ieraugā bez piedevām (U) un ieraugā ar rudzu iesala piedeva (I) fermentācijas sākumā ir mazāks – attiecīgi $4,39 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$ un $4,55 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$, salīdzinot ar ieraugu, kam pievienota bioloģiski aktīvētu rudzu miltu piedeva un kurā raugu daudzums ir $5,74 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$ (7. attēls.).

Fermentācijas procesa pirmajā fāzē, proti, līdz 24 h, raugu šūnu skaits strauji palielinās ieraugā U, sasniedzot $6,09 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$, taču samazinās ieraugos M un I – attiecīgi līdz $5,58 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$ un $3,54 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$. Tā iemesls ir pH izmaiņas ieraugos (8. attēls.) – pirmās fermentācijas fāzes beigās pH ieraugā M ir 3,95 un ieraugā I – 4,57. Šīs pH vērtības ir zemākas par raugu optimālo attīstības pH intervālu $-5,0-5,6$ (Hutkins, 2006).

Otrajā fermentācijas fāzē – no 25. līdz 48. h – novērojama pretēja tendence – raugu daudzums palielinās ieraugā M un I, savukārt pazeminās – ieraugā U. Tas skaidrojams ar to, ka, pievienojot jaunu skrotēto miltu porciju,

vienlaicīgi palielinās arī baktēriju kopskaits, kur dominējošās ir aerobās endosporu veidojošās *Bacillus* ģints baktērijas, kuru metabolīti var kavēt raugu attīstību, jo tās hidrolizē olbaltumvielas. Pēc 32 stundu fermentācijas, raugu daudzums ieraugā U ticamības intervāla robežās ($p = 95\%$) ir identisks raugu skaitam, kas konstatēts uzsākot fermentāciju. Pēc otrās ierauga atjaunošanas raugu daudzums palielinās visos ieraugos, fermentācijas beigās ieraugos U, M, I sasniedzot attiecīgi 5,77, 6,83 un 6,20 \log_{10} kvv \cdot g $^{-1}$.

Pētījuma rezultāti parāda līdzīgu PB un raugu attīstības tendenci (6. un 7. attēls) tieši ieraugā M. Tas skaidrojams ar šajā ieraugā identificēto heterofermentatīvo PB sugu *Lactobacillus plantarum* un rauga *Saccharomyces cerevisiae* savstarpējo simbiozi, kas atbilst ar literatūrā atrodamajām atziņām (Spicher, Stephan, 1999).



8. att. Titrējamā skābuma un pH izmaiņas ieraugos 48 stundu fermentācijas laikā /

Fig. 8. Changes of pH and titratable acidity in sourdoughs during 48-hour fermentation

Vides pH (8. attēls.) fermentācijas sākumā ticamības intervāla robežās ($p = 95\%$) sakrīt visos paraugos un ir 6,69–6,70. Fermentācijas pirmajā fāzē vides pH visstraujāk samazinās ieraugā M, sasniedzot pH 3,95, un tas liecina par aktīvu pienskābes baktēriju un raugu darbību. Kontroles ieraugā U pH vērtība krītas vismazāk – līdz pH 5,40 –, tāpēc spontānā ierauga gatavošanā ieteicams lietot kā nefermentēta iesala, tā bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevas.

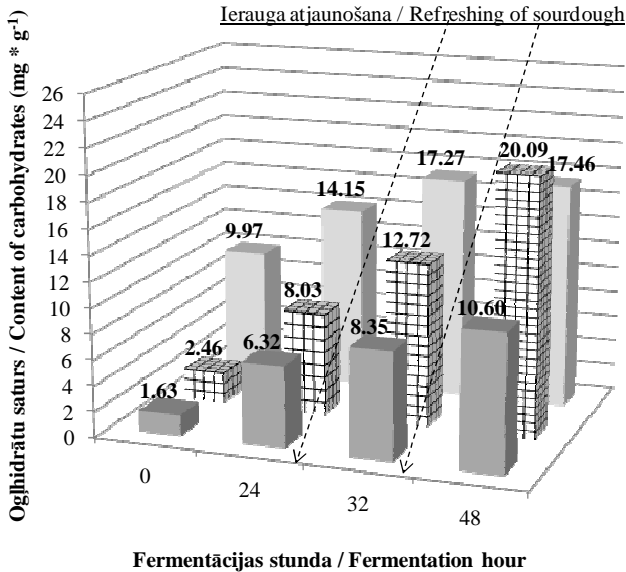
Izvērtējot un salīdzinot visu pagatavoto ieraugu – U, M un I – mikrobioloģisko kvalitāti un aktivitāti, var secināt, ka vislabākie rezultāti panākti pievienojot bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu ieraugam M. Pēc 48h fermentācijas ieraugā M konstatēts:

- viszemākais MAFAM skaits – $5,05 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$;
- vislielākais pienskābes baktēriju daudzums – $6,94 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$;
- visplašākais identificēto PB spektrs – *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627, *L. curvatus* ssp. *curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646 –, salīdzinot ar ieraugu U;
- vislielākais raugu skaits – $6,83 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$;
- viszemākais vides pH – 3,93;
- visaugstākais titrējamais skābums – 13,6 (ml 0,1 n NaOH).

Tādēļ turpmākajiem pētījumiem autors izvēlējies divus spontānos ieraugus: kontroles ieraugu U bez piedevām un ieraugu M ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu 20% apmērā no miltu daudzuma ieraugā.

Zinātniskos pētījumos pierādīts, ka spontānajos rudzu maizes ieraugos sastopamās homofermentatīvās un heterofermentatīvās PB vielmaiņas procesos izmanto galvenokārt monosaharīdus un disaharīdus (*Reed, Nagodawithana, 1995*).

Fermentācijas procesa norises pētījumiem izraudzītajos ieraugos U un M noteiktas ogļhidrātu – glikozes, fruktozes un maltozes –, kā arī organisko skābju – pienskābes un etiķskābes – satura izmaiņas fermentācijas laikā un to saistība ar pH un titrējamo skābumu. Ieraugos noteikts arī aminoskābju un vitamīnu saturs.



- Fruktozes saturs ieraugā U / Fructose content in sourdough U
- ▨ Glikozes saturs ieraugā U / Glucose content in sourdough U
- Maltozes saturs ieraugā U / Maltose content in sourdough U

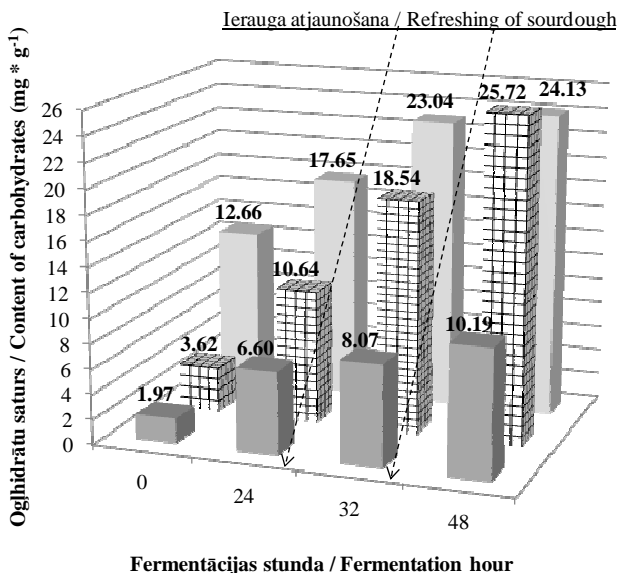
9. att. Maltozes, glikozes un fruktozes satura izmaiņas ieraugā U 48 stundu fermentācijas laikā /

Fig. 9. Changes in content of maltoze, glucose and fructose in sourdough U during 48 hours of fermentation

Maltozes saturs pēc pirmās atjaunošanas (2. fermentācijas fāzē) M ieraugā paaugstinās no 17,64 līdz 23,04 mg·g⁻¹ (10. attēls.), bet ieraugā U – no 14,15 līdz 17,27 mg·g⁻¹ (9. attēls.).

Vislielākās izmaiņas glikozes saturā ieraugos U un M novērojamas pēc pirmās atjaunošanas līdz fermentācijas beigām, kad glikozes saturs palielinās no 8,02 līdz 20,09 mg·g⁻¹ ieraugā U un no 10,64 līdz 25,72 mg·g⁻¹ ieraugā M (9. un 10. attēls.). Augstāks glikozes saturs ieraugā M skaidrojams ar fermentu α un β amilāžu aktivitāti, kas hidrolizē cieti (Hui *et al.*, 2004).

Fruktozes koncentrācija visvairāk palielinās ieraugu fermentācijas 3. fāzē (9. un 10. attēls.). Līdzīgi kā pH un titrējamā skābuma dati, arī ogļhidrātu rādītāji liecina par augstāku metabolisko aktivitāti fermentācijas 2. un 3. fāzē abos ieraugos.

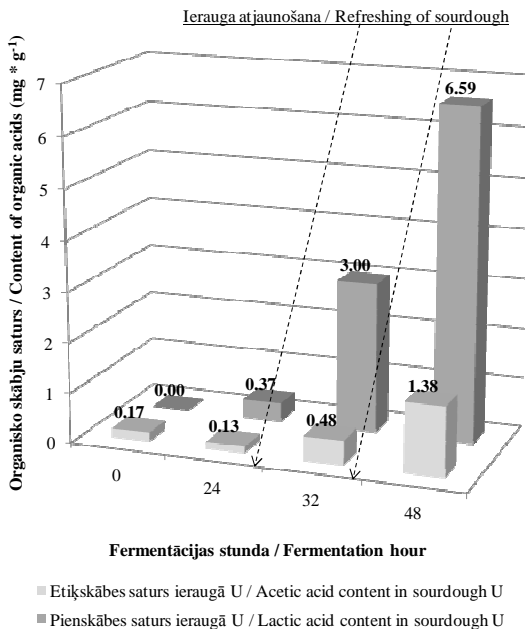


- Fruktozes saturs ieraugā M / Fructose content in sourdough M
- ▨ Glikozes saturs ieraugā M / Glucose content in sourdough M
- Maltozes saturs ieraugā M / Maltose content in sourdough M

10. att. Maltozes, glikozes un fruktozes satura izmaiņas ieraugā M 48 stundu fermentācijas laikā /

Fig. 10. Changes in content of maltoze, glucose and fructose in sourdough M during 48 hours of fermentation

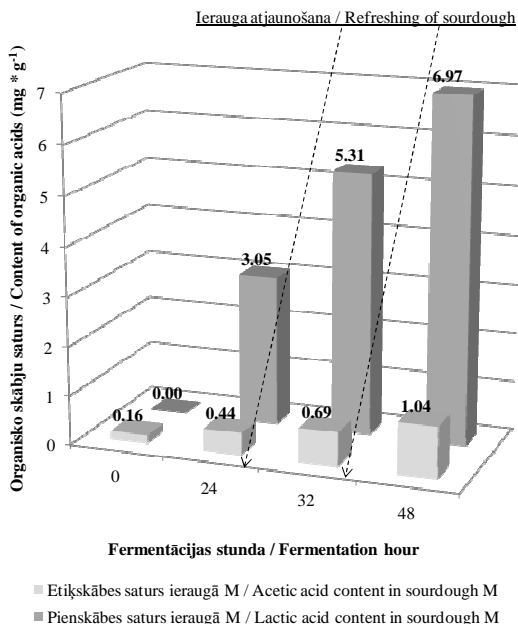
Pētījumos iegūtie rezultāti (9. un 10. attēls.) pierāda ieraugu gatavošanas trīs fāžu tehnoloģijas nozīmīgumu, jo, atjaunojot spontāno ieraugu, tajā tiek nodrošināts pietiekams monosaharīdu un disaharīdu saturs, kas nepieciešams pienskābes baktēriju un raugu aktīvam metabolismam. Pienskābes baktērijas un raugi iepriekšminētos ogļhidrātus izmanto kā enerģijas avotu vielmaiņas procesam, kā arī organisko skābju producēšanai.



11. att. Pienskābes un etiķskābes saturs ieraugā U 48 stundu fermentācijas laikā /

Fig. 11. Changes in content of lactic and acetic acid in sourdough U during 48 hours of fermentation

Rudzu maizes garšas un aromāta veidošanā būtiska loma ir organisko skābju saturam. Kā norādīts zinātniskajā literatūrā, lai raksturotu ieraugā esošo skābju attiecības, izmanto molāro attiecību starp pienskābi un etiķskābi – fermentācijas koeficientu (FK). Lai iegūtu ar ieraugu gatavotu maizi ar sabalansētām garšas īpašībām, FK skaitliskajai vērtībai ieraugā vajadzētu būt 4. Ja etiķskābe netiek ražota pietiekamā daudzumā, FK ir pārāk augsts un produkta garša – neizteikta. Savukārt zema FK gadījumā (pārāk daudz etiķskābes) maizes garša ir pārāk izteikta un skāba (Spicher, Stephan, 1999).



12. att. Pienskābes un etiķskābes satura izmaiņas ieraugā M 48 stundu fermentācijas laikā /

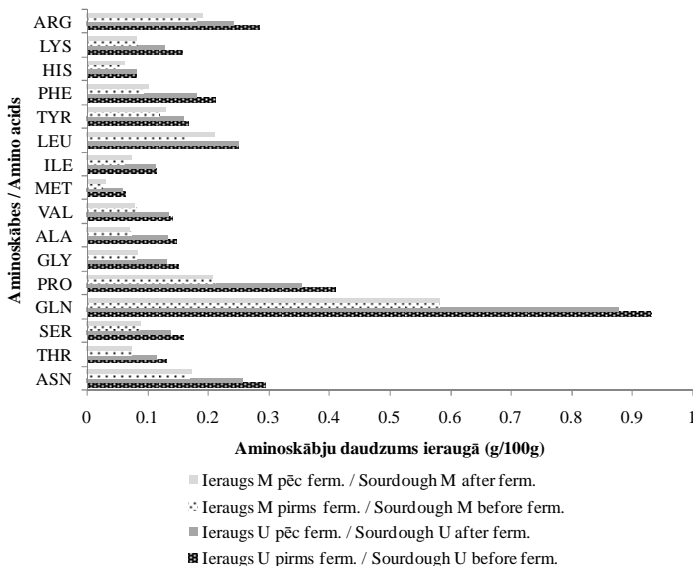
Fig. 12. Changes in content of lactic and acetic acid in sourdough M during 48 hours of fermentation

Pētījuma rezultāti liecina, ka pienskābes un etiķskābes molārā attiecība – fermentācijas koeficients (FK) – pēc 48 h ieraugā U ir 3,2 un ieraugā M – 4,5, un tas apstiprina ierauga M atbilstību kvalitatīva ierauga prasībām.

Iegūtie analīžu dati par organisko skābju izmaiņām ieraugu fermentācijas fāzēs (11. un 12. attēls.) atklāj, ka to satura izmaiņu tendence, ir identiska ar ogļhidrātu izmaiņu rezultātiem (9. un 10. attēls.). Pienskābes saturs ieraugā U pirmajā fermentācijas fāzē (līdz 24 h) mainās no 0 līdz 0,37 mg·g⁻¹ (11. attēls.), turpretim ieraugā M tas mainās būtiski – no 0 līdz 3,05 mg·g⁻¹ (12. attēls.). Pienskābes un etiķskābes koncentrācija ievērojami fermentācijas 2. un 3. fāzē palielinās gan ieraugā U, gan ieraugā M.

Pienskābes baktēriju celmi ieraugos nosaka organisko skābju veidošanās intensitāti. Otrajā fermentācijas fāzē ieraugos U un M identificēto PB celmu spektrs atšķiras – ieraugā U dominē celmi *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646, bet ieraugā M – *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646. Kā zināms no literatūras datiem, *L. plantarum* aktīvi fermentē glikozi un homofermentatīvi producē pienskābi tādēļ ieraugā M pienskābes saturs palielinās straujāk nekā ieraugā U.

Etiķskābes saturs fermentācijas gaitā straujāk palielinās ieraugā U – no 0,17 līdz 1,38 mg·g⁻¹ – nekā ieraugā M, kur tas paaugstinās no 0,16 līdz 1,04 mg·g⁻¹. Tas izskaidrojams ar ieraugā U identificētā fakultatīvi heterofermentatīvā PB celma *L. coryniformis* klātbūtni, kas, pēc literatūras datiem, bez pienskābes aktīvi producē arī etiķskābi. Abos ieraugos var novērot būtisku saistību starp nozīmīgāko metabolītu – pienskābes un etiķskābes – saturu ieraugos un vides pH izmaiņām (8. attēls.). Spontānos ieraugos sastopamajām PB piemīt arī proteolītiskas īpašības, kas izraisa olbaltumvielu hidrolīzi un aminoskābju veidošanās (Salovaara, 2004).

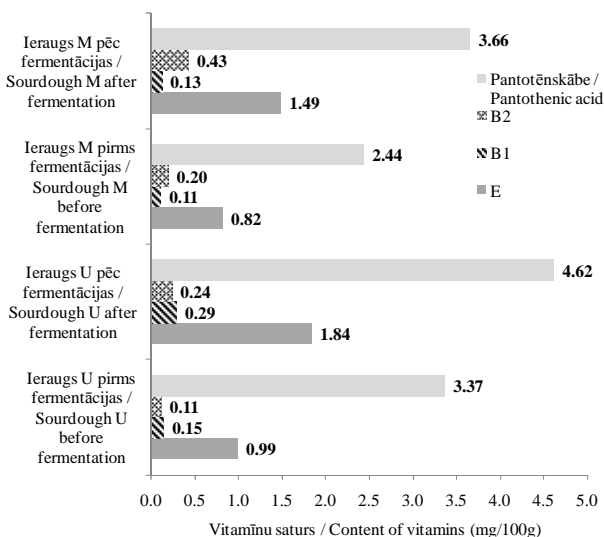


13. att. Aminoskābju saturs ieraugos pirms un pēc fermentācijas /
Fig. 13. Content of amino acids in sourdoughs before and after fermentation

Rezultāti par aminoskābju satura izmaiņām ieraugos U un M parāda augstu glicīna saturu abos ieraugos, taču paraugā M fermentācijas laikā tas paliek nemainīgs (13. attēls.). Kopējā aminoskābju satura izmaiņu tendence ir šāda: aminoskābju saturs fermentācijas gaitā paaugstinās ieraugā M, bet samazinās ieraugā U. Visvairāk – 1.3 reizes – ierauga M fermentācijas gaitā palielinās leicīna saturs. Būtiski palielinās arī arginīna, tirozīna un izoleicīna saturs.

Ieraugā M sastopamās PB konstruktīvajā metabolismā aktīvāk izmanto aminoskābes, lai atjaunotu šūnu struktūru elementus – šūnas apvalku, citoplazmatisko membrānu – un aktivētu procesus ribosomās un mezosomās (Spicher, Stephan, 1993).

Lai noskaidrotu arī citas spontānos ieraugos U un M esošās bioloģiski aktīvās vielas, tajos noteikts vitamīnu saturs.



14. att. Vitamīnu satura izmaiņas ieraugos pirms un pēc fermentācijas / Fig. 14. Changes in content of vitamins in sourdoughs before and after fermentation

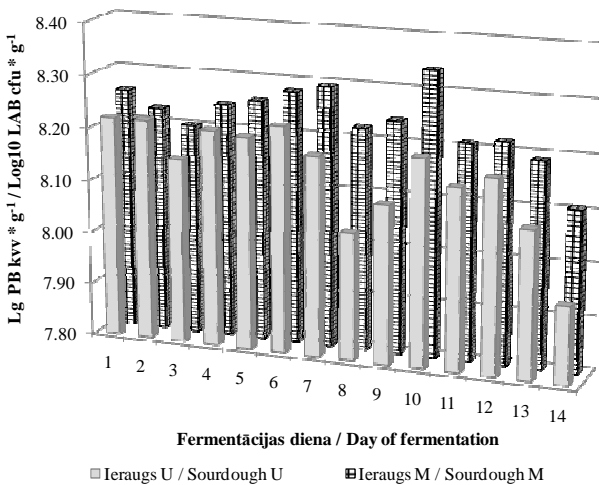
Izvērtējot vitamīnu satura izmaiņas fermentācijas procesā ieraugā U, iegūtie pētījuma rezultāti liecina, ka E vitamīna saturs palielinājies 1,9 reizes, B₁ vitamīna – 2 reizes, B₂ vitamīna – 2,2 reizes un pantotēnskābes – 1,37 reizes (14. attēls.). Savukārt ieraugā M B₂ vitamīna, pantotēnskābes un E vitamīna saturs palielinājies attiecīgi 2,15, 1,5 un 1,8 reizes. Tomēr B₁ vitamīna daudzums ticamības intervāla robežās (p = 95%) paliek nemainīgs. Kā zināms no literatūras datiem (Казакoв, Карпиленко, 2005), B₁ vitamīns ietilpst piruvātdekarboksilāzes sastāvā un tiek izmantots šā fermenta sintēzē.

Arī noteiktais vitamīnu saturs ieraugos liecina, ka fermentācijas procesā substrātā uzkrājušies pienskābes baktēriju un raugu vielmaiņas produkti.

3. Spontāno ieraugu izmantošanas iespējas atkārtotās ģenerācijās

Ražošanas apstākļos lietojot spontānā rudzu ierauga gatavošanas metodi, viena daļa gatavā ierauga (nobriedušā ierauga) tiek izmantota mīklas gatavošanā, bet otra tiek atstāta kā „mātes ieraugs”. Būtiska nozīme ir nobriedušā ierauga aktivitātei, lai to varētu lietot atkārtoti vairākās ģenerācijās.

Lai pētītu ieraugu U un M fermentācijas aktivitāti atkārtotās ģenerācijās, veikta mikrofloras un fizikāli ķīmisko rādītāju noteikšana laikā līdz 14 dienām.



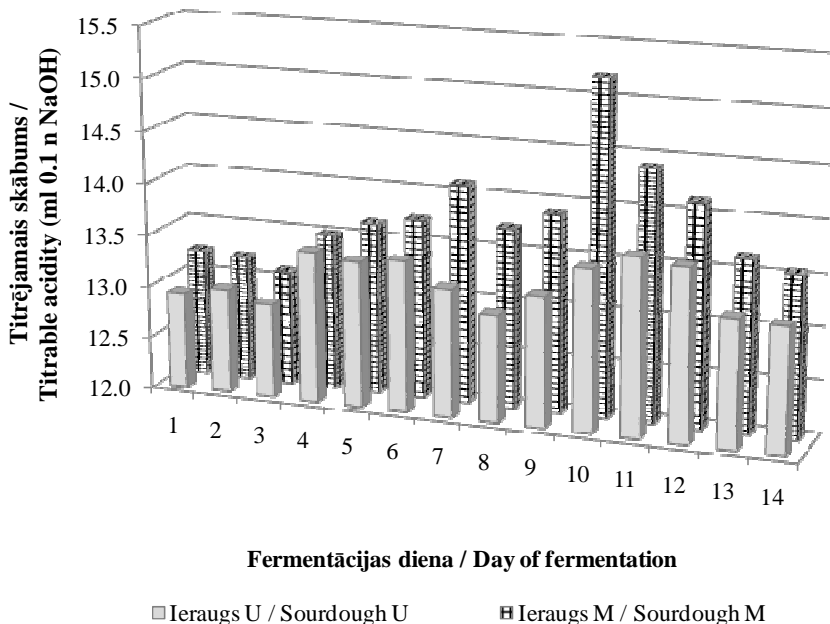
15. att. Ieraugu U un M sastāvā esošo PB attīstības dinamika 14 dienu atkārtotās ģenerācijās /

Fig. 15. Dynamics of LAB in 14 generations of sourdough U and M

Kā pierāda iegūtie dati, ieraugā M, kura pamatā ir spontānais ieraugs ar aktivēto rudzu graudu piedevu, PB skaits visās ģenerācijās pārsniedz PB skaitu ieraugā U. Turklāt stabilāka PB attīstības dinamika līdz 10. ģenerācijai vērojama tieši ieraugā M, un tas liecina par ieraugā adaptēties spējīgāku mikrofloru. PB skaits ieraugā M sasniedz maksimumu 10. ģenerācijā – 8,34 log kvv·g⁻¹. No rezultātiem izriet, ka spontānos ieraugus atkārtoti ieteicams lietot līdz 10. ģenerācijai, jo pēc 10. ģenerācijas ieraugos sāk samazināties PB skaits (15. attēls.). Identificējot PB celmus ieraugā M, var secināt, ka sākotnēji dominē *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus* ssp. *curvatus* 2207, *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627, bet ieraugā U – *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus* ssp. *curvatus* 2207, *L. coryniformis* 1629.

Lietojot ieraugus atkārtotās ģenerācijās, tajos sastopamāo celmu spektrs ir mainīgs. Jāatzīmē, ka 6. ģenerācijā ieraugā M nav konstatēts *L. plantarum* 1369, kas aktīvi producē pienskābi, un PB asociācija ieraugā M ir identiska ieraugā U konstatētajai – tajā ietilpst *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus* ssp. *curvatus* 2207. Turpinot lietot ieraugu atkārtotās ģenerācijās, 10. ģenerācijā parādās jauns PB celms *Pediococcus pentoseceous* 2147, kas dominē ieraugā M līdz 13. ģenerācijai.

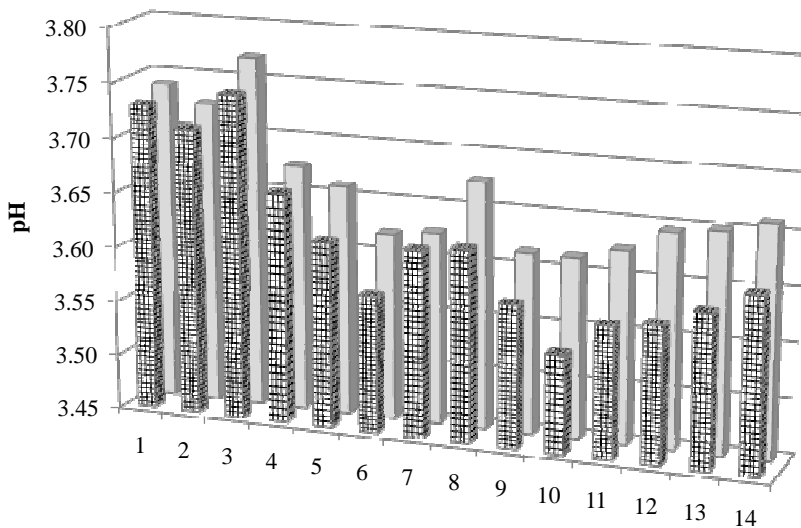
Paralēli veikti pētījumi par titrējamā skābuma un pH izmaiņām ieraugu atkārtotās ģenerācijas, un iegūtie dati parādīti 16. un 17. attēlā.



16. att. Ieraugu U un M titrējamā skābuma izmaiņu dinamika 14 dienu atkārtotās ģenerācijās /
Fig. 16. Dynamics of titratable acidity in 14 generations of sourdough U and M

Titrējamā skābuma rezultāti ieraugā būtiski korelē ar PB attīstības dinamiku (15. attēls.) – korelācijas koeficients starp minētājiem rādītājiem ieraugā U ir $r = 0,57$ un M ieraugā – $r = 0,60$.

Kā redzams 16. attēlā, visaugstākie titrējamā skābuma rezultāti ieraugā M iegūti 10. ģenerācijā (15,20), bet ieraugā U – 11. ģenerācijā (13,55), bet turpmākajās atkārtotajās ģenerācijās titrējamais skābums samazinās. Tas liecina par ieraugu PB populāciju savstarpējo mijiedarbību un identificēto PB celmu aktivitātes samazināšanos.



Fermentācijas diena / Day of fermentation

▣ Ieraugs M / Sourdough M □ Ieraugs U / Sourdough U

17. att. Ieraugu U un M pH izmaiņu dinamika 14 dienu atkārtotās ģenerācijās /

Fig. 17. Dynamics of pH in 14 generations of sourdough U and M

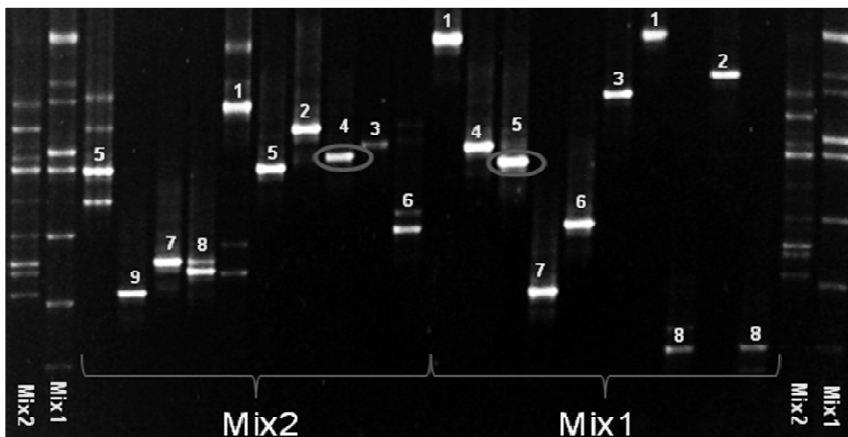
PH izmaiņas ieraugu fermentācijas gaitā nav tik izteiktas, salīdzinot ar PB un titrējamā skābuma izmaiņām. Līdz 10. ģenerācijai pH vērtība ieraugā U pazeminās no 3,74 līdz 3,62, bet ieraugā M– no 3,73 līdz 3,54. Pēc 10. ģenerācijas abu ieraugu pH vērtība paaugstinās. Arī vides pH rādītāju izmaiņas korelē ar PB skaita izmaiņām, un ieraugā U $r = -0,47$, bet ieraugā M $r = -0,39$ (18. attēls.).

4. Pienskābes baktēriju un raugu identifikācija spontānos rudzu maizes ieraugos un atkārtotās ierauga ģenerācijas

Viens no promocijas darba uzdevumiem ir aprobēt molekulārās bioloģijas metodes ierauga mikrobiālās sistēmas identificēšanā. Pienskābes baktēriju identifikācija veikta, izmantojot divus DNS iegūšanas paņēmienus:

- DNS izolēta tieši no ieraugiem U un M;
- DNS izolēta no PB koloniju veidojošām vienībām, kas izaugušas, veicot uzsējumus no ieraugiem U un M uz selektīvām MRS un MMRS barotnēm (abas selektīvās barotnes lietotas ar nolūku izvērtēt, kura no tām ir piemērotāka, lai iegūtu plašāku PB spektru).

Pirms poliakrilamīda gēlā ievadīt spontāno ieraugu vai ieraugu atkārtoto ģenerāciju paraugus, nepieciešams izvēlēties standartkultūras, izveidojot marķierus Mix 1 un Mix 2 PB celmu identificēšanai (18. attēls. un 2. tabula.). Atbilstīgi literatūras datiem (*Ehrmann, Vogel, 2005; De Vuyst et al, 2009*) pētījumiem izvēlēti Eiropas maizes ieraugos bieži sastopamo pienskābes baktēriju sugu celmi. Pēc DNS izolēšanas, 16S rDNS gēna V3 reģiona amplificēšanas izmantota DGGE elektroforēzes metode. Rezultāti liecina, ka gēlā pārklājas divu PB celmu – *L. paracasei ssp. paracasei* 1635 un *L. zeve* 1639 – 16S rDNS gēna V3 reģioni (18. attēls. un 2. tabula.). Paraugkultūru novietojums marķierī parādīts 2. tabulā.



18. att. Paraugkultūru marķieri Mix 1 un Mix 2 DGGE poliakrilamīda gēlā /

Fig. 18. Sample culture markers Mix 1 and Mix 2 in DGGE polyacrylamide gel

**Paraugkultūru atšifrējums marķieros /
Transcript of sample cultures in markers**

Praugkultūras / Sample cultures	Celms / Strain	Novietojums Mix 1 marķierī / Emplacement in Mix 1	Novietojums Mix 2 marķierī / Emplacement in Mix 2
<i>L. plantarum</i>	1369	1-1*	–
<i>L. alimentarius</i>	1627	1-1*	–
<i>L. fermentum</i>	2152	1-2	–
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2190	1-3	–
<i>L. coryniformis</i>	1629	1-4	–
<i>L. delbrueckii</i>	1646	1-5	–
<i>Weissella cibaria</i>	41967	1-6	–
<i>L. lindneri</i>	2163	1-7	–
<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	1635	1-8*	–
<i>L. zeve</i>	1639	1-8*	–
<i>L. pontis</i>	2164	–	2-1
<i>L. brevis</i>	1643	–	2-2
<i>L. sakei ssp. sakei</i>	1656	–	2-3
<i>L. curvatus ssp. curvatus</i>	2207	–	2-4
<i>Pediococcus pentoseceus</i>	2147	–	2-5*
<i>L. mindensis</i>	14500	–	2-5*
<i>Pediococcus acidilactici</i>	2145	–	2-6
<i>L. namurensis</i>	19117	–	2-7
<i>L. sanfranciscensis</i>	20451	–	2-8
<i>L. secaliphilus</i>	17896	–	2-9

*piezīme. Marķierī Mix 1 *L. paracasei ssp. paracasei* 1635 un *L. zeve* 1639, *L. plantarum* 1369 un *L. alimentarius* 1627, kā arī marķierī Mix2 *Pediococcus pentoseceus* 2147 un *L. mindensis* 14500, iespējama iezīmju pārklāšanās gēlā /

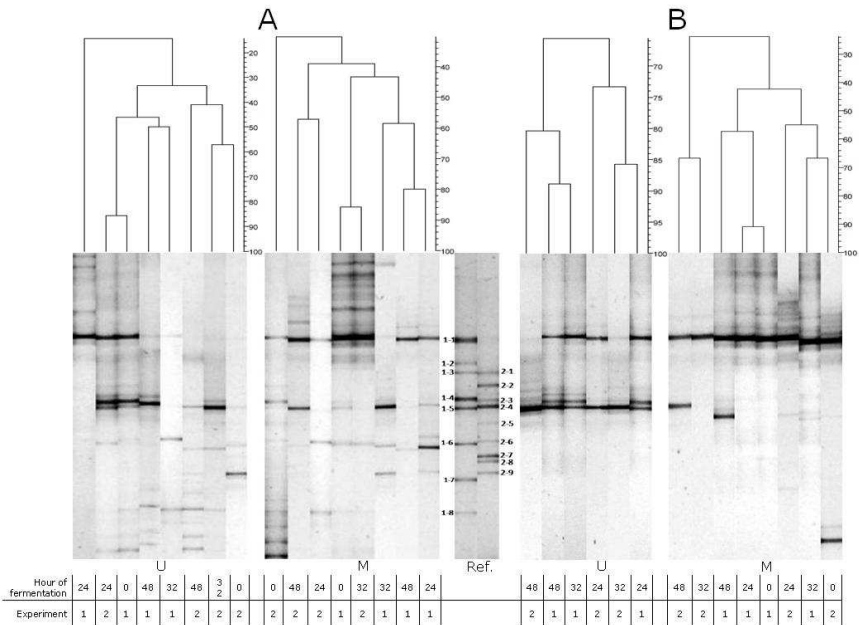
*note. Bands of *L. paracasei ssp. paracasei* 1635 and *L. zeve* 1639, *L. plantarum* 1369 and *L. alimentarius* 1627 in Mix 1, *Pediococcus pentoseceus* 2147 and *L. mindensis* 14500 in Mix 2, in gel may overlap

Lai iegūtu maksimālu pienskābes baktēriju spektru, kuru var noteikt ar DGGE metodi un novērot poliakrilamīda gēlā, nepieciešams izvēlēties optimālu barotni PB kultivēšanai. Pienskābes baktēriju skaita noteikšana izmantota kā papildu rādītājs barotņu izvēlē. Pētījumiem izraudzītas divas selektīvās barotnes: MRS un modificētā MRS barotne (MMRS).

Priekšmēģinājumos nosakot PB koloniju veidojošo vienību skaitu abās barotnēs, iegūtie rezultāti liecina, ka tajās augošo PB skaits būtiski neatšķiras.

Kā izejmateriāls DNS izolēšanai gatavotas PB suspensijas no MRS un MMRS barotnēs izaugušām PB kolonijām. Lietojot PCR un DGGE metodes, atklājas, ka MMRS agara barotnē attīstījies plašāks PB sugu spektrs nekā MRS barotnē. MRS barotnē pēc 24 h fermentācijas gan ieraugā U, gan ieraugā M plašāks identificēto PB spektrs ir paraugos, kuros DNS iegūta tieši no ieraugiem. Ieraugā U identificēti trīs PB celmi – *L. plantarum* 1369, *L. curvatus* ssp. *curvatus* 2207 un viens neidentificēts –, turpretim MMRS barotnē – septiņi PB celmi: *L. plantarum* 1369, *L. curvatus* ssp. *curvatus* 2207, *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1635, *L. zeve* 1639 un trīs neidentificēti. Tādēļ tālākiem eksperimentiem izvēlēta MMRS barotne.

Spontānā ierauga (U) un spontānā ierauga ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu piedevu (M) fermentācija un mikrobiālās ekosistēmas izmaiņas fermentācijas gaitā redzamas 19. attēlā.



19. att. Divu veidu spontāno ieraugu DGGE analīzes izmantojot DNS, kas iegūti tieši no ieraugiem (A) un no MMRS barotnē inkubētu ieraugu PB koloniju noskalojumiem (B) /

Fig. 19. DGGE analysis of two types of spontaneous sourdoughs using DNA extracted directly from sourdoughs (A) and sourdough LAB colonies growing on MMRS media

Pētījuma rezultāti liecina, ka paraugos, kuros DNS izolēta tieši no ieraugiem, ir ievērojami plašāks pienskābes baktēriju spektrs, salīdzinot ar paraugiem, kuros DNS izolēta no MMRS barotnēs kultivētu ieraugu paraugu koloniju noskalojumiem. Tātad ne visi ieraugos sastopamie PB celmi spēj attīsties selektīvajā MMRS barotnē.

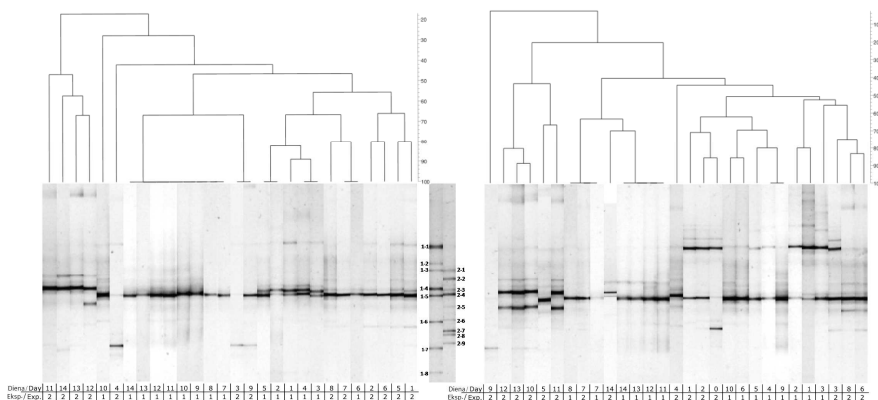
Salīdzinot spontānā ierauga (U) un ierauga, kuram pievienoti bioloģiski aktivēti rudzu graudu milti 20% apjomā (M) izejmateriālus, secināms, ka plašāks PB celmu spektrs atrodams ierauga M izejmateriālā.

Svarīgi atzīmēt, ka neatkarīgi no DNS izolēšanas paņēmiena, ieraugā M dominē *L. plantarum* 1369, kas aktīvi producē pienskābi, kurai ir ļoti būtiska nozīme rudzu maizes garšas un aromāta veidošanā. To apstiprina arī dati par pienskābes saturu ieraugos (11. un 12. attēls.), sakarā ar kuriem, pienskābes saturs ieraugā M ir ievērojami lielāks nekā ieraugā U. Zinātniskajā literatūrā minēts, ka šie mikroorganismi satur nīzīnam līdzīgu antimikrobiālu proteīnu laktolīnu, kas inhibē *Staphylococcus aureus*, *Leuconostoc mesenteroides* un *Pediococcus damnosus*. *L. plantarum* satur arī plantracīnu A, kas inhibē *P. pentosaceus* un *Leuconostoc paramesenteroides* attīstību (Davidson, Hoover, 1993). Iespējams, tieši šai sugai raksturīgās antimikrobioālās aktivitātes dēļ, tā dominē visās ierauga M gatavošanas fāzēs.

Analogi pētījumi veikti, identificējot raugus, to PCR analīzēm izmantots atšķirīgs 16S rRNS gēna fragments (V1), tādēļ analīzes ar raugiem jāveic atsevišķi. Par paraugkultūru izvēlēta *Saccharomyces cerevisiae* 50. Visos spontānā ierauga paraugos (gan U, gan M) identificēts viens – *Saccharomyces cerevisiae* 50 – celms. Ieraugos sastopamie raugi veido simbiozi ar PB, tādējādi veicinot fermentācijas procesa norisi. Iegūtie rezultāti sakrīt ar zinātniskajā literatūrā atrodamajām atziņām par raugu sugu identifikāciju rudzu maizes ieraugos (Hutkins, 2006; Salminen, 2004).

Identifikācija, izmantojot API testus. PB un raugu identifikācija veikta arī ar otru identifikācijas metodi – API testu identifikācijas sistēmu, kuras pamatā ir mikroorganismu bioķīmiskās reakcijas. Lietojot API testa stripu API CHL 50, identificētas šādas PB sugas: *Lactobacillus coprophilus*, *Lactobacillus delbureckii*, *Pediococcus damnosus*. Izmantojot ID 32 C stripu, identificēta raugu suga *Saccharomyces cerevisiae* (13–16 pielikums).

Kā minēts iepriekš, ieraugi U un M tiek lietoti atkārtotās ģenerācijas, un ir ļoti būtiski identificēt un novērtēt PB populācijās dominējošos celmus un iegūt izpratni par to savstarpējo mijiedarbību. Ieraugu U un M DGGE elektroforēzes attēli ar identificēto pienskābes baktēriju „pēdām” gēlos redzami 20. attēlā.



20. att. 14 dienu atkārtoto ģenerāciju ieraugu DGGE analīzes. DNS izdalīta tieši no ieraugu paraugiem /
Fig. 20. DGGE analysis of 14 sourdough generations. DNA extracted directly from sourdoughs

Nosakot dominējošos PB celmus ieraugu U un M atkārtoto ģenerāciju paraugos, kuros DNS izdalīta tieši no ieraugu paraugiem, var secināt, ka līdz 5. ģenerācijai ieraugā U dominē *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. coryniformis* 1629. Sestajā ģenerācijā ieraugā U pārstāj dominēt *L. coryniformis* 1629, un tas, iespējams, negatīvi ietekmē šā ierauga spēju raudzēt mīklu. Tomēr *L. coryniformis* 1629 ieraugā sāk dominēt 11. ģenerācijā, un tas pierāda pazeminātu ierauga U kvalitāti un antagonismu starp ieraugā sastopamajiem PB celmiem no 6. līdz 10. ģenerācijai.

Līdz 10. ģenerācijai ieraugā M dominē *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627. Svarīgi atzīmēt, ka ieraugā M dominē *L. plantarum* 1369, kas stabili dominē arī trīs fāžu spontānā ierauga fermentācijas laikā, liecinot par tā izturību un spēju adaptēties. 10. ģenerācijā *L. plantarum* 1369 nomaina *Pediococcus pentoseceus* 2147. Literatūras avotos atrodamas atziņas par *P. pentosaceus* inhibējošo ietekmi uz *L. plantarum*, tomēr tā nav izskaidrojama ar *P. pentosaceus* producēto skābju ietekmi, jo *L. plantarum* ir izteikti skābju izturīga suga. Inhibējošais efekts skaidrojams ar to, ka *P. pentosaceus* satur termoizturīgu bakteriocīnu pediocīnu A, kas inhibē arī citu grampozitīvo mikroorganismu, piemēram, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus faecalis* un *Bacillus cereus* attīstību, tomēr pediocīns A neietekmē gramnegatīvo baktēriju un raugu attīstību (Davidson, Hoover, 1993).

Iegūtie rezultāti liecina, ka ieraugu M un U atkārtotās ģenerācijās stabili dominē *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, tomēr M ieraugā dominē spēcīgi *L. plantarum* 1369 un *Pediococcus pentoseceus* 2147 celmi,

kuri, iespējams, nodrošina ierauga M pārākumu un augstāku producēto metabolītu saturu, salīdzinot ar ieraugu U.

Ierauga M atkārtotās ģenerācijās uzskatāmi redzama PB celmu mijiedarbība, turklāt tiem raksturīgas izteiktas antimikrobiālas īpašības, kas palīdz nomākt miltiem raksturīgo blakus mikrofloru.

Pētījumi par mikroorganismu populāciju, un īpaši PB, attīstību un to celmu daudzveidību rudzu maizes ieraugos ir nozīmīgi, jo to veidotie metabolīti nosaka rudzu maizes aromātu un garšas īpašības.

5. Liofilizēto spontāno ieraugu izstrāde un kvalitātes izvērtējums

Iepriekš veiktie pētījumi pierāda, ka nobriedušā jeb „mātes ierauga” augsta aktivitāte saglabājas 10 ģenerācijās, taču maizes ražotājiem nepieciešams nemainīgi kvalitatīvs ieraugs. Daži Latvijas maizes ražošanas uzņēmumi iepērk gatavus ieraugus no ārvalstīm: Vācijas, Dānijas un Krievijas. Šo valstu uzņēmumi ražo saldētus ieraugus, kuru uzglabāšanas laiks saldētavā ir līdz pusgadam, un liofilizētos ieraugus.

Tā kā Latvijā šāda veida ieraugi netiek ražoti, viens no pētījumu uzdevumiem ir izstrādāt liofilizētos spontānos ieraugus, noteikt to kvalitāti un salīdzināt ar komerciāli pieejamiem ieraugiem. Laboratorijas apstākļos veikta spontāno ieraugu U un M liofilizēšana un noteikti to kvalitātes rādītāji (3. tabula.).

3. tabula / Table 3.

Liofilizēto ieraugu U, M un „TK-Starter” kvalitātes rādītāji / Quality parameters of lyophilised sourdoughs M, U and „TK Starter”

Ieraugs / Sourdough		Sausna / Dry matter (%)	pH	Titrējamais skābums / Titratable acidity (ml 0.1 n NaOH)	Pienskābes baktērijas (log ₁₀ kvv ⁻¹ g ⁻¹) / Lactic acid bacteria (lg cfu g ⁻¹)	Raugi (log ₁₀ kvv ⁻¹ g ⁻¹) / Yeasts (lg cfu g ⁻¹)
U		94.37	3.99	17.0	7.33	6.14
M		96.15	3.93	14.5	7.59	6.80
„TK Starter”		97.21	4.07	14.9	7.21	6.09
Tir- kultūras / Starter cultures	<i>L. plantarum</i>	96.45	–	–	10.25	–
	<i>P. pentosaceus</i>	95.73	–	–	10.90	–

Iegūto liofilizēto ieraugu aktivitāte pārbaudīta, sagatavojot dažādus mīklas paraugus, kuriem pievienoti liofilizētie ieraugi 3%, 5% un 10% apjomā no miltu daudzuma (*Kunkulberga et al.*, 2008). Priekšmēģinājumi pierāda, ka liofilizēto ieraugu pievienošana līdz 10% nedod vēlamos rezultātus, jo mīklas titrējamais skābums nepārsniedz 9. Lai paaugstinātu liofilizēto ieraugu aktivitāti, papildus pievieno no ieraugiem izolētās PB tīrkultūras *L. plantarum* un *P. pentosaceus*.

No identificēto PB spektra izvēlēta *L. plantarum* (21. attēls.), jo tā ir dominējoša un izturīga PB suga spontānā ierauga gatavošanas gaitā visās trīs fāzēs ieraugā M, turklāt *L. plantarum* un *P. pentosaceus* dominē ierauga M atkārtotās ģenerācijās (21. attēls.) Pēc izolēto tīrkultūru pavairošanas to biomasa tiek liofilizēta, iegūstot sausos preparātus ar augstu PB saturu – $1,51 \cdot 10^{10}$ kvv·g⁻¹ (*L. plantarum*) un $8,49 \cdot 10^{10}$ kvv·g⁻¹ (*P. pentosaceus*), kas 0,1% apmērā pievienoti ieraugam M (3 tabula.).

Kā redzams 4. tabulā, pēc liofilizēto ieraugu aktivēšanas un lietošanas mīklas raudzēšanā (pievienots ieraugs 5% apmērā) labākie rādītāji iegūti ar liofilizēto ieraugu M, kuram pievienotas PB tīrkultūras, – mīklas skābums pH ir 3,85 un titrējamais skābums – 12,0. Šie rezultāti pārsniedz literatūrā norādītos (*Kunkulberga, Segliņš*, 2010) un praksē lietotā „TK-starter” ierauga rādītājus.

Maizes, kas gatavota ar ieraugu M un tīrkultūrām, pH un titrējamais skābums ir identisks ar „TK-starter” ieraugu gatavotai maizei raksturīgajiem, tādējādi var secināt, ka izstrādātais jaunais liofilizētais ieraugs spēj aizstāt komerciāli pieejamo (4. tabula.).

4. tabula / Table 4.

**Liofilizēto ieraugu pārbaude maizes ražošanas procesā /
Testing of lyophilisated sourdoughs in bread production process**

Ieraugs / Sourdough	pH	Titrējamais skābums / Titratable acidity (ml 0.1 n NaOH)	pH	Titrējamais skābums / Titratable acidity (ml 0.1 n NaOH)	pH	Titrējamais skābums / Titratable acidity (ml 0.1 n NaOH)
	Pēc atjaunošanas / After refreshing		Pēc mīklas raudzēšanas / After fermentation of dough		Pēc maizes cepšanas / After bread baking	
„Bocker”	4.3	13.7	4.19	10.6	4.56	6.9
U	4.17	16.9	4.18	11.2	4.79	5.8
M + tīrkultūras / M + isolated cultures	4.03	18.1	3.85	12.0	4.61	7.0

SECINĀJUMI

1. Pirmo reizi Latvijā veikti pētījumi par mikroorganismu populāciju attīstību spontānos rudzu maizes ieraugos.
2. Fermentācijas procesā vislabākie mikrobioloģiskie rādītāji iegūti ieraugā, kas gatavots no skrotētiem (1370. tipa) rudzu miltiem, jo tajā novērojama intensīvāka mijiedarbība starp mikroorganismu populācijām – raugu un pienskābes baktēriju skaits strauji palielinās, vienlaicīgi nomācot *Bacillus* un *Enterobacteraceae* ģinšu mikroorganismu vairošanos, turklāt 48 stundu fermentācijas laiks ir pietiekams stabilas mikrobiālās sistēmas izveidei.
3. Spontānais ieraugs ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu mikrobiālās kvalitātes ziņā ir piemērotāks mīklas gatavošanai, salīdzinot ar ieraugu bez piedevas un ieraugu ar iesala piedevu, jo pienskābes baktēriju un raugu skaits tajā ir visaugstākais – attiecīgi, $7,94 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$ un $6,83 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$ –, bet mezofīli aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu skaits un pH vērtība – viszemākie – attiecīgi $5,05 \log_{10} \text{ kvv} \cdot \text{g}^{-1}$ un pH 3,93.
4. Fermentācijas procesa 2. un 3. fermentācijas fāzē ieraugā spontānajā ieraugā ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu dominē *L. plantarum* 1369, kas homofermentatīvi producē pienskābi no glikozes, tādēļ tajā pienskābes saturs palielinās straujāk nekā spontānajā ieraugā bez piedevas un fermentācijas koeficienta vērtība ieraugos ir attiecīgi 4,5. un 3,2.
5. Ieraugu atkārtotās ģenerācijās stabilāka pienskābes baktēriju attīstības dinamika līdz 10. ģenerācijai vērojama tieši ieraugā ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu, un tas liecina par adaptētās spējīgāku mikrofloru. Pēc 10. ģenerācijas ieraugu aktivitāte samazinās.
6. Pētot ieraugu mikrobiālo ekosistēmu ar denaturējoša gradienta gēla elektroforēzi metodi, pierādīts, ka paraugos, kuros DNS izolēta tieši no ieraugiem, ir ievērojami plašāks pienskābes baktēriju spektrs, salīdzinot ar paraugiem, kuros DNS izolēta no MMRS barotnēs kultivētu ieraugu paraugu koloniju noskalojumiem. Tātad ne visi ieraugos sastopamie pienskābes baktēriju celmi spēj attīstīties selektīvajā MMRS barotnē.
7. Trīs fāžu fermentācijas procesa beigās spontānajā ieraugā bez piedevas identificēti trīs pienskābes baktēriju celmi – *L. coryniformis* 1629, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646 –, bet spontānajā ieraugā ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu – četri – *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646 –, kuri nodrošina augstākus kvalitātes rādītājus ieraugā. Abos spontānā ierauga paraugos identificēts viens rauga – *Saccharomyces cerevisiae* 50 – celms.

8. Ieraugu atkārtotās ģenerācijās stabili dominē *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, tomēr ieraugā ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu dominē *L. plantarum* 1369 un *Pediococcus pentoseceus* 2147 celmi, kuri nodrošina tā pārākumu un augstāku producēto metabolītu saturu, salīdzinot ar ieraugu bez piedevas.
9. Izstrādātais liofilizētais ieraugs, kura pamatā ir spontānais ieraugs, kas gatavots no rudzu 1370. tipa miltiem, pievienojot 20% bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu un pienskābes baktēriju *Lactobacillus plantarum* un *Pediococcus pentosaceus* tīrkultūras 0,1% apmērā, var aizstāt komerciālo ieraugu.
10. Pierādīta promocijas darba hipotēze, ka spontānā rudzu maizes ierauga aktivitāti paaugstina bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu un pienskābes baktēriju tīrkultūru piedeva.

TOPICALITY OF THE RESEARCH

During the last decades an interest among residents of many European countries has increased in bread made with sourdough (*Spicher, Stephan, 1999*). More and more customers prefer healthy bread that is aromatic, tasty, with good structure and prolonged storage time. Demand is increasing also for ecological food, including grains from biological farming and bread made of it. Customers for their diet chose bread in the production technology of which sourdough is used that improves its quality and flavour properties (*Hui et al., 2004*).

Bread with spontaneous sourdough has been prepared for centuries; however, the scientific studies on the factors influencing the spontaneous sourdough quality have started recently. Until introduction of baker's yeast and its availability, bread made with sourdough was probably the main bread type consumed in Europe and North America. Dough was leavened by means of wild acid bacteria cultures, including heterofermentative strains that produce enough CO₂ resulting in dough fermentation. Composition of the spontaneous sourdoughs often included also wild yeasts that later became indispensable in fermentation process. These associations of wild bacteria and yeasts are easy to maintain and use even for several years (*Hutkins, 2006*). Stability of long used and maintained sourdoughs could be explained by originating of compounds with inhibiting influence (*Messens, De Vuyst, 2002*), as well as by the microbial interaction of lactic acid bacteria and yeasts.

Sourdough preparation in three stages is one of the oldest methods that have developed on the basis of bakers' practical experience. However, this method is labour-consuming – it takes 30-50 hours for sourdough preparation, strictly observing temperature regimes and duration of stages. Duration of stages and temperature regimes has been worked out in order to stimulate the growth of lactic acid bacteria and yeasts in sourdough. During the first fermentation stage at temperature 25–26° C favourable conditions for yeast growth are ensured, during the second and the third stage temperature is increased up to 30° C, so that active growth of lactic acid bacteria can take place (*Kramer, 2002*).

For rye bread preparation sourdough is mainly used in regions where rye is cultivated – in Northern, Central and Eastern Europe, including Baltic states, where rye bread occupies a significant market share. Customers in Latvia are fond of rye bread made with spontaneous sourdough.

In the rye bread making process the quality of spontaneous sourdough is of great importance, as it is influenced not only by the chemical composition of flour and enzymes in it, but also by microflora in flour and dynamics of its growth during the sourdough preparation stages. In laboratory conditions microflora of fermented spontaneous sourdough is determined only by the type

of flour and its quality – lactic acid bacteria in it are able to provide a stable microbiological association in sourdough at short time (Van der Meulen *et al.*, 2007). Composition of spontaneous sourdoughs prepared at bakeries is influenced not only by microorganisms in flour, but also by those found on equipment and in air of premises (De Vuyst *et al.*, 2009). If the sourdough activity is insufficient and dough lacks the needed acidity, manufacturers add acidity regulators, or imported frozen or lyophilised starters are used for sourdough preparation.

Only during the last decades lactic acid bacteria and yeast species have been identified that take part in sourdough fermentation. Up to now, about 50 lactic acid bacteria of genus *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* and *Weissella* have been isolated from sourdoughs, and 20 yeast species of genus *Saccharomyces*, *Candida* and *Torula*.

Flour microflora contains also microscopic fungi of *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* types. Metabolites of the said microorganisms have an unfavourable impact on the spontaneous sourdough fermentation process, therefore the count of yeasts and heterofermentative lactic acid bacteria is one of the factors that influences the growth of microorganism populations in spontaneous sourdough and facilitates fermentation process.

When refreshing sourdough several times, formation of associations is observed, in which usually one or two species of *Lactobacillus* prevail, significantly – threefoldly or fourfoldly exceeding the count of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms (Corsetti, Settanni, 2007).

In Latvia no researches have been performed by now on microflora of the spontaneous rye bread sourdough and its metabolites, and no competitive lyophilised sourdough starter is produced on the basis of spontaneous sourdough.

Taking into consideration the above, the following **hypothesis** has been put forward in the doctoral thesis: activity of spontaneous rye bread sourdough is enhanced by adding flour from biologically activated rye grains and lactic acid bacteria isolated cultures.

Hypothesis is proved by the **theses under defence**:

1. use of peeled rye flour (type 1370) in preparation of spontaneous sourdough ensures a sufficient biological prevalence of useful microorganisms – populations of yeasts and lactic acid bacteria;
2. flour from biologically activated rye grains facilitates multiplication of lactic acid bacteria and yeast populations and formation of desirable metabolites in spontaneous rye bread sourdough;
3. there are stable lactic acid bacteria populations in repeated generations of sourdough prepared with addition of flour made from biologically activated rye grains;

4. from DNA of the samples under research a wider information about the range of lactic acid bacteria strains can be obtained than from DNA of lactic acid bacteria colony forming units that have grown on the selective TPC media;
5. lyophilised spontaneous sourdough with additives of flour made from biologically activated rye grains and of lactic acid bacteria isolated cultures can compete with commercial sourdough starter.

Object of the research of the doctoral thesis – spontaneous rye bread sourdough

Aim of the doctoral thesis – to investigate dynamics of growth of microbial populations in spontaneous rye bread sourdoughs and to develop a lyophilised sourdough applicable for bread production.

In order to achieve the aim of work, the **objectives** were set up as follows:

- Investigate and analyze microbial interaction in spontaneous sourdoughs, prepared from crude (type 1740) and peeled (type 1370) rye flour, and evaluate rye bread suitability for preparation of spontaneous sourdoughs.
- Determine influence of unfermented rye malt and flour made from biologically activated rye grains on the fermentation process and quality indices of spontaneous rye sourdough.
- Investigate activity and diversity of sourdough microflora in repeated generations.
- Appropriate methods of molecular biology for identification of sourdough microflora.
- Identify the dominating lactic acid bacteria and yeast species and strains in spontaneous sourdough fermentation stages and repeated generations of sourdoughs.
- Develop a new lyophilised rye bread sourdough and compare it with commercially available analogues.

Scientific importance of the thesis.

- For the first time in Latvia studies on microflora of spontaneous rye bread sourdough have been performed, and a lyophilised sourdough developed, based on traditional spontaneous sourdough with additives of flour made from biologically activated rye grains and of lactic acid bacteria isolated cultures. A patent LV 13899 A has been obtained – „Method for preparation of spontaneous rye sourdough”.
- Study results included in the doctoral thesis show the mutual interaction of microflora of spontaneous rye bread sourdough during fermentation stages and its influence on quality of the ready sourdough.
- In the Thesis, the main correlations have been determined in spontaneous sourdough, in spontaneous sourdough with rye malt addition and in

spontaneous sourdough with addition of flour made from biologically activated rye grains (growth intensity of mesophylic aerobic and facultative anaerobic microorganisms, lactic acid bacteria and yeasts, changes of pH, titrable acidity, organic acids, carbohydrates, amino acids and vitamins during fermentation), according to which the sourdough selection was made.

- By means of the methods of molecular biology, for the first time in Latvia identification of lactic acid bacteria species and strains in spontaneous rye bread sourdoughs was performed.

The economic significance of the doctoral thesis – in bakeries of Latvia spontaneous sourdoughs in repeated generations are being used in the technological process for rye bread preparation, as well as imported frozen or lyophilised starters. The new lyophilised sourdough with addition of flour made from biologically activated rye grains and of lactic acid bacteria isolated cultures developed by the author, can be used in the technological process for rye bread preparation.

APPROBATION OF THE SCIENTIFIC WORK

The results of the research work **have been presented** in 11 international scientific conferences and congresses in Latvia, Lithuania, Hungary, Germany, Republic of South Africa, Denmark, Spain, Turkey, and in the international food exhibition „Riga food 2008”.

The results of the work have been **summarised and published** in six peer-reviewed scientific editions, and one patent of the Republic of Latvia has been confirmed (the list of publications and attended conferences and congresses see on pages 7–9).

MATERIALS AND METHODS

Time and place of the research

Research was performed in Latvia and Denmark, from 2007 until 2011.

At the laboratories of the Faculty of Food Technology, Latvia University of Agriculture, the following studies were performed:

- at the Laboratory of Microbiology – sourdoughs were prepared, microorganisms were cultivated and identified, physical and chemical indices were determined;
- at the Laboratory of Packaging Material Investigations – spontaneous sourdoughs lyophilised;
- at the Laboratory of Food Analysis – moisture in sourdough and bread was determined.

At Latvia University the following studies were performed:

- Institute of Biology – determination of vitamins B1, B2, pantothenic acid and amino acids;
- Institute of Microbiology and Biotechnology – maltose, glucose, fructose, lactic acid, acetic acid and succinic acid were determined;

In Denmark, the Faculty of Nature Sciences of the University of Copenhagen the following studies were performed:

- at Laboratories of the Department of Quality and Technology – sourdoughs were prepared, their physical and chemical parameters were determined;
- at the Microbiology Laboratories of the Department of Food the microbiological and genetical analyses of the sourdoughs were performed.

Materials used in the research

For preparation of spontaneous sourdoughs under the research, the following materials were used: peeled (type 1370) and crude (type 1740) rye flour of variety “Kaupo” and biologically activated rye grains of variety “Voshod” from JSC “Jelgavas Dzirnavas”, rye malt from “Naukšēni” Ltd. and drinking water (according to Cabinet Regulation No 235 of April 29, 2003 “On mandatory harmlessness and quality requirements for drinking water, and the procedures for monitoring and control thereof”) Quality indices of the lyophilised spontaneous sourdoughs were compared with the quality indices of rye bread sourdough „TK-Starter” of the commercial company „BÖCKER”.

Structure of the research

In order to investigate growth dynamics of microorganism populations in sourdoughs, prepared by means of crude and peeled rye flour, and evaluate their suitability for sourdough preparation, the sourdoughs were refreshed every 24 hours, temperature at fermentation was 26°C, 32°C and 28°C, fermentation time – 72 h.

For preparation of spontaneous sourdoughs with addition of malt and flour made from biologically activated rye grains, a three-stage fermentation process was used that in general lasts 48 hours; the sourdough was refreshed two times – by adding a new portion of water and flour (Figure 1).

For preparation of spontaneous sourdoughs raw materials were used as follows:

- in sourdough U – 100% peeled rye flour (type 1370) and drinking water;
- in sourdough M – 80% peeled rye flour (type 1370) and 20% flour made from biologically activated rye grains, and drinking water;
- in sourdough I – 80% peeled rye flour (type 1370) and 20% unfermented rye malt and drinking water.

In order to investigate sourdough fermentation activity in repeated generations, microflora and physical and chemical parameters were determined up to 14 days. Fermentation of two different repeated sourdough generations during 14 days was performed, by using spontaneous sourdoughs U and M.

- Components of the refreshed sourdough U (% from the flour mass): 10% spontaneous sourdough U + 100% peeled rye flour (type 1370) + 80% drinking water (32°C).
- Components of the refreshed sourdough M (% from the flour mass): 10% spontaneous sourdough M + 80% peeled rye flour (type 1370) + 20% flour made from biologically activated rye grains + 80% drinking water (32°C).

The samples were taken before and after every fermentation stage. All the sourdough samples were incubated at temperature 25°C. At every refreshment of sourdough, 10% of the sourdough fermented during the previous stage was used, to which a new portion of flour and water was added. This process was repeated every 24 hours.

Determination of sourdough microflora. Sourdoughs were examined microbiologically, and decimal dilutions were prepared. Test samples were taken in conformity with and decimal dilutions for microbiological examination". Indices were determined as follows:

- Total count of mesophylic aerobic and facultative anaerobic microorganisms in conformity with Standard LVS EN ISO 4833:2003
- Yeasts in conformity with Standard ISO 21257-2:2008
- Lactic acid bacteria (LAB) in conformity with Standard ISO 9332:2003 by using modified MRS media (MMRS), in composition of which there is more peptone (20 g/l) and yeast extract (10 g/l) in comparison with the standard MRS media, and to which the amino acid cysteine was added (1 g/l). The isolated cultures were multiplied by using the media „Lactobacilli MRS broth” (Ref. 14202-24).

For identification of microorganisms selective media were used (MRS – for lactic acid bacteria, malty extract agar medium – for yeasts). Morphological properties of microorganisms were determined (shape, mobility), colouring was performed according to Gram’s method, Catalase test and identification up to species by means of API biochemical test system.

- lactic acid bacteria – 50 CHL;
- Bacillus spp. and species related to its genus – 50 CHB;
- yeasts – ID 32 C.

DNA isolation was performed according to standard method, by using GenElute™ „Bacterial Genomic DNA Kit”.

Polymerase chain reaction was performed by using „Stratagene RoboCycler Gradient 96” in PCR reaction by means of heat-resistant

polymerase the needed DNA fragment (16S rDNA V3 or V1 region) was multiplied for further studies of microbial ecosystem diversity.

Diversity of microbial ecosystems of sourdoughs and changes in fermentation process were investigated by using amplified V3 (LAB) and V1 (for yeasts) regions from 16S ribosomal DNA. Ecosystem of microorganisms was identified by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), using DGGE standard method by means of system „*INGENYphorU-2*”.

Sourdoughs and biomass of isolated cultures were lyophilised by using sublimation drier „*Armfield FT 33*”. Samples were first frozen at -20°C . During sublimation process the samples were frozen at -55°C , duration of sublimation was 48–72 h.

Testing of lyophilised sourdoughs in bread production process. Lyophilised sourdoughs and the commercially available sourdough „*TK-starter*” of the company „*Bocker*” were used for making of rye sourdough for rye bread baking.

Data mathematical processing was performed by the methods of mathematical statistics, using correlation analysis, one factor dispersion analysis and Tukey’s test. The mean values of the results, level of validity of results (p) and standard deviation were calculated by means of „*Microsoft Excel*” program pack (*Arhipova, Bălița, 2003*).

RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION

1. Growth of microflora in spontaneous sourdoughs, prepared from peeled (type 1370) and crude rye flour (type 1740)

The most essential factors in preparation of spontaneous sourdough that influence the microbiological process are the type of flour and the specific microflora in it. Spontaneous sourdough for rye bread production is made both from crude (type 1740) and peeled (type 1370) rye flour. In order to evaluate which of the mentioned flour types contribute in more active sourdough, investigation of flour was performed, determining mesophylic aerobic and facultative anaerobic microorganisms, as well as growth dynamics of lactic acid bacteria and yeasts in fermentation process. According to literature sources, crude, peeled and fine flour differ in their chemical composition. Flour of type 1370 is used in sourdough making due to its high content of carbohydrates, because it provides a nutritive basis for lactic acid bacteria (LAB) and yeasts, at the same time providing optimal fermentation conditions.

Results of experiments show that the initial plate count of TPC in spontaneous sourdoughs made from rye flour of types 1370 and 1740 in three stages was accordingly $4.81 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ and $5.05 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, plate count of LAB - accordingly $4.32 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ and $3.58 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, plate count of yeasts – accordingly $4.55 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ and $4.77 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ (Fig. 2 and 3).

Initially the plate count of TPC was higher than the important microorganisms participating in sourdough preparation, and higher than LAB and yeasts in both sourdoughs, that is an evidence of a high concentration of flour-specific microflora. According to the data in literature (Hui *et al.*, 2004), monosaccharides and disaccharides originate from starch under the influence of activity of α and β amylases, and are actively used by yeasts and LAB in their metabolism.

Results obtained in research show that in the beginning yeasts are multiplying faster, as the chosen temperature at fermentation 26°C is optimal for their growth. At sourdough refreshing, when the substrate environment is changed after 24 hours, to which microorganisms shall adapt, their multiplication intensity decreased.

During the second fermentation stage at temperature 32°C, the plate count of LAB rapidly increased in sourdough that can be explained by optimal conditions for multiplication. At sourdough refreshing after 48 h the plate count of TPC decreased, and both yeasts and LAB continue growing. The explanation could be that under the influence of LAB and yeast metabolites, unfavourable environmental conditions occur for growth of gram-positive *Bacillus* and gram-negative bacteria of genus *Enterobacteriaceae* found in flour.

Evaluating fermentation process up to the 72nd hour, as it is evident from the obtained results (Fig. 2), there was no significant growth of microorganism populations observed after 54 h, probably, a stationary stage in their growth was reached and mature sourdough formed, in which metabolites of microorganisms have accumulated – amino acids, vitamins, organic acids – as well as the desirable microflora – LAB and yeasts have multiplied in the sourdough.

After comparing the plate count of microorganisms in sourdoughs, a conclusion follows that the best indices relating fermentation process were obtained within 48 hours in sourdough made from flour of type 1370 – the plate count of lactic acid bacteria increased from 4.32 log₁₀ cfu·g⁻¹ up to 6.06 log₁₀ cfu·g⁻¹, that is very important, as the metabolites of LAB determine the needed level of acidity in sourdough (Loenner, Preve, 1988). During the initial four fermentation hours microflora that is in flour adapts to new environmental conditions, thus microorganisms are in the lag stage. After the fourth fermentation hour a rapid growth of all identified microorganisms takes place – it is the exponential stage, and until the first refreshment of sourdough, interaction continues among mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms, lactic acid bacteria and yeasts.

According to the obtained data, LAB and yeasts multiply actively after refreshment of the sourdough, simultaneously suppressing the growth of TPC.

The performed microbiological researches on sourdough made from crude (type 1740) flour show that the initial plate count of TPC there is higher than in sourdough made from peeled (type 1370) flour.

After evaluating the growth of microorganism populations in sourdough made from crude (type 1740) flour, a conclusion follows that during fermentation time up to 72 h LAB and yeasts are not sufficiently active to be able to suppress TPC, which contain also gram-negative enterobacteria and gram-positive endospore-forming bacteria found in flour (Fig. 3).

When investigating changes in pH and titrable acidity in 72-hour fermentation process (Fig. 4), a significant correlation was observed in both sourdoughs between increase of the plate count of lactic acid bacteria and changes in the ambient pH (for the type 1370 $r = -0.66$; for the type 1740 $r = -0.50$), and also between increase of the plate count of lactic acid bacteria and changes in the titrable acidity (for the type 1370 $r = 0.79$; for the type 1740 $r = 0.52$). The results of pH and titrable acidity also show an active growth of microorganisms up to the 48th hour of fermentation, when pH decreased to 3.93 (for the type 1370) and 3.94 (for the type 1740) and the titrable acidity increased up to 13.90 (for the type 1370) and 14.10 (for the type 1740).

Indices of the fermentation pH and titrable acidity after the last refreshing of sourdoughs did not differ significantly from those observed after the 48-hour fermentation. Taking it as a basis, peeled (type 1370) rye flour and fermentation time 48 hours were chosen for the further research.

2. Spontaneous sourdoughs with additions of flour made from biologically activated rye grains and malt

In rye bread production technology in bakeries spontaneous sourdough is prepared, as well as spontaneous sourdough with addition of unfermented rye malt. In the course of this research the author has developed a new method of spontaneous sourdough preparation, where unfermented rye malt is substituted by addition of flour made from biologically activated rye grains (Patent LV 13899 A – „Method for preparation of spontaneous rye sourdough”).

In preparation of spontaneous sourdough unfermented malt is used as a biologically valuable and active additive for enhancement of fermentation process to obtain a higher concentration of lactic acid bacteria and yeast cells, and to reach fast the ambient acidity of pH below 4.0 in ready sourdough.

In order to evaluate how the rye malt and the additive of flour made from biologically activated rye grains influence sourdough fermentation, several experiments were performed. Pre-experiment results showed that the optimal amount of the above additives is 20% from the total amount of flour in sourdough.

Dynamics in changes of ambient pH and growth of sourdough microflora during 48-hour fermentation are displayed in Figures 5, 6, 7 and 8. According to research results, the changes of TPC plate count during fermentation process depend on the kind of prepared sourdough (Fig. 5). The

initial plate count of TPC in sourdough M (with addition of flour made from biologically activated rye grains) and sourdough I (with malt) is identical in the margins of error – $5.39 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ and $5.30 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ accordingly. At the end of fermentation process the plate count of TPC in sourdough M was the lowest – $5.05 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ – due to the high activity of lactic acid bacteria (Fig. 6).

Comparing changes in the plate count of TPC in practically used sourdoughs U (without additive – the control sample) and I (with malt), a conclusion is that a rapid growth of TPC during the first stage of fermentation takes place in both sourdoughs, and it starts decreasing only in the sourdough I after the first refreshing,

By the end of fermentation, the highest plate count of TPC was in sourdough U, as after determining the amount of LAB (Fig. 6) and yeasts (Fig. 7) by the end of fermentation a conclusion can be that their activity is not sufficient to outrival mesophylic aerobic and facultative anaerobic microorganisms.

The initial amount of LAB (Fig. 6) in sourdough with flour made from biologically activated grains (M) was $5.42 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, that significantly exceeds the plate count of LAB in sourdough with malt additive (I) and in control sourdough U, in which the initial amount of LAB was accordingly $4.61 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ and $4.45 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$. The explanation is that flour made from biologically activated rye grains contains more biologically active compounds – amino acids, monosaccharides, vitamins –, that have originated during the grain germination process and have contributed in growth of LAB.

When identifying LAB strains within the research by means of methods of molecular biology, six different LAB strains were initially found in sourdough M – *Pediococcus acidilactici* 2147, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646, *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627, *Leuconostoc mesenteroides* 2190 –, and only three – in sourdough U: *L. coryniformis* 1629, *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627. Thus sourdough M contains a wider range of LAB strains, which proves effectiveness of flour made from biologically activated rye grains in the use of sourdough preparation.

During the entire fermentation process the amount of LAB prevails in sourdough M, in comparison to the plate count of LAB in sourdoughs U and I.

The dynamics of yeast growth in sourdoughs show that their plate count in spontaneous sourdough without additions (U) and in sourdough with rye malt addition (I) is less in the beginning of fermentation – $4.39 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ and $4.55 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ accordingly –, in comparison with sourdough with addition of flour made from biologically activated rye grains, where the plate count of yeasts is $5.74 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ (Fig. 7).

During the first stage of fermentation, ie, up to 24 h, the plate count of yeast cells increased rapidly in sourdough U, reaching up to $6.09 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, but decreased in sourdoughs M and I – to $5.58 \log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ and

3.54 log₁₀ cfu·g⁻¹ accordingly. The reason is the pH changes in sourdoughs (Fig. 8) – at the end of the first fermentation stage pH in sourdough M is 3.95 and in sourdough I – 4.57. These pH values are less than the optimal yeast growth pH interval – 5.0–5.6 (Hutkins, 2006).

During the second fermentation stage – from the 25th up to the 48th h – an opposite tendency was observed – the yeast amount increased in sourdoughs M and I, but decreased – in sourdough U. It could be explained that by adding a new portion of peeled flour, the total plate count of bacteria increased as well, with domination of the endospore-forming aerobic bacteria of genus *Bacillus*, metabolites of which can impede yeast growth, because they hydrolyze proteins. After 32 hours of fermentation, the amount of yeasts in sourdough U within the interval of validity (p = 95%) was identical with the plate count of yeasts detected at the beginning of fermentation. After the second refreshing of sourdough the amount of yeasts increased in all sourdoughs, by the end of fermentation reaching up to 5.77, 6.83 and 6.20 log₁₀ cfu·g⁻¹ in sourdoughs U, M, I accordingly.

Research results show a similar growth tendency of LAB and of yeasts (Figures 6 and 7) specifically in sourdough M. The explanation lies in the mutual symbiosis of the heterofermentative LAB species *Lactobacillus plantarum* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* found in this sourdough, which conform to data in literature (Spicher, Stephan, 1999).

Ambiance pH (Fig. 8) at the beginning of fermentation within the interval of validity (p = 95%) is 6.69–6.70 and matches in all samples. During the first stage of fermentation the ambiance pH most rapidly decreased in sourdough M down to pH 3.95, which is an evidence of activity of lactic acid bacteria and yeasts. In the control sample U the decrease of pH values was the least – down to pH 5.40 – therefore it is advisable to use both unfermented malt and flour made from biologically activated rye grains for preparation of spontaneous sourdough.

After evaluating and comparing all the prepared sourdoughs – U, M and I – in respect of microbiological quality and activity, a conclusion follows that the best results were obtained by adding flour made from biologically activated rye grains to sourdough M. After 48h of fermentation in sourdough M were detected:

- the least plate count of TPC – 5.05 log₁₀ cfu·g⁻¹;
- the highest amount of lactic acid bacteria – 6.94 log₁₀ cfu·g⁻¹;
- the widest range of LAB – *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627, *L. curvatus* ssp. *curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646 –, in comparison to sourdough U;
- the highest plate count of yeasts – 6.83 log₁₀ cfu·g⁻¹;
- the lowest ambiance pH – 3.93;
- the highest titrable acidity – 13.6 (ml 0.1 n NaOH).

Therefore the author has chosen two spontaneous sourdoughs for further studies: the control sourdough U without additive and the sourdough M with addition of flour made from biologically activated rye grains – 20% of the total amount of flour in sourdough.

Researches reflected in literature sources show that homofermentative and heterofermentative LAB in spontaneous rye bread sourdoughs mainly use monosaccharides and disaccharides in metabolic processes (Reed, Nagodawithana, 1995).

In sourdoughs U and M chosen for research of fermentation process, changes in the content of carbohydrates – glucose, fructose and maltose –, and of organic acids – lactic and acetic acids– during fermentation were determined, as well as connection of these changes with pH and the titrable acidity. The content of amino acids and vitamins was also determined in the sourdoughs.

Content of maltose after the first refreshing (fermentation stage 2) increased from 17.64 up to 23.04 mg·g⁻¹ (Fig. 10) in sourdough M and from 14.15 up to 17.27 mg·g⁻¹ in sourdough U (Fig. 9).

The greatest changes in the content of glucose in sourdoughs U and M were observed after the first refreshing until the end of fermentation, when the content of glucose increased from 8.02 up to 20.09 mg·g⁻¹ in sourdough U and from 10.64 up to 25.72 mg·g⁻¹ in sourdough M (Fig. 9 and 10). A higher content of glucose in sourdough M is explained by activity of α and β amylases that hydrolyse starch (Hui *et al.*, 2004).

Concentration of fructose most of all increased during the 3rd stage of sourdough fermentation (Fig. 9 and 10). Like the data of pH and titrable acidity, the carbohydrate indices also show higher metabolic activity during the 2nd and the 3rd fermentation stages in both sourdoughs.

The results obtained in the research (Fig. 9 and 10) prove significance of the three-stage technology in sourdough preparation, as by refreshing the spontaneous sourdough, a sufficient amount of monosaccharides and disaccharides is provided that is necessary for active metabolism of lactic acid bacteria and yeasts. Lactic acid bacteria and yeasts use the above mentioned carbohydrates as energy sources for their metabolic processes, as well as for production of organic acids.

The content of organic acids has a significant role in formation of rye bread taste and aroma. As stated in scientific literature, the molar proportion between lactic and acetic acid – fermentation quotient (FQ) is used to characterise relationship of the acids found in the sourdough. In order to obtain bread with balanced flavour properties, the numerical value of FQ shall be 4. If acetic acid is not produced sufficiently, the FQ is too high, but the taste of the

product – insipid. If the FQ is too low (too much acetic acid), the bread taste is exceedingly pronounced and sour (Spicher, Stephan, 1999).

Study results show that molar proportion of lactic and acetic acid – the fermentation coefficient (FQ) – is 3.2 in sourdough U after 48 h, and 4.5 in sourdough M, which proves conformity of sourdough M to qualitative sourdough requirements.

Data of analysis on the changes of organic acids during fermentation stages of sourdoughs (Fig. 11 and 12) reveal that tendency of changes in their content is identical with results of changes in carbohydrates (Fig. 9, 10). Content of lactic acid in sourdough U during the first fermentation stage (up to 24 h) changed from 0 to $0.37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (Fig. 11), but in sourdough M it changed significantly – from 0 to $3.05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (Fig. 12). During the 2nd and the 3rd fermentation stages concentration of lactic and acetic acids increased significantly both in sourdough U and M.

Lactic acid bacteria strains in sourdoughs determine intensity of organic acid formation. During the second fermentation stage the range of identified LAB strains in sourdoughs U and M differ – in sourdough U the strains *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646 dominate, but in sourdough M – *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646. According to data in literature, *L. plantarum* actively ferments glucose and homofermentatively produces lactic acid, therefore in sourdough M the content of lactic acid increased more rapidly than in sourdough U.

During fermentation the content of acetic acid increased more rapidly in sourdough U – from 0.17 up to $1.38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ – than in sourdough M, where it increased from 0.16 up to $1.04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. It could be explained by the presence of heterofermentative strain of LAB *L. coryniformis* identified in sourdough U, which according to the data in literature apart from lactic acid actively produce also acetic acid. In both sourdoughs a significant correlation was detected between the content of the most important metabolites – lactic acid and acetic acid – in sourdoughs and the changes of ambient pH (Fig. 8). LAB found in spontaneous sourdoughs have also proteolytic features that cause protein hydrolysis and formation of amino acids (Salovaara, 2004).

Results on the changes in content of amino acids in sourdoughs U and M show high content of glycine in both sourdoughs, but in sourdough M it remains unchangeable during fermentation (Fig. 13). The total tendency of changes in the content of amino acids is as follows: during fermentation the content of amino acids increased in sourdough M, but decreased in sourdough U. Most of all – for 1.3 times – increased the content of leucine in sourdough M. Significantly increased also the content of arginine, tyrosine and isoleucine.

LAB found in sourdough M more actively use amino acids for constructive metabolism in order to renew the cell structure elements – cell

membrane, cytoplasmic membrane – and to activate processes in ribosomes and mesosomes (*Spicher, Stephan, 1993*).

In order to determine biologically active compounds also in other spontaneous sourdoughs U and M, the content of vitamins was determined in them.

After evaluating changes in the content of vitamins in sourdough U during fermentation process, the obtained data show that the content of vitamin E has increased for 1.9 times, B1 – for 2 times, B2 – for 2.2 times and pantothenic acid – for 1.37 times (Fig. 14). In sourdough M the content of vitamin B2, pantothenic acid and vitamin E has increased accordingly for 2.15, 1.5 and 1.8 times. The content of vitamin B1 within the interval of validity ($p = 95\%$) remains unchangeable. According to data in literature (*Казakov, Картиленко, 2005*), vitamin B1 is in the composition of pyruvate decarboxylase and is used for synthesis of this ferment.

Also the determined content of vitamins in sourdoughs shows that metabolic products of lactic acid bacteria and yeasts have accumulated in the substrate during fermentation.

3. Potential of spontaneous sourdough application in repeated generations

When applying the method of spontaneous rye sourdough preparation in bread production, one part of the ready sourdough (matured sourdough) is used for dough preparation, but another part is left as „mother dough”. Essentially important is activity of the matured sourdough so that it could be used in repeated generations.

In order to investigate fermentation activity of sourdoughs U and M in repeated generations, determination of microflora and physical and chemical indices was performed within the time of 14 days.

As the obtained data show, the plate count of LAB in sourdough M based on the sourdough with flour made from biologically activated rye grains, exceeds the plate count of LAB in sourdough U in all generations. Moreover, a more stable growth dynamics of LAB up to the 10th generation was observed specifically in sourdough M that is an evidence of microflora of a better adaptability in the sourdough. The plate count of LAB in sourdough M reached its maximum at the 10th generation – 8.34 log cfu·g⁻¹. As it follows from the results, the spontaneous sourdoughs are advisable to use until the 10th generation, because after that the plate count of LAB starts decreasing (Fig. 15). Identifying the LAB strains in sourdough M, the conclusion is that initially there dominate *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627, but in sourdough U – *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. coryniformis* 1629.

Using sourdoughs in repeated generations, the range of strains found in them is changeable. It should be mentioned that in the 6th generation of sourdough M no *L. plantarum* 1369 that actively produce lactic acid was detected, and LAB association in sourdough M is identical to the one detected in sourdough U – it includes *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus* ssp. *curvatus* 2207. When continue using sourdough in repeated generations, a new LAB strain *Pediococcus pentoseceous* 2147 emerges in the 10th generation which dominates in sourdough M until the 13th generation.

There were made parallel researches on changes of the titrable acidity and the pH in repeated sourdough generations, and these results are shown in Figures 16 and 17.

Titrable acidity in sourdough has a significant correlation with the LAB growth dynamics (Fig. 15) – correlation coefficient between the mentioned indices in sourdough U - $r = 0.57$ and in sourdough M - $r = 0.60$.

As displayed in Figure 16, the highest values of titrable acidity in sourdough M were obtained in the 10th generation (15.20), but in sourdough U – in the 11th generation (13.55), but the titrable acidity decreased in further repeated generations. It is an evidence of the interaction between LAB populations in sourdoughs and of the decrease in activity of the identified LAB strains.

Changes of pH in sourdoughs during fermentation are not pronounced in comparison to changes of LAB and titrable acidity. Up to the 10th generation pH value in sourdough U decreased from 3.74 to 3.62, but in sourdough M – from 3.73 to 3.54. After the 10th generation pH values of both sourdoughs increased. Changes in the ambient pH indices also correlate with changes in the plate count of LAB; in sourdough U $r = -0.47$, and in sourdough M -0.39 (Fig. 18).

4. Identification of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneous rye bread sourdoughs and repeated sourdough generations

One of the tasks of the doctoral thesis is to approbate methods of molecular biology for identification of sourdough microbial system. Identification of lactic acid bacteria was performed by using two DNA extraction methods:

- DNA extracted directly from sourdoughs U and M;
- DNA extracted from LAB colony forming units grown on the selective media MRS and MMRS from sourdough U and M inoculations (both selective media were used in order to evaluate which of them is more suitable for obtaining a wider range of LAB).

Before introduction of the samples of spontaneous sourdoughs or their repeated generations in the polyacrylamide gel, it was necessary to chose

standard cultures by making markers Mix 1 and Mix 2 for identification of LAB strains (Fig. 18 and Table 2). In conformity with data in literature (Ehrmann, Vogel, 2005; De Vuyst *et al.*, 2009), lactic acid bacteria strains frequently found in European bread sourdoughs were used for research. After DNA extraction, amplification of region V3 of genus 16S rDNA, method of electrophoresis DGGE was used. The results show that in gel the regions V3 of genus 16S rDNA of two LAB strains – *L. paracasei ssp. paracasei* 1635 and *L. zeve* 1639 – overlap (Fig. 18 and 2). Location of the sample cultures in marker is shown in Table 2.

In order to obtain a maximum range of lactic acid bacteria which could be identified by DGGE method and observed in polyacrylamide gel, it was necessary to use an optimal medium for LAB cultivation. Enumeration of the plate count of lactic acid bacteria was used as an additional indicator for media selection. Two selective media were chosen for the research: MRS and the modified MRS medium (MMRS).

The results of pre-experiments determining the plate count of LAB colony forming units in both media revealed no significant difference in the plate count of LAB growing in them. As a raw material for DNA extraction LAB suspensions were prepared from LAB colonies grown in MRS and MMRS media. By using PCR and DGGE methods it was found that in MMRS agar medium a wider range of LAB species had grown than in MRS medium. In MRS medium after 24-h fermentation both in sourdough U and sourdough M a wider range of identified LAB was in the samples in which DNA had been extracted directly from sourdoughs. In sourdough U three LAB strains were identified – *L. plantarum* 1369, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207 and one unidentified –, but in MMRS medium – seven LAB strains: *L. plantarum* 1369, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. paracasei ssp. paracasei* 1635, *L. zeve* 1639 and three unidentified. Therefore the MMRS medium was chosen for further experiments.

Fermentation of spontaneous sourdough (U) and spontaneous sourdough with addition of flour made from biologically activated rye grains (M) and changes in microbial ecosystem during fermentation are displayed in Figure 19.

Research results show that in samples where DNA was extracted directly from sourdoughs, there is a considerably wider range of lactic acid bacteria in comparison to samples where DNA was extracted from sourdough LAB colonies growing on MMRS media. It means that not all LAB strains found in sourdoughs can grow in the selective MMRS medium.

Comparing the raw materials of spontaneous sourdough (U) and sourdough with addition of 20% of flour made from biologically activated rye grains (M) a conclusion follows that a wider range of LAB strains is found in the raw material of sourdough M.

It is necessary to note that apart from DNA extraction method, in sourdough M dominated the strain *L. plantarum* 1369 which actively produces

lactic acid having a significant role in formation of rye bread taste and aroma. This is confirmed also by data on the content of lactic acid in sourdoughs (Fig. 11 and 12), according to which the content of lactic acid in sourdough M is considerably higher than in sourdough U. There is information in scientific literature that these microorganisms contain an antimicrobial protein lactoline that is similar to nisin, which inhibits *Staphylococcus aureus*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Pediococcus damnosus*. *L. plantarum* contains also plantaricin A, which inhibits growth of *P. pentosaceus* and *Leuconostoc paramesenteroides* (Davidson, Hoover, 1993).

Probably, due to its characteristic antimicrobial activity this species dominates in all the sourdough M preparation stages.

Analogue researches have been performed identifying yeasts; for their PCR analyses a different fragment (V1) of genus 16S rRNA is used, therefore analyses with yeasts shall be made separately. *Saccharomyces cerevisiae* 50 was chosen as a sample culture. In all spontaneous sourdough samples (both in U and M) one strain was identified - *Saccharomyces cerevisiae* 50. Yeasts found in sourdoughs form a symbiosis with LAB, thus facilitating fermentation process. The obtained results match with scientific considerations on identification of yeast species in rye bread sourdoughs (Hutkins, 2006; Salminen, 2004).

Identification by using API tests. Identification of LAB and yeasts were performed also by using another identification method – API test identification system which is based on biochemical reactions of microorganisms. By means of API test strip API CHL 50 the following LAB species were identified: *Lactobacillus coprophilus*, *Lactobacillus delbureckii*, *Pediococcus damnosus*. By using the strip ID 32 C, yeast species *Saccharomyces cerevisiae* was identified (Appendix 13–16).

As mentioned before, sourdoughs U and M were used in repeated generations, and it was essentially important to identify and evaluate strains dominating in LAB populations and understand their interaction. Pictures of electrophoresis DGGE of sourdoughs U and M with „traces” of the identified bacteria in gels are shown in Figure 20.

After determining the dominating LAB strains in samples of sourdoughs U and M repeated generations, where DNA was extracted directly from the sourdough samples, a conclusion is that up to the 5th generation *L. delbureckii* 1646, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. coryniformis* 1629 dominates in sourdough U. In the 6th generation *L. coryniformis* 1629 cease to dominate in sourdough U, and this probably has a negative influence on dough fermentation ability. However, *L. coryniformis* 1629 starts dominating in sourdough in the 11th generation, and this proves a lowered quality of sourdough U and antagonism among the LAB strains found in sourdough from the 6th to 10th generations.

In sourdough M, *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627 dominate up to the 10th generation. It is important to note that in sourdough M dominates *L. plantarum* 1369, which dominates also during the three-stage spontaneous sourdough fermentation, thus demonstrating its strength and adaptation ability. In the 10th generation *L. plantarum* 1369 is substituted by *Pediococcus pentoseceus* 2147. There is information in literature sources about the inhibiting influence of *P. pentosaceus* on *L. plantarum*, however, it is not explained by influence of acids produced by *P. pentosaceus*, because *L. plantarum* is a remarkably acid-resistant species. The inhibiting effect is explained by the fact that *P. pentosaceus* contains thermoresistant bacteriocin pediocin A that inhibits also the growth of other gram-positive microorganisms, for example, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus faecalis* and *Bacillus cereus*, but pediocin A does not influence the growth of gram-negative bacteria and yeasts (Davidson, Hoover, 1993).

The obtained results show that in repeated generations of sourdoughs M and U solidly dominate *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus ssp. curvatus* 2207, however, in sourdough M strong strains of *L. plantarum* 1369 and *Pediococcus pentoseceus* 2147 dominate that probably ensure advantage of the sourdough M and a higher content of produced metabolites in comparison to sourdough U.

In repeated generations of sourdough M interaction of LAB strains is evident, moreover, they have pronounced antimicrobial properties that help suppress the by-microflora characteristic to flour.

Research on populations of microorganisms, especially of LAB, their growth and variety of strains in rye bread sourdoughs is important, because metabolites produced by them determine rye bread aroma and taste properties.

5. Development of lyophilised spontaneous sourdoughs and its quality evaluation

Previous studies show that mature or mother sponge maintains high activity in 10 generations, but bread producers need sourdough of unchangeable quality. Some bread production enterprises in Latvia export ready-to-use sourdough starters: from Germany, Denmark and Russia. Enterprises of these countries produce frozen sourdoughs with storage time in freezing camera up to 6 months, and lyophilised starters.

As such sourdoughs are not produced in Latvia, one of the tasks of the research was to develop lyophilised spontaneous sourdoughs starters, evaluate their quality and compare with commercially available starters. In laboratory conditions lyophilisation of spontaneous sourdoughs U and M was performed and their quality parameters determined (Table 3).

Activity of the obtained lyophilised sourdoughs was examined by preparing different sourdough samples, to which lyophilised sourdoughs were

added in the amount of 3%, 5% and 10% of flour (Kunkulberga et al., 2008). Pre-experiments show that addition of lyophilised sourdoughs up to 10% provided no desirable results, as the sourdough titrable acidity did not exceed 9. In order to enhance activity of lyophilised sourdoughs, LAB cultures *L. plantarum* and *P. pentosaceus* isolated from sourdoughs were added. *L. plantarum* (Fig. 21) was chosen from the range of identified LAB, because it was a dominating and durable LAB species during all three stages of spontaneous sourdough preparation in sourdough M, moreover, *L. plantarum* and *P. pentosaceus* dominated in sourdough M repeated generations (Fig. 21). After multiplication of the isolated cultures their biomass was lyophilised, thus obtaining dry products with high content of LAB – $1.51 \cdot 10^{10}$ cfu·g⁻¹ (*L. plantarum*) and $8.49 \cdot 10^{10}$ cfu·g⁻¹ (*P. pentosaceus*), which were added to sourdough M in amount of 0.1% (Table 3).

As shown in Table 4, after activating the lyophilised sourdoughs and their use in dough fermentation (starter was added in the amount of 5%), the best parameters were obtained with lyophilised sourdough M, to which LAB isolated cultures had been added, – dough acidity pH is 3.85 and titrable acidity – 12.0. These results exceed data mentioned in literature (Kunkulberga, Segliņš, 2010) and parameters of the practically used starter „TK-starter”.

The pH and titrable acidity of bread made with sourdough M and isolated cultures is identical with bread prepared with the starter „TK-starter”, so the conclusion is that the new developed lyophilised sourdough starter can substitute the commercially available one (Table 4).

CONCLUSIONS

1. For the first time in Latvia studies on development of microbial populations in spontaneous rye bread sourdoughs have been performed.
2. The best microbiological parameters relating fermentation process were obtained in sourdough made from peeled (type 1370) rye flour, because of higher intensity of interaction between microorganism populations – plate count of yeasts and lactic acid bacteria was growing rapidly thus suppressing multiplication of microorganisms of genus *Bacillus* and *Enterobacteraceae*. Moreover 48-hour fermentation time was enough to form a stable microbial system.
3. Spontaneous sourdough with addition of flour made from biologically activated rye grains is more suitable for dough preparation in the matter of microbial quality in comparison to sourdough without additive and sourdough with malt additive, because the plate count of lactic acid bacteria and yeasts is the highest in it – $7.94 \log_{10}$ cfu·g⁻¹ and $6.83 \log_{10}$ cfu·g⁻¹ – accordingly, but the plate count of mesophilic aerobic and facultative anaerobic

microorganisms and pH value – the lowest – 5.05 log₁₀ cfu·g⁻¹ and pH 3.93 accordingly.

4. During the 2nd and the 3rd stages of fermentation process *L. plantarum* 1369 dominantes in sourdough with addition of flour made from biologically activated rye grains, which homofermentatively produces lactic acid from glucose, therefore the content of lactic acid increased more rapidly in this sourdough than in sourdough without additive, and fermentation coefficient in 4.5 and 3.2 accordingly.
5. In repeated generations of sourdoughs a more stable growth dynamics of lactic acid bacteria up to the 10th generation was observed specifically in sourdough M that is an evidence of microflora of a better adaptability. After the 10th generation activity of sourdoughs decreased.
6. Results of investigation the sourdough microbial ecosystem by means of DGGE method show that in samples where DNA was extracted directly from sourdoughs, there is a considerably wider range of lactic acid bacteria in comparison to samples where DNA was extracted from sourdough colonies growing on MMRS media. It means that not all lactic acid bacteria strains found in sourdoughs can grow in the selective MMRS medium.
7. By the end of three-stage fermentation process three lactic acid bacteria strains were identified in sourdough without additive – *L. coryniformis* 1629, *L. curvatus* ssp. *curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646 –, but in sourdough with addition of flour made from biologically activated rye grains – four lactic acid bacteria strains – *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627, *L. curvatus* ssp. *curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646 –, which ensure higher quality parameters in sourdough. In the both samples of spontaneous sourdoughs there was identified one – *Saccharomyces cerevisiae* 50 – strain.
8. In repeated generations of sourdoughs solidly dominate *L. delbrueckii* 1646, *L. curvatus* ssp. *curvatus* 2207, however, in sourdough with addition of flour made from biologically activated rye grains strains of *L. plantarum* 1369 and *Pediococcus pentoseceus* 2147 dominate, which ensure its advantage and a higher content of produced metabolites in comparison to sourdough without additive.
9. The developed lyophilised starter, based on spontaneous sourdough that is made from rye flour of type 1370 by adding 20% flour made from biologically activated rye grains and isolated cultures of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* in the amount of 0.1%, can substitute the commercial starter.
10. Hypothesis of research study has been proven that activity of spontaneous rye bread sourdough is enhanced by adding flour from biologically activated rye grains and lactic acid bacteria isolated cultures.