



Spontāno rudzu maizes ieraugu ķīmisko un mikrobioloģisko rādītāju izmaiņas fermentācijas laikā

Changes in the Chemical and Microbiological Properties of Spontaneous Rye Sourdough during Fermentation

Emīls Kozlinskis, Līga Skudra, Tatjana Rakčejeva, Daiga Kunkulberga

LLU Pārtikas tehnoloģijas katedra
Department of Food technology, LLU
e-mail: Emils.Kozlinskis@gmail.com

Abstract. In traditional rye bread baking in Latvia, a spontaneous sourdough starter is used which microflora is determined in flour and in microorganism cultures in the external environment. The aim of this research was to analyze the chemical and microbiological parameters of spontaneous sourdough starters that were prepared using two types of flour – 100% medium extraction (ash content – 1.45%) rye flour (starter U), and 80% medium extraction rye flour with addition of 20% of biological enzyme-rich rye flour (starter M). Total titratable acidity (TTA) and pH were measured in each preparation step. Organic acids and reduced sugars were determined using HPLC (Agilent 1100). Amino acids as well as vitamins E, B1, B2, and B5 were determined in all samples. DNA was extracted directly from starter samples or from washed cells plated on MRS media. Microbial diversity of lactic acid bacteria (LAB) species was investigated using amplified V3 regions of 16S rDNA gene from the sourdough DNA. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used for community fingerprinting. Both sourdough starters (U and M) showed acceptable final pH and TTA values after a 48-hour fermentation (pH 4.05 and 4.11, and TTA – 13 and 12.6 respectively) representing active metabolism of LAB, and contained acceptable amounts of lactic acid bacteria – 7.24 and 7.62 log₁₀ CFU g⁻¹ respectively. Both spontaneous starter samples contained biologically active compounds which benefit the technological process of rye bread making. This is the first study to gain insight into the microflora of a spontaneous starter made in Latvian bread industry by using genetic methods.

Key words: spontaneous rye sourdough, fermentation, lactic acid bacteria.

Ievads

Pēdējo gadu desmitu laikā daudzās Eiropas valstīs pastiprinājusies interese par maizi, kas gatavota ar ieraugu (Spicher, Stephan, 1999). Aizvien vairāk patērētāju dod priekšroku veselīgai maizei ar aromātisku garšu, labu struktūru un ilgu glabāšanas laiku bez konservantiem. Palielinās arī pieprasījums pēc ekoloģiski tīras pārtikas, bioloģiskās saimniecībās audzētiem graudaugiem un no tiem ražotas maizes. Jāatzīmē, ka patērētāji uzturā vairāk izvēlas maizi, kuras ražošanas tehnoloģiskajā procesā tiek lietots ieraugs, kas uzlabo maizes kvalitāti un garšas īpašības (Hui, Meunier-Goddik et al., 2004).

Maizes gatavošanas procesā notiekošā fermentācija, proti, mīklas rūgšana, atšķiras no citu pārtikas produktu fermentācijām – tās mērķis nav paildzināt izejmateriālu uzglabāšanas laiku (kā,

piemēram, produktu skābējot), bet pārvērst graudaugu produktus funkcionālākās un vieglāk izmantojamās formās.

Ieraugs ir miltu un ūdens maisījums, kurā pienskābo rūgšanu izraisa pienskābes baktērijas (PB). Ierauga sastāvā ir arī raugi, kuri ir nozīmīgi mīklas raudzēšanas kapacitātes nodrošināšanai. Lai gan oficiāla ierauga definīcija neeksistē, tā noteikti iekļauj visdažādāko veidu ieraugu produktus ar dzīvām PB. Pēc literatūrā publicētiem datiem (Loenner, Preve, 1988), ierauga sastāvā jābūt 5·10⁸ kvv g⁻¹ metaboliski aktīvu PB gramā, un tā pH jābūt mazākam par 4.5.

Vairums kviešu un rudzu maizes gatavošanā izmantoto ieraugu vēl joprojām tiek gatavoti, izmantojot nobriedušā ierauga porciju (mātes ieraugu), taču pastāv tendence izmantot definētas PB un raugu tīrkultūru asociācijas ar specifisku fermentācijas modeli vai spēju ražot antimikrobiālus savienojumus.

PB un raugu tīrkultūru asociācijām kļūstot komerciāli pieejamām, arī šī tendence kļuva izteiktāka.

Rudzu maizes ražošanā, lai uzsāktu fermentāciju, ceptuves izmanto gan pašu adaptētos ieraugus, gan pievieno komerciālās PB un raugu tīrkultūru asociācijas. Vairums Vācijas un Dānijas ceptuvju mīklai regulāri pievieno komerciālo ieraugu ar adaptētu mikrofloru, kas izdalīta no spontānajiem ieraugiem. Komerciālie ieraugi ir, piemēram, "Sanfrancisko sour" kviešu maizes gatavošanai un "Bocker-Reinzucht-Sauer" rudzu maizes gatavošanai (Hui, Meunier-Goddik et al., 2004).

Noturīgs un mikrobioloģiski stabils ieraugs ir pamats augstas kvalitātes maizes ražošanai. Ierauga fermentācijas kapacitāti nosaka tā mikroflora (PB un raugi), miltu tips (kviešu/rudzu, miltu izmaluma pakāpe, enzīmu aktivitāte), miltu/ūdens attiecība (mīklas iznākums) un tehnoloģiskā procesa parametri. Pie pēdējiem pieskaitāmi temperatūra, sākotnējais pH, pievienotā spontānā ierauga apjoms, „mātes ierauga” vai tīrkultūru asociācijas apjoms, fermentācijas laiks un ražošanas veids (cepiens/nepārtraukts). Visiem minētajiem procesa parametriem jābūt kontrolētiem (Hui, Meunier-Goddik et al., 2004).

Ieraugs tiek raksturots pēc ķīmiskajiem parametriem (titrējamā skābuma, pienskābes un etiķskābes satura), kā arī pēc tādiem mikrobiālajiem parametriem kā PB un raugu sugu kvalitatīvie un kvantitatīvie rādītāji (Hui, Meunier-Goddik et al., 2004).

Vairumā nobriedušu rudzu un kviešu ieraugu beigu pH ir 3.5–3.8 (Lund, Hansen, Lewis, 1989). Dažādu ieraugu pH rādītāji variē un atšķiras mazāk nekā titrējamā skābuma vērtības. Titrējamais skābums un pH ieraugā atkarīgs no fermentācijas temperatūras, miltu izmaluma pakāpes, kā arī no ūdens un miltu attiecības. Rudzu ieraugi parasti tiek gatavoti no augstākas maluma pakāpes miltiem nekā kviešu ieraugi, un titrējamā skābuma vērtības ir robežās no 15 līdz 26 (Spicher, Stephan, 1999).

Pienskābes un etiķskābes saturs ieraugā ir ļoti svarīgs maizes specifiskās garšas un aromāta nodrošināšanai (Hansen, Lund, Lewis, 1989). Ierauga skābju attiecības raksturošanai Vācijas pētnieki izmanto molāro attiecību starp pienskābi un etiķskābi – fermentācijas koeficientu (FK). Lai iegūtu 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 ir neizteikta. Savukārt zema FK gadījumā (pārāk daudz etiķskābes) maizes garša ir pārāk izteikta un skāba (Spicher, Stephan,

1999). Tomēr etiķskābei, salīdzinot ar pienskābi, piemīt lielāks antimikrobiālais efekts pret pelējumu un aerobo endosporu veidojošo *Bacillus subtilis*, kura izraisa maizes mikrobiālo bojāšanos.

No visām fermentēto pārtikas produktu sistēmām tieši ierauga fermentācijā visnozīmīgākās ir heterofermentatīvās PB. *Lactobacillus sanfranciscensis* ir dominējošā suga gan rudzu, gan kviešu ieraugos. Arī *L. brevis* un *L. plantarum* bieži tiek konstatētas Krievijas, Vācijas, Austrijas un Zviedrijas ieraugos. Savukārt Vācijas, Austrijas, Somijas, Zviedrijas, Dānijas un Krievijas rudzu maizes ieraugos atrastas arī homofermentatīvās PB sugas – *L. acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. leichmanii*, *L. mindensis*, un heterofermentatīvās – *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. buchnerii*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. fructivorans*, *L. fermentum*, *L. viridensis*, kā arī nesen atklātās *L. panis* un *L. frumenti*. Vācijas ieraugos ciešā asociācijā ar *L. sanfranciscensis* atrodama arī nesen atklātā *L. pontis*.

Mazāka *Lactobacillus* ģints daudzveidība novērota kviešu ieraugos, kur identificētas *L. alimentarius*, *L. casei*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. lactis* un nesen atrasta arī *L. paralimentarius*. Turklāt no kviešu ieraugiem izolētas arī homofermentatīvās *Pediococcus* un *Weissella*, kā arī heterofermentatīvās *Leuconostoc* ģints baktērijas.

Ierauga mikroflora ir atkarīga no fermentācijas apstākļiem – miltu tipa, maluma pakāpes, ūdens attiecības, fermentācijas temperatūras, fermentācijas laika un ierauga atjaunošanas tehnoloģijas. Vairums ieraugu tiek fermentēti 30 °C temperatūrā, bet *L. delbrueckii* tiek izolēts no rudzu ierauga, kas fermentēts 50 °C temperatūrā (Spicher, Lonner, 1985). W.P. Hammes, P. Stolz un M.G. Ganzle (1996) atklājuši, ka dominējošās PB sugas biezos ieraugos ar fermentācijas temperatūru 23–30 °C ir *L. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. fructivorans*, *L. fermentum* un *L. brevis*.

Dažiem industriālajiem ieraugiem raksturīgs augsts ūdens saturs – tie ir šķidri un tādējādi vieglāk izmantojami tehnoloģiskajās līnijās, tiem raksturīga paaugstināta fermentācijas temperatūra (>30 °C) un īsāks fermentācijas laiks (15–20 h). Šķidros ieraugus iespējams ražot lielos daudzumos, bieži izmantojot nepārtrauktās fermentācijas sistēmas, un atdzesēt uzglabāšanai rezervuāros līdz septiņām dienām. Šāda tipa ieraugos dominē *L. panis* (Wiese, Strohmair et al., 1996), *L. reuteri*, *L. sanfranciscensis* un *L. pontis* (Hammes, Stolz, Ganzle, 1996). Šķidros ieraugos

vāji vairojas miltos esošās raugu sugas, tādēļ mīklai bieži pievieno maizes raugu (Hui, Meunier-Goddik et al., 2004).

Ja ieraugu uzglabā istabas temperatūrā, tajā turpinās fermentācijas process. PB ir jutīgas pret zemu vides pH ilgākā laika periodā, tādēļ tās var kļūt neaktīvas un pat aiziet bojā. Tādēļ, izvēloties komerciālo ieraugu, tiek dota priekšroka liofilizētiem ieraugiem. Tomēr PB ir jutīgas pret liofilizēšanu, tādēļ komerciālajos kaltētajos ieraugos esošajām PB jābūt izturīgām pret šo apstrādes veidu. No liofilizētiem komerciālajiem ieraugiem ir izolētas *L. plantarum*, *L. brevis* un *Pediococcus pentosaceus*. Tikai nesen ir pieejami komerciālie liofilizētie ieraugi, kas satur *L. sanfranciscensis* (Hammes, Stolz, Ganzle, 1996).

Ierauga mikrofloras identificēšana

Bieži vien daudzas PB nav iespējams identificēt ar tradicionālām metodēm, kas var radīt kļūdas to klasificēšanā. Dažas sugas uz laboratorijas barotnēm aug ļoti slikti, tādēļ tās ir grūti izolēt un identificēt. Ātrai klasificēšanai izveidots molekulāru zondēšanas metožu komplekts, kas ietver hibridizāciju un uz PCR (polimerāzes ķēdes reakcija) balstītas metodes, kā arī specifisku sekvenču atpazīšanu ribosomālajos gēnos (Vogel, Muller et al., 1996). Tomēr sugu līmenī šī zondēšana var būt ierobežota, jo tās var zaudēt savu specifiskumu, kad tiek atklātas jaunas sugas ar identiskām RNS sekvenču daļām. Kā alternatīvu var izmantot taksonomisko metodi RAPD (nejauši amplificēta polimorfa DNS), ar kuras palīdzību iespējams konstatēt paraugu bioloģisko daudzveidību celmu līmenī un rezultātā iegūto elektroforētisko modeli sakārtot klāsteros un salīdzināt ar datubāzi (Vogel, Knorr et al., 1999). Konsekventa 16S rRNS sekvenču analīzes pielietošana un DNS-DNS hibridizācijas eksperimenti ir palīdzējuši identificēt daudzas jaunas sugas. No rudzu ieraugiem izolētas *L. pontis* un *L. panis* (Vogel, Bocker et al., 1994), kā arī pēdējā laikā – *L. frumenti* un *L. mindensis* (Ehrmann, Vogel, 2005).

Viena no labākajām bakteriālo izolātu identificēšanas metodēm ir dažādu, ar PCR amplificētu (pavairotu), 16S rRNS reģionu sekvenēšana un salīdzinošā sekvenču analīze ar jau eksistējošām sekvenčām, kas organizētas datu bāzēs, piemēram, ARB vai BLAST (Müller, Wolfrum et al., 2001).

16S rRNS sekvenču datu salīdzinošā analīze atklāj trīs filoģenētiski atšķirīgus „ierauga PB” klāsterus. Pirmais klāsteris (*L. delbrueckii* grupa) iekļauj *L.*

delbrueckii un 11 citas obligāti homofermentatīvas sugas. Otrais klāsteris (*L. casei*/*Pediococcus* grupa) iekļauj 32 *Lactobacillus* sugas (ieskaitot *L. alimentarius*) un piecas *Pediococcus* sugas. Trešais klāsteris (*Leuconostoc paramesenteroides* grupa) iekļauj heterofermentatīvās *Weissella* baktērijas. 16S rRNS *Lactobacillus* ģints grupas neatbilst līdz šim pieņemtajam iedalījumam apakšģintīs *Thermobacterium*, *Streptobacterium* un *Betabacterium*, kā arī trim grupām pēc fizioloģiskā iedalījuma – obligāti homofermentatīvās, fakultatīvi homofermentatīvās un heterofermentatīvās PB (Collins, Rodrigues et al., 1991).

Viena no galvenajām molekulārās pieejas priekšrocībām ir iespēja novērtēt PB klātbūtni, attīstību un dzīvotspēju ieraugā bez mikroorganismu kultivēšanas. Ribosomālo DNS amplikonu denaturācijas vai temperatūras gradienta gēla elektroforēze (attiecīgi DGGE vai TGGE) ir labi piemērota metode kompleksas ekosistēmas dalībnieku un to aktivitātes novērtēšanai laika vienībā (Ehrmann, Vogel, 2005).

Pētījuma mērķis ir izvērtēt fizikāli ķīmiskos un mikrobioloģiskos rādītājus spontānajos rudzu ieraugos, kas gatavoti, izmantojot rudzu skrotētos un bioloģiski aktivētus rudzu graudu miltus.

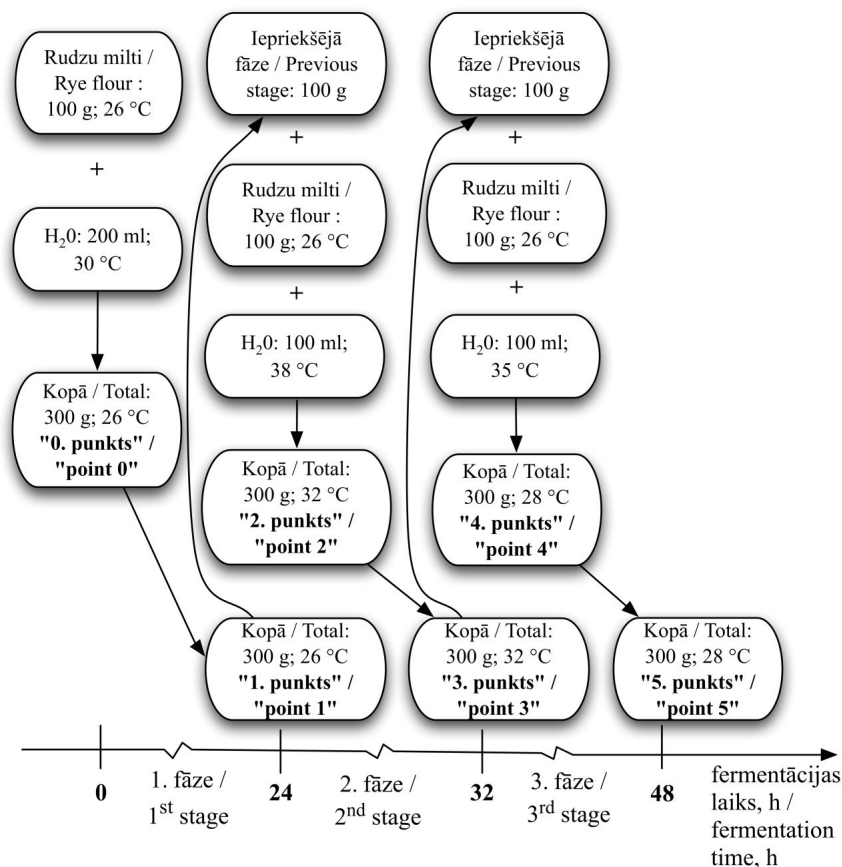
Materiāli un metodes

Ieraugi gatavoti un to fizikālie un ķīmiskie, kā arī bioķīmiskie un mikrobioloģiskie rādītāji noteikti Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas Tehnoloģijas katedras laboratorijās, Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā, Latvijas Universitātes Bioloģijas institūtā un Kopenhāģenas Universitātes Dzīvības zinātņu fakultātē.

Eksperimentos izmantotas šādas izejvielas:

- a/s „Jelgavas Dzirnavas” skrotētie rudzu milti – 1370. tips (mitrums – 13.4%, pelnvielu daudzums – 1.45%);
- SIA „Jelgavas Dzirnavas” rudzu graudi (mitrums – 33.66% pēc aktivēšanas);
- dzeramais ūdens graudu skalošanai un mitrināšanai (atbilstoši LR Ministru kabineta 2003. gada noteikumiem Nr. 235 „Dzeramā ūdens obligātās nekaitīguma prasības”).

Spontānā ierauga gatavošanā izmantots trīs fāzu fermentācijas process, kas kopumā ilga 48 stundas, ieraugu divas reizes atjaunojot – pievienojot jaunu ūdens un miltu porciju (1. att.).



1. att. Trīs fāžu spontāna rudzu ierauga fermentācijas tehnoloģiskais process.
Fig. 1. Technological process of a three-stage spontaneous rye sourdough fermentation.

Spontānā ierauga (U) gatavošanā izmantoti 100% skrotēto rudzu graudu milti, bet spontānā ierauga (M) gatavošanā – 20% rudzu graudu skrotēto miltu aizstāti ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltiem. Fermentācija norisinājās firmas „Memmert” inkubatoros „IPP 400”, un paraugi tika ņemti pirms un pēc katras fermentācijas fāzes: 0. un 1. punkts 1. fāzē, 2. un 3. punkts 2. fāzē un 4. un 5. punkts 3. fāzē.

Titrējamā skābuma noteikšanai ieraugos izmantota standartmetode pēc G. Spicher un H. Stephan (1999). PH noteikšanai izmantots „Jenway 3250” pH-metrs, titrējamā skābuma noteikšanai – 0.1 N NaOH.

B₁, B₂, B₅ un E vitamīna saturs ieraugu paraugos noteikts attiecīgi pēc AOAC standartmetodēm 986.27., 970.65., 961.14. un 971.30.

Organisko skābju (pienskābes, etiķskābes, dzintarskābes) un ogļhidrātu (glikozes, fruktozes, maltozes) koncentrācija noteikta, izmantojot šķidrums hromatogrāfu „Agilent 1100” ar spektrofotometrisko detektoru. Datu analīzei izmantota datorprogramma „Agilent Chemstation”.

Ieraugiem veikta mikrobioloģiskā testēšana un decimālatšķaidījumu gatavošana. Testa

paraugu noņemšana veikta atbilstoši standartam LVS EN ISO 8261. Noteikti šādi rādītāji:

- mezofili aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu (MAFAM) kopskaits (standarts LVS EN ISO 4833);
- raugi (standarts ISO 21527-2);
- pienskābes baktērijas (PB), lietojot selektīvo MRS (Ref. 01-111) barotni.

Uzsējumi MAFAM noteikšanai veikti uz gaļas peptona agara (Nutrient Agar Ref. 01-140), raugu noteikšanai – uz iesala ekstrakta agara barotnes (Ref. 01-111). Mikroorganismu koloniju skaita noteikšanai izmantots automātiskais koloniju skaitītājs Acolyte®.

Iegūto datu apstrāde veikta ar matemātiskās statistikas metodēm; iegūtajiem rezultātiem aprēķināti vidējie aritmētiskie lielumi; rezultātu ticamības līmenis (*p*) un standartnovirzes noteiktas ar Microsoft Excel programmas paketi.

Pienskābes baktērijas identificētas, izmantojot „API 50 CHL” testu. Ierauga mikrobiālās ekosistēmas daudzveidība pētīta, izmantojot amplificētus V3 reģionus no 16S ribosomālā ierauga DNS. Mikroorganismu ekosistēmas identificēšanai

izmantota denaturējošā gradienta gēla elektroforēze (DGGE).

DNS attīrīšana veikta pēc standartmetodes, izmantojot GenElute™ „Bacterial Genomic DNA Kit”. DNS attīrīts no ieraugu paraugiem, tos centrifugējot (A tips), vai no MRS barotnē izaugušo PB koloniju veidojošo vienību suspensijas (B tips). Pēc DNS attīrīšanas supernatantu ievietoja saldētavā -20 °C tālākai izmantošanai polimerāzes ķēdes reakcijā (PCR). Pēc DNS klātbūtnes pārbaudes iespējams veikt PCRm, izmantojot „Stratagene RoboCycler Gradient 96 PCR” iekārtu ar automātisku paraugu pārvietošanas iespēju dažādos temperatūras režīmu blokos. PCR reakcijā ar karstumizturīgas polimerāzes palīdzību nepieciešamais DNS fragments tika pavairots. Reakcija ietvēra trīs soļus: DNS dubultspirāles sadalīšana 94 °C, praimeru pievienošanās DNS vienpavediena struktūrai 60 °C, vajadzīgā fragmenta sintēze 72 °C. Šie soļi atkārtojās cikliski 35 reizes. Iegūstot veiksmīgi amplificētus rDNS reģiona rezultātus, iespējams veikt mikrobiālās ekosistēmas izpēti, izmantojot DGGE standartmetodi poliakriālamīda gēlā ar „INGENYphorU-2” sistēmas palīdzību. Mikroorganismu sugu identificēšanai gēlā nepieciešams ievadīt paraugkultūru sajaukumus (Mix 1 un Mix 2). DGGE iegūtie dati tika apstrādāti ar programmatūru „BioNumerics”, izmantojot

Pearson vai Dice algoritmu un izveidojot mikrobiālās sistēmas klāsterus.

Rezultāti un diskusija

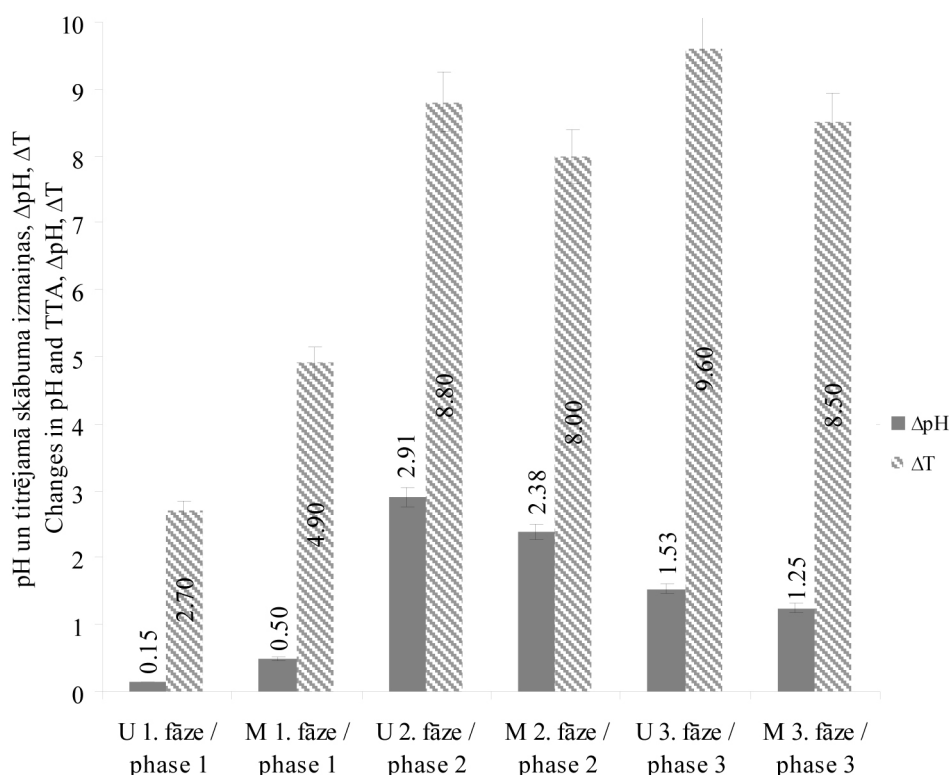
Izvērtējot pH un titrējamā skābuma izmaiņas spontānajos ieraugos, var secināt, ka strauja titrējamā skābuma paaugstināšanās un korelācija ar pH vērtības pazemināšanos vērojama ieraugu gatavošanas otrajā un trešajā fāzē (2. att.).

Pirmajā fermentācijas fāzē M ieraugam konstatēts lielāks titrējamā skābuma pieaugums un pH samazinājums nekā U ieraugam ($\Delta_T M > \Delta_T U$ par 81%; $\Delta_{pH} M > \Delta_{pH} U$ par 70%).

Savukārt fermentācijas otrajā un trešajā fāzē lielāks titrējamā skābuma pieaugums un pH samazinājums konstatēts U ieraugam, salīdzinot ar M ieraugu (2. fāzē $\Delta_T U > \Delta_T M$ par 9%; 3. fāzē $\Delta_T U > \Delta_T M$ par 11%; 2. un 3. fāzē $\Delta_{pH} U > \Delta_{pH} M$ par 18%). To var izskaidrot ar fermentācijas procesā ieraugos esošo enzīmu un mikroorganismu sastāvu un darbību.

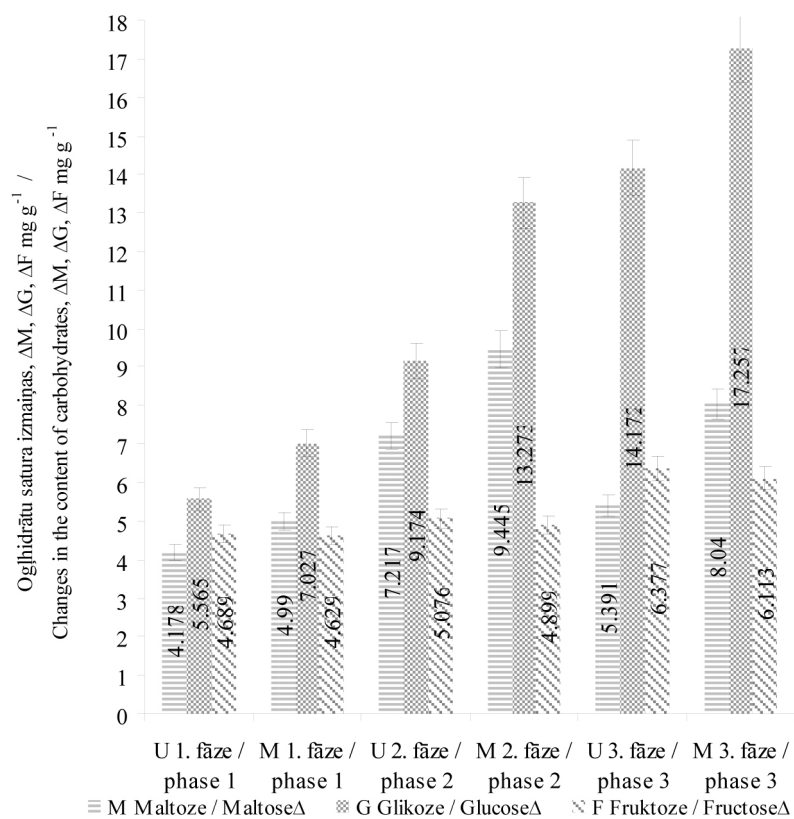
Pētījumā noteiktas arī glikozes, fruktozes un maltozes koncentrāciju pieauguma izmaiņas fermentācijas laikā (3. att.).

Vislielākās glikozes koncentrācijas izmaiņas ieraugā novērojamas fermentācijas 3. fāzē, kad M ieraugā glikozes koncentrācija palielinājās par 18% vairāk nekā U ieraugā. Tas izskaidrojams ar enzīmu



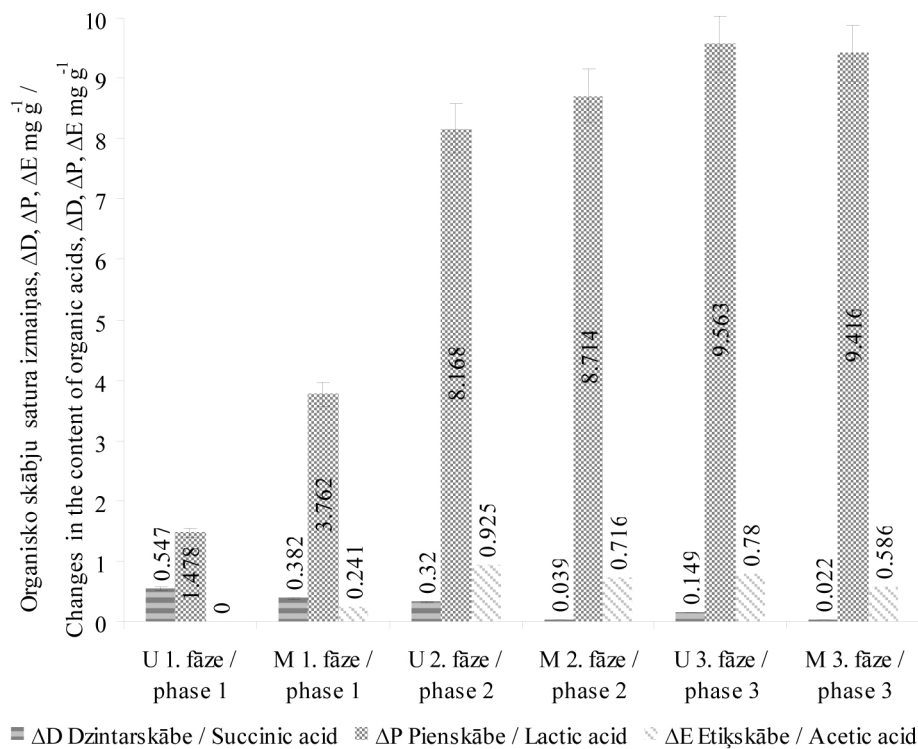
2. att. Titrējamā skābuma un pH izmaiņas ieraugos fermentācijas laikā.

Fig. 2. Changes in pH and TTA in sourdoughs during fermentation.



3. att. Ogļhidrātu saturs izmaiņas ieraugos fermentācijas laikā.

Fig. 3. Changes in the content of carbohydrates in sourdoughs during fermentation.



4. att. Organisko skābju saturs izmaiņas fermentācijas laikā.

Fig. 4. Changes in the content of organic acids in sourdoughs during fermentation.

α un β amilāžu aktivitāti, kas hidrolizē cieti (Hui, Meunier-Goddik et al., 2004), un ar pienskābes baktēriju un raugu metabolismu. Būtisks maltozes pieaugums 2. fermentācijas fāzē bija vērojams M ieraugā, kas par 31% pārsniedza U ierauga rādītāju. Fruktozes koncentrācija visvairāk palielinājās ieraugu fermentācijas 3. fāzē. Tāpat kā pH un titrējamais skābums, arī ogļhidrātu izmaiņu dati uzrādīja augstāku metabolisko aktivitāti abu ieraugu fermentācijas 2. un 3. fāzē.

Pētījumu rezultāti par organisko skābju izmaiņām ieraugu fermentācijas fāzēs atklāja identisku to koncentrāciju izmaiņu tendenci, salīdzinot ar ogļhidrātu satura izmaiņām.

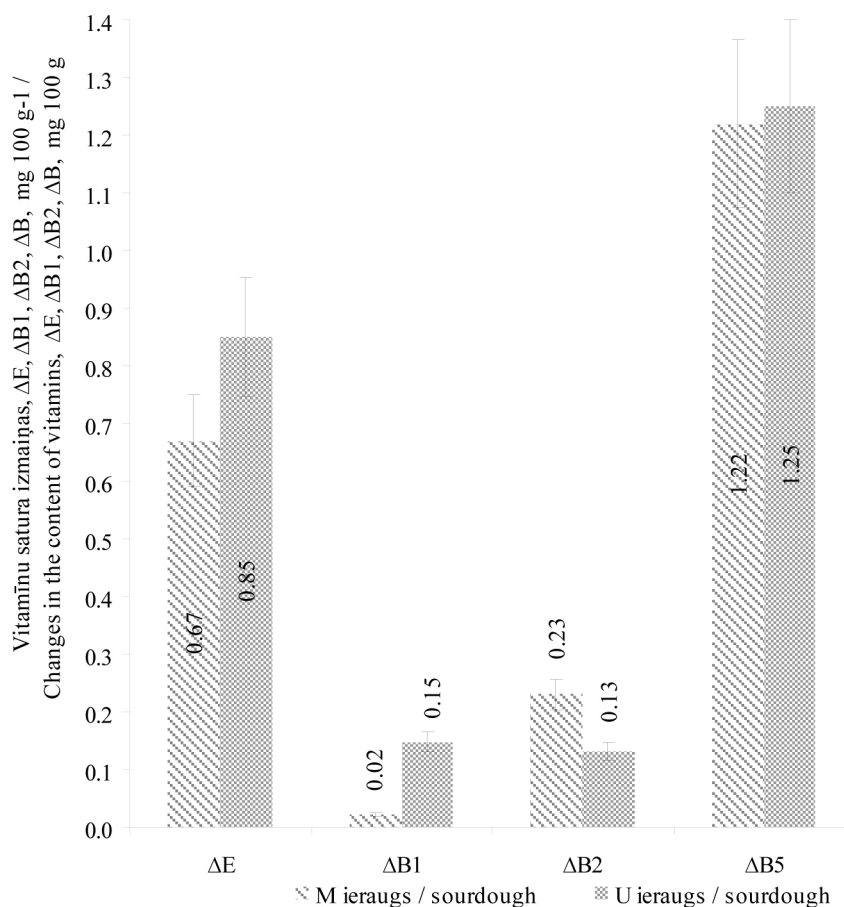
Pienskābes un etiķskābes koncentrācija būtiski palielinājās fermentācijas 2. un 3. fāzē gan U, gan M ieraugā (4. att.). Pienskābes satura izmaiņas kļūdas robežās ($p=95\%$) sakrita abiem paraugiem gan 2., gan 3. fermentācijas fāzē. Etiķskābes satura pieaugums 2. un 3. fermentācijas fāzē U paraugā pārsniedza M parauga rādītājus attiecīgi par 11% un 25%. Dzintarskābes saturs pēc fermentācijas samazinājās

24 stundas gan U, gan M ieraugā. Tas skaidrojams ar atšķirīgu dominējošo heterofermentatīvo PB sugu darbību fermentācijas 2. un 3. fāzē, kas aktīvāk producē etiķskābi un dzintarskābi.

No pētītajiem B grupas vitamīniem vislielākais pieaugums fermentācijas gaitā bija B_5 vitamīnam, kas ticamības robežās abu ieraugu paraugos bija vienāds ($p=95\%$). B_2 vitamīna koncentrācija M paraugā palielinājās būtiskāk (par 43%) nekā U paraugā, taču B_1 vitamīna saturs M paraugā fermentācijas gaitā praktiski palika nemainīgs (5. att.). Kā zināms no literatūras datiem (Казаков un Карпиленко, 2005), B_1 vitamīns ietilpst pirovātdēkarboksilāzes sastāvā un tiek izmantots šī enzīma sintēzē.

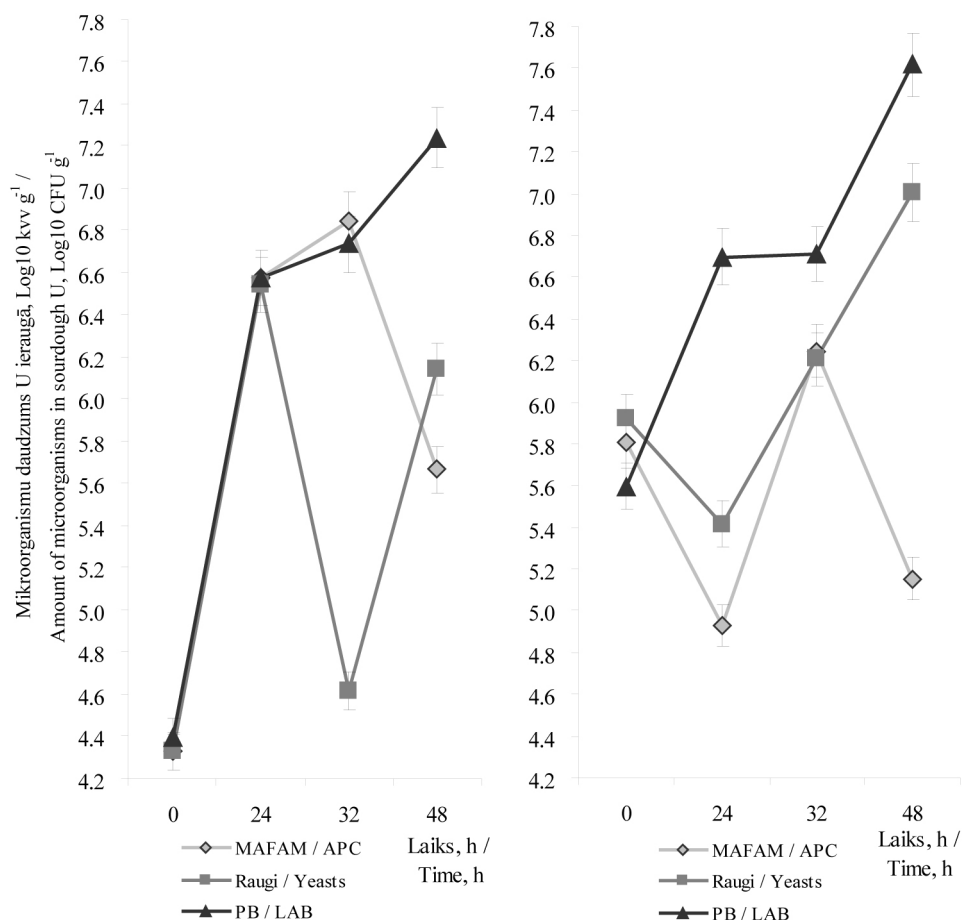
E vitamīna izmaiņas fermentācijas gaitā ieraugu paraugos nebija būtiskas (5. att.).

Ierauga mikrofloras dinamikas rādītāji liecināja par intensīvu pienskābes baktēriju un raugu darbību fermentācijas pirmajā fāzē U ieraugā – PB koncentrācija palielinājās par 49%, bet raugu – par 51% (6. att.). M paraugā PB koncentrācija palielinājās tikai par 20%, taču,



5. att. Vitamīnu satura izmaiņas ieraugos fermentācijas laikā.

Fig. 5. Changes in the content of vitamins in sourdoughs during fermentation.



6. att. Ieraugu mikrofloras rādītāji katras fermentācijas fāzes beigās.
Fig. 6. Plate count of microorganisms at the end of fermentation phases.

1. tabula / Table 1

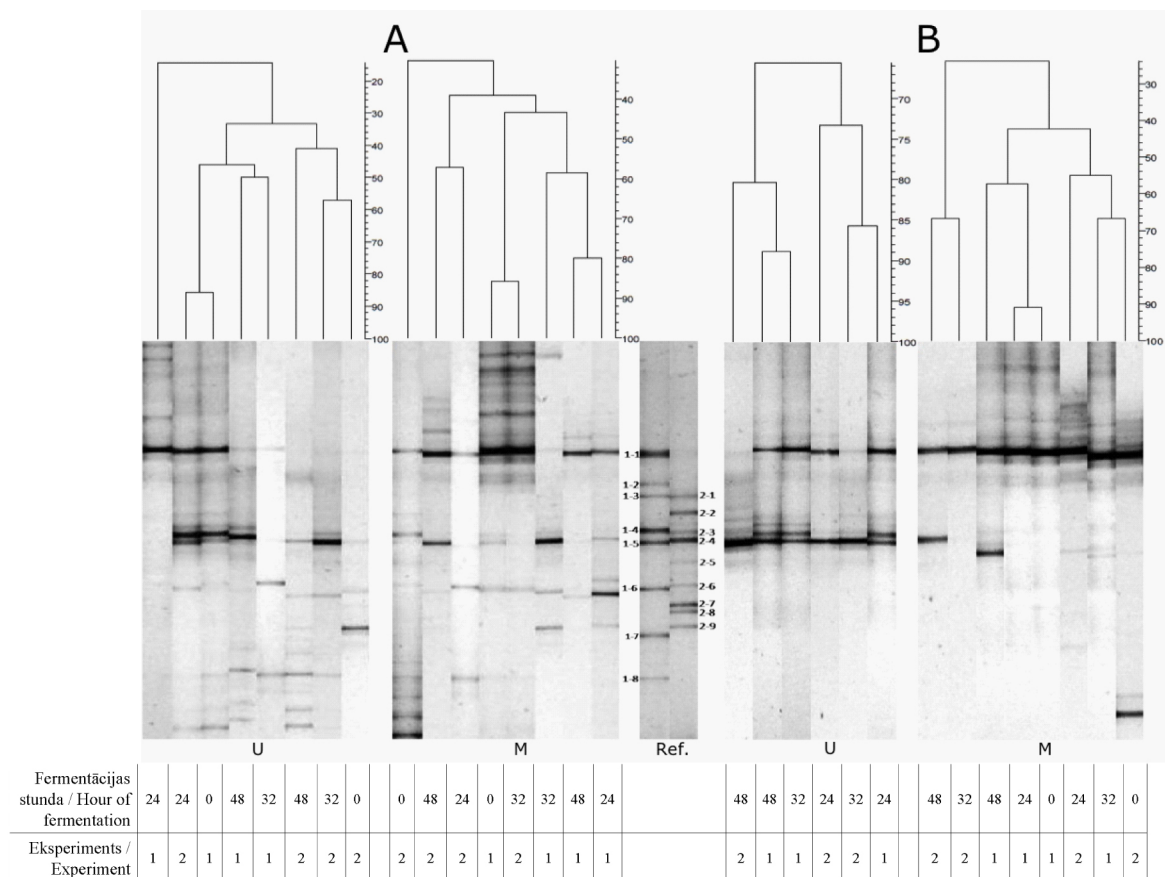
Izmantotās paraugkultūras un to novietojums DGGE gēlā
Reference strains and their position in DGGE gel

Novietojums	Paraugkultūra	Novietojums	Paraugkultūra
1-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus alimentarius</i>	2-1	<i>Lactobacillus pontis</i>
1-2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2-2	<i>Lactobacillus brevis</i>
1-3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2-3	<i>Lactobacillus sakei</i>
1-4	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	2-4	<i>Lactobacillus curvatus</i>
1-5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	2-5	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ; <i>Lactobacillus mindensis</i>
1-6	<i>Weissella cibaria</i>	2-6	<i>Pediococcus acidilactici</i>
1-7	<i>Lactobacillus lindneri</i>	2-7	<i>Lactobacillus namurensis</i>
1-8	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus zeae</i>	2-8	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
		2-9	<i>Lactobacillus secaliphilus</i> .

ņemot vērā augstu sākotnējo PB koncentrāciju, pēc fermentācijas 1. fāzes tā kļūdas robežās ($p=95\%$) sakrita ar PB koncentrāciju U ieraugā. Fermentācijas 2. fāzē PB skaits abos ieraugos palielinājās

līdz $6.73 \pm 0.02 \log_{10} \text{ kvv g}^{-1}$, bet fermentācijas beigās sasniedza 7.24 (U) un 7.62 (M) $\log_{10} \text{ kvv g}^{-1}$.

Sākotnējā raugu koncentrācija U ieraugā bija $4.33 \log_{10} \text{ kvv g}^{-1}$, bet M ieraugā sasniedza



7. att. Ieraugos esošo PB zīmes DGGE gēlos A tipa paraugos, kur DNS ekstrahēts tieši no ierauga, un B tipa paraugos, kur DNS ekstrahēts no MRS barotnē izaugušo koloniju suspensijas.

Fig. 7. Bands of type A sourdough samples (DNA extracted directly from sourdough) and type B sourdough samples (DNA extracted from colony suspension in MRS broth) in DGGE gels.

5.92 log₁₀ kvv g⁻¹, jo bioloģiskās aktivēšanas procesā bija veidojušies optimāli apstākļi raugu vairošanai.

Aktīva pienskābes baktēriju metabolisma rezultātā fermentācijas 1. fāzē raugu koncentrācija M ieraugā būtiski pazeminājās līdz 5.42 log₁₀ kvv g⁻¹. Šī tendence bija novērojama arī U ieraugā, kur fermentācijas 2. fāzē raugu koncentrācija pazeminājās no 6.54 līdz 4.62 log₁₀ kvv g⁻¹. Fermentācijas beigās raugu koncentrācija M ieraugā bija par vienu pakāpi augstāka nekā U ieraugā un sasniedza 7.01 log₁₀ kvv g⁻¹, kas atbilst mīklā izmantojama ierauga prasībām (Biotechnology, 1995).

Izvērtējot mikrofloras attīstību ieraugos, var secināt, ka U ieraugā fermentācijas 1. fāzē intensīvi attīstās MAFAM, bet M ieraugā to skaits samazinās, jo M ierauga gatavošanā izmantojot aktivēto graudu piedevu, rodas labvēlīga vide raugu un pienskābes baktēriju attīstībai. Jāatzīmē, ka viena no dominējošām MAFAM grupām ir *Bacillus* ģints aerobās endosporu veidojošās baktērijas, kuras spēj

hidrolizēt olbaltumvielas un radīt sārmainu vidi, kas nav labvēlīga PB un raugu attīstībai. Tāpēc PB un raugi tiek kultivēti uz selektīvām barotnēm, kur, vairojoties optimālos apstākļos, to skaits pārsniedz koloniju daudzumu, kas izaug uz gaļas peptona agara (MAFAM) barotnes.

DGGE analīžu veikšanai tika izvēlētas paraugkultūras (*reference strains*), kuru amplificētus 16s gēna rDNS fragmentus (V3 reģionu) ievadot gēlā, iegūst „pēdas”. Tās poliakrilamīda gēlā parādās pie konkrētiem gradientu procentiem, tādējādi nostājoties konstantās vietās. Tika izvēlētas paraugkultūras, kas literatūras avotos minētas kā rudzu ieraugiem raksturīgas (1. tabula).

DGGE analīžu rezultāti (7. att.) parādīja šādus dominējošos PB celmus: *Lactobacillus plantarum* 1369, *Lactobacillus alimentarius* 1627, *Lactobacillus delbrueckii* 1646, un *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* 2207 abos paraugos. Ievērojami zemāka mikrobiālā daudzveidība redzama paraugos, kur DNS ekstrahēts no MRS barotnē izaugušo koloniju suspensijas (B tipa

paraugi), kurā *Lactobacillus secaliphilus* 17896 un *Lactobacillus zeve* 1639 „pēdas” pazūd pilnībā. Iespējams, to var izskaidrot ar atmirušu šūnu „pēdām”, kas parādās poliakrilamīda gēlā paraugos, kur DNS ekstrahēts tieši no ierauga (A tipa paraugi), vai ar nepietiekamiem augšanas apstākļiem iepriekšminēto mikroorganismu attīstībai.

M ieraugā stabila dominējošā PB suga (gan A, gan B tipa paraugos) bija *Lactobacillus plantarum* 1369 un *Lactobacillus alimentarius* 1627, savukārt U ieraugā pēc 24 stundu fermentācijas sāka dominēt *Lactobacillus curvatus subsp. curvatus* 2207.

DGGE rezultāti skaidri parāda mikrobioloģiskās daudzveidības atšķirības starp 1. un 2. eksperimentu. Izmantojot DGGE metodi, visos spontānā ierauga paraugos tika identificēts rauga *Saccharomyces cerevisiae* 50 celms.

„API 50 CHL” testa rezultāti uzrāda identificētas PB sugas *Pediococcus damnosus* (*Pediococcus cerevisiae*), *Lactobacillus brevis* un *Lactobacillus fermentum*, kas, iespējams, ir neidentificētās sugas DGGE gēlos un neatbilst nevienai no paraugkultūrām, vai pārstāv citu sugas celmu.

Secinājumi

1. Pienskābes baktēriju un raugu aktīva metabolisma rezultātā fermentācijas procesa beigās ieraugā, kas gatavots no skrotētiem miltiem, pH pazeminājās līdz 4.05, un ieraugā ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu miltu piedevu – līdz 4.11, bet titrējamais skābums paaugstinājās attiecīgi līdz 13.0 un 12.6°.
2. Organisko skābju un ogļhidrātu satura izmaiņas ieraugu fermentācijas fāzēs bija praktiski vienādas.
3. Ieraugu fermentācijas procesā visintensīvāk palielinājās B₅ vitamīna saturs.
4. Ierauga gatavošanā pievienojot bioloģiski aktivētu rudzu graudu piedevu un radot labvēlīgu vidi pienskābes baktēriju un raugu attīstībai, ierauga fermentācijas 1. fāzē iespējams samazināt mezofili aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu attīstību.
5. Ieraugā ar bioloģiski aktivētu rudzu graudu piedevu fermentācijas procesa beigās pienskābes baktēriju un raugu daudzums sasniedza attiecīgi 7.62 log₁₀ kvv g⁻¹ un 7.01 log₁₀ kvv g⁻¹, kas atbilst kvalitatīva ierauga rādītājiem.
6. Eksperimentos izmantojot API testu, ieraugos tika identificētas *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus brevis* un *Lactobacillus fermentum*

pienskābes baktēriju sugas un raugu suga *Saccharomyces cerevisiae*.

7. Izmantojot DGGE metodi, abu ieraugu fermentācijas procesa beigās bija vērojama līdzīga un stabila dominējošo pienskābes baktēriju celmu asociācija, kurā ietilpa *L. plantarum* 1369, *L. alimentarius* 1627, *L. curvatus subsp. curvatus* 2207, *L. delbrueckii* 1646 un rauga *Saccharomyces cerevisiae* 50 celms.

Literatūra

1. *Biotechnology*. (1995) 2nd edition. Volume 9. Enzymes, Biomass, Food, and Feed. Edited by G. Reed and T.W. Nagodawithana. VCH Publishers, Weinheim and New York, 243–318.
2. Collins, M.D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguerre, M., Farrow, J.A.E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M., Wallbanks, S. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria determined by reverse transcriptase sequence of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 77, 5–12.
3. Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. (2005) Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 31–42.
4. Hammes, W.P., Stolz, P., Ganzle, M.G. (1996) Metabolism of lactobacilli in traditional sourdoughs. *Advances in Food Science*, 18, 176–184.
5. Hansen, A., Lund, B., Lewis, M.J. (1989) Flavour production and acidification of sour doughs in relation to starter culture and fermentation temperature. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 22, 145–149.
6. Hui, Y. H., Meunier-Goddik, L., Hansen, A.S., Josephsen, J., Nip, W., Stanfield, P.S., Toldra, F. (2004) *Handbook of food and beverage fermentation technology*. Marcel Dekker, New York, 729–754.
7. Loenner, C., Preve, A.K. (1988) Acidification properties of lactic acid bacteria in rye sourdoughs. *Food Microbiology*, 5, 43–58.
8. Lund, B., Hansen, A., Lewis, M. J. (1989) The influence of dough yield on acidification and production of volatiles in sour doughs. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 22, 150–153.
9. Müller, M.R.A., Wolfrum, G., Stolz, P., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. (2001) Monitoring

- the growth of *Lactobacillus* during rye flour fermentation. *Food Microbiol.*, 18, 217–227.
10. Spicher, G., Lonner, C. (1985) Die mikroflora des sauersteiges. XXI. Mitteilung: die in sauersteigen schwedischer backereien vorkommenden lactobacillen. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 181, 9–13.
 11. Spicher, G., Stephan, H. (1999) *Hanbuch Sauerteig, Biologie, Biochemie, Technologie*. BEHR'S Verlag, Hamburg, 223–403.
 12. Vogel, R.F., Bocker, G., Stolz, P., Ehrmann, M.A., Fanta, D., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., Schleifer, K. H., Hammes, W.P. (1994) Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 223–229.
 13. Vogel, R.F., Knorr, R., Muller, M.R.A., Steudel, U., Ganzle, M.G., Ehrmann, M.A. (1999) Non-dairy lactic fermentations: the cereal world. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 403–411.
 14. Vogel, R.F., Muller, M., Stolz, P., Ehrmann, M. (1996) Ecology in sour-doughs produced by traditional and modern technologies. *Adv. Food Sci.*, 18, 152–159.
 15. Wiese, B.G., Strohmar, W., Rainey, F.A., Diekmann, V. (1996) *Lactobacillus panis* sp. nov., from sourdough with a long fermentation period. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 449–453.
 16. Казаков, Е.Д., Карпиленко, Г.П. (2005) *Биохимия зерна и хлебопродуктов*. ГИОРД, Санкт-Петербург, 510 стр.

Pateicības

Pētījums veikts ESF projekta „Pārtikas nozares zinātniski pētnieciskās grupas izveide” līguma Nr. 2009/0232/IDP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/122 ietvaros.

Analīzes pētījumam veiktas ar ESF projekta “Atbalsts doktora studiju programmu īstenošanai”, vienošanās Nr. 2009/0180/IDP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/017/, līguma Nr. 04.4-08/EF2.D3.12 atbalstu.