KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Eivitas Jagentavičius

FERMENTINĖS HIDROLIZĖS ĮTAKA SIAURALAPIŲ LUBINŲ (LUPINUS ANGUSTIFOLIUS L.) SĖKLŲ BALTYMŲ SUDĖČIAI IR FUNKCINĖMS SAVYBĖMS

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas
Doc. dr. Loreta Bašinskienė

KAUNAS, 2016

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

FERMENTINĖS HIDROLIZĖS ĮTAKA SIAURALAPIŲ LUBINŲ (LUPINUS ANGUSTIFOLIUS L.) SĖKLŲ BALTYMŲ SUDĖČIAI IR FUNKCINĖMS SAVYBĖMS

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

Vadovas

Doc. dr. Loreta Bašinskienė

Recenzentas

Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

Projektą atliko

Eivitas Jagentavičius

KAUNAS, 2016

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

Eivitas Jagentavičius

Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

„Fermentinės hidrolizės įtaka siauralapių lubinų (*Lupinus angustifolius* L.) sėklų baltymų sudėčiai ir funkcinėms savybėms“

AKADEMINIO SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2016 m. gegužės 27 d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Eivito Jagentavičiaus**, baigiamasis projektas tema „Fermentinės hidrolizės įtaka siauralapių lubinų (*Lupinus angustifolius* L.) sėklų baltymų sudėčiai ir funkcinėms savybėms“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

Turinys

Įvadas 8

1. Literatūros apžvalga 10

1.1. Lubinų cheminės sudėties ypatumai, naudojant juos kaip funkcinius ir maistinius ingredientus 10

1.1.1. Pagrindiniai lubinų baltymai 11

1.1.2. Maistinės lubinų savybės 13

1.1.3. Lubinų baltymų alerginis poveikis 14

1.1.4. Lubinų baltymų biologinis poveikis 15

1.2. Lubinų baltymų išskyrimo metodai 15

1.3. Lubinų baltymų panaudojimas maisto pramonėje 17

1.3.1. Lubinų koncentratai ir izoliatai 17

1.3.2. Lubinų priedų įtaka kepinių kokybei 18

1.3.3. Lubinų savybės sudaryti putas ir emulsijas 19

1.4. Fermentinės hidrolizės taikymas baltymų maistinėms ir funkcinėms savybėms pagerinti 19

1.4.1. Baltymų funkcinių savybių pokyčiai 20

1.4.2. Baltymų alerginio poveikio mažinimas 21

1.4.3. Skonio savybių gerinimas 22

1.4.4. Bioaktyvių peptidų susidarymas 23

2. Tyrimų objektai ir metodai 25

2.1. Tyrimų objektai 25

2.1.1. Lubinų sėklos 25

2.1.2. Fermentiniai preparatai 25

2.1.3. Lubinų baltymų hidrolizatų gamyba 26

2.1.4. Keksų be glitimo baltymų bandomieji kepimai 28

2.2. Tyrimo metodai 29

2.2.1. Lubinų cheminių rodiklių nustatymas 29

2.2.2. Baltymų funkcinių savybių tyrimai 31

2.2.3. Elektroforezė 32

2.2.4. Keksų kokybės rodiklių nustatymas 33

2.2.5. Matematinė statistinė duomenų analizė 34

3. Rezultatai ir jų aptarimas 35

3.1. Baltymų kiekio pokyčiai lubinų miltų hidrolizės metu 35
3.1.1. Fermentacijos sąlygų įtaka baltymų hidrolizei 35
3.1.2. Baltymų išskyrimo būdo įtaka jų kiekiui ir hidrolizės efektyvumui 37
3.1.3. Baltymų kokybiniai pokyčiai hidrolizės metu 38
3.2. Hidrolizės įtaka lubinų baltymų funkcinėms savybėms 39
3.3. Lubinų baltymų priedų įtaka keksų be glitimo baltymų kokybei ir maistinei vertei 48
Išvados 51
Bibliografinių nuorodų sąrašas 52

Jagentavičius Eivitas. Fermentinės hidrolizės įtaka siauralapių lubinų (*Lupinus angustifolius L.*) sėklų baltymų sudėčiai ir funkcinėms savybėms *Magistro baigiamasis projektas.* Maisto mokslas ir sauga / darbo vadovas doc. dr. Loreta Bašinskienė. Cheminės technologijos fakultetas, Kauno technologijos universitetas.

Tyrimų sritis: Technologijos mokslai, Maisto produktų technologijos.

Raktiniai žodžiai: lubinai, lubinų izoliatai, lubinų hidrolizatai, fermentinė hidrolizė.

Kaunas, 2016. 63 psl.

SANTRAUKA

Ankštinių augalų sėklos nuo seno žinomos kaip puikus baltymų šaltinis, o lubinuose baltymų kiekis, lyginant su kitais ankštiniais augalais, vienas didžiausių Sėkmingam augalinių baltymų panaudojimui maisto pramonėje būtina, kad jie pasižymėtų aukšta maistine verte ir reikiamomis funkcinėmis savybėmis.

Šio darbo tikslas buvo nustatyti fermentinės hidrolizės įtaką siauralapių lubinų (*Lupinus angustifolius L.*) sėklų baltymų sudėčiai ir funkcinėms savybėms (emulgavimo ir putų susidarymo) ir įvertinti jų panaudojimo galimybes kepinių be glitimo baltymų gamybai.

Tyrimo objektu pasirinkti Lietuvoje selekcionuojamos veislės Nr. 1710 siauralapiai lubinai (*Lupinus angustifolius* L.), užauginti 2014 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Žemdirbystės instituto Vokės filiale. Šios veislės lubinai pasižymi dideliu baltymų (36 %) ir mažu alkaloidų (0,039–0,064 %) kiekiu bei dideliu sėklų derliumi.

Lubinų baltymų hidrolizei pasirinkti proteolitinų fermentų komerciniai preparatai Flavourzyme, Alcalase, Neutrase, Protamex (Novozymes). Įvertinta hidrolizės įtaka lubinų baltymų sudėčiai, funkcinėms savybėms ir jų tinkamumui kepinių be glitimo baltymų gamybai.

Lubinų baltymų tirpumas pakito juos hidrolizuojant. Didžiausi tirpių baltymų pokyčiai nustatyti veikiant kompleksiniu endoproteazės ir egzopeptidazės preparatu Flavourzyme. Hidrolizė proteolitiniais fermentais turėjo įtakos ir baltymų funkcinėms savybėms: didino jų putų ir emulsijų sudarymo pajėgumą bei putų stabilumą, tačiau mažino emulsijų stabilumą, lyginant su nehidrolizuotais baltymais. Lubinų baltymų hidrolizatas daugiau pagerino kepinių iš ryžių miltų tekstūros savybes (kietumą, tamprumą, rišlumą, stangrumą) nei baltymų izoliatas. Tai patvirtina, kad hidrolizė pagerino baltymų funkcines savybes ir rodo jų panaudojimo galimybes miltinės konditerijos kepinių be glitimo baltymų kokybei ir maistingumui pagerinti.

Jagentavičius Eivitas. Influence of enzymatic hydrolysis on the protein composition and functional properties of narrow - leaved lupine (*Lupinus angustifolius L.*) seeds. *(Each Word of the Title is Written in Capital Letters)*: *Master's* thesis in Food Science and Safety / supervisor assoc. doc. dr. Loreta Bašinskienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Technological Sciences, Food Technology.

Key words: lupine, lupine isolates, lupine hydrolysates, enzymatic hydrolysis.

Kaunas, 2016. 63 p.

SUMMARY

Legume seeds has long been known as an excellent source of protein and lupine protein content compared with other legumes, one of the most successful vegetable protein for the food industry, it is imperative that they be characterized high nutritional value and the required functionality.

The aim was to influence of enzymatic hydrolysis on the protein composition and functional properties of narrow - leaved lupine (Lupinus angustifolius L.) seeds, the protein composition and functional properties (emulsifying and foaming) and to evaluate their potential in baked goods without gluten protein production.

The study object is varieties of Lithuania No. 1710 lupine (Lupinus angustifolius L.) grown in 2014 in Lithuanian Agriculture and Forestry Science Center Institute of Agriculture. The lupine varieties with high protein (36%) and low alkaloid (0.039 to 0.064%) and a high seed yield.

Lupin protein hydrolysis use of proteolytic enzymes commercial preparations Flavourzyme, Alcalase, Neutrase, Protamex (Novozymes). The estimated impact of the hydrolysis of lupine protein composition, functional properties and their suitability baked goods without gluten protein production.

Lupin protein solubility was changed by hydrolyzing them. The highest soluble protein was observed in the operation of complex endopeptidase and exopeptidase preparation Flavourzyme. Hydrolysis proteolytic enzymes and proteins influenced the functional properties: increasing their foaming and emulsification capacity and foam stability, but reduced emulsion stability compared with not hydrolysed proteins. Lupin protein hydrolyzate more improved bakery products from rice flour texture characteristics (hardness, springiness, cohesiveness, chewiness) than protein isolate. This confirms that the hydrolysis improved their functional properties and show their potential in gluten free bakery products quality and nutritional improvement.

Įvadas

Ankštinių augalų sėklos nuo seno žinomos kaip puikus baltymų šaltinis, o lubinuose baltymų kiekis, lyginant su kitais ankštiniais augalais, vienas didžiausių. Manoma, jog augalinės kilmės maistinių medžiagų poreikis ateityje augs dėl ekonominių ir aplinkos veiksnių, taip pat turės įtakos naujų, saugių ir sveikų maisto produktų kūrimui, kurį sukels vis didėjantis vartotojų informuotumas apie mitybos įpročių poveikį žmogaus gerovei. Pagrindiniai ankštinių augalų baltymai yra randami sėklaskilčių audinių rezervinėse vakuolėse ir dažniausiai priklauso atsarginių baltymų grupei, kuri tarnauja kaip azoto ir anglies šaltinis besiformuojantiems augalams.

Pastaraisiais metais lubinų sėklų baltymai tapo svarbia mitybos specialistų susidomėjimo sritimi ne tik dėl savo maistingųjų medžiagų, bet taip pat dėl neigiamo ir teigiamo poveikio, kurį jie gali daryti žmogaus organizmui. Tai maisto netoleravimas, alergijos, endogeninių hidrolitinių fermentų slopinimas, tačiau ir hipolipideminės, hipotenzijos, anti-kancerogeninės ir nutukimą mažinančios savybės. Be to, augaliniai baltymai atlieka svarbų technologinį/funkcinį vaidmenį, ką rodo padidėjęs jų, kaip maisto produktų ingredientų, naudojimas.

Lubinai savo baltymų kiekiu prilygsta sojai, todėl tai gali būti naujas augalinių baltymų šaltinis, naudojamas maisto pramonėje. Dabartiniu metu Lietuvoje auginami vien siauralapiai lubinai *(Lupinus augustifolius L.).* Siauralapių lubinų sėklose baltymų kiekis svyruoja nuo 286 iki 366 g/kg [1]. Lubinų baltymai gerai virškinami ir pagal tarptautinius standartus laikomi labai panašiais į sojų baltymus. Šiuose baltymuose randama 18 nepakeičiamų aminorūgščių. Lubinų sėklose taip pat randama apie 46–60 g/kg riebalų, taip pat vitaminų, karotino bei mineralinių medžiagų [2]. Lubinų panaudojimą sunkina juose esantis didelis alkaloidų kiekis. Tačiau Lietuvos selekcininkai išvedė naujas lubinų rūšis, kuriose jų kiekis nedidelis.

Be didelio alkaloidų kiekio, lubinai turi dar kelis antimitybinius junginius: lektinų, tripsino inhibitorių, cianogeninių glikozidų, fitatų ir α-galaktozidazių. Siauralapiuose lubinuose tripsino inhibitorių koncentracija svyruoja nuo 1,12–2,05 TIU/mg, fitatų – nuo 11,1 iki 1,856 g/kg, cianogeninių glikozidų randama maži kiekiai (<0,01 mg HCN/ 100 g sėklų), pagrindinės α-galaktozidazės – rafinozė, stachiozė, verbakozė ir ajukozė [3].

Siekiant pagerinti lubinų maistinę vertę ir jų virškinamumą bei sumažinti antimitybinius veiksnius, taikomi įvairūs metodų: mirkymas, lukštenimas ir daiginimas [4], fermentacija [5], terminis apdorojimas [6], švitinimas. Baltymų hidrolizė vykdoma dėl daugelio priežasčių, pvz norint pagerinti maistines savybes, gedimo stabdymui, suteikti naujas tekstūros savybes, padinti ar sumažinti tirpumą, suteikti stipresnes emulsavimosi savybes, užkirsti kelią nepageidaujamoms sąveikoms, pašalinti tam tikrą kvapą, pašalinti toksinus ir inhibitorius [7]. Buvo atlikti tyrimai,

kurių metu nustatyta, kad sojos baltymų hidrolizatai, gauti naudojant fermentus, turėjo didesnį antioksidacinį potencialą nei nehidrolizuoti baltymų izoliatai [8]. Hidrolizės metu susidaro mažesnės molekulinės masės peptidai, kurie pasižymi geresnėmis maistinėmis savybėmis. Yra įrodyta, kad mažesnės molekulinės masės peptidai yra lengviau įsisavinami virškinimo trakte nei laisvos aminorūgštys, tai parodo baltymų hidrolizatų privalumą prieš įvairius aminorūgščių mišinius [9]. Tyrimai taip pat parodė, kad hidrolizatai gali būti naudojami žmonių mityboje nepakeičiamoms amino rūgštims gauti, išskyrus liziną ir metioniną [10]. Fermentinė hidrolizė yra labiau vertinama nei cheminė hidrolizė. Buvo atlikti tyrimai, kad tam tikrų baltymų junginių, kurie susidaro cheminės hidrolizės metu, negali skaidyti skrandžio ir kasos proetazės [11]. Nustatyta, kad hidrolizatai pasižymi mažesnėmis alerginėmis savybėmis [12].

Sėkmingam augalinių baltymų panaudojimui maisto pramonėje būtina, kad jie pasižymėtų reikiamomis funkcinėmis savybėmis. Nors atlikta nemažai tyrimų, norint išsiaiškinti ankštinių augalų baltymų savybes ir kaip jos keičiasi hidrolizės metu, daugiausia dėmesio susilaukė sojos baltymai ir baltymų hidrolizė virškinimo fermentais. Išsamių tyrimų apie komercinių proteazių įtaką lubinų baltymų sudėčiai ir funkcinėms savybėms nėra paskelbta.

Šio darbo tikslas buvo nustatyti fermentinės hidrolizės įtaką siauralapių lubinų (*Lupinus angustifolius L.*) sėklų baltymų sudėčiai ir funkcinėms savybėms (emulgavimo ir putų susidarymo) ir įvertinti jų panaudojimo galimybes kepinių be glitimo baltymų gamybai.

Tikslui pasiekti spręsti uždaviniai:

1. Nustatyti apdorojimo komercinėmis endoproteazėmis (Alcalase, Neutrase, Protamex) ir egzopeptidazių/endoproteazių kompleksu (Flavourzyme) įtaką lubinų baltymų, išskirtų ekstrakcijos šarminėje terpėje/nusodinimo izoelektriniame taške ir išsūdymo būdais, kokybinei ir kiekybiniai sudėčiai;
2. Nustatyti apdorojimo fermentais įtaką lubinų baltymų putų susidarymo savybėms;
3. Nustatyti apdorojimo fermentais įtaką lubinų baltymų emulgavimo savybėms;
4. Įvertinti lubinų baltymų izoliatų ir hidrolizatų panaudojimo galimybes miltinės konditerijos kepinių (keksų) be glitimo baltymų gamybai.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Lubinų cheminės sudėties ypatumai, naudojant juos kaip funkcinius ir maistinius ingredientus

Lubinai (*Lupinus*) yra puikus maisto medžiagų, tokių kaip baltymų, riebalų, skaidulinių ir mineralinių medžiagos bei vitaminų, šaltinis (žr. 1.1 lentelė) [17, 27]. Dažniausiai lubinai savo sudėtimi nenusileidžia sojoms. Iš apie 1000 lubinų rūšių Lietuvoje daugiausia auginami geltonžiedžiai *(Lupinus luteus L.)* ir siauralapiai *(Lupinus angustifolius L.)*. Kaip laukiniai auga ir daugiamečiai lubinai *(Lupinus poliphyllus L.)*. Baltieji lubinai *(Lupinus albus L.)* dėl labai ilgos vegetacijos šalyje grūdams neauginami, nes nespėja subręsti.

Lubinai paprastai turi apie du kartus daugiau baltymų nei kitų ankštinių augalų grūdai, kuriuos paprastai vartoja žmonės. Baltymų kiekis lubinuose, priklausomai nuo rūšies ir veislės ypatumų, nuo auginimo sąlygų ir dirvožemio savybių, gali kisti ribose nuo 28 % iki 48 % [18, 35, 36, 39]. Globulinai (α-kongliutenai (11S šeimos baltymai), β-kongliutenai (7S šeimos baltymai) ir γ-kongliutenai) lubinuose yra pagrindinės atsarginės maisto medžiagos (80–90 %), t. y. rezerviniai baltymai [19], o prolaminai ir gliutelinai aptinkami mažais kiekiais, panašiais kaip ir daugelyje kitų ankštinių javų grūdų [20]. Lubinai pasižymi gera nepakeičiamų aminorūgščių sudėtimi [21]. Jie yra laikomi geru lizino šaltiniu ir paprastai turi mažai sieros turinčių aminorūgščių (metionino ir cisteino) [20, 22, 43].

Skaidulinės medžiagos sudaro apie 40 % saldžiųjų lubinų grūdo masės, t. y. daugiau nei daugelyje kitų ankštinių augalų [23, 40, 41]. Baltųjų lubinų grūdų luobelė turi 89 % netirpių skaidulinių medžiagų. Pagrindinis netirpių skaidulinių medžiagų komponentas yra celiuliozė (79 %). Kiti komponentai: hemiceliuliozė ir ligninas – sudaro, atitinkamai, 14 % ir 7 % [24]. Nors lubinai priklauso ankštiniams javams ir nėra apibūdinami kaip aliejiniai augalai, jie savo grūduose turi nemažai (5–20 %) riebalų [25]. Lubinų riebalai pasižymi gerai subalansuota riebalų rūgščių sudėtimi, juose yra 10 % sočiųjų riebalų rūgščių ir 90 % nesočiųjų riebalų rūgščių, kurių nuo 32 % iki 50 % sudaro oleino (C18: 1), nuo 17 % iki 47 % – linolo (C18: 2) ir nuo 3 % iki 11 % – linoleno (C18: 3) rūgštis [26]. Lubinai turi didesnį kiekį tirpių angliavandenių nei kviečiai ar kiti ankštiniai augalai, išskyrus sojos pupeles [27]. Juose yra labai mažai krakmolo (5–12 %) ir daugiau tirpiųjų skaidulinių medžiagų polisacharidų (30–40 %) [28].

Be to, lubinai turi fitochemikalų, pasižyminčių antioksidaciniu poveikiu – polifenolių, daugiausia taninų ir flavonoidų [27, 29, 44]. Ištirta, kad lubinai, lyginant su kitais ankštiniais augalais, turi mažiau nepageidaujamų komponentų, pavyzdžiui, fito rūgšties, oligosacharidų, tripsino inhibitorių, lektinų ir saponinų [27, 30, 34]. Pagrindinės lubinuose randamos kenksmingos

medžiagos yra įvairūs alkaloidai [31, 45, 47], tokie kaip lupininas, lupaninas, sparteinas, lupinidinas, anagirinas, monolupinas, termopsinas, puzilinas, angustifolinas ir kt. [32]. Šie junginiai yra pagrindiniai lubinų vartojimą ribojantys veiksniai [33].

1.1 lentelė. Lubinų maistinė vertė [27]

Mitybos komponentai	**Baltieji lubinai cv. Multolupa**	**Baltieji lubinai cv. Marta**	**Geltonieji lubinai cv.4486**	**Geltonieji lubinai cv.4492**
Baltymai (g/100 g s.m.)	30.6 ± 0.26	37.4 ± 3.12	37.9 ± 2.44	36.8 ± 0.77
Riebalai (g/100 g s.m.)	14.64 ± 1.11	11.34 ± 0.73	8.79 ± 0.42	8.54 ± 0.02
Pelenai (g/100 g s.m.)	3.65 ± 0.29	3.79 ± 0.06	4.95 ± 0.12	3.14 ± 0.07
Tirpūs angliavandeniai (g/100 g s.m.)				
Sacharozės	2.58 ± 0.06	3.09 ± 0.08	1.38 ± 0.13	1.21 ± 0.04
Maistinės skaidulos				
Tirpios	5.21 ± 0.18	3.64 ± 0.12	4.90 ± 0.03	3.21 ± 0.05
Netirpios	34.22 ± 0.08	30.80 ± 0.11	28.78 ± 0.01	31.13 ± 0.28
Visos skaidulos	39.42 ± 0.26	34.44 ± 0.23	33.68 ± 0.04	34.33 ± 0.34
Krakmolas				
Visas	3.27 ± 0.23	2.81 ± 0.08	4.53 ± 0.41	4.00 ± 0.09
Prieinamas	1.78 ± 0.11	1.84 ± 0.13	1.84 ± 0.13	2.20 ± 0.24
Vitaminai (g/100 g s.m.)				
α- tokoferolis	0.19 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.48 ± 0.01	0.27 ± 0.02
γ- tokoferolis	20.1 ± 0.86	51.6 ± 0.5	11.19 ± 0.63	9.41 ± 0.16
δ- tokoferolis	0.25 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.24 ± 0.01
Tiaminas	0.36 ± 0.01	0.34 ± 0.01	1.49 ± 1.12	1.16 ± 0.07
Riboflavinas	0.61 ± 0.04	0.65 ± 0.05	0.85 ± 0.04	0.37 ± 0.02
Vitaminas C	6.48 ± 0.09	NP	2.56 ± 0.13	NP
NP - neaptinkama, s.m. – sausosios medžiagos				

1.1.1. Pagrindiniai lubinų baltymai

Lubinuose vyrauja dviejų klasių baltymai, kurie pagal Osborne klasifikaciją atitinka albuminų ir globulinų frakcijas. Jų kiekybinis santykis yra apie 1:9. Taip pat nedideliais kiekiais randama ir kitų frakcijų baltymų, įskaitant prolaminus. Veislės ypatumai gali turėti įtaką baltymų kokybinei ir kiekybinei sudėčiai [37].

Albuminai laikomi funkciniais baltymais. Daugelis iš jų yra metaboliniai fermentai, tiesiogiai arba netiesiogiai susiję su sėklaskilčių audinių apsaugos funkcija. Kiti albuminai vaidina svarbų vaidmenį augalų apsaugoje, pavyzdžiui, hidrolazių inhibitoriai ir lektinai. Jų lubinuose arba visai nėra, arba yra labai maži kiekiai [38].

Globulinai yra tipiniai druskoje tirpūs rezerviniai baltymai. Pirmąjį lubinų globulinų frakcijų išskyrimą atliko Blagrove ir Gillespie. Šie mokslininkai, naudodami celiuliozės acetato elektroforezės metodą, išskyrė keturias pagrindines baltųjų (*L. albus*) ir siauralapių (*L. angustifolius*) lubinų frakcijas, kurios buvo pavadintos α-, β-, γ- ir δ-kongliutenais. Tolesni tyrimai, naudojant izoelektrinį fokusavimą, parodė, kad α-, β- ir δ-kongliutenams būdingos rūgštinės savybės, o γ-kongliutenui – šarminės (žr. 1.2. lentelė) [42].

1.2 lentelė. Lubinų kongliutenų savybės

Kongliutenas	Baltymų šeima	% visų globulinų	Baltymų savybės			Monomerinė sudėtis				Baltymo funkcija lubinuose
			M_r, kDa	pl	Ketvirtinė struktūra	Subvieneto pavadinimas	M_r, kDa	pl	Glikozilinimas	
α	11S	35-37	330-430	5.1-5.8	Heksamerinė	Rūgštinis[a]	42-52	4.5-4.7	Taip/ne[b]	Rezervinė
						Bazinis[a]	20-22	6.7-8.6	Ne	
β	7S	44-45	143-260	5.0-6.0	Trimerinė	DMM	53-64	5.1-5.7	Taip	Rezervinė
						VMM	25-46	5.3-8.4	Taip/ne[b]	
						MMM	17-20	4.2-5.0	Taip/ne[b]	
γ	7S	4-5	200	7.9	Tetramerinė	Didelis[a]	29	8.2-8.9	Taip	Nežinoma
						Mažas[a]	17	5.8-6.6	Ne	
δ	2S	10-12	13	Rūgštinis	Monomerinė	Didelis[a]	9	4.1-4.3	Ne	Nežinoma
						Mažas[a]	4	n.d.	Ne	

DMM, VMM, MMM: atitinkamai, didelė, vidutinė ir maža molekulinė masė.
n.d.: nenustatyta.
[a] Kovalentiškai sujungti disulfidinėmis jungtimis.
[b] Ne visi polipeptidai yra glikozilinti.

α-Kongliutenas priskiriamas 11S globulinų šeimai. Lubinuose jis sudaro apie 35–37 % visų globulinų. α-Kongliutenas yra oligomerinis baltymas, sudarytas iš heksamerų; tačiau prieš pro-polipeptido proteolitinį konvertavimą į subvienetus, paplitusi α-kongliuteno forma yra trimeras. Lubinų α-kongliutenas yra randamas sėklaskilčių ląstelių vakuolėse ir jo, kaip atsarginės maisto medžiagos, vaidmenį patvirtina intensyvi proteolizė.

β-Kongliutenas priklauso 7S globulinų šeimai. Jo kiekis *L. albus* sėklose svyruoja tarp 44–45 %, todėl jis laikomas pagrindiniu lubinų baltymu. β-Kongliutenas yra trimerinis baltymas, kurio monomerus sudaro 16–70 kDa molekulinės masės polipeptidai. β-konglutino yra randama sėklaskilčių ląstelėse. Jis visiškai suskyla dygimo metu, tai rodo, kad jis taip pat yra atsarginė maisto medžiaga.

γ-Kongliutenas yra šarminis 7S šeimos baltymas, kuris vienodai tirpsta tiek vandenyje, tiek ir druskos tirpaluose. Šis baltymas sudaro apie 4–5 % bendro subrendusių lubinų baltymų kiekio [45]. Esant neutraliam pH, paplitusi γ-kongliuteno forma yra tetrameras arba heksameras [46]. Esant rūgštiniam pH, jis disocijuoja iki maždaug 50 kDa monomerų. Kiekvienas monomeras yra sudarytas iš dviejų disulfidiniais ryšiais sujungtų 17 ir 29 kDa subvienetų. γ-Kongliutenas randamas besivystančių lubinų baltymuose, taip pat dygstančių skilčialapių ekstra ląsteliniuose baltymuose. γ-Kongliuteno stabilumas sėklų dygimo metu ir *in vitro* tyrimų metu su įvairiais proteolitiniais fermentais rodo, kad tai ne atsarginė maisto medžiaga. γ-Kongliutenas išsiskiria ir kitomis savo

savybėmis: jis prisijungia dvivalenčių metalų jonus, ypač Zn^{2+} ir Ni^{2+} [53], esant plačiam pH verčių intervalui [54].

δ-Kongliutenas priklauso 2S albuminų šeimai. Lubinuose jis sudaro maždaug 10–12 %, tačiau kiti naujausi duomenys rodo mažesnį jo kiekį - apie 3–4 %. δ-Kongliutenas yra monomerinis mažos molekulinės masės baltymas, sudarytas iš dviejų subvienetų: (a), kurio molekulinė masė yra apie 4 kDa ir (b), kurio molekulinė masė yra apie 9 kDa. Dvi polipeptido grandinės yra sujungtos dviem disulfidiniais ryšiais Cys^{a8}-Cys^{b24} ir Cys^{a20}-Cys^{b13} arba Cys^{a20}- Cys^{b12}. Apie lubinų δ-kongliuteno tarpląstelinę lokalizaciją ir apie jo biologinę funkciją duomenų nėra [36].

Kiti svarbūs lubinų baltymai, randami nedideliais kiekiais, taip pat gali būti susiję su jų savybėmis ir tinkamumu maisto produktų gamybai. Pavyzdžiui, neseniai lubinuose buvo nustatytas Bowman Birk serino proteazės inhibitorius (BBI) [58]. Tai paneigia ankstesnius tyrimus, kad lubinuose nėra šios rūšies inhibitorių. Bendras baltymų inhibitorių aktyvumas lubinuose yra maždaug 10 % jų aktyvumo sojų pupelėse ir tris kartus didesnis, nei randama daržo žirniuose ar pupelėse [59]. Iš lubinų išskirtas BBI yra priskiriamas baltymų inhibitoriui, slopinančiam tripsiną, o ne labiausiai paplitusiam baltymų inhibitoriui, slopinančiam chimotripsiną. Todėl atliekama nemažai tyrimų, nagrinėjant potencialų antikancerogeninį arba priešuždegiminį įvairių BBI poveikį [60].

1.1.2. Maistinės lubinų savybės

Lubinų sėklas žmonės valgo nuo seniausių laikų. Iki šiol jos yra dažnai vartojamos kai kuriose Europos ir Lotynų Amerikos šalyse. Lubinai yra svarbus baltymų šaltinis žmonėms, nes jų biologinė vertė yra 91 % kiaušinių baltymų vertės. Naujai sukurtose saldžiųjų lubinų veislėse palyginus su kitomis lubinų rūšimis randama gana nedaug antimitybinių junginių, tokių kaip, alkaloidų ir oligosacharidų [31]. Baltųjų (*L. albus*) lubinų grūdų aminorūgščių indeksas (EAAI) ir baltymų efektyvumo koeficientas (PER) yra aukštesni už siauralapių (*L. angustifolius*) ir geltonųjų (*L. luteus*) lubinų [47]. Maistinės lubinų miltų ar baltymų koncentratų savybės tyrinėjamos gana plačiai, tačiau duomenų apie atskiras baltymų frakcijas nėra daug. Nepakeičiamų aminorūgščių sudėtis atskirose baltymų frakcijose pateikta 1.3 lentelėje [28, 47].

1.3 lentelė. Lubinų kongliutenų nepakeičiamos aminorūgštys

Kongliutenas	Dideliais kiekiais randamos aminorūgštys		Mažais kiekiai randamos aminorūgštys	
	Aminorūgštis	Kiekis, %	Aminorūgštis	Kiekis, %
α	Leucinas Izoleucinas	7.5 5.8	Metioninas Triptofanas	0.2 1.0
β	Leucinas Fenilalalinas	7.3 4.9	Metioninas+Cisteinas Triptofanas	tr. 0.1
γ	Leucinas Treoninas	9.4 7.4	Metioninas Triptofanas	0.8 1.1
δ	Leucinas Cisteinas	8.8 6.5	Metioninas Triptofanas	0.5 1.1
tr: pėdsakai				

1.1.3. Lubinų baltymų alerginis poveikis

Lubinų baltymų alerginis poveikis yra aktuali tema, kalbant apie jų panaudojimą maisto produktuose. Esant ribotam lubinų ir jų produktų naudojimui, iki šiol nėra atlikta sistemingų epidemiologinių tyrimų apie lubinų alergijos paplitimą. Dabartinis lubinų vertinimas yra grindžiamas rezultatais, gautais kryžminės reakcijos tyrimuose, kurie atskleidė tam tikras ūmines alergines reakcijas [66], ypač žemės riešutams jautriems žmonėms [67]. Nustatyta, kad kryžminio reaktyvumo norma lubinų miltams yra apie 30 % [68]. Remiantis šiais preliminariais tyrimais, lubinų baltymai gali sukelti alerginę reakciją lubinams jautriems žmonėms ir žmonėms, kurie yra jautrūs kitiems ankštiniams augalams, ypač žemės riešutams, dėl jų baltymų sekos/struktūros panašumų. Manoma, kad lubinų alergenai gali kryžmiškai reaguoti su žemės riešutų alergenais Arah 1 ir Arah 8. Tyrimais nustatyta, kad alergijas sukeliantys lubinų baltymai yra labai panašūs į Arah 1, taip pat į sojų pupelių β-kongliciną [69].

Nors duomenų yra per mažai, kad būtų galima identifikuoti svarbiausius lubinų alergenus, β-kongliutenas, pagrindiniai α-kongliuteno subvienetai ir γ-kongliutenas dažnai aptinkami prisijungę prie imunoglobulinų E (IgE). Lubinų alergenai pavadinimu *Lup an 1*, atitinkantys siauralapių (*L. angustifolius*) lubinų β-kongliuteną, visai neseniai buvo įtraukti į Tarptautinės imunologų draugijų sąjungos duomenų bazę (http://www.allergen.org). Iki šiol atliktuose tyrimuose nenustatytas δ-kongliuteno, priklausančio 2S baltymų šeimai, dažnai vadinamai pagrindiniais alergenais [70], reikšmingas imunologinis reaktyvumas [68]. Dėl šios priežasties lubinai ir jų produktai neseniai buvo įtraukti į 2006 m. gruodžio 22 d. Komisijos direktyvos 2006/142/EB, iš dalies keičiančios Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 2000/13/EB III a priedą, kuriame pateiktas alergijas sukeliančių sudedamųjų dalių, kurios bet kokiu atveju turi būti nurodytos maisto produktų etiketėse, sąrašas. Tai yra prevencinė priemonė, skirta apsaugoti vartotojus nuo ūmių alergijų, kurias gali sukelti maisto produktų, kurių sudėtyje yra lubinų, vartojimas [99].

1.1.4. Lubinų baltymų biologinis poveikis

Dažniausiai lubinų biologinis poveikis siejamas su tam tikrais jų cheminiais komponentais, pavyzdžiui, baltymais, skaidulinėmis medžiagomis, krakmolu, oligosacharidais, antioksidantais ir kt. [71, 73].

Nustatyta, kad lubinų γ-kongliutenas turi gliukozės kiekio kraujyje mažinimo poveikį ir gali sąveikauti su žinduolių hormonų grupės baltymu insulinu [54]. Žymus glikemijos indekso sumažėjimas gliukozės perteklių turinčioms žiurkėms buvo pastebėtas, davus joms išgryninto γ-kongliuteno. γ-kongliuteno gliukozės kiekį mažinantis poveikis gali būti lyginamas su metformino, gerai žinomo hipoglikemijos vaisto, poveikiu [75, 76].

Lubinų baltymai taip pat pasižymi plazmos cholesterolio ir trigliceridų kiekį mažinančiu poveikiu [75], antihipertenzines savybes [76], angiotenziną konvertuojantį fermentą (ACE) slopinančiu poveikiu [77].

1.2. Lubinų baltymų išskyrimo metodai

Lubinų baltymų izoliatai ir koncentratai yra perspektyvūs maisto ingredientai. Norint paruošti lubinų baltymų koncentratus su didesniu jų kiekiu, būtina papildomai juos apdoroti, kad būtų pašalinti kai kurie mažos molekulinės masės komponentai (vandenyje tirpūs angliavandeniai, mineralinės medžiagos ir kitos nedideliais kiekiais esančios medžiagos). Nebaltyminės sudedamosios dalys yra ekstrahuojamos vandeniniu alkoholio tirpalu, paliekant baltymus ir polisacharidus, kurie vėliau nusodinami ir liofilizuojami, siekiant gauti baltymų koncentratą [79].

Dažniausiai baltymų ekstraktų gamyba apima baltymų ekstrahavimą šarminėje terpėje ir jų nusodinimą izoelektriniame taške arba naudojant ultrafiltraciją. Bet šarminė terpė gali sukelti nepageidaujamus baltymų struktūros ir funkcinių savybių pokyčius. Siekiant kuo efektyviau išskirti augalinius baltymus atliekamas pirminis žaliavos apdorojimas: lukštenimas, malimas, virimas, mirkymas ir kt. procesai, kurie gali padidinti baltymų ekstraktų išeigą [79–85]. Gautų augalinių baltymų kokybė vertinama pagal jų aminorūgščių sudėtį bei virškinamumą. Baltymų izoliatų ir koncentratų savybes ir tolimesnį panaudojimą nulemia išgavimo metodika. [86].

Lubinų baltymų koncentratų gavimui taikomi sausieji ir šlapieji frakcionavimo būdai. Tvaresni yra sausieji [87]. Viso grūdo miltai gali būti frakcionuojami į baltymus, krakmolą, izoliatus ir koncentratus naudojant šlapią arba sausą apdorojimą [81, 84, 88–90].

Dervas nustatė, kad siekiant gauti kuo didesnį kiekį baltymų iš lubinų miltų, būtina prieš tai pašalinti mažos molekulinės masės junginius (vandenyje tirpius sacharidus, mineralines medžiagas) [91]. Jayasena lubinų baltymams ekstrahuoti naudojo alkilinimą šarminėje terpėje (pH 9,0) [92].

Trys pagrindiniai lubinų kongliutenų išskyrimo metodai buvo sukurti per pastaruosius metus (žr. 1.4 lentelė). Vienas iš jų skirtas išgauti visas išgrynintas baltymų frakciją laboratorinėmis sąlygomis, kitas - pramoniniam dalinai išgrynintų lubinų baltymų frakcijų išskyrimui; trečiasis buvo sukurtas baltymų frakcijų išskyrimui laboratorinėmis sąlygomis, tačiau gali būti taikomas pusiau pramoniniu būdu, siekiant išgauti tris didesnio grynumo baltymų frakcijas nei išgaunama pramoniniu būdu [105].

Baltymų išskyrimas laboratorinėmis sąlygomis. Nuriebinti lubinų miltai yra ekstrahuojami, neutraliu arba šiek tiek šarminiu buferiniu tirpalu, kurio sudėtyje yra NaCl, santykiu 1:20, keletą valandų, pastoviai maišant ir esant 4 °C temperatūrai. Suspensija yra centrifuguojama ir baltymai iš supernatanto yra išskiriami gelfiltracijos arba ultrafiltracijos būdu. Gautas ekstraktas yra frakcionuojamas anijonų mainų chromatografijos metodu (pavyzdžiui, naudojant Whatman DEAE celiuliozę DE 52), esant pH 7,5. Esant šioms sąlygoms, gryna γ-kongliuteno frakcija neužsilaiko kolonėlėje. β-kongliutenas yra išskiriamas, naudojant 0,27 M buferinio tirpalo-ekstrahento joninę jėgą, o α- ir δ-kongliutenai – 0,37 M. Kad atskirti δ-kongliuteną nuo α-kongliuteno, taikoma afininė (gimiringumo) chromatografija, naudojant konkanavaliną A. α- ir β-kongliutenai gali būti papildomai gryninami TSKgel DEAE 5PW kolonėlėje, esant pH 7,5. Melo Ferreira & Teixeira pasiūlė tam tikrus šios gryninimo sistemos pakeitimus. Frakcija, kurios sudėtyje yra γ-kongliuteno, parūgštinama acto rūgštimi iki pH 4,5, po to γ-konglutinas išskiriamas anijonų mainų kolonėlėje, naudojant Whatman CM celiuliozę ir 0,35 M joninę jėgą [105].

Baltymų išskyrimas gamybinėmis sąlygomis. Šis metodas buvo sukurtas Fraunhofer institute (Vokietija) ir aprašytas Wäsche, Müller ir Knauf. Jis apima baltymų ekstrakciją, esant šarminiam terpės pH, ir α-, β- ir δ-kongliutenų nusodinimu izoelektriniame taške, esant rūgštiniam pH. Ši baltymų frakcija buvo pavadinta „E tipo“ ir pasižymi geromis emulsijų sudarymo savybėmis. Supernatante likęs γ-kongliutenas išgaunamas ultrafiltracijos būdu ir stabilizuojamas džiovinant. Ši γ-kongliutenu turtinga frakcija buvo pavadinta „F tipo“ ir pasižymi geromis putų sudarymo savybėmis [105].

Baltymų išskyrimas pusiau gamybinėmis sąlygomis. Šiame metode taip pat taikoma baltymų ekstrakcija šarminėje terpėje, po to rūgštinis α-, β- ir δ-kongliutenų nusodinimas, paliekant supernatante γ-kongliuteną. γ-Kongliutenas toliau gryninamas ir išgaunamas, nusodinant su Zn^{2+}. α-, β- ir δ-Kongliutenai resuspenduojami natrio acetate, kurio sudėtyje yra 0,4 M NaCl ir 40 % etanolio (pH 4,0), maišant suspensiją 1 h kambario temperatūroje. Tai padidina δ-kongliuteno tirpumą, todėl po centrifugavimo jis lieka skystyje virš α- ir β-kongliutenų nuosėdų. δ-kongliuteno netirpi forma išgaunama naudojant šaltą nusodinimą, t. y. išlaikant skystį -20 ^{o}C temperatūroje 24 h [36].

1.4 lentelė. Lubinų konglutinų izoliatų procedūrų schema

	Laboratorinėmis sąlygos	Gamybinėmis sąlygomis	Pusiau gamybinėmis sąlygomis
Žaliava	Miltai	Miltai, dribsniai	Miltai
Baltymų ekstrakcija	Neutralus pH 0.5 M NaCl	Šarminė terpė	Šarminė terpė
Frakcionuojant	Anijonų mainų chromatografija ConA chromatografija Katijonų mainų chromatografija Insulino chromatografija	Izoelektrinis nusodinimas, pH 4.0 - 5.0	Izoelektrinis nusodinimas, pH 4.0 - 5.0 rūgštinio vandens, etanolio nusodinimas nusodinimas su Zn^{2+}
Galutinis baltymų produktas, konglutinai	α δ β γ	α+β+δ γ	α+β δ γ

1.3. Lubinų baltymų panaudojimas maisto pramonėje

1.3.1. Lubinų koncentratai ir izoliatai

Dėl didelio baltymų kiekio lubinai yra plačiai naudojami įvairių maisto produktų gamybai [33, 36, 95, 97, 110, 122]. Lubinų miltai dažnai naudojami įvairiuose kepiniuose kaip kiaušinių pakaitalas, pavyzdžiui, sausainiuose, pyraguose, blynuose, makaronuose, traškučiuose, duonoje. Jie taip pat naudojami kaip sviesto pakaitalas pyraguose ir prancūziškuose rageliuose. Lubinų sudėtyje nėra glitimo, todėl kartais jie naudojami kaip funkcinis ingredientas maisto produktų be glitimo baltymų gamybai [99].

Lubinų baltymų koncentratai (kurių sudėtyje yra 60–70 % baltymų) [47, 94, 105] ir izoliatai (90 % baltymų sausosiose medžiagose) maisto produktuose gali būti papildomu baltymų šaltiniu [31], pasižyminčiu geromis funkcinėmis ir maistinėmis [44, 102, 109] bei technologinėmis savybėmis [96, 103]. Be to, lubinų baltymai turi tam tikrų papildomų privalumų: jie yra technologiškai lengviau apdorojami, jų denatūravimo temperatūra yra aukštesnė nei gyvūninių baltymų [94].

Daugiausia informacijos literatūroje randama apie E tipo ir F tipo lubinų baltymų izoliatų, kurie pasižymi specifinėmis savybėmis, panaudojimą [105].

E tipo baltymų izoliatas, sudarytas yra α-, β-, ir δ-kongliutenų, išsiskiria labai geromis emulsijų sudarymo ir emulsijų stabilumo savybėmis, palyginus su panašiomis frakcijomis, gautomis iš kitų ankštinių augalų, o F tipo baltymų izoliatas, kuriame yra γ-kongliutenų, pasižymi tirpumu plačiose pH ribose ir turi geras putų sudarymo ir putų stabilumo savybes [104, 108].

Atskiros lubinų baltymų frakcijos puikiai tinka tokių aukštesnės vertės maisto produktų, kaip makaronų, traškučių, duonos, pyrago kepinių ir miltinės konditerijos gaminių, padažų, majonezų,

zefyrų, mėsos gaminių kūrimui [22]. Lubinų baltymų izoliatai buvo sėkmingai išbandyti keksų gamyboje, pilnai pakeičiant jais kiaušinių ir pieno baltymus, taip pat baltymais praturtintų dietinių sausainių gamyboje. Makaronų, praturtintų lubinų baltymų izoliatais ir koncentratais, paruošimo būdas yra užpatentuotas. Neseniai kaip naujas produktas buvo pasiūlyti lubinų traškučiai, kurie gali būti dedami kaip ingredientas į salotas, sriubas [108].

1.3.2. Lubinų priedų įtaka kepinių kokybei

Lubinų miltais galima keisti dalį kvietinių miltų, siekiant pagerinti kepinių maistinę vertę [110]. Nustatyta, kad iki 10 % lubinų miltų priedas gerina miltų vandens įgėrimą, kepinio kvapą, skonį, tekstūrą, ilgina tinkamumo vartoti trukmę [22]. Taip pat nustatyta, kad 5 % lubinų miltų priedas padidino tešlos stabilumą ir kokybės skaičių, tačiau toliau didinant lubinų miltų kiekį, tešlos maišymo trukmė ilgėjo, o tešlos stabilumas mažėjo [113].

Išskirtinės kvietinių miltų kepimo savybės labiausiai susijusios su juose esančių glitimo baltymų pajėgumu suformuoti klampiai elastingą tinklą, sumaišius juos su vandeniu. Kvietinių miltų tešlos klampiai elastingų savybių silpnėjimas pridėjus lubinų priedo, mažina jų tinkamumą duonos gamybai: mažina kepinio tūrinę apimtį ir turi neigiama įtaką jo tekstūrai. Kepinio tūrio mažėjimo priežastis yra ta, kad sumažėjus glitimo baltymų kiekiui, mažėja tešlos dujų sulaikymo pajėgumas kildinimo ir kepimo metu [113].

Kvietinių miltų pakeitimas lubinų miltais taip pat sumažino plutos spalvos intensyvumą, o minkštimo spalva tapo geltonesnė [110], jo tekstūra buvo tankesnė [113]. Lubinų miltų ir baltymų koncentratų geltonos spalvos intensyvumą galima sumažinti, naudojant citrinos rūgštį (1 %) [117].

Tačiau lubinų miltų geltona spalva gali būti pageidautina makaronų gamyboje [113]. Naudojant spagečių gamybai iki 5 % lubinų baltymų izoliato priedą, galima pagaminti aukštesnės vertės produktą, pasižymintį priimtina spalva, patenkinamomis virimo ir geromis maistinėmis savybėmis. Tose šalyse, kur makaronai yra kasdieninis maisto produktas, tokių spagečių paros normos suvartojimas (sausas svoris nuo 80 g iki 100 g) atitiktų 4–5 g lubinų baltymų suvartojimą, t. y. 1/5 dozės, kurią kiekvienas padidėjusį cholesterolio kiekį turintis žmogus turėtų suvartoti, siekiant sumažinti širdies ir kraujagyslių ligų riziką [118]. Nustatyta, kad ankštinių augalų fitochemikalai turi teigiamą poveikį širdies darbui ir kraujagyslėms [119]. Tyrimai parodė, kad siauralapių (*L. angustifolius*) lubinų fenoliniai junginiai, nepaisant silpnų jų antioksidacinių savybių, gali turėti teigiamą poveikį, mažinant širdies ir kraujagyslių ligų riziką bei apsauginį poveikį kraujagyslėms [120].

1.3.3. Lubinų savybės sudaryti putas ir emulsijas

Lubinų grūdų baltymai yra labai tirpūs esant pH > 5,5 ir turi geras vandens ir riebalų surišimo savybes, putų ir emulsijų sudarymo savybes [94, 121].

Lubinų miltai gali būti naudojami kaip kiaušinių albumino pakaitalas – putas sudaranti medžiaga maiste. Nustatyta, kad lubinų baltymų koncentrato putos savo tekstūra ir mikrostruktūra yra labai panašios į nevirto kiaušinio baltymo putas ir išlaiko stabilumą net po 36 h [110]. Lubinų lipidai turi įtakos jų putų sudarymo savybėms ir struktūrai. Daugiau poliniai lipidai (glikolipidai, fosfolipidai) veikia kaip putų stabilizatoriai, o mažiau poliniai lipidai (trigliceridai) yra silpno paviršinio aktyvumo ir linkę formuoti sutirštintus monosluoksnius, kurie gali būti lengvai desorbuojami [110]. Xu ir Mohamed nuomone, lubinų nuriebinimas nepažeidžia lubinų baltymų ar kitų sudedamųjų dalių ir pagerina jų putų sudarymo savybes [122], tačiau Pollard ir kt. teigia, kad nuriebintų baltymų miltų ir koncentratų putos yra mažiau standžios nei nenuriebintų [110]. Riebalų ekstrahavimo metodas taip pat gali turėti didelį poveikį lubinų savybėms ir funkcionalumui. Naudojant riebalų ekstrakcijai kaip tirpiklį *n*-heksaną, pašalinami nepoliniai lipidai (pavyzdžiui, trigliceridai) ir poliniai lipidai (pavyzdžiui, riebalų rūgštis ir fosfolipidai). Naudojant kaip tirpiklį metanolį, išskiriami nepoliniai lipidai [122].

Lubinų baltymams taip pat būdingos emulsijų sudarymo savybės, todėl jie gali būti naudojami riebalų stabilizavimui. Be to, dėl lubinų baltymų savybės sudaryti gelį, jie gali būti naudojami apdoroto/virto produkto struktūrai pagerinti [21]. Teigiama, kad lubinų baltymų koncentratai, lyginant su lubinų miltais, pasižymi geresnėmis emulsijų sudarymo savybėmis ir prastesniu jų stabilumu [110]. Raymondo ir kt. nustatė, kad lubinų baltymų emulsijos stabilumą galima padidinti šiluminio apdorojimo būdu. Lubinų emulsinės savybės yra svarbios funkcinės savybės, plečiant lubinų panaudojimą maisto produktų gamyboje [110, 125].

1.4. Fermentinės hidrolizės taikymas baltymų maistinėms ir funkcinėms savybėms pagerinti

Vienas iš maisto žaliavų perdirbimo tikslų yra pagerinti produktų maistine vertę ir funkcines savybes, pavyzdžiui, geresnis virškinamumas, juslinės savybės (tekstūra, skonis), biologinis aktyvumas (geresnės antioksidacinės savybės, sumažintas alerginių junginių kiekis). Daugelis šių savybių gali būti gaunamos taikant baltymų hidrolizę specifinėmis proteazėmis. Fermentai ir hidrolizės laipsnis turi būti parenkami, atsižvelgiant į norimas skonines savybes, tirpumą ir kitas funkcines hidrolizuoto produkto savybes [127].

1.4.1. Baltymų funkcinių savybių pokyčiai

Baltymų funkcinės savybės – tai fizikinės ir cheminės savybes, kurios lemia jų panaudojimą maisto produktuose. Taikant baltymų hidrolizę, galima modifikuoti funkcines baltymų savybes, įskaitant tirpumą, gelio, emulsijų ir putų sudarymą. Be to proteolizė mažina baltymų molekulinę masę, padidina jonizuojamų grupių skaičių, gali susidaryti hidrofobinės grupės, kurios keičia fizines ir chemines sąveikas [130, 132–134]. Tačiau hidrolizės sąlygas reikia kontroliuoti, kad būtų išvengta per didelio baltymų suskaidymo, kuris gali pakeisti jų funkcionalumą ir turėti neigiamą poveikį juslinėms savybėms, pavyzdžiui, susidaryti kartaus skonio peptidai [130].

Baltymų tirpumas priklauso nuo jų hidrofobinių bei elektrostatinių sąveikų. Įvairiuose literatūros straipsniuose teigiama, kad hidrolizės metu baltymų tirpumas didėja [135–137]. Didesnis hidrolizuotų baltymų tirpumas dažniausiai susijęs su padidėjusiu nedidelės molekulinės masės peptidų bei jonizuojamų amino- ir karboksigrupių kiekiu. Zhao ir kt. teigia, kad žemės riešutų baltymų izoliatų hidrolizė fermentiniu preparatu Alcalase pagerino baltymų tirpumą ir tai buvo susiję su paviršiaus hidrofobiškumo sumažėjimu. Tačiau hidrolizės procesai turi būti kontroliuojami, siekiant padidinti baltymų tirpumą [134]. Hidrolizatuose gali susidaryti hidrofobiniai peptidai, dėl kurių didėja peptidų agregacija, mažinanti tirpumą [132, 138]. Paraman ir kt. pastebėjo, kad esant stipriems hidrofobiniams ryšiams ir sulfhidrilinių grupių sąveikoms, hidrolizuotų baltymų tirpumas mažėjo, net ir esant dideliam hidrolizės laipsniui [139].

Emulsijų sudarymo pajėgumas yra svarbi baltymų savybė, kuri didina jų panaudojimą maisto produktų gamyboje [133]. Baltymai gali turėti amfifilinių savybių, susijungti ir formuoti vientisas membranas aplink riebalų lašelius. Nustatyta, kad baltymų emulsijų sudarymo savybės priklauso nuo jų hidrofobiškumo ir aminorūgščių sudėties. Didėjant baltymų tirpumui ir hidrofobiškumui, didėja ir emulsijų sudarymo pajėgumas ir jų stabilumas. Didžiausias emulsijų sudarymo pajėgumas gaunamas, esant mažam baltymų hidrolizės laipsniui ir didesniam didelės molekulinės masės peptidų kiekiui riebalų ir vandens sąveikos paviršiuje. Turgeon ir kt. gauti rezultatai parodė, kad β-laktoglobulino hidrolizė tripsinu sumažino jo emulsijų sudarymo pajėgumą, kadangi susidarę mažos molekulinės masės peptidai prarado gebėjimą sąveikauti su vandenine ir nevandenine fazėmis [64].

Baltymų savybė sudaryti gelį reikalauja įprastos baltymo struktūros išsilankstymo. Gelio sudarymui kaip pradinė medžiaga reikalingas tam tikros grandinės ilgio baltymų tirpalas. Paprastai proteolizės metu susidarę mažos molekulinės masės peptidų sumažina baltymų pajėgumą sudaryti gelį [48]. Tačiau mažo laipsnio baltymų hidrolizė gali pagerinti gelio sudarymo savybes. Damrongsakkul ir kt. žaliavinės odos hidrolizei naudojo papainą ir fermentinį preparatą Neutrase, hidrolizės papainu produktas (su didesnės molekulinės masės peptidų fragmentais) pasižymėjo

didele klampa ir pajėgumu sudaryti gelį, o hidrolizės Neutrase produktas buvo labai mažos klampos [57].

Hrckova ir kt. nustatė, kad nuriebintų sojos miltų apdorojimas trimis skirtingomis proteazėmis (Flavourzyme 1000 L, Novozym FM 2,0 L ir Alcalase 2,4 L FG) pagerino jų putų ir gelio sudarymo savybes. Nors hidrolizės visais šiais fermentais laipsniai buvo panašūs, dėl jų specifiškumo gauti hidrolizatai pasižymėjo skirtingomis savybės, ypač kai buvo naudojamas Flavourzyme. Flavourzyme (iš *Aspergillus oryzae*) yra endo- ir egzopeptidazių mišinys, o Alcalase ir Novozym proteazės (iš *Bacillus licheniformis*) yra serino endopeptidazės. Geresnės gelio sudarymo savybės išryškėjo, esant trumpalaikei baltymų hidrolizei. Kai apdorojimo *Alcalase* trukmė buvo iki 60 min, susidarę peptidai pasižymėjo geresniu gelio sudarymo pajėgumu nei natyvinis baltymas. Tačiau po 60 min hidrolizės hidrolizatai nesudarė jokio gelio [98]. Yust ir kt. pateikė tyrimų rezultatus apie fermentinio preparato *Alcalase* panaudojimą avinžirnių baltymų funkcinėms savybėms pagerinti. Visi hidrolizatai pasižymėjo geresnėmis funkcinėmis savybėmis, pavyzdžiui, tirpumu ir putų sudarymo pajėgumu, nei pats avinžirnių baltymų izoliatas [63].

1.4.2. Baltymų alerginio poveikio mažinimas

Alergija maistui yra apibrėžiama kaip nepageidaujama imunologinė reakcija į maisto produktus, kuri gali būti susijusi su IgE antikūniais, arba ne. Daugelis alergenų yra baltymai. Baltymo alergeniškumas (gebėjimas sukelti alergines reakcijas) priklauso nuo epitopų (alergeno dalių, sąveikaujančių su specifiniais antikūnais ar T limfocitais) skaičiaus. Priklausomai nuo pirminės baltymo struktūros, epitopas gali būti linijinis arba konformacinis. Konformaciniai epitopai yra lengvai suardomi maisto gamybos metu, pavyzdžiui, termiškai apdorojant. Bet norint suardyti linijinius epitopus, būtina suardyti konkrečias aminorūgščių sekas baltymų grandinėje, tokiais atvejais, peptidinių jungčių skaidymas yra vienas iš sprendimo būdų [100, 104].

Hidrolizuoti baltymai (8000–20000 Da molekulinės masės peptidai) vadinami hipoalerginiais [129, 131]. Kruopštus fermento pasirinkimas ir taikomas hidrolizės būdas gali žymiai sumažinti baltymų alergiškumą, kuris priklauso nuo hidrolizės laipsnio ir filtravimo metodų, naudojamų pašalinti likusius baltymus. Norint gauti saugų hipoalergišką produktą, būtinas hidrolizatų ultrafiltravimas [128].

Norint sumažinti alergiškumą, daugeliui baltymų reikalingas didelis hidrolizės laipsnis. Tačiau ne visos protezė pasižymi tokiu poveikiu. Cabanillas ir kt. tyrė skrudintų žemės riešutų baltymą, kuris buvo hidrolizuotas Alcalase ir Flavourzyme fermentiniais preparatais. Naudojant Flavourzyme, po 300 min hidrolizės IgE reaktyvumas sumažėjo 65 %, bet 30 min apdorojimas

Flavourzyme sukėlė IgE reaktyvumo padidėjimą. Tuo tarpu naudojant Alcalase, IgE reaktyvumo sumažėjo 100 % [126].

Litertūroje pateikiami duomenys apie tripsino ir pepsino panaudojimą tokių ankštinių augalų, kaip saldieji lubinai, avinžirniai, lęšiai, baltymų hidrolizei, siekiant sumažinti jų alergiškumą. Avinžirnių ir lęšių baltymų imunogeninis poveikis išnyko po kelių minučių fermentinio apdorojimo, bet saldžiųjų lubinų baltymų hidrolizatų antigeninis aktyvumas mažėjo palaipsniui. Antigeniniai epitopai, esantys hidrolizate, buvo visiškai sunaikinti po 30 min hidrolizės tripsinuo, o po hidrolizės pepsinu vis dar turėjo apie 23 % antigeniškumo [124].

Sojos baltymai turi ne mažiau kaip 16 IgE baltymų, kurių molekulinė masė nuo 7,5 iki 97 kDa ir kurie gali sukelti klinikinę alergiją, todėl atliekama daug tyrimų, siekiant kontroliuoti šių baltymų sukeliamas alergijas ir įvertinti fermentavimo metodų tinkamumą jų alerginiam reaktyvumui sumažinant [123].

1.4.3. Skonio savybių gerinimas

Nepaisant to, kad baltymų hidrolizatai, gauti esant dideliam hidrolizės laipsniui, gali būtinaudojami įvairiems tikslams, pavyzdžiui, kaip hipoalerginiai produktai ar didelio tirpumo baltymai, planuojant naudoti šiuos hidrolizatus žmonių mitybai, svarbus veiksnys, į kurį reikia atsižvelgti, yra skonio medžaigų formavimasis. Priklausomai nuo naudojamų baltymų ir fermento tipo, hidrolizės metu gali būti gaunami kartaus skonio peptidai. Tyrimai rodo, kad egzistuoja koreliacija tarp kartaus skonio ir peptidų grandinės ilgio, hidrofobiškumo, N-galinės ir C-galinės aminorūgšties [115, 116]. Teisingas fermento parinkimas gali sumažinti nemalonaus skonio medžiagų susidarymą baltymų hidrolizės metu.

Kodera ir kt. nustatė, kad baltymų hidrolizatai gauti, naudojant D3 proteazę (išgrynintą fermentą iš daigintų sojų skilčialapių), yra žymiai mažiau kartus nei hidrolizatai, gauti naudojant subtiliziną, pepsiną, tripsiną ir termoliziną [114]. Dėl D3 proteazės specifiškumo, dauguma hidrofobinių aminorūgščių liekanų hidrolizate nėra peptido gale, kaip gali atsitikti, jei bus naudojamas pepsinas. Arai ir kt. duomenimis, kartieji peptidai, išskirti iš sojos baltymų hidrolizatų, gautų naudojant virškinimo fermentus, turėjo galinę aminorūgštį leuciną, bet, kai buvo naudojama karboksipeptidazė, kuri ardo C-galines struktūras, kartus skonis žymiai sumažėjo. Wróblewska ir kt. tyrė skirtingų fermentų (komercinės proteazės Alcalase, papaino ir pepsino) ir jų kiekių įtaką hidrolizatų savybėms. Buvo pastebėti baltymų hidrolizatų priimtinumo skirtumai: Alcalase ir papainu hidrolizuoti produktai pasižymėjo mažiausiu kartaus skonio intensyvumu ir didžiausiu bendru priimtinumu [112]. Tačiau yra atvejų, kai kartieji peptidai gali būti pageidautini, pavyzdžiui, sūrių gamyboje. Sūrių gamybos ir nokinimo metu laipsniška proteolizė yra būtina sąlyga teisingam

Camembert ar Brie sūrių skonio formavimuisi. Egzogeninė proteazė gali būti pridedama, siekiant paspartinti nokinimo procesus [107, 111].

1.4.4. Bioaktyvių peptidų susidarymas

Bioaktyvūs peptidai – tai specifiniai baltymų fragmentai, kurie turi teigiamą poveikį organizmo funkcijoms ir sveikatai [106]. Įvairūs peptidai, priklausomai nuo jų aminorūgščių sudėties ir sekos, gali turėti teigiamą poveikį širdies ir kraujagyslių ligų gydymui, virškinimui, imuninei ir nervų sistemai [93, 101].

Dažniausiai biologiškai aktyvūs peptidai gaunami vykstant baltymų hidrolizei virškinimo metu ar mikrobinės fermentacijos būdu. *In vitro* fermentiniai procesai yra plačiai tyrinėjami [78, 93]. Pepsinas, chimotripsinas ir ypač tripsinas yra plačiai naudojami, imituojant virškinimo poveikį peptidų susidarymui. Komercinės proteazės, pavyzdžiui, Alcalase ar Termolizinas taip pat naudojamos peptidų gamybai. Nors peptidai gali susidaryti natūraliai virškinimo metu, naudojant komercinius fermentinius preparatus galima gauti skirtingo aktyvumo peptidus [93]. Tokių peptidų bioaktyvumo mechanizmai ne visiškai išaiškinti, paskelbta tik keletas tyrimų apie jų struktūros ir aktyvumo ryšį. Tyrimais nustatyta, kurią proteazę reikia pasirinkti, norint gauti pageidaujamo poveikio peptidus. Pavyzdžiui, angiotenziną konvertuojančio fermento (AKF) inhibitoriai – paprastai yra trumpos grandinės peptidai, kurių sudėtyje yra nuo 2 iki 12 aminorūgščių. Tyrimai rodo, kad efektyviausi AKF slopina peptidai, turintys hidrofobinių (aromatinių arba šakotosios grandinės) aminorūgščių C-galinėje pozicijoje [74, 106]. Tai gali padėti paaiškinti, kodėl hidrolizė pepsinu (atskelia hidrofobines liekanas) arba tripsinu (atskelia argininą ir liziną) naudojama antihipertenzinių peptidų gamybai. Išrūgų baltymų β-laktoglobulinų hidrolizės produktas – peptidas Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg pasižymi AKF inhibiciniu poveikiu ir gali būti gaunamas, naudojant tripsiną [72]. Tyrimai rodo, kad AKF slopinančiu poveikiu pasižymi peptidai, turintys aminorūgštį proliną C-galinėje pozicijoje, kuri yra atspari virškinimo proteazėms, todėl tokių peptidų gamybai reikalingos bakterinės ar grybinės proteazės [62, 78]. Be to, kai kurie peptidai, gauti veikiant β-kazeiną *Lactobacillus* fermentais, pavyzdžiui, Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile arba Ser-Lys-Val-Tyr-Pro, yra atsparūs virškinimo fermentams, taip pat rūgštiniam ir šarminiam terpės pH, todėl taip pat gali būti įdomūs farmakologiniu požiūriu [61].

Klompong ir kt. teigia, kad geltonųjų dryžuotųjų žuvų (*Selaroidesleptolepis*) baltymų hidrolizatų antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo jų hidrolizės laipsnio ir nuo pasirinkto fermento. Esant mažam hidrolizės laipsniui (5 %), hidrolizatai, gauti naudojant proteazės preparatą Alcalase, pasižymėjo didesniu DPPH radikalų susirišimo aktyvumu, nei gauti, esant dideliam

hidrolizės laipsniui (25 %); proteazės preparatas Flavourzyme buvo dar efektyvesnis [59]. Žemės riešutų baltymų antioksidacinis ir AKF inhibitorinis aktyvumas taip pat priklausė nuo hidrolizės fermetiniu preparatu Alcalase laipsnio [56]. Peptido antioksidacinis aktyvumas gali būti siejamas su gebėjimu slopinti žalingus lipidų pokyčius oksidacijos metu ir priklauso nuo tam tikrų aminorūgščių, pavyzdžiui, tirozino, histidino, metionino ir triptofano buvimo peptiduose. Galima teigti, kad hidrolizatų antioksidacinės savybės priklauso nuo hidrolizei naudojamų fermentų [55]. Pedroche ir kt. nustatė, kad cholesterolį mažinančiu poveikiu, antioksidaciniu aktyvumu ir AKF inhibitoriniu aktyvumu pasižymi 1400–1800 Da masės peptidai, gauti atliekant nuoseklią hidrolizę tripsinu ir chimotripsinu [52].

2. Tyrimų objektai ir metodai

2.1. Tyrimų objektai

2.1.1. Lubinų sėklos

Tyrimo objektu pasirinkti Lietuvoje selekcionuojamos veislės Nr. 1710 siauralapiai lubinai (*Lupinus angustifolius* L.), užauginti 2014 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Žemdirbystės instituto Vokės filiale. Šios veislės lubinai išsiskiria mažu alkaloidų kiekiu sėklose (0,039–0,064 %), dideliu atsparumu grybinėms ligoms, sparčiu augimu visais augalų vystymosi tarpsniais bei dideliu sėklų derliumi (2,3–2,9 t/ha^{-1}) [1]. Tyrimams lubinų sėklos sumaltos Pranciškaus Jokubausko malūne (Kaunas) iki 1mm dydžio dalelių.

2.1.2. Fermentiniai preparatai

Lubinų baltymų hidrolizei Novozymes A/S (Danija) fermentiniai preparatai: endoproteazės Alcalase, Neutrase, Protamex ir egzopeptidazių/endoproteazių kompleksas Flavourzyme. Endoproteazės veikdamos atskelia peptidines jungtis polipeptido grandinės viduje, o egzopeptidazės – grandinės galuose. Gamintojo duomenimis, Alcalase fermentiniame preparate yra serino tipo endoproteazė iš *Bacillus licheniformis*, kuri turi labai platų substrato specifiškumą, t. y. gali hidrolizuoti dauguma peptidinių jungčių baltymų molekulėse. Neutrase yra bakterinė neutrali proteazė iš *Bacillus amyloliquefaciens*, dažnai naudojama komerciniais tikslais. Protamex proteazių kompleksas gaminamas iš *Bacillus* spp. ir skirtas hidrolizuoti baltymus maisto produktuose. Flavourzyme – tai egzopeptidazės ir endoproteazės kompleksas iš *Aspergillus oryzae*, todėl pasižymi didžiausiu hidrolizės laipsniu. Ruošiant baltymų hidrolizatus, rekomenduojama šių fermentinių preparatų dozė 50–100 g/100 kg produkto. Optimalios atskirų fermentų veikimo sąlygos pateiktos 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Optimalios proteazių veikimo sąlygos

Proteazės	**Optimalus pH**	**Optimali temperatūra (°C)**	**Didžiausias hidrolizės laipsnis %**
Alcalase	8	50–60	15–25
Neutrase	7	40–50	10–15
Protamex	7–8	50	10–20
Flavourzyme	5.5–7.5	50–55	~60

Siekiant kontroliuoti funkcines hidrolizatų savybes, svarbu laiku sustabdyti fermentinę reakcija. Visos proteazės gali būti negrįžtamai inaktyvuojamos terminio apdorojimo metu. 2.2 lentelėje pateiktos rekomenduojamos proteazių inaktyvavimo sąlygos.

2.2 lentelė. Proteazių inaktyvavimo sąlygos

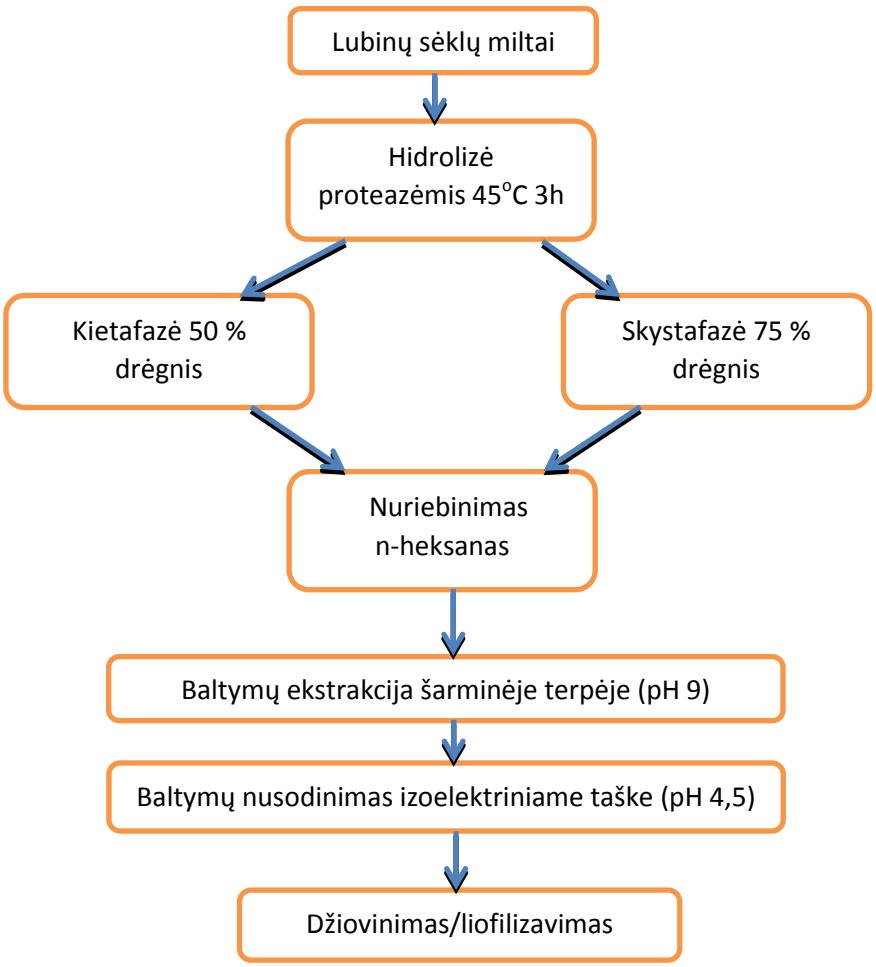
Proteazės	**pH**	**Temperatūra (C°)**	**Laikas (min.)**
Alcalase	4 8	50 85	30 10
Flavourzyme	6–8	90	10
Neutrase	4 7	50 80	30 5
Protamex	4 8	50 85	30 10

2.1.3. Lubinų baltymų hidrolizatų gamyba

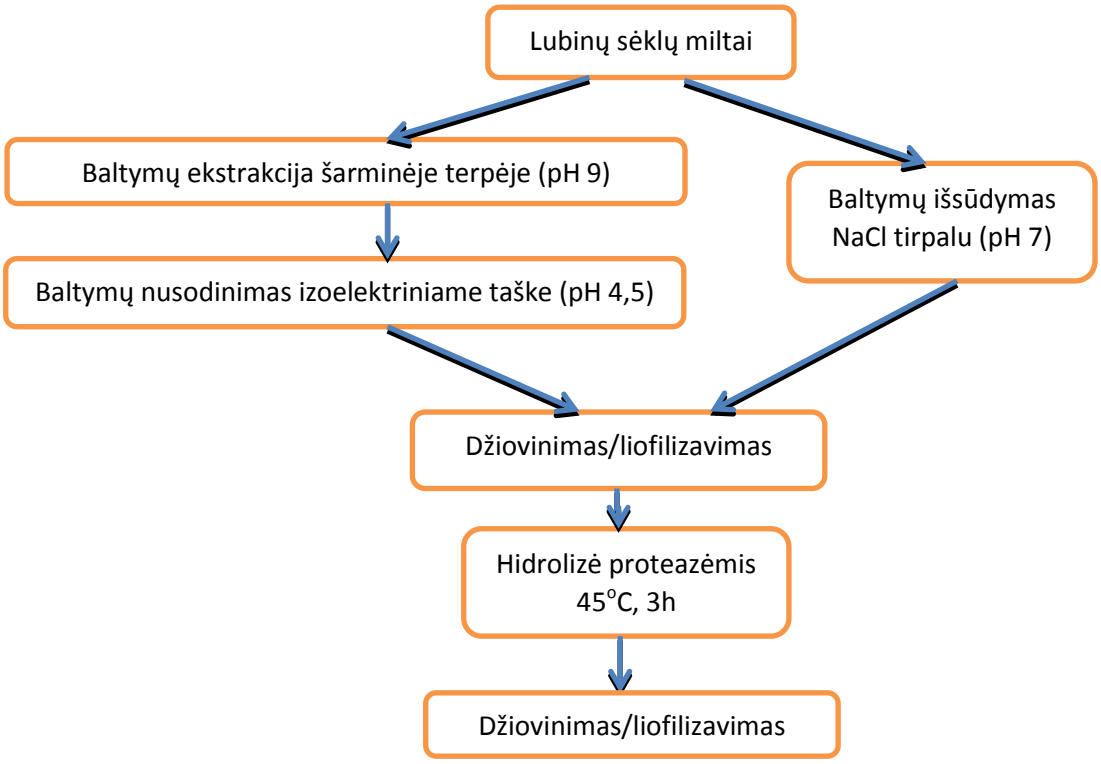
Baltymų hidrolizatų gamybai taikyti įvairūs jų hidrolizės ir išskyrimo būdai:

I- baltymų hidrolizė ir išskyrimas iš nuriebintų lubinų miltų (2.1 pav.);

II- baltymų hidrolizė ir išskyrimas iš nenuriebintų lubinų miltų (2.2 pav.).



2.1 pav. Baltymų hidrolizė ir išskyrimas iš nuriebintų lubinų miltų.



2.2 Pav. Baltymų hidrolizė ir išskyrimas iš nenuriebintų lubinų miltų.

Pirmuoju atveju, pradžioje atlikta lubinų miltų hidrolizė (kietafazė ir skystafazė). Po to hidrolizuoti miltai nuriebinti, naudojant kaip tirpiklį n-heksaną. Nuriebinimas vykdytas 80 ºC temperatūroje 2 h Soksleto aparate.

Lubinų miltų hidrolizei taikyti 2 būdai: kietafazis (50 % drėgnis) ir skystafazis (75 % drėgnis). Tam 1000 g lubinų miltų, kurių drėgnis 11 %, sumaišyta, atitinkamai, su 445 ml ir 557,5 ml H_2O. Hidrolizei naudoti įvairūs proteolitiniai fermentiniai preparatai (žr. 2.1 lentelė). Preparato kiekis – 0,2 g/100 g miltų parinktas remiantis gamintojo rekomendacijomis (50–100 g/100 kg miltų). Prieš hidrolizę miltų suspensijų pH sureguliuotas iki optimalaus fermentų veikimui (Alcalase pH = 8; Neutrase pH = 7; Protamex pH = 7,5; Flavourzyme pH = 7,5). Hidrolizė atlikta 45 ºC temperatūroje, trukmė – 3 h. Po 0,5 h, 1 h, 2 h ir 3 h buvo imami mėginiai ir stabdoma jų hidrolizė, išlaikant 10 min 85 ºC temperatūroje. Taip pat nustatytas hidrolizatų pH.

Baltymų išskyrimui iš hidrolizuotų nuriebintų lubinų miltų taikyta ekstrakcija šarminėje terpėje ir jų nusodinimas izoelektriniame taške. Tam hidrolizuoti lubinų miltai sumaišyti su distiliuotu vandeniu santykiu 1:12 ir išlaikyti 30 min kambario temperatūroje (20±2 °C), retkarčiais pamaišant. Po to 1 M NaOH tirpalu suspensijos pH sureguliuota iki pH = 9 ir dar išlaikyta 1 h, nuolat maišant. Suspensija centrifuguota “Heraeuslabofuge 200” centrifuga 15 min 3000 aps./min greičiu. Į centrifugatą lašinta 1 M HCl tirpalas, kol pasiekiamas pH = 4,5, ir vėl išlaikyta 1 h. Nusėdę baltymai atskirti centrifuguojant 15 min 3000 aps./min greičiu ir išdžiovinti sublimacinėje

džiovykloje “Sublimator 3x4x5 Zirbus technology”. Gautame baltymų hidrolizate nustatytas bendras ir tirpiųjų baltymų kiekis bei funkcinės jų savybės.

Tęsiant eksperimentus toliau, antrame etape atsisakyta lubinų miltų nuriebinimo. Berghout ir kt. tyrimai parodė, kad netaikant nuriebinimo iš lubinų miltų gaunami analogiški baltymų kiekiai [49], todėl šis būdas ir buvo išbandytas eksperimento metu. Be to papildomai palyginti du literatūroje aprašomi baltymų išskyrimo metodai: (1) išsūdymas arba (2) ekstrakcija šarminėje terpėje ir nusodinimas izoelektriniame taške. Šiuo atveju pradžioje buvo atliktas baltymų išskyrimas ir po to hidrolizė. Naudojant išsūdymą baltymų išskyrimui, 1000 g lubinų miltai sumaišyta su 1M NaCl tirpalu santykiu: 1:5, suspensijos pH sureguliuotas iki pH = 7 ir išlaikyta 2 h, nuolat maišant. Po to suspensija centrifuguota “Heraeuslabofuge 200” centrifuga 30 min 3000 aps./min greičiu. Baltymų ekstrakcija pakartota, naudojant po centrifugavimo likusias nuosėdas. Abu centrifugatai sumaišyti, praskiesti 10 kartų distiliuotu H_2O ir 18 h išlaikyti šaldytuve 4 °C temperatūroje. Nupylus skystąją fazę, likutis centrifuguotas “Heraeuslabofuge 200” centrifuga 30 min 3000 aps./min greičiu. Nusodinti baltymai atskirti ir išdžiovinti sublimacinėje džiovykloje “Sublimator 3x4x5 Zirbus technology”. Baltymų iš nenuriebintų miltų ekstrakcija šarminėje terpėje ir jų nusodinimas izoelektriniame taške atlikta analogiškai kaip ir pirmame etape.

Po to, analogišku būdu kaip ir pirmame etape, atlikta baltymų hidrolizė. Gauti hidrolizatai išdžiovinti ir juose nustatytas bendras ir tirpiųjų baltymų kiekis ir jų funkcinės savybės.

2.1.4. Keksų be glitimo baltymų bandomieji kepimai

Keksų be glitimo baltymų bandomieji kepimai atlikti KTU Maisto mokslo ir technologijų kompetencijų centro duonos laboratorijoje pagal modifikuotą Sanz ir kt. [l48] receptūrą ir gamybos būdą. Keksų tešla ruošta iš ryžių miltų, papildomai pridedant vieną iš baltymų priedų: lubinų baltymų izoliatą (LBI), lubinų baltymų hidrolizatą (LBH), kiaušinių baltymo miltelius (KB). Tešlos receptūra: 100 g ryžių miltų; 100 g vandens; 17 g baltymų priedo; 75 g cukraus; 46 g rafinuoto saulėgrąžų aliejus; 4 g natrio hidrokarbonato (valgomosios sodos); 3 g citrinų rūgšties; 1,5 g druskos; 0,5 g ksantano gumos. Baltymų priedo kiekis apskaičiuotas taip, kad atitiktų baltymų kiekį, pridedamą su pieno ir kiaušinių produktais kepant pagal tradicinę receptūrą [148]. Kontroliniai kepiniai ruošti pe papildomų baltymų priedų.

Bandomiesiems kepimams naudoti (UAB "Ustukių malūnas") gamybos ryžių miltai, kuriuose drėgmės ir baltymų kiekis buvo, atitinkamai, 12,19 g / 100 g ir 5,9 g / 100 g; kiaušinio baltymo milteliai (KB) (UAB "Alvas ir Ko"), drėgmės ir baltymų – atitinkamai, 6,83 g / 100 g ir 79.38 g / 100 g. Citrinų rūgštis (UAB "Rudugys"), rafinuotas rapsų aliejus (UAB "Rukola"), natrio

hidrokarbonatas, cukrus (AB "Nordic Sugar Kėdainiai") ir druska (UAB "Preskonita") buvo įsigyti vietiniuose prekybos tinkluose, ksantano guma – iš Brenntag Lietuva. Įvertinus lubinų baltymų putų sudarymo savybes, kaip priedai keksų be glitimo baltymų gamybai pasirinktas išsūdymo būdu išskirtas lubinų baltymų izoliatas (LBI2) ir jo hidrolizės Protamex fermentiniu preparatu produktas (LBHP).

Laboratorinėmis sąlygomis tešla plakta buitiniu plakikliu (Tefal Prep'line 450 W), esant plakimo greičiui 400 aps/min. Pradžioje sumaišyti sausi komponentai: ryžių miltai, baltymų priedas, natrio hidrokarbonatas, cukrus, citrinų rūgštis ir druska, po to pilamas aliejus ir viską sumaišius, pabaigoje – vanduo. Plakimo trukmė – 10 min, iki vienalytės konsistencijos. Išplakta tešla išpilstyta po 40,5 g į 5 cm skersmens formas ir kepta elektrinėje krosnyje (MIWE Condo, Vokietija) 20 min 180 °C temperatūroje. Iškepti keksai vėsinti kambario temperatūroje apie 1 val., tada supakuoti į polietileninius maišelius ir laikyti 24 val. kambario temperatūroje iki jų kokybės tyrimo.

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Lubinų cheminių rodiklių nustatymas

Miltų drėgnis:

2 g lubinų miltų mėginys vienodu sluoksniu paskleidžiamas išdžiovintame iki pastovios masės ir pasvertame biukse. Biuksas uždengiamas ir su turiniu pasveriamas 1 mg tikslumu. Biuksai ir jų dangteliai atskirai sudedami į džiovinimo spintą. Džiovinama 130 ºC temperatūroje 45 min. Baigus džiovinti, biuksai išimami iš džiovinimo spintos, uždengiami ir įdedami į eksikatorių, kuriame ataušta iki kambario temperatūros. Ataušę biuksai su mėginiu pasveriami 1 mg tikslumu. Atlikti 3 lygiagretūs tyrimai.

Drėgmės kiekis, procentais, skaičiuojamas pagal formulę [50]:

$$W = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1}\right) \cdot 100$$

čia: W – analizuojamo mėginio drėgmės kiekis, (%), W_1– analizuojamo mėginio masė, (g), prieš džiovinimą, W_2– analizuojamo mėginio masė, (g), po džiovinimo.

Bendras baltymų kiekis:

Bendro lubinų miltų baltymų kiekio nustatymui 1,0 g tiriamo produkto mėginio sudedama į Kjeldalio kolbas, įpilama 20 ml koncentruotos H_2SO_4, įdedamas katalizatorių mišinys (kalio sulfato milteliai (1000 masės dalių), titano dioksidas (30 masės dalių) ir vario sulfato pentahidratas (30 masės dalių)) ir antiputokšlių (cinko šratų). Kjeldalio kolbos „Behr Labor Technik" mineralizavimo

aparate kaitinamos 100 min, kol mineralizatas tampa skaidrus, t. y. kol produkto organinės medžiagos suskyla ir lieka tik mineraliniai junginiai. Kolbos atvėsinamos.

Atvėsintos kolbos dedamos į „Behr Labor Technik“ distiliatorių. Distiliuojama 5 min. Distiliatas surenkamas į kūginę 300 ml talpos kolbą su boro rūgšties (H_3BO_3) tirpalu. Pasibaigus distiliacijai, į kūginę kolbą įlašinami 2–3 lašai Taširo indikatoriaus ir distiliatas titruojamas 0,1N HCl tirpalu, kol distiliato spalva iš žalios spalvos tampa ryškiai violetine.

Tokiomis pat sąlygomis distiliuojamas ir titruojamas kontrolinis (tuščias) mėginys (sieros rūgštis).

Azoto kiekis (N) % apskaičiuojamas pagal formulę [50]:

$$N = [1{,}4 \times n \times K(V_1 1 - V_1 0\ ]/m$$

čia 1,4 – azoto kiekis, kurį sujungia 1 ml 0,1 N HCl, (g),V_1 – 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas iš distiliuojamo mineralizato išsiskyrusiam amoniakui sujungti, (ml),V_0 – 0,1 M HCl kiekis, sunaudotas tuščiajam mėginiui titruoti (ml), K – druskos rūgšties tirpalo pataisos koeficientas (1) m – analizuoto mėginio masė, (g).

Baltymų kiekis apskaičiuojamas pagal formulę [50]:

$$B_{pr} = N \times k$$

čia: N – azoto (N) kiekis,k – koeficientas perskaičiuoti azoto kiekį į baltymų kiekį (5,7).

Tirpiųjų baltymų kiekis:

Tirpiųjų baltymų kiekio nustatymui pasveriama 5 g lubinų miltų (arba miltų po hidrolizės), sudedama į kūginę 300 ml talpos kolbą ir užpilama 20 ml distiliuoto vandens. Įpilama 2 ml 10 % NaCl, kad geriau ištirptų ne tik albuminų, bet ir globulinų grupės baltymai. Mišinys suplakamas ir paliekamas stovėti 10 min, protarpiais vis suplakant. Po to filtruojama per vatą. Medžiagos liekana kolboje dar kartą ekstrahuojama užpylus 20 ml vandens ir filtruojama per vatą į tą patį indą. Gautas filtratas supilamas į 50 ml matavimo kolbą, pripilama vandens iki žymės ir sumaišoma.

Pipete paimama 20 ml filtrato ir supilama į Kjeldalio kolbą į ją įpilama 20 ml koncentruotos H_2SO_4, įdedamas katalizatorių mišinys, antiputokšlių (cinko šratų), ir toliau viskas atliekama, taip kaip ir nustatant bendrą baltymų kiekį. Išsiskyrusio azoto ir baltymų kiekis apskaičiuojamas pagal tas pačias formules.

Tirpiųjų baltymų kiekis miltuose surandamas pagal paimtą analizei jų kiekį ir praskiedimo tūrį [178]:

$$B_{pr} = B_f \times \frac{25}{G}$$

čia: G – analizei paimtas miltų kiekis, g, 50 – paruošto filtrato, kuriame yra tirpūs baltymai, tūris, ml.

2.2.2. Baltymų funkcinių savybių tyrimai

Putų sudarymo pajėgumas:

Putų sudarymo pajėgumo tyrimui ruoštos trys 1 % baltymų vandens suspensijos 0,25 g baltymų sumaišoma su 10 ml vandens ir, lašinant 0,1 M NaOH arba 0,1 M HCl tirpalą, suspensijos pH sureguliuojamas iki 4, 6, ir 8. Supilama į skirtingas 25 ml matavimo kolbutes ir praskiedžiama iki žymės. Po to imama 10 ml suspensijos ir plakama "IKA T25 digital" plakikliu 5 min. Putų sudarymo pajėgumas (PSP) % apskaičiuojamas pagal formulę [51]:

PSP = (putų tūris (ml) / bendras suspensijos tūris (ml)) x 100, (%)

Putų stabilumas:

Atlikus putų susidarymo tyrimą stebimas jų stabilumas. Tyrimas atliekamas dvi valandas, periodiškai kas 30 min, užrašant putų kiekį ml. Putų stabilumas (PS) % apskaičiuojamas pagal formulę [51]:

PS = (putų tūris (ml) tam tikru laiko momentu / pradinis putų tūris (ml)) x 100, (%)

Emulsijos sudarymo pajėgumas:

Emulsijos sudarymo pajėgumo tyrimui ruoštos trys 1 % baltymų ir vandens suspensijos. 0,25 g baltymų sumaišoma su 10 ml vandens ir, lašinant 0,1 M NaOH arba 0,1 M HCl tirpalą, suspensijos pH sureguliuojamas iki 4, 6, ir 8. Supilama į skirtingas 25 ml matavimo kolbutes ir praskiedžiama iki žymės. 5 ml suspensijos 5 min homogenizuojama "IKA T25 digital" homogenizatoriumi, esant 7600 aps./min greičiu. Praėjus 5 min, įpilama 5 ml "Vilniaus" rapsų aliejaus ir tuo pačiu greičiu homogenizuojama dar 5 min. Vėliau emulsija centrifuguojama 10 min 3000 aps./min greičiu. Emulsijos sudarymo pajėgumas (ESP) % apskaičiuojamas pagal formulę [51]:

ESP = (emulsijos sluoksnio tūris (ml) / bendras suspensijos tūris (ml)) x 100, (%)

Emulsijos stabilumas:

Emulsijos stabilumo tyrimui mėginiai ruošti taip pat, kaip ir emulsijos susidarymo pajėgumui nustatyti. Tik prieš centrifugavimą emulsija papildomai pakaitinama 85 °C temperatūroje 30 min, tuomet atvėsinama iki kambario temperatūros (20±2°C), 5 min laikant mėgintuvėlius po šaltu vandeniu. Atvėsinti mėginiai centrifuguojami 10 min 3000 aps./min greičiu. Emulsijos stabilumas (ES) % apskaičiuojamas pagal formulę [51]:

ES = (emulsijos sluoksnio tūris (ml) / bendras suspensijos tūris (ml)) x 100, (%)

2.2.3. Elektroforezė

Tirpalai ir jų ruošimas:

1. 30 % akrilamido tirpalas. Matavimo kolboje vandenyje ištirpinama 30 g akrilamido ir 0,8 g N,N - metilenbisakrilamido ir praskiedžiama iki 100 ml.
2. 4 x TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas, kai pH 8,8: 1,5 M TRIS·HCI, 0,4 % NDS. 36,4 g TRIS ištirpinama 110 ml vandens. Į gautą tirpalą įpilama 8 ml 10 % NDS tirpalo. Sureguliuojamas tirpalo pH iki 8,8 su 1 N HCl ir praskiedžiamas vandeniu iki 200 ml.
3. 4 x TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas, kai pH 6,8: 0,5 M TRIS·HCl, 0,4 % NDS. 12,12 g TRIS ištirpinama 110 ml vandens. Į gautą tirpalą įpilama 8 ml 10 % NDS tirpalo. Sureguliuojamas tirpalo pH iki 6,8 su 1 N HCl ir praskiedžiamas vandeniu iki 200 ml.
4. Elektroforezės TRIS - glicino buferinis tirpalas: 3,02 g TRIS, 14,4 g glicino, 1 g NDS ir pripilama iki 1000 ml vandens.
5. 10 % amonio persulfato [$(NH_4)_2S_2O_8$] tirpalas (svoris/tūris). 0,1 g amonio persulfato ištirpinama 1 ml vandens. Tirpalas ruošiamas prieš pat naudojimą.
6. Tetrametiledilendiaminas (TEMED).
7. 2 x baltymo denatūravimo buferinis tirpalas: 5 ml 4 x TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas, kai pH 6,8, 4 ml glicerolio, 1,2 g NDS, 2 ml 2-merkaptoetanolio, 1 mg mėlynojo bromfenolio ir pripilama iki 100 ml vandens. Išmaišoma ir išpilstoma po 1 ml.
8. Standartinis baltymų mišinys.
9. Tiriamojo baltymo pavyzdžiai.
10. 10 % acto rūgštis.
11. Dažo Coomassie mėlio tirpalas: 10 % acto rūgšties, 0,006 % Coomassie mėlio R-250,90 % vandens. Laikoma kambario temperatūroje.
12. Baltymams dažyti Coomassie mėliu baltymo tvirtinimo tirpalas: 25% izopropilo alkoholio, 10 % acto rūgšties ir 65 % vandens. Laikoma kabario temperatūroje.

Skiriamojo gelio paruošimas:

Naudojamos dvi švarios stiklo plokštelės ir dvi stiklo plokštelės su tarpinėmis. Stiklo plokštelės įstatomos į elektroforezės aparato gardelę specialiame stovelyje ir viena su kita suspaudžiama spaustukais. Tarpeliai tarp stiklo plokštelių pripildomi skiriamojo gelio, iki plokštelės viršaus paliekama maždaug 2 cm koncentruojamam poliakrilamido geliui. Ant skiriamojo gelio viršaus pipete atsargiai, nesuardant gelio paviršiaus, užlašinamas sluoksnis distiliuoto vandens. Laukiama, kol įvyks polimerizacijos reakcija (30–60 min. kambario temperatūroje). Tada vanduo nupilamas.

Koncentruojamojo gelio paruošimas:

Į stiklinę pripilama 0,65 ml 30 % akrilamido tirpalo, 1,25 ml 4 x TRIS·HCl/NDS buferinio tirpalo (pH 6,8) ir 3,05 ml vandens. Pripilama 25 µl 10 % amonio persulfato tirpalo ir 5 µl tetrametiledilendiamino. Gerai išmaišoma. Gautas tirpalas supilamas ant skiriamojo gelio. Į užpiltą koncentruojamojo gelio sluoksnį įstatomos šukos, laukiama kol įvyks polimerizacijos reakcija ir atsargiai išimamos šukos.

Baltymo preparato paruošimas elektroforezei:

Plastikiniame 1,5 ml mėgintuvėlyje tiriamojo baltymo tirpalas santykiu 1:1 praskiedžiamas 2 x baltymo denatūravimo buferiniu tirpalu. Mišinys 3–5 min. kaitinamas verdančio vandens vonioje. Švirkštu ant šulinėlių dugno uždedami ploni paruoštų baltymų sluoksniai, o į kraštinius šulinėlius įpilamas etaloninio baltymo mišinys. Iš pripildymui skirto stovelio išimama gardelė ir įstatoma į elektroforezės aparatą. Elektroforezės aparato talpykla pripildoma elektroforezės TRIS-glicino tirpalo. Paleidžiama srovė elektroforezei vykdyti, kai judantis gelyje mėlynasis bromfenolis pasiekia skiriamojo gelio apačią, elektros srovė išjungiama.

Gelyje esančio baltymo dažymas po elektroforezės:

Po elektroforezės poliakrilamido gelis atsargiai atskiriamas nuo stiklo plokštelių, įdedamas į plastikinę vonelę ir užpilamas baltymų tvirtinimo tirpalu tiek, kad apsemtų. Vonelė lėtai purtoma kambario temperatūroje 30–60 min. Nupilamas baltymo tvirtinimo tirpalas ir užpilamas Coomassie mėlio dažo tirpalas. Dažoma, kol baltymo juostelės nusidažo norimo ryškumo spalva. Baigus dažyti, dažai nupilami ir užpilama 10 % acto rūgšties. Vonelė purtoma kambario temperatūroje, kol iš gelio išsiplauna nesusirišę su baltymu dažai [65].

2.2.4. Keksų kokybės rodiklių nustatymas

Nukepimas: keksiukai sveriami prieš kepimą (M1) ir po kepimo bei 1 val. vėsinimo (M2). Svorio nuostoliai kepimo metu buvo apskaičiuoti kaip šių svorių skirtumas (M1-M2).

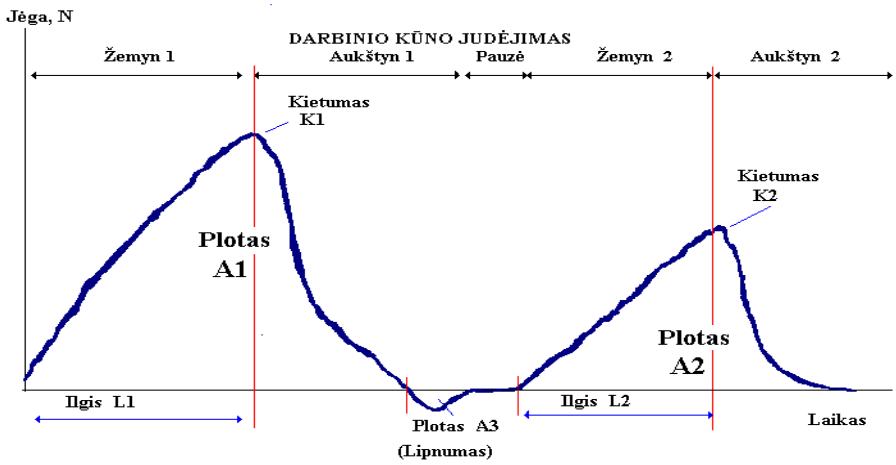
Kepinio aukštis buvo matuojamas slankmačiu po 1 val. vėsinimo nuo aukščiausio keksiuko taško iki apačios.

Kepinio savitasis tūris apskaičiuojamas pagal tūrio ir masės santykį (cm^3/g) [13]. Kepinio tūris nustatytas pagal jo išstumtą sorų kruopų kiekį. Išstumtos sorų kruopos sveriamos 0,1 g tikslumu ir apskaičiuojamas mėginio tūris *V,* cm^3. Kepinys sveriamas elektroninėmis svarstyklėmis 0,1 g tikslumu.

Tekstūros rodikliai. Keksų tekstūros rodiklių matavimai atlikti su TA.XT.plus tekstūros analizatoriumi (Stable Microsystems, Godalming, JK). Iš kekso vidurinės dalies išpjautas 1,5 cm

storio mėginys, kuris naudotas tekstūros profilio analizei. Sudarant tekstūros profilį, mėginys buvo spaudžiamas 75 mm skersmens cilindru (P/75) 1 mm/s greičiu iki 50 % suspaudimo, išlaikant 5 s tarp dviejų spaudimo ciklų. Iš gautų „jėgos-laiko“ kreivių (2.3 pav.) nustatyti šie tekstūros parametrai – kietumas, rišlumas, tamprumas, stangrumas:

1) kietumas – mechaninė tekstūros savybė, nusakoma jėga (N), reikalinga pasiekti reikiamą (40 %) produkto deformaciją, ji nustatoma pagal jėgos smailės viršūnę pirmo spaudimo ciklo metu (K1);
2) rišlumas – mechaninė tekstūros savybė, nusakoma laipsniu, iki kurio medžiaga gali būti deformuojama iki jai suyrant (A2/A1);
3) tamprumas – mechaninė tekstūros savybė, susijusi su atsistatymo greičiu, paveikus deformuojančiai jėgai ir deformuotos medžiagos atsistatymo laipsniu, nustojus veikti šiai jėga (L2/L1);
4) stangrumas – mechaninė tekstūros savybė, nusakoma rišlumu ir laiko trukme, reikalinga produktą „sukramtyti“ iki tinkamo nuryti. Apskaičiuojamas kaip kietumo, rišlumo ir tamprumo sandauga (K1×(A2/A1) ×(L2/L1)).



2.3 pav. Tekstūros profilio analizės „jėgos-laiko“ kreivė

2.2.5. Matematinė statistinė duomenų analizė

Tirtų rodiklių vidutinės vertės ir standartinio nuokrypio vertės apskaičiuotos panaudojant MS Excel 2010 programą. Visi tyrimai kartoti tris kartus.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

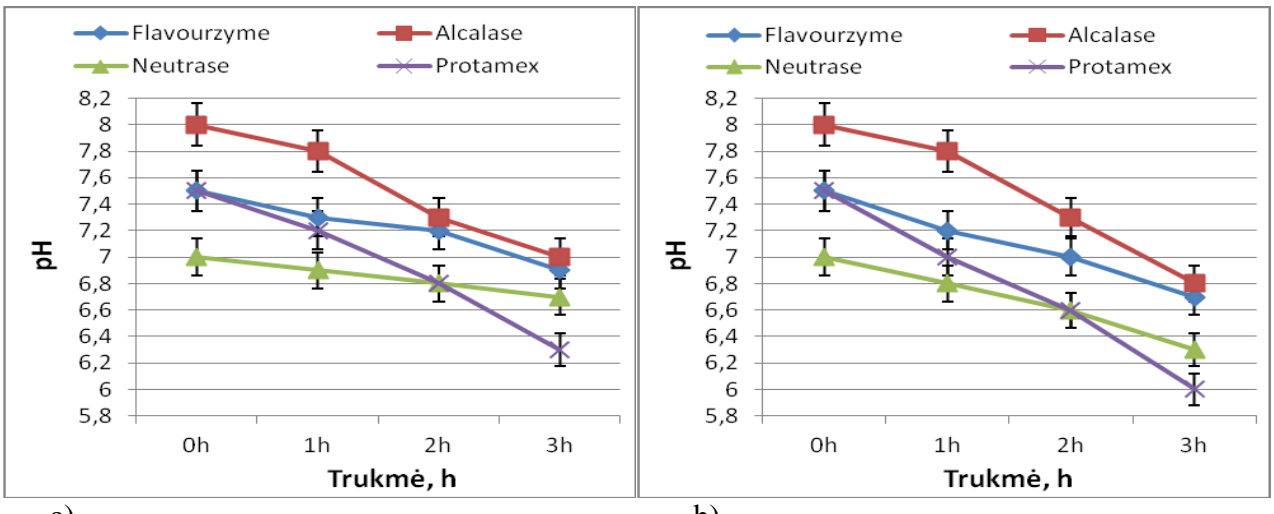
3.1. Baltymų kiekio pokyčiai lubinų miltų hidrolizės metu

3.1.1. Fermentacijos sąlygų įtaka baltymų hidrolizei

Fermentinei baltymų hidrolizei kietafaziu ir skystafaziu būdu naudoti lubinų miltai, kurių drėgnis – 11±3,4 %, bendras baltymų kiekis – 36±0,8 % s.m., tirpiųjų baltymų kiekis – 30±1,9 % s.m.

Fermentinė hidrolizė yra būdas pagerinti baltymų savybes, kurios priklauso nuo baltymo ir naudojamo fermento specifiškumo, taip pat nuo hidrolizės sąlygų, ypač pH ir temperatūros. Įvertinus literatūroje pateiktus duomenis, palyginamiesiems tyrimams pasirinkti endoproteazių ir egzopeptidazių/endoproteazių komplekso fermentiniai preparatai endoproteazių fermentiniai preparatai: Alcalase, Neutrase, Protamex, o taip pat egzopeptidazių/endoproteazių kompleksas Flavourzyme (Novozymes A/S, Danija).

Lubinų baltymai hidrolizuoti 3 h, stebint proceso metu pH pokyčius (žr. 3.1 pav.). pH tyrimai hidrolizės metu parodė, kad šio rodiklio vertės proceso metu nuolat mažėjo. Taikant kietafazę fermentinę hidrolizę, pH vertės sumažėjo 4,3–16 %, o skystafazę – nuo 10 iki 20 %. Galima teigti, kad skystoje terpėje vyko greitesni fermentacijos procesai. Didžiausias pH pokytis kietafazės ir skystafazės fermentinės hidrolizės metu matyti po 3 h veikiant Protamex fermentiniu preparatu (atitinkamai, 16 % ir 20 %), mažiausias – Neutrase preparatu (atitinkamai, 4,3 % ir 10 %).

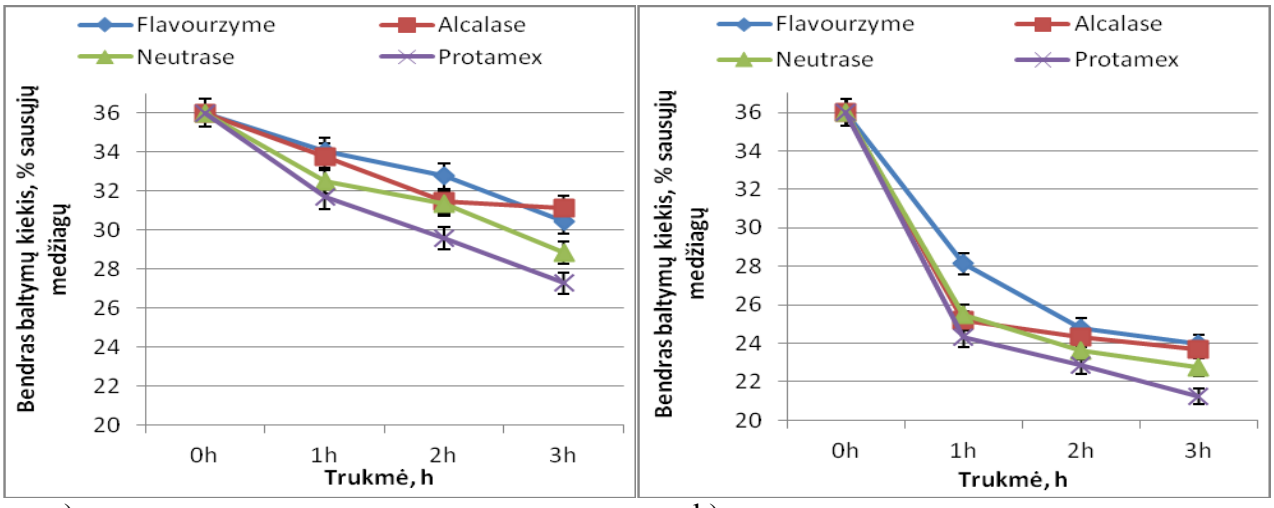


a) b)

3.1 pav. pH pokytis lubinų miltų kietafazės (a) ir skystafazės (b) hidrolizės proteolitiniais fermentais metu.

Bendras ir tirpiųjų baltymų kiekis hidrolizatuose, gautuose kietafazės ir skystafazės fermentinės hidrolizės metu, pateiktas 3.2 ir 3.3 pav. Iš gautų tyrimo rezultatų matyti, kad baltymų

kiekis (bendras ir tirpiųjų) taip pat mažėjo, ilgėjant hidrolizės trukmei. Lubinų miltai, paveikti preparatais Alcalase ir Flavourzyme, išsiskyrė didesniu baltymų kiekiu nei paveikus Neutrase ir Protamex Mažiausias bendro baltymų kiekio pokytis nustatytas lubinų miltuose, paveiktuose Alcalase fermentiniu preparatu kietafaziu būdu – 13,6 %, o skystafaziu – Flavourzyme (33,4 %). Tuo tarpu kietafaziu būdu Neutrase hidrolizuotuose lubinų miltuose baltymų kiekis sumažėjo 19,9 %, skystafaziu – 36,8 %, panaudojus Protamex preparatą – analogiškai, 24,2 % ir 41 %.



a) b)

3.2 pav. Bendro baltymų kiekio pokyčiai lubinų kietafazės (a) ir skystafazės (b) hidrolizės proteolitiniais fermentais metu.

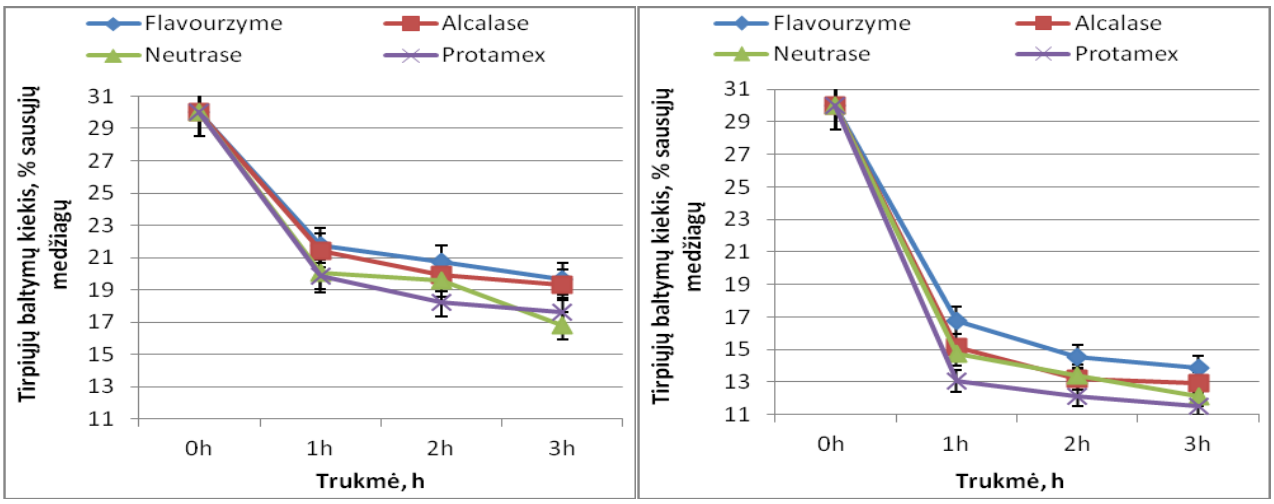
Analogiškos tendencijos pastebėtos, tiriant tirpiųjų baltymų kiekį ir jo pokyčius hidrolizės metu. Mažesni tirpiųjų baltymų pokyčiai taip pat buvo hidrolizuojant fermentiniais preparatais Flavourzyme (kietafaziu būdu – 34,4 %, skystafaziu – 53,7 %) ir Alcalase (35,6 % ir 56,8 %), didžiausi – Protamex (41,2 % ir 61,6 %).

Fermentinės hidrolizės metu pH ir baltymų kiekio mažėjimas nėra priimtinas. Toks pH pokytis rodo, kad lubinų miltų terpėje be hidrolizės vyko ir savaiminio rūgimo procesas, kaupiantis rūgštims – mikroorganizmų metabolizmo produktams. Lubinuose esantys mikroorganizmai hidrolizės metu, esant tinkamoms jų metabolizmui sąlygoms, aktyviai dauginosi ir maitinosi terpėje esančiomis medžiagomis. Dėl mikroorganizmų, kurių vystymuisi reikalingas azotas, veiklos matomas tiek pH, tiek ir bendro bei tirpiųjų baltymų kiekio mažėjimas. Galima teigti, kad skystoje terpėje vyko greitesni fermentacijos procesai, nes baltymų kiekio sumažėjimas pasireiškė labiau.

Proteazių poveikio skirtumus galima būtų paaiškinti skirtingu jų veikimu ir skirtingomis optimaliomis veikimo sąlygomis. Alcalase, Neutrase ir Protamex fermentiniuose preparatuose esančios endoproteazė skaido tik polipeptidinės grandinės vidines jungtis, susidarant įvairaus ilgio peptidams, o Flavourzyme egzopeptidazių ir endoproteazių kompleksas katalizuoja tiek vidinių

peptidinių jungčių, tiek ir galinių peptidinių jungčių hidrolizę, atskeliant laisvas aminorūgštis. Be to, Flavourzyme išsiskiria optimaliu veikimui terpės pH, kuris yra dauigau rūgštinis (5,5–7,5) lyginant su kitų fermentų veikimui optimaliu pH (7,0–8,0).

Pirmieji lubinų fermentinės hidrolizės tyrimai parodė, kad veikiant tiesiogiai lubinų miltus fermentais, dėl tuo pat metu vykstančių rūgimo procesų, negalima tiksliai įvertinti proteazių įtakos baltymų kiekiui ir savybėms, todėl buvo nuspręsta pradžioje išskirti baltymų izoliatus ir po to atlikti jų hidrolizę.



a) b)

3.3 pav. Tirpiųjų baltymų kiekio pokyčiai lubinų kietafazės (a) ir skystafazės (b) hidrolizės proteolitiniais fermentais metu.

3.1.2. Baltymų išskyrimo būdo įtaka jų kiekiui ir hidrolizės efektyvumui

Šiuo atveju pradžioje buvo atliktas baltymų išskyrimas. Palyginimui taikyti du išskyrimo būdai: ekstrakcija šarminėje terpėje/nusodinimas izoelektriniame taške (lubinų baltymų izoliatas 1 – LBI1) ir išsūdymas (lubinų baltymų izoliatas 2 – LBI2). Naudojant ekstrakciją šarminėje terpėje ir nusodinimą izoelektriniame taške, baltymų kiekis LBI1 buvo 95,3±1,2 %, o taikant išsūdymą (LBI2) – 92,5±1.55 %, t. y. nežymiai mažesnis. Išskyrimo būdas turėjo įtakos ir tirpiųjų baltymų kiekiui LBI: jų kiekis LBI1 nustatytas 71±1,48 %, o LBI2 – 68,52±2,03 %.

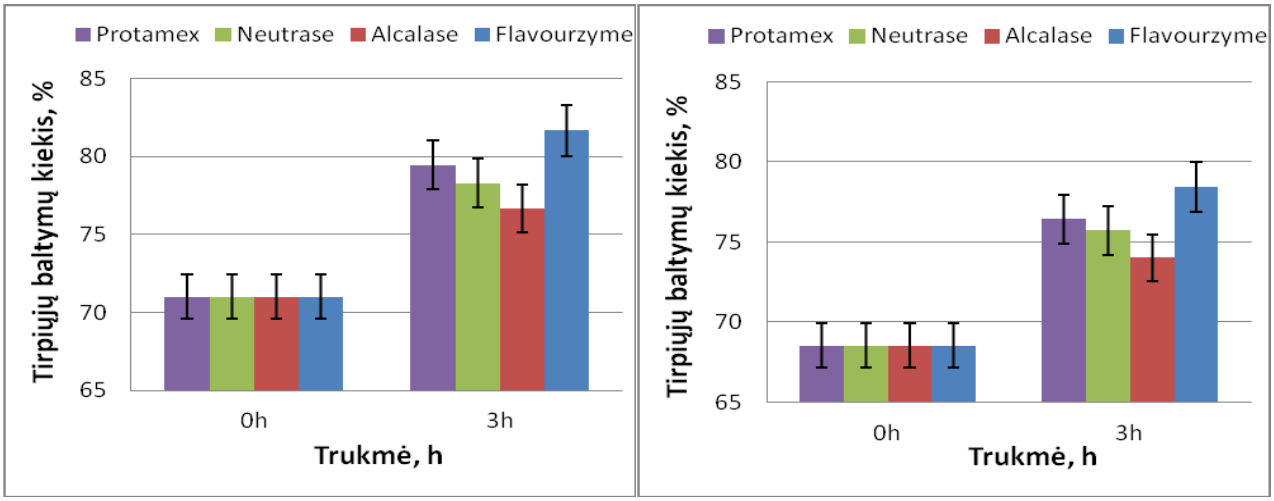
Gauti rezultatai atitinka literatūroje pateiktus kitų mokslininkų tyrimų rezultatus. Rodriguez Ambriz ir kt. taikydami ekstrakciją šarminėje terpėje ir nusodinimą izoelektriniame taške, išskyrė baltymų izoliatus, kuriuose buvo 95,7 % baltymų, o taikant išsūdymą – 93,2 % [19]. Išskirtas baltymų kiekis buvo didesnis taikant ekstraciją ir nusodinimą, nei išsūdymą. Paredes L'opez ir Ordorica Falomir duomenimis, šiais būdais išskirtuose lubinų baltymų izoliatuose baltymai sudarė,

atitinkamai, 90 % ir 61 % [14]. Didesnius baltymų kiekius izoliatuose, gautuose taikant ekstraciją ir nusodinimą, mokslininkai aiškina NaCl susidarymu neutralizavimo proceso metu.

Vėliau išskirti lubinų baltymai buvo hidrolizuoti naudojant pasirinktus proteolitinius preparatus, jų pokytis po 3 h hidrolizės pateiktas 3.4 pav. Analizuojant rezultatus matoma tendencija, kad daugiausiai lubinų baltymai tirpumas pakito hidrolizuojant juos Flavourzyme fermentiniu preparatu, tirpiųjų baltymų kiekis LBI1 hidrolizate ir LBI2 hidrolizate padidėjo, atitinkamai, 15 % ir 14,5 %. Mažiausias tirpiųjų baltymų pokytis nustatytas Alcalase fermentiniu preparatu hidrolizuotuose LBI, abiem atvejais jų kiekis padidėjo tik 8 %.

Pommer, tirdamas nuriebintų kukurūzų baltymų hidrolizės laipsnį, nustatė, kad Flavourzyme fermentiniu preparatu veiktų baltymų hidrolizės laipsnis buvo 12,25 % ir buvo reikšmingai didesnis nei veikiant Alcalase, Protamex ar Neutrase preparatais (atitinkamai, 6.40, 5,84 ir 4,20 %). Aukštą hidrolizės laipsnį mokslininkas sieja su kompleksinėmis Flavourzyme savybėmis, susijusiomis su endoproteazės ir egzopeptidazės veikimu [140].

Apie šių fermentinių preparatų panaudojimą lubinų baltymų hidrolizei duomenų nerasta.



a) b)

3.4 pav. Tirpiųjų baltymų kiekio pokyčiai lubinų baltymų išskirtų ekstrakcijos/nusodinimo (a) ir išsūdymo (b) būdu, hidrolizės proteolitiniais fermentais metu.

3.1.3. Baltymų kokybiniai pokyčiai hidrolizės metu

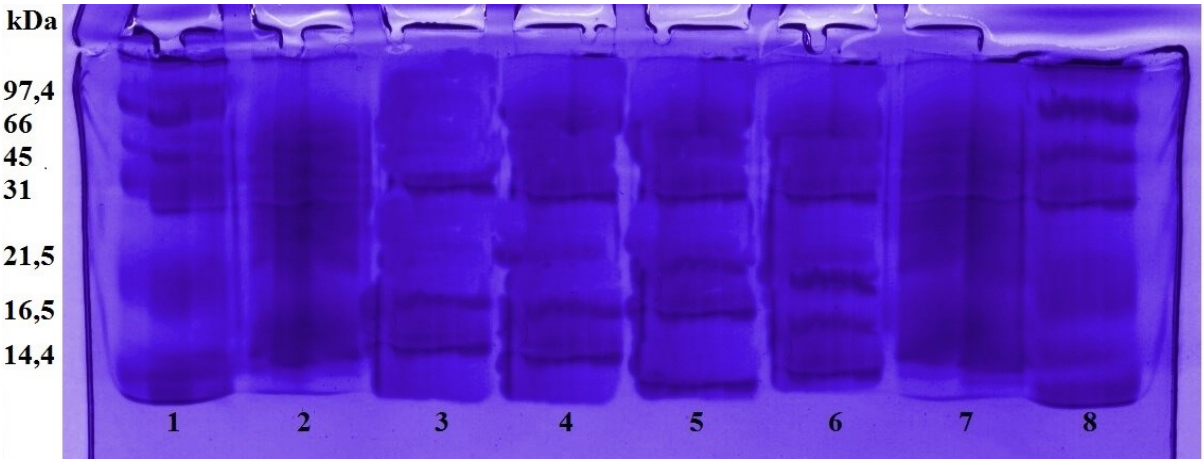
Siekiant išsiaiškinti lubinų baltymų pokyčius hidrolizės skirtingais fermentiniais preparatais metu, buvo atliktas elektroforezės tyrimas pagal 2.2.3. skyriuje aprašytą metodiką. Atlikto tyrimo rezultatai pateikti 3.5 pav. Tyrimai parodė, kad hidrolizės metu vyksta intensyvūs LBI sudėties persitvarkymas, atsiranda naujų baltyminių medžiagų. Flavourzyme hidrolizuotuose baltymuose aptinkami baltymai, turintys molekulinę masę 31 kDa, 16,5 kDa, ir 14,4 kDa (3 juosta), Alkalase –

31 kDa, 21,5 kDa, 16,5 kDa ir 14,4 kDa (4 juosta), Neutrase – 31 kDa, 21,5 kDa ir 16,5 kDa (5 juosta), Protamex – 31 kDa 21,5 kDa ir 16,5 kDa (6 juosta).

Iš elektroforetinio spektro matyti, kad nehidrolizuotų baltymų linijos (2 ir 7 juostos) yra tarsi „išplaukusios“. Toks elektroforezės vaizdas būdingas sulipusiems baltymams.

Flavourzyme preparatu hidrolizuotų LBI elektroforetiniame spektre matyti mažiausios molekulinės masės baltymai, tokie rezultatai gali būti paaiškinami tuo, kad Flavourzyme yra kompleksinis egzopeptidazės ir endoproteazės preparatas bei jo hidrolizės laipsnis didžiausias. Alcalase endoproteaze veiktų baltymų elektroforetiniame spektre išryškėjo daugiausiai – 4 baltymų linijos, tačiau, kaip parodė tolimesni tyrimai, tai neturėjo reikšmingos įtakos šiuo preparatu veiktų LBI funkcinėms savybėms. Neutrase ir Protamex hidrolizuotų LBI elektroforetiniai spektrai buvo beveik identiški.

Siauralapių lubinų globulinams priskiriami 66–48 kDa molekulinės masės baltymai. Mažesnės molekulinės masės peptidai, matomi Flavourzyme, Alcalase, Neutrase ir Protamex paveiktų baltymų elektroforetiniuose spektruose, rodo, kad lubinų sėklų globulinai yra jautrūs šių fermentų hidrolizei.



3.5 pav. Baltymų elektroforetinis spektras (1 ir 8 – markeris; 2 ir 7 – nehidrolizuoti baltymai, 3 – Flavourzyme, 4 – Alcalase, 5 – Neutrase, 6 – Protamex).

3.2. Hidrolizės įtaka lubinų baltymų funkcinėms savybėms

Šio tyrimo tikslas buvo nustatyti fermentinės hidrolizės įtaką lubinų baltymų funkcinėms savybėms: putų sudarymo pajėgumui ir jų stabilumui, o taip pat emulsijų sudarymo pajėgumui ir jų stabilumui.

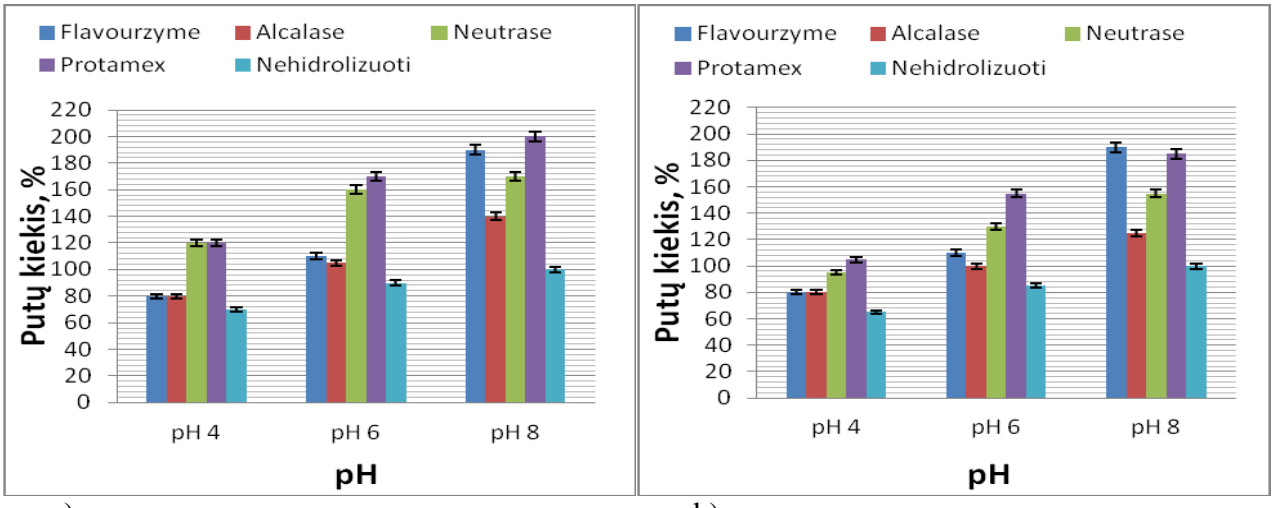
Putų sudarymo pajėgumas ir jų stabilumas. Lubinų baltymų putų sudarymo pajėgumo, esant skirtingam pH, tyrimo rezultatai pateikti 3.6 pav. Nustatyta, kad lubinų baltymų pajėgumas sudaryti putas didėjo, didėjant terpės pH vertėms. Didžiausias putų sudarymo pajėgumas nustatytas šarminėje terpėje, esant pH 8. Lyginant su šio rodiklio vertėmis, nustatytomis rūgštinėje terpėje, kai

pH 4,0, putų kiekis, tiriant LBI, buvo 33,3–38,9 % didesnis, o hidrolizuotus LBI – nuo 31,3 % iki 66,7 % didesnis. Be to, didesnė pH įtaka pastebėta, analizuojant LBI2 baltymus.

Hidrolizė proteazėmis didino lubinų baltymų putų sudarymo pajėgumą, o jos įtaka priklausė nuo pasirinkto fermentinio preparato sudėties. Didžiausiu pajėgumu sudaryti putas pasižymėjo Protamex ir Neutrase fermentiniu preparatu hidrolizuoti lubinų baltymai. Paveikus LBI1 šiais preparatais, nepriklausomai nuo terpės pH, baltymai sudarė didžiausią putų kiekį, kuris buvo, atitinkamai, 45,5–52,6 % ir 43,8–46,7 % didesnis, lyginant su nehidrolizuotais baltymais. Tuo tarpu, lyginant su nehidrolizuotais baltymais, šiais fermentais hidrolizuoto LBI2 putų sudarymo pajėgumas buvo, atitinkamai, 42,1–48,6 % ir buvo 35,3–37,9 % didesnis. Tai rodo, kad baltymų išskyrimo būdas taip pat turėjo įtakos jų hidrolizatų putų sudarymo pajėgumui. Didesniu pajėgumu sudaryti putas išsiskyrė hidrolizuoti LBI1 baltymai. Hidrolizė Alcalase preparatu turėjo mažiausią įtaką šiai lubinų baltymų savybei: putų sudarymo pajėgumas padidėjo 14,3–30,8 % (LBI1) ir 8,3–21,7 % (LBI2).

Pastebėta, kad Flavourzyme fermentinio preparato efektyvumui didelę įtaką turėjo terpės pH. Flavourzyme hidrolizuoti baltymai šarminėje terpėje (pH 8) taip pat išsiskyrė dideliu pajėgumu sudaryti putas: LBI1 ir LBI2 putų kiekis padidėjo, lyginant su nehidrolizuotų baltymų, 50 %. Tuo tarpu, esant terpės pH 4–6, šio rodiklio vertės buvo tik 8,3–25 % didesnės.

Yust ir kt. pateikė tyrimų rezultatus apie fermentinių preparatų panaudojimą avinžirnių baltymų funkcinėms savybėms pagerinti. Visi hidrolizatai pasižymėjo geresnėmis funkcinėmis savybėmis, pavyzdžiui, tirpumu ir putų sudarymo pajėgumu, nei pats avinžirnių baltymų izoliatas [63].



a) b)

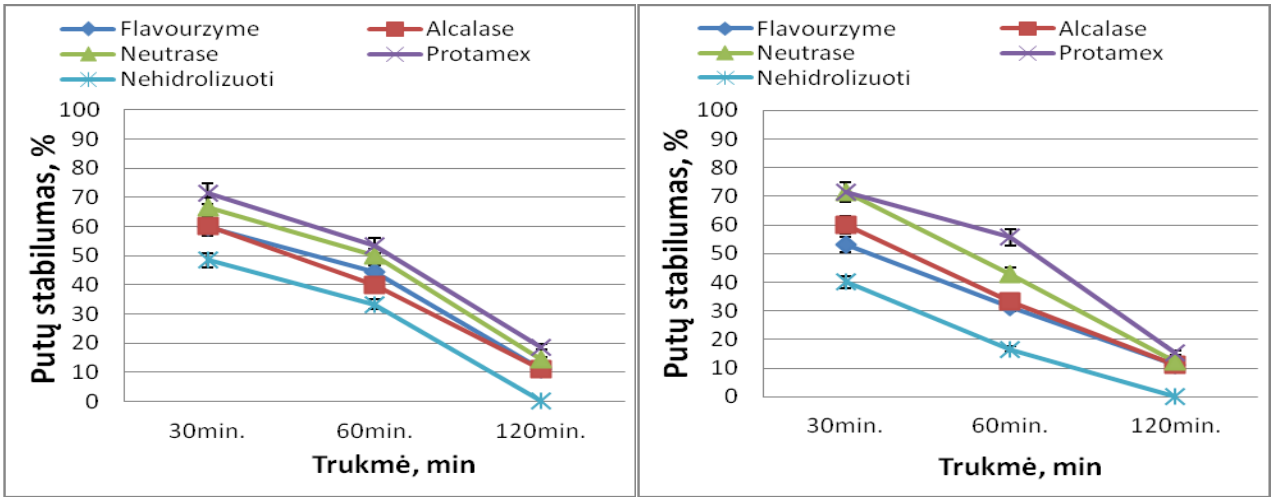
3.6 pav. Hidrolizuotų lubinų baltymų, išskirtų ekstrakcijos/nusodinimo (a) ir išsūdymo (b) būdu, putų sudarymo pajėgumas (PSP), priklausomai nuo terpės pH.

Putų stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad ši lubinų baltymų savybė taip pat priklausė nuo jų išgavimo būdo, terpės pH bei proteazių savybių (3.7–3.9 pav.). Pastebėta tendencija, kad putų stabilumas, kaip ir putų sudarymo pajėgumas, didėjo, didėjant terpės pH nuo 4 iki 8.

Nehidrolizuotų LBI2 putos buvo mažiausiai stabilios, nepriklausomai nuo terpės pH. Esant pH 4 ir pH 6 jau po 30 min išlaikymo jų tūris sudarė tik ~ 40 % pradinio tūrio, o po 120 min visai išnyko. Šiek tiek didesnis jų stabilumas nustatytas esant pH 8; išlaikius 120 min, jų kiekis buvo 11,5 %. Tyrimai parodė, kad didesniu stabilumu pasižymėjo LBI1 putos. Jų kiekis po 30 min sudarė 48,5–55 %, be to po 120 min jas buvo galima stebėti tik esant terpės pH 8 (12,8 %).

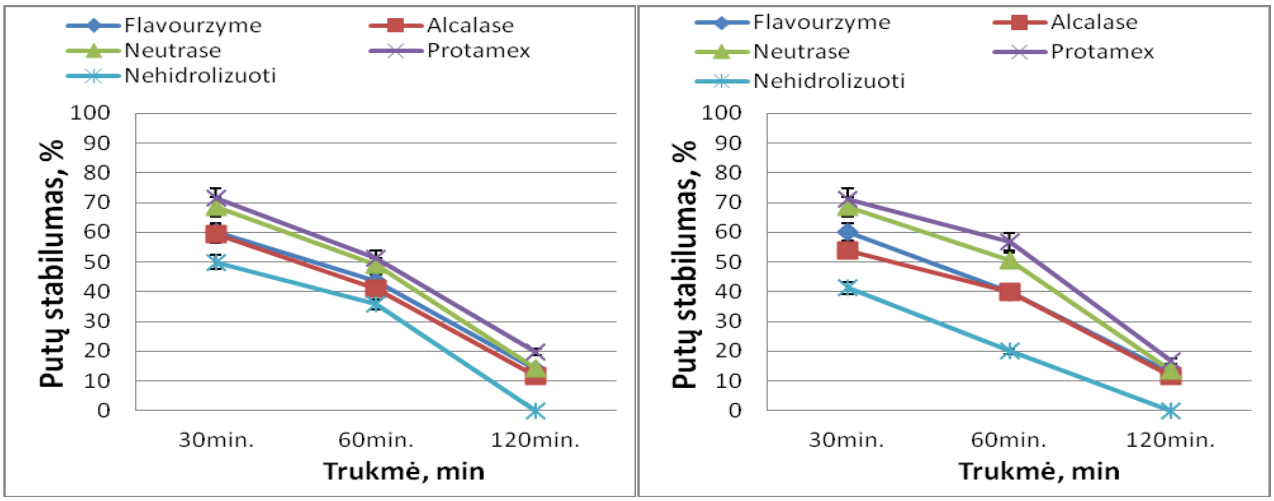
Gauti rezultatai sutampa su Abdeen pateiktais duomenimis, kuris taip pat nustatė LBI putų stabilumo mažėjimą 1,5 h laikymo metu. Šiuos pokyčius galima paaiškinti tuo, kad plakimo metu susidarę oro burbuliukai laikymo metu pradeda sproginėti ir irti [141].

Lubinų batymų hidrolizė taip pat didino putų stabilumą (žr. 3.7–3.9 pav.). Didžiausiu putų stabilumu išsiskyrė baltymai, hidrolizuoti Protamex preparatu. Šios putos buvo stabiliausios tiek pradiniame tyrimo taške, tiek ir tyrimo pabaigoje – jų kiekis po 30 min laikymo sudarė virš 71 % , o po 120 min – nuo 18,7 % (pH 4) – iki 20,2 % (pH 8). Baltymų, hidrolizuotų Alcalase preparatu, putos buvo mažiausiai stabilios ir po 120 min jų kiekis buvo nuo 11 %. (pH 4-6) iki 16,9 %. (pH 8). Baltymų išskyrimo būdas neturėjo reikšmingos įtakos putų stabilumo rodikliui.



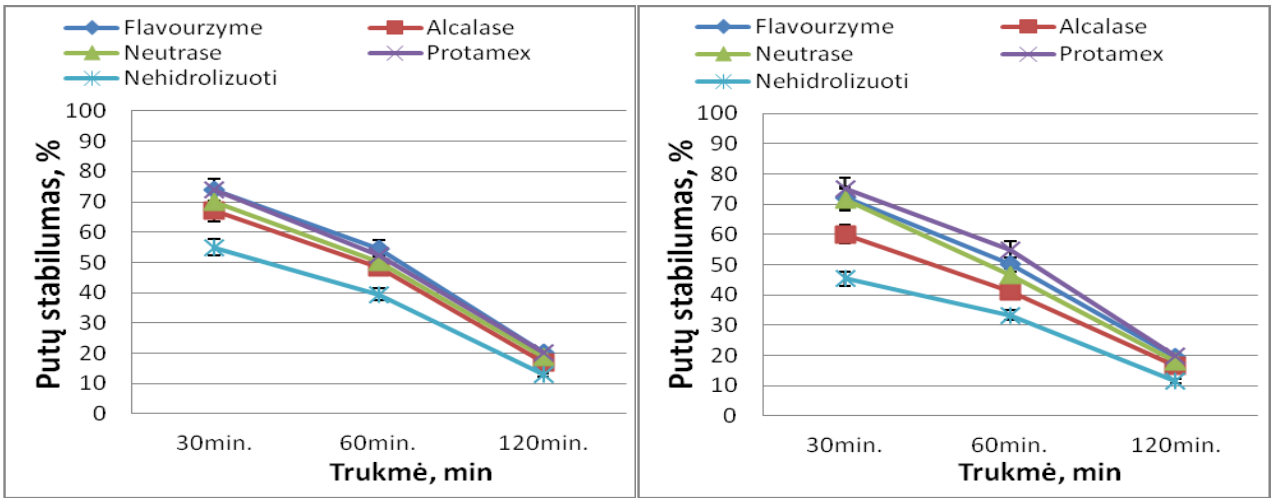
a) b)

3.7 pav. Hidrolizuotų lubinų baltymų, išskirtų ekstrakcijos/nusodinimo (a) ir išsūdymo (b) būdu, putų stabilumas (PS), kai terpės pH = 4.



a) b)

3.8 pav. Hidrolizuotų lubinų baltymų, išskirtų ekstrakcijos/nusodinimo (a) ir išsūdymo (b) būdu, putų stabilumas (PS), kai terpės pH = 6.



a) b)

3.9 pav. Hidrolizuotų lubinų baltymų, išskirtų ekstrakcijos/nusodinimo (a) ir išsūdymo (b) būdu, putų stabilumas (PS), kai terpės pH = 8.

Augalinių baltymų putų sudarymo savybių priklausomybė nuo pH nustatyta ir kitų mokslininkų tyrimuose. Abdalla ir kt., tirdami *L. campestris* lubinų baltymų izoliato ir sojos baltymų izoliato putų sudarymo savybes, nustatė, kad didžiausias putų tūris susidarė esant 2 pH, o mažiausias – izoelektrinio taško diapazone (pH 4–6), jų kiekis vėl didėjo, pereinant į šarminę terpę (pH 8–10). Panašios tendencijos pastebėtos ir putų stabilumo tyrimuose. Lubinų baltymai pasižymėjo geresnėmis putų sudarymo savybėmis nei sojos baltymai [16]. Rodriguez Ambriz ir kt. taikydami ekstrakciją šarminėje terpėje ir nusodinimą izoelektriniame taške, išskyrė lubinų baltymų izoliatus, jų duomenimis, mažiausias putų sudarymo pajėgumas ir stabilumas kiekis išryškėjo esant pH 4; didžiausias – labai rūgštinėje terpėje (pH 2) arba labai šarminėje (pH 8–10). Vidutiniu putų sudarymo pajėgumu ir stabilumu hidrolizuoti baltymai pasižymėjo, kai terpės pH 6 [19]. Pollard ir

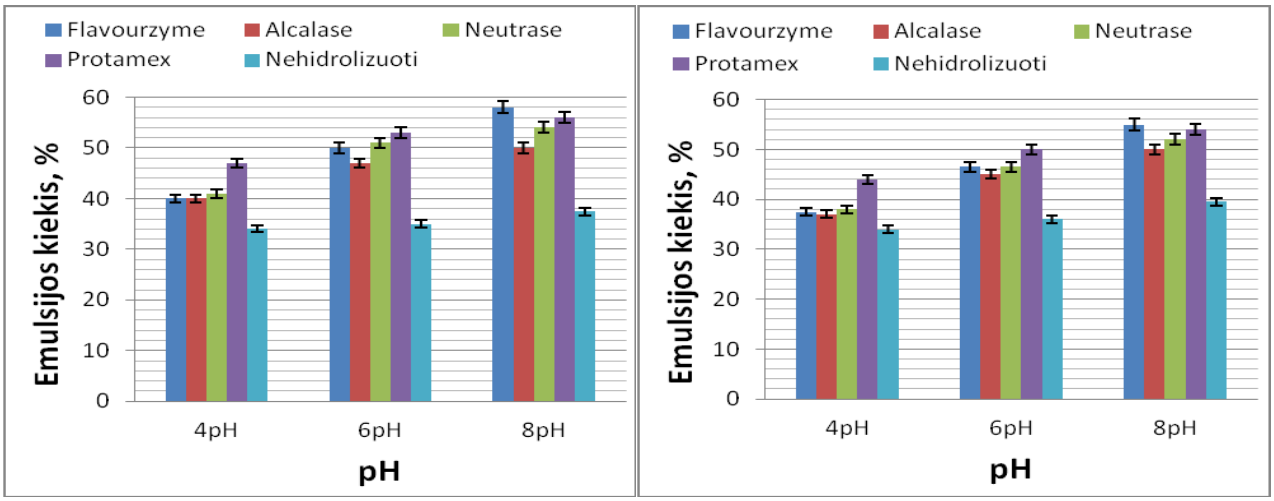
kt. hidrolizuotų lubinų baltymų putų sudarymo ir stabilumo savybių pasireiškimą šarminėje terpėje sieja su lubinuose esančiais glikolipidais ir fosfolipidais, kurie veikia kaip putų stabilizatoriai [110].

Mokslininkų nuomone, baltymų pajėgumas sudaryti putas tiesiogiai priklauso nuo jų tirpumo indekso [142]. Kadangi baltymų hidrolizė padidino jų tirpumą, tuo galima būtų paaiškinti geresnes hidrolizuotų lubinų baltymų putų sudarymo savybes lyginant su nehidrolizuotais baltymais. Eksperimento metu nustatyta, kad daugiausiai tirpių baltymų susidarė hidrolizuojant fermentiniais preparatais Flavourzyme, Protamex, šie hidrolizatai išsiskyrė ir geriausiomis putų sudarymo savybėmis. Tokie geromis putų sudarymo savybėmis pasižymintys baltymų hidrolizės produktai galėtų būti sėkmingai panaudoti kaip baltymų šaltinis gaiviųjų gėrimų gamyboje, taip pat kepinių, pavyzdžiui, pyragaičių, sausainių ar duonos gamyboje.

Emulsijų sudarymo pajėgumas ir jų stabilumas. Tiriant kitą lubinų baltymų savybę – emulsijų sudarymo pajėgumą pastebėtos panašios tendencijos, kaip ir tiriant jų putų sudarymo pajėgumą.

Lubinų baltymų emulsijų sudarymo pajėgumas didėjo, didėjant terpės pH vertėms (žr. 3.10 pav). Didžiausias emulsijų sudarymo pajėgumas nustatytas šarminėje terpėje. Esant pH 8, LBI susidaręs emulsijos kiekis buvo 9,4–13,9 %, o hidrolizuotuose LBI – 16–31,8 % didesnis nei rūgštinėje terpėje, kai pH 4,0.

Hidrolizė tirtais fermentiniai preparatais taip pat didino baltymų emulsijų sudarymo pajėgumą, tačiau šiuo atveju labiau išryškėjo fermentų specifiškumas. Rūgštinėje terpėje (pH 4–6) didžiausiu emulsijų sudarymo pajėgumu pasižymėjo Protamex preparatu hidrolizuoti lubinų baltymai: susidaręs emulsijos kiekis buvo 28–34 % ir 23–28 % didesnis, lyginant su nehidrolizuotais baltymais. Tuo tarpu šarminėje terpėje (pH 8) didžiausiu emulsijų sudarymo pajėgumu išsiskyrė Flavourzyme preparatu hidrolizuoti baltymai: emulsijos kiekis padidėjo, atitinkamai 35 % ir 28 %. Hidrolizė Alcalase preparatu turėjo mažiausią įtaką šiai lubinų baltymų savybei: emulsijų sudarymo pajėgumas padidėjo 15-26 % (LBI1) ir 8,1–24 % (LBI2). Visais atvejais, šiek tiek didesniu emulsijų sudarymo pajėgumu išsiskyrė hidrolizuoti LBI1 baltymai.

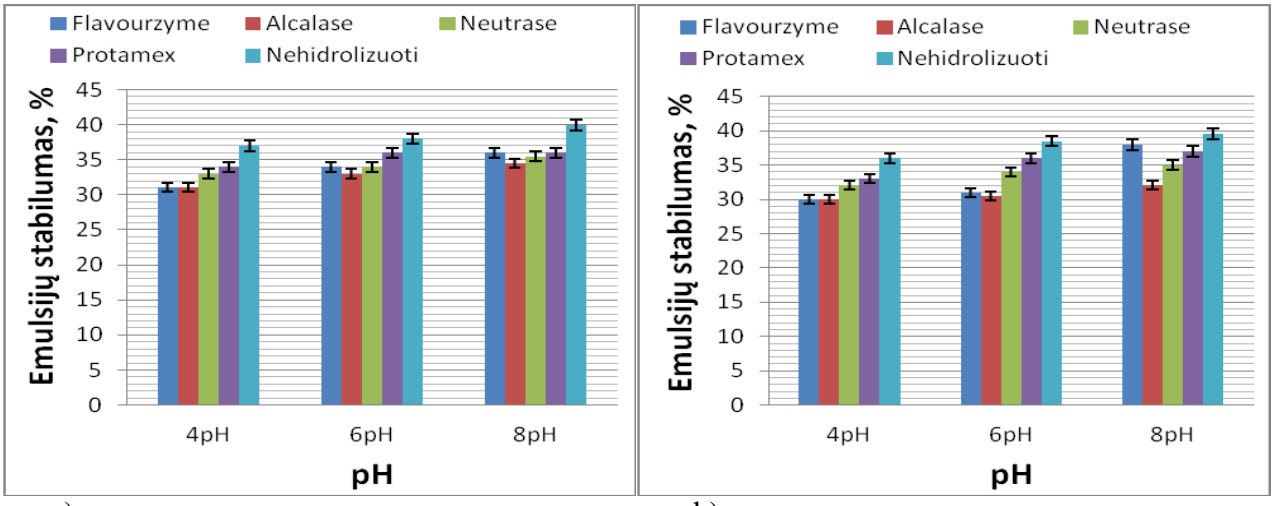


a) b)

3.10pav. Hidrolizuotų lubinų baltymų, išskirtų ekstrakcijos/nusodinimo (a) ir išsūdymo (b) būdu, emulsijų sudarymo pajėgumas, priklausomai nuo terpės pH.

Nors hidrolizė proteazėmis didino lubinų baltymų emulsijų sudarymo pajėgumą, tačiau tai turėjo neigiamą įtaką jų stabilumui (žr. 3.11 pav.). Visais atvejais didžiausiu stabilumu išsiskyrė emulsijos, ruoštos su nehidrolizuotais baltymais. Naudojant hidrolizuotus baltymus, emulsijų stabilumas buvo iki 20,8 % mažesnis. Rūgštinėje terpėje mažiausiai emulsijos stabilumą keitė baltymų hidrolizė Protamex preparatu (LBI1 sumažėjo 8,1 %, o LBI2 – 8.4 %), šarminėje – hidrolizė Flavourzyme preparatu (sumažėjo 10 % LBI1 ir 3,8 % LBI2). Didžiausias poveikis šiam rodikliui pastebėtas, pridėjus Alcalase preparatu hidrolizuotų baltymų – emulsijos stabilumas sumažėjo 13,8–19 % kai pH 8.

Kaip ir kitos funkcinės savybės, emulsijų stabilumas didėjo, didėjant terpės pH vertėms ir naudojant LBI1.



a) b)

3.11 pav. Hidrolizuotų lubinų baltymų, išskirtų ekstrakcijos/nusodinimo (a) ir išsūdymo (b) būdu, emulsijų stabilumas, priklausomai nuo terpės pH.

Įvairių mokslininkų tyrimų rezultatai taip pat rodo, kad augalinių baltymų emulsijų sudarymo pajėgumą apsprendžia hidrofilinis-lipofilinis balansas, kuris priklauso nuo terpės pH. Nustatyta, kad baltymų emulsijų sudarymo pajėgumo priklausomybės nuo pH pobūdis yra analogiškas kaip ir jų tirpumo priklausomybės nuo pH [143–146], todėl mokslininkų nuomone ši baltymų savybė taip pat stipriai susijusi su jų tirpumu: nustatyta teigiama koreliacija tarp baltymų tirpumo ir jų emulsijų sudarymo pajėgumo [147]. Tyrimai rodo, kad lubinų baltymų izoliatai pasižymi geresnėmis emulsijų sudarymo savybėmis nei kiti žinomi augaliniai baltymai, pavyzdžiui, sojos. Šios lubinų baltymų savybės siejamos su jų labai dideliu tirpumu, esant pH > 5,5 [94, 121]. Todėl lubinų baltymų izoliatų panaudojimas mėsos produktų (maltų mėsos gaminių) gamyboje būtų perspektyvus dar vienas LBI panaudojimo maisto produktuose būdas.

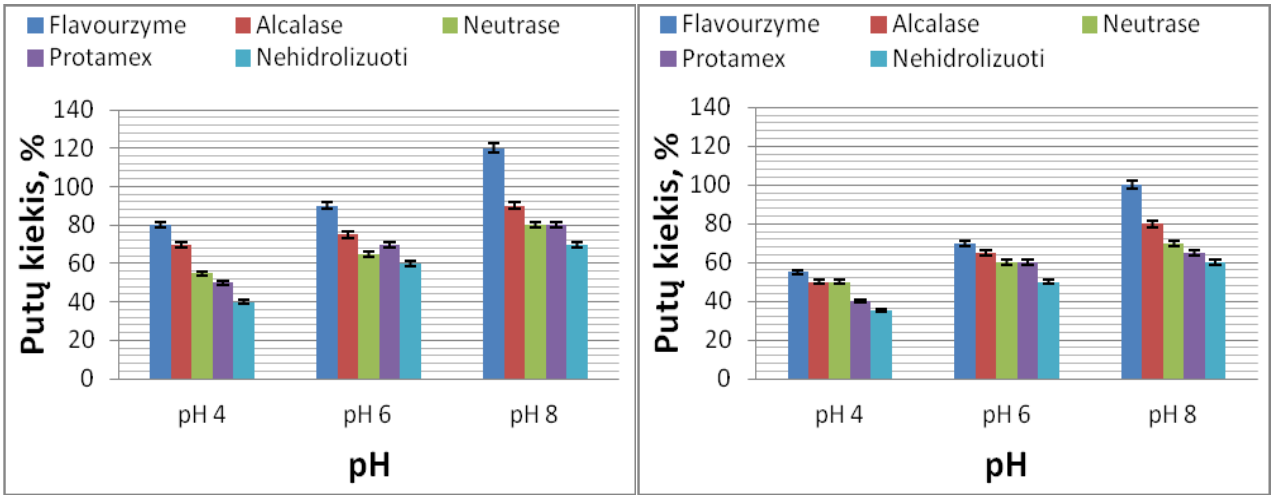
Vertinant skirtingus baltymų izoliatų išgavimo būdus, literatūroje pateikiami duomenys, kad daugumoje atveju išsūdymo būdu išskirti izoliatai pasižymėjo geresnėmis savybėmis nei izoliatai, išskirti ekstrakcijos/nusodinimo būdu. Tai aiškinama tuo, kad druskos priedas, naudojamas išsūdymo metu, pagerina baltymų tirpumą, o tuo pačiu ir emulsijų sudarymo pajėgumą. Mūsų eksperimento metu pastebėtos priešingos tendencijos: baltymai, išskirti ekstrakcijos/nusodinimo būdu, išsiskyrė šiek tiek geresnėmis tiek putų sudarymo, tie ir emulsijų sudarymo savybėmis.

Vertinant hidrolizės įtaką lubinų baltymų funkcinėms savybėms, gauti rezultatai atitinka literatūroje pateiktus duomenis apie hidrolizės įtaką kitų augalinių baltymų savybėms. Hrckova ir kt. nustatė, kad nuriebintų sojos miltų apdorojimas skirtingomis proteazėmis (Flavourzyme 1000 L, Novozym FM 2,0 L ir Alcalase 2,4 L FG) pagerino jų putų ir emulsijų sudarymo savybes. Nors hidrolizės visais šiais fermentais laipsniai buvo panašūs, dėl jų specifiškumo gauti hidrolizatai pasižymėjo skirtingomis savybės, ypač kai buvo naudojamas Flavourzyme [98]. Villacres ir Ruales tyrė lubinų (*Lupinus mutabilis Sweet*) hidrolizę papainu ir Flavourzyme ir taip pat nustatė, kad hidrolizė pagerino lubinų baltymų putų ir emulsijų sudarymo savybės [15]. Baltymų molekulinės masės sumažėjimas proteolizės metu ir jų tirpumo padidėjimas turėjo teigiamą įtaką jų paviršiaus hidrofobiškumui ir pajėgumui mažinti paviršiaus įtemptį.

Atlikus LBI tyrimus, pastebėta, kad baltymų išskyrimo būdas turėjo įtakos jų funkcinėms savybėms. Literatūroje pateiktais Pollard ir kt. duomenimis, lubinų baltymų koncentratai, lyginant su lubinų miltais, pasižymi geresnėmis emulsijų sudarymo savybėmis, bet mažesniu jų stabilumu [110]. Todėl papildomai atliktas eksperimentas, įvertinant baltymų, išskirtų iš kietafaziu ir skystafaziu būdu protezėmis hidrolizuotų lubinų miltų savybes.

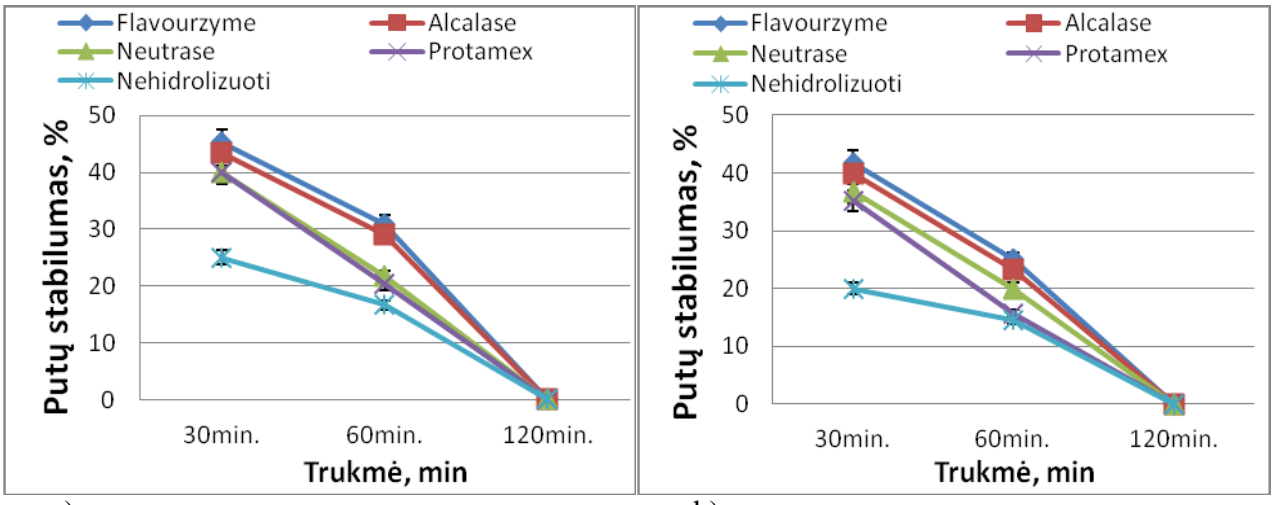
Eksperimentas patvirtino rezultatus, gautus tiriant baltymų fermentinės hidrolizės įtaką jų funkcinėms savybėms. Kaip ir LBI tyrimo atveju, atlikus fermentinę hidrolizę, pagerėjo baltymų putų ir emulsijų sudarymo pajėgumas bei putų stabilumas, bet sumažėjo emulsijų stabilumas (žr.

3.12–3.17 pav.). Šiuo atveju, nepriklausomai nuo terpės pH, didžiausiu teigiamu poveikiu išsiskyrė fermentiniai preparatai Flavourzyme ir Alcalase.



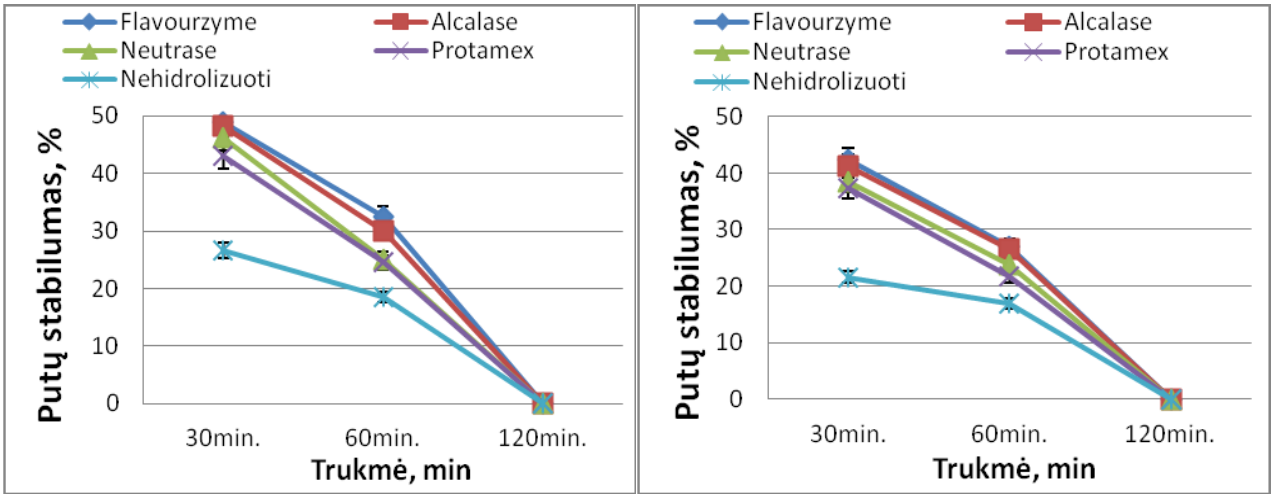
a) b)

3.12 pav. Kietafazės (a) ir skystafazės (b) fermentinės hidrolizės įtaka lubinų baltymų putų sudarymo pajėgumui (PSP), priklausomai nuo terpės pH.



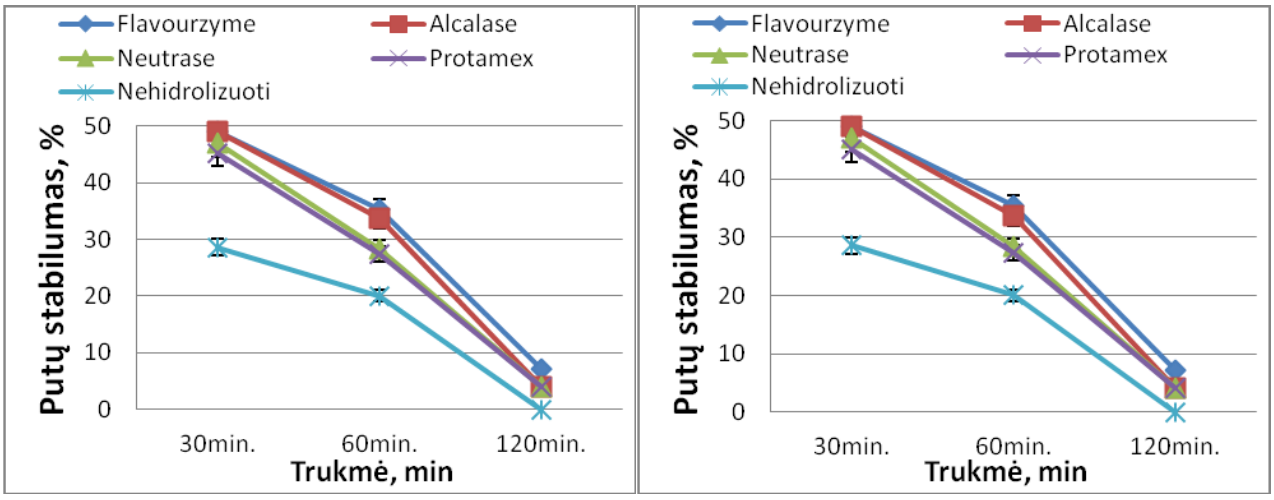
a) b)

3.13 pav. Kietafazės (a) ir skystafazės (b) fermentinės hidrolizės įtaka lubinų baltymų putų stabilumui, kai pH 4.



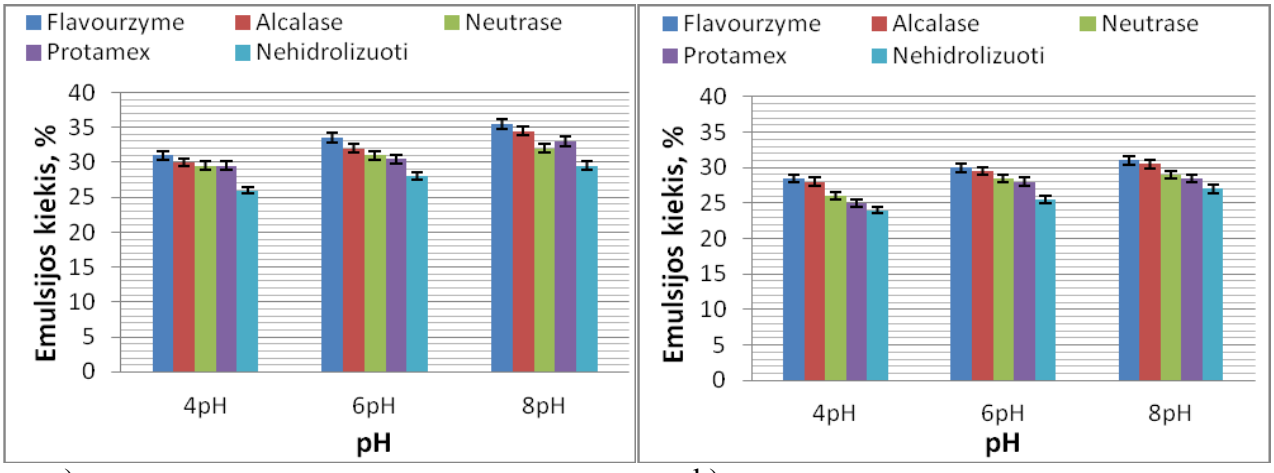
a) b)

3.14 pav. Kietafazės (a) ir skystafazės (b) fermentinės hidrolizės įtaka lubinų baltymų putų stabilumui, kai pH 6.



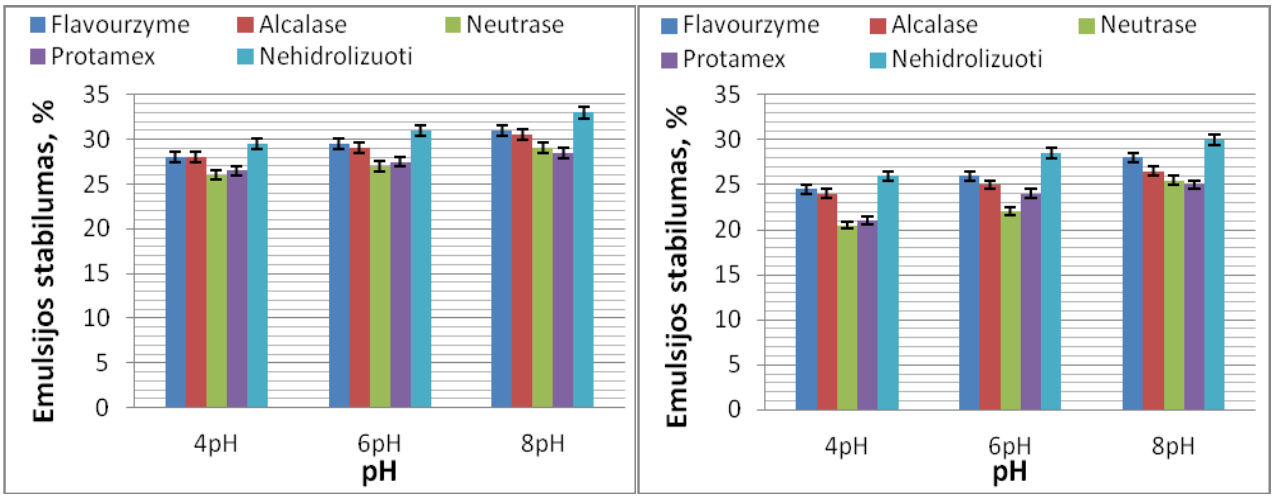
a) b)

3.15 pav. Kietafazės (a) ir skystafazės (b) fermentinės hidrolizės įtaka lubinų baltymų putų stabilumui, kai pH 8.



a) b)

3.16 pav. Kietafazės (a) ir skystafazės (b) fermentinės hidrolizės įtaka lubinų baltymų emulsijos sudarymo pajėgumui.



a) b)

3.17 pav. Kietafazės (a) ir skystafazės (b) fermentinės hidrolizės įtaka lubinų baltymų emulsijų stabilumui.

3.3. Lubinų baltymų priedų įtaka keksų be glitimo baltymų kokybei ir maistinei vertei

Šio darbo etapo tikslas buvo nustatyti lubinų baltymų įtaką keksų be glitimo baltymų kokybei ir įvertinti jų panaudojimo galimybes šių kepinių gamybai.

Tradiciškai keksai gaminami iš kvietinių miltų, cukraus, augalinių riebalų, kiaušinių ir pieno produktų [149]. Tačiau asmenys, sergantys celiakija ir alergiški glitimo baltymams, negali vartoti šių kepinių, kadangi jų gamybai naudojami kvietiniai miltai. Pastaruoju metu susidomėjimas produktais be glitimo baltymų didėja ir tarp vartotojų, netoleruojančių glitimo baltymų ir norinčių atsisakyti kviečių turinčių produktų sveikatos sumetimais [150]. Tačiau gaminant produktus be glitimo baltymų kyla daug technologinių problemų. Daugelis tokių produktų dažnai yra prastos kokybės: mažos tūrinės apimties, blankios spalvos ir biraus minkštimo.

Kepiniams be glitimo baltymų gaminti kaip pagrindinė žaliava dažniausiai naudojami ryžių miltai [151–156] arba įvairūs krakmolo šaltiniai, pavyzdžiui, ryžių, kukurūzų, bulvių ar kviečių [156]. Kepinio kokybei pagerinti dažniausiai naudojami tokie ingredientai, kaip cukrus, kiaušinio baltymo milteliai, pienas, cheminiai purikliai, druska, augaliniai riebalai, hidrokoloidai ir emulsikliai, stabilizatoriai [151, 152, 155, 156]. Gularte ir kt. nuomone, kiaušiniai yra svarbiausias ingredientas, norint užtikrinti gerą keksų kokybę [153, 156, 157]. Tyrimai rodo, kad kiaušinių pakeitimas komerciniais kiaušinių pakaitais turi įtakos kepinio kokybei: drėgniui, tūriui, spalvai, tekstūrai ir skoniui. Kadangi lubinų baltymams būdingos geros putų ir emulsijų sudarymo savybės, šiuos baltymus tikslinga būtų išbandyti ir keksų be glitimo baltymų gamyboje kaip gyvūninės kilmės baltymų (kiaušinių ir pieno) pakaitus. Be funkcinių savybių, lubinų baltymų priedai praturtintų kepinius augalinės kilmės baltymais ir padidintų jų maistinę vertę [158].

Pirmuose eksperimento etapuose įvertinus lubinų baltymų putų sudarymo savybes, kaip priedai keksų be glitimo gamybai pasirinktas išsūdymo būdu išskirtas lubinų baltymų izoliatas (LBI2) ir jo hidrolizės Protamex fermentiniu preparatu produktas (LBHP). Siekiant įvertinti augalinės ir gyvūninės kilmės baltymų įtakos skirtumus, papildomai atlikti keksų su kiaušinio baltymo milteliais kepimai.

Aukštis, nukepimas ir savitasis tūris. Bandomieji kepimai parodė, kad tirti baltyminiai priedai turėjo nevienareikšmę įtaką ryžių miltų keksų fizikiniams rodikliams (žr. 3.1 lentelė). Baltymų priedas neturėjo reikšmingos įtakos nukepimo rodikliui, tačiau nuo jo rūšies priklausė kepinio aukštis ir savitasis tūris. Didžiausiu aukščiu ir tūrine apimtimi išsiskyrė kepinys su kiaušinio baltymo priedu. Kontrolinių kepinių (be baltymų priedo) ir kepinių su lubinų baltymų priedais (LBI2 ir LBHP) aukštis ir savitasis tūris reikšmingai nesiskyrė. Skirtinga gyvūninės kilmės (kiaušinių) baltymų įtaka kepinių kokybei galėtų būti siejama su jų pajėgumu sulaikyti didesnį oro kiekį plakimo ir kepimo metu. Geera ir kt. tirdami įvairių kiaušinių pakaitų (kiaušinių miltelių, išrūgų baltymų, sojos miltų, kviečių glitimo, ksantano gumos, agaro gumos ir kt.) įtaką keksų kokybei, taip pat nustatė, kad kepiniai, pagaminti su kiaušinio milteliais, buvo didžiausio aukščio ir tūrio, mažiausio tankio [158]. Gularte ir kt. nustatė, kad ankštinių miltų (žirnių, lęšių ir pupelių) priedas neturėjo reikšmingos įtakos sluoksniuoto ryžių miltų pyrago nukepimui ir padidino kepinio savitąjį tūrį [154].

3.1 lentelė. Baltyminių priedų įtaka keksų fizikiniams rodikliams

Tiriamasis kepinys	Aukštis (mm)	Nukepimas (g)	Savitasis tūris (cm^3/g)
Be baltymų priedų	37,1 ± 1,1	7,5 ± 0,3	1,56 ± 0,04
LBI	35,2 ± 1,3	7,6 ± 0,3	1,54 ± 0,04
LBHP	36,4 ± 0,9	7,5 ± 0,2	1,54 ± 0,05
KB	43,2 ± 2,2	7,4 ± 0,3	2,19 ± 0,05

LBI – lubinų baltymų izoliatas; LBHP – lubinų baltymų hidrolizatas, gautas naudojant Protamex preparatą; KB – kiaušinio baltymo milteliai.

Tekstūros rodikliai. Baltyminių priedų įtakos ryžių miltų keksų tekstūros rodikliams tyrimo rezultatai pateikti 3.2 lentelėje. Rezultatų analizė parodė, kad kepiniai su skirtingais baltyminiais priedais reikšmingai skyrėsi kietumu, tamprumu, rišlumu ir stangrumu. Daugiausiai kepinio tekstūros parametrus keitė kiaušinio baltymo priedas. Šie kepiniai išsiskyrė didžiausiu kietumu, tamprumu, rišlumu ir stangrumu. Lyginant lubinų baltymų priedus, didesnę įtaką tekstūros rodikliams turėjo lubinų baltymų hidrolizatas, kuris reikšmingai padidino tirtus tekstūros rodiklius, išskyrus stangrumą. Keksai su lubinų baltymų izoliato priedu pasižymėjo panašiomis tekstūros savybėmis kaip ir kepiniai be baltymų priedų.

Apibendrinant tekstūros tyrimo rezultatus galima teigti, kad keksai su gyvūninės kilmės (kiaušinių) baltymų priedu buvo tampresni, rišlesni ir stangresni nei kepiniai su augalinės kilmės (lubinų) baltymų priedais. Tamprumo ir rišlumo padidėjimas gali būti siejamas su didesne šių kepinių tūrine apimtimi ir akytesne struktūra. Žinoma, kad tamprumas susijęs su kepinio akytumu ir elastingumu, didesnės šio rodiklio vertės rodo geresnę keksų kokybę [148]. Tankesnė kepinių su lubinų baltymų priedais struktūra turėjo įtakos ir mažesnėms tekstūros rodiklių vertėms. Lubinų baltymų hidrolizė reikšmingai pagerino jų funkcines savybes ir panaudojimo kepinių be glitimo baltymų gamyboje galimybes.

3.2. lentelė. Baltyminių priedų įtaka keksų tekstūros rodikliams

Mėginys	Kietumas (N)	Tamprumas	Rišlumas	Stangrumas (N)
Be baltymų priedų	104 ± 11	0.564 ± 0,042	0.411 ± 0,009	24 ± 2
LBI2	97 ± 15	0.573 ± 0,037	0.412 ± 0,008	27 ± 4
LBHP	114 ± 14	0.610 ± 0,029	0.450 ± 0,025	27 ± 5
KB	114 ± 11	0.818 ± 0,047	0.672 ± 0,063	63 ± 10
LBI – lubinų baltymų izoliatas; LBHP – lubinų baltymų hidrolizatas, gautas naudojant Protamex preparatą; KB – kiaušinio baltymo milteliai.				

Išvados

1. Hidrolizė egzopeptidazių ir endoproteazių kompleksu iš Aspergillus oryzae (Flavourzyme) turėjo didesnę įtaką lubinų baltymų tirpumui nei hidrolizė endoproteazėmis; tirpiųjų baltymų kiekis hidrolizate padidėjo, lyginant su baltymų izoliatu, 14,5–15 %. Mažiausias tirpiųjų baltymų pokytis nustatytas endoproteaze iš *Bacillus licheniformis* (Alcalase) hidrolizuotuose baltymuose; jų kiekis padidėjo tik 8 %. Baltymų išskyrimo būdas: ekstrakcija šarminėje terpėje/nusodinimas izoelektriniame taške arba išsūdymas – turėjo įtakos jų kiekiui, bet ne hidrolizės efektyvumui.
2. Lubinų baltymų hidrolizatai išsiskyrė geresnėmis putų sudarymo savybėmis nei nehidrolizuoti baltymai. Šių savybių pokyčiai priklausė nuo fermentinio preparato parinkimo ir terpės pH. Didžiausiu putų sudarymo pajėgumu ir jų stabilumu pasižymėjo egzopeptidazių ir endoproteazių kompleksu iš *A. oryzae* (Flavourzyme) ir endoproteaze iš *Bacillus* spp. (Protamex) hidrolizuoti baltymai šarminėje terpėje (pH 8). Rūgštinant terpę iki pH 4, putų sudarymo savybės prastėjo.
3. Hidrolizuoti baltymai, lyginant su nehidrolizuotais, pasižymėjo didesniu pajėgumu sudaryti emulsiją, tačiau mažesniu jų stabilumu, nepriklausomai nuo terpės pH. Rūgštinėje terpėje (pH4–6) didžiausiu emulsijos sudarymo pajėgumu išsiskyrė endoproteaze iš *Bacillus* spp. (Protamex) hidrolizuoti baltymai, o šarminėje terpėje (pH 8) – egzopeptidazių ir endoproteazių kompleksu iš *A. oryzae* (Flavourzyme).
4. Baltyminių priedų įtaka ryžių miltų keksų kokybei priklausė nuo jų šaltinio. Gyvūninės kilmės (kiaušinio) baltymai daugiau gerino šių kepinių kokybę (tūrį, kietumą, tamprumą, rišlumą, stangrumą) nei augalinės kilmės (lubinų) baltymai. Jiems artimiausios kokybės rodiklių vertės buvo būdingos kepiniams su lubinų baltymų hidrolizato (gauto veikiant egzopeptidazių ir endoproteazių kompleksu iš *A. oryzae* (Flavourzyme)) priedu. Tai patvirtina, kad hidrolizė pagerino lubinų baltymų funkcines savybes ir rodo jų panaudojimo galimybes miltinės konditerijos kepinių be glitimo baltymų kokybei ir maistingumui pagerinti.

Bibliografinių nuorodų sąrašas

1. MAKNICKIENĖ, Zita. "Mažai alkaloidų turinčių siauralapių lubinų selekcija" Žemdirbystė, t. 94, Nr. 4 (2007), p. 71–78.
2. Interneto prieiga: [žiūrėta 2015 m. spalio 18 d.] http://www.agroakademija.lt/augalininkyste/technologijos/?SId=600.
3. RUIZ-LOPEZ, M. A. P.M. Garcia-Lopez, H. Castaneda-Vazquez, N. J. F. Zamora, P. Garzon-De la Mora, J. Banuelos Pineda, C. Burbano, M. M. Pedrosa, C. Cuadrado, and M. Muzquiz. Chemical Composition and Antinutrient Content of three Lupinus Species from Jalisco, Mexico. Journal of food compositions and analysis. 2000, Vol. 13, P. 193–199. doi:10.1006/jfca.1999.0887
4. SRIPRIYA, G, U. Antony, T. S. Chandra. Changes in carbohydrates, free amino acids, organic acids, phytate and HCl extractability of minerals during germination and fermentation of finger millet (Eleusine coracana). Food Chemistry. 1997, Vol. 58, P. 345–350.
5. CZARNECKA, M, Z. Czarnecki, J. Nowak, H. Roszyk. Effect of lactic fermentation and extrusion of bean and pea seeds on nutritional and functional properties. Nahrung, 1998, Vol. 42, P. 7–11.
6. MULIMANI, V. H., S. Paramjyothi. Effect of heat treatment on trypsin/chymotrypsin inhibitor activity of red gram (Cajanus cajan L.). Plant Foods Hum. Nutr. 1994, Vol. 46, P. 103–107.
7. FEENEY, R. E. Tailoring proteins for Food and medical uses: State of the art and interrelationships. In Feeney RE & Whitaker JR (eds). Protein Tailoring for Food and Medical uses. Marcel Decker Inc., New York, 1986, P. 1–40.
8. PEÑA-RAMOS, E. A., Y. Xiong. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. J. Food Sci. 2002, Vol. 67, P. 2952–2956.
9. SCHMIDL, M. K., S. T. Taylor, J. A. Nordlee. Use of hydrolysate based products in special medical diets. Food Tech. 1994, Vol. 48, P. 77–85.
10. PAPAVERGOU, E. J., J. G. Bloukas, G. Doxastkis. Effect of lupin seed proteins on quality characteristics of fermented sausages. Meet Sci. 1999, Vol. 52, P. 421–427.
11. SHUKLA, T. P. Chemical modification of food proteins. In Food protein deterioration. Mecanisms and functionality. Cherry, J. P., Ed.; American Chemical Society. Washington, DC. 1982.
12. MAHMOUD, M., W. Malone, C. Cordle. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. J Food Sci. 1992, Vol. 57, No. 5, P. 1223–1229.

13. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (AACC) – 10th Edition – Including Annual Supplements. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 2003. 1200 p. ISBN 1891127128.
14. PAREDES-L´OPEZ, O., C. Ordorica-Falomir. Production of safflower protein isolates: Composition, yield and protein quality. J Sci Food Agric. 1986, Vol. 37, P. 1104–1109.
15. VILLACRES, Elena, Jenny Ruales. Obtainment and physical-chemical and functional characterization of a lupin (*Lupinus mutabilis Sweet*) protein hydrolyzate. International Journal of Advanced Research. 2014, Vol. 2, Issue 1, P. 158–165.
16. ABDALLA, M.H., A.O. Elkhalifa, A.H. Eltinay. Factors affecting protein extraction from cowpea. J Food Sci. Technol. 2001, Vol. 38, P. 532-533.
17. ZIELINSKA, D., J. Frias, M. K. Piskuła, H. Kozłowska, H. Zielinski, C. Vidal-Valverde. Evaluation of the antioxidant capacity of lupin sprouts germinated in the presence of selenium. European Food Research and Technology. 2008, Vol. 227, P. 1711–1720.
18. LINNEMANN, A. R., D. S. Dijkstra. Toward sustainable production of protein-rich foods: appraisal of eight crops for Western Europe. Part I. Analysis of the primary links of the production chain. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2002, Vol. 42, P. 377–401.
19. RODRIGUEZ-AMBRIZ, S. L., A. L. Martinez-Ayala, F. Millan, C. Davila-ortiz. Composition and functional properties of *Lupinus campestris* protein isolates. Plant Foods for Human Nutrition. 2005, Vol. 60, P. 99–107.
20. GULEWICZ, P., C. Martinez-Villaluenga, J. Frias, D. Ciesiolka, K. Gulewicz, C. Vidal-Valverde. Effect of germination of the protein fraction composition of different lupin seeds. Food Chemistry. 2008, Vol. 107, P. 830–844.
21. DRAKOS, A., G. Doxastakis, V. Kiosseoglou. Functional effects of lupin proteins in comminuted meat and emulsion gels. Food Chemistry. 2007, Vol. 100, P. 650–655.
22. MARTINEZ-VILLALUENGA, C., E. Sironi, C. Vidal-Valverde, M. Duranti. Effects of oligosaccharide removing procedure on the protein profiles of lupin seeds. European Food Research and Technology. 2006b, Vol. 223, P. 691–696.
23. CLARK, R. L., S. J. Johnson. Sensory acceptability of foods with added lupin (*Lupinus angustifolius*) kernel fiber using pre-set criteria. Journal of Food Science. 2002, Vol. 67, P. 356–362.
24. CIESIOŁKA, D., P. Gulewicz, C. Martinez-Villaluenga, R. Pilarski, M. Bednarczyk, K. Gulewicz. Products and biopreparations from alkaloid-rich lupin in animal nutrition and ecological agriculture. Folia Biologica. 2005, Vol. 53, P. 59–66.

25. UZUN, B., C. Arslan, M. Karhan, C. Toker. Fat and fatty acids of white lupin (*Lupinus albus L.*) in comparison to sesame (*Sesamum indicum* L.). Food Chemistry. 2007, Vol. 102, P. 45–49.
26. HAMAMA, A. A., H. L., Bhardwaj. Phytosterols, triterpene alcohols, and phospholipids in seed oil from white lupin. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2004, Vol. 81, P. 1039–1044.
27. MARTINEZ-VILLALUENGA, C., J. Frias, C. Vidal-Valverde. Functional lupin seeds (*Lupinus albus* L. and *Lupinus luteus* L.) after extraction of α-galactosides. Food Chemistry. 2006a, Vol. 98, P. 291–299.
28. ERBAS, M., M. Certel, M. K. Uslu. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). Food Chemistry. 2005, Vol. 89, P. 341–345.
29. OOMAN, B. D., N. Tiger, M. Olson, P. Balasubramanian. Phenolics and antioxidative activities in narrowleafed lupins (*Lupinus angustifolius* L.). Plant Foods for Human Nutrition. 2006, Vol. 61, P. 91–97.
30. FERNANDEZ-OROZCO, R., J. Frias, R. Muňoz, H. Zielinski, M.K. Piskula, H. Kozlowska, C. Vidal-Valverde. Effect of fermentation conditions on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* cv. Zapaton. European Food Research and Technology. 2008, Vol. 227, P. 979–988.
31. EL-ADAWY, T. A., E. H. Rahma, A. A. El-Bedawey, A. F. Gafar. Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates. Food Chemistry. 2001, Vol. 74, P. 455–462.
32. MAKNICKIENĖ, Z., Ražukas A.: Narrow-leaved forage lupine (*Lupinus angustifolius* L.) breeding aspects. Žemės Ūkio Mokslai. 2007, Vol. 14, P. 27–31.
33. DE CORTES-SANCHEZ, M., P. Altares, M. M. Pedrosa, C. Burbano, C. Cuadrado, C. Goyoaga, M. Muzquiz, C. Jimenez-Martinez, G. Davila-Ortiz. Alkaloid variation during germination in different lupin species. Food Chemistry. 2005, Vol. 90, P. 347–355.
34. PASTOR-CAVADA E., R. Juan, J. E. Pastor, M. Alaiz, J. Vioque. Analytical nutritional characteristics of seed proteins in six wild *Lupinus* species from Southern Spain. Food Chemistry. 2009, Vol. 117, P. 466–469.
35. MULAYIM M., A. Tamkoc, M. Babaoglu. Sweet white lupins versus local bitter genotype: agronomic characteristics as affected by different planting densities in the Goller region of Turkey. European Journal of Agronomy. 2002, Vol. 17, P. 181–189.
36. SIRONI, E., F. Sessa, M. Duranti. A simple procedure of lupin seed protein fractionation for selective food applications. European Food Research and Technology. 2005, Vol. 221, P. 145–150.

37. VAZA, A. C., C. Pinheiroa, J. M. N. Martins, C. P. P. Ricardo. Cultivar discrimination of Portuguese Lupinus albus by seed protein electrophoresis: the importance of considering ‘‘glutelins’’ and glycoproteins. Field Crops Research. 2004, Vol. 87, P. 23–34.
38. CASEY, R. Distribution and some properties of seed globulins. In P. R. Shewry, & R. Casey (Eds.), Seed proteins. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers.1999, P. 159–169.
39. CAPRARO, J., C. H. Magni, M. Fontanesi, A. Budelli, M. Duranti. Application of two-dimensional electrophoresis to industrial process analysis of proteins in lupin-based pasta. LWT-Food Science and Technology. 2008, Vol. 41, P. 1011–1017.
40. HALL, R. S., S. K. Johnson, A. L. Baxter, M. J. Ball. Lupin kernel fiber-enriched foods beneficially modify serum lipids in men. European Journal of Clinical Nutrition. 2005, Vol. 59, P. 325–333.
41. SMITH, S. C., R. Choy, S. K. Johnson, R. H. Hall, A. C. M. Wildeboer-Veloo, G. W. Welling. Lupin kernel fiber consumption modifies fecal microbiota in healthy men as determined by rRNA gene fluorescent in situ hybridization. European Journal of Nutrition. 2006, Vol. 45, P. 335–341.
42. BLAGROVE, R. J., J. M. Gillespie. Isolation, purification and characterisation of the seed globulins of Lupinus albus. Australian Journal of Plant Physiology. 1975, Vol. 2, P. 13–27.
43. PISARIKOVA, B., Z. Zraly, F. Bunka, M. Trckova. Nutritional value of white lupine cultivar Butan in diets for fattening pigs. Veterinarni Medicina. 2008, Vol. 53, P. 124–134.
44. MARTINEZ-VILLALUENGA, C., H. Zieliński, J. Frias, M. K. Piskuła, H. Kozłowska, C. Vidal-Valverde. Antioxidant capacity and polyphenolic content of high-protein lupin products. Food Chemistry. 2009, Vol. 112, P. 84–88.
45. JIMENEZ-MARTIINEZ, C., H. Hernandez-Sanchez, G. Alvarez-Manilla, N. Robledo-Quintos, J. Martiınez-Herrera, G. Davila-Ortiz. Effect of aqueous and alkaline thermal treatments on chemical composition and oligosaccharide, alkaloid and tannin contents of *Lupinus campestris* seeds. Journal of Science and Food Agriculture. 2001, Vol. 81, P. 1–8.
46. DURANTI, M., F. Sessa, A. Scarafoni, T. Bellini, F. Dallocchio. Thermal stabilities of lupin seed conglutin g protomers and tetramers. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000, Vol. 48, P. 1118–1123.
47. SUJAK, A., A. Kotlarz, W. Strobel. Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. Food Chemistry. 2006, Vol. 98, P. 711–719.
48. TOTOSAUS, A., J. G. Montejano, J. A. Salazar, I. Guerrero, Int. J. Food Sci. Technol. 2002, Vol. 37, P. 589–601.

49. BERGHOUT, J. A. M., R. M. Boom, A. J. van der Goot. The potential of aqueous fractionation of lupin seeds for high – protein foods // Journal of Food Chemistry. 2014. Vol. 159. P. 64–70.
50. JUODEIKIENĖ, G., D. Vidnmantienė. Grūdų ir konditerijos produktų mokslas ir technologija. Kaunas, 2013.
51. FEENEY, R. E. Tailoring proteins for Food and medical uses: State of the art and interrelationships. In Feeney RE & Whitaker JR (eds) Protein Tailoring for Food and Medical uses. Marcel Decker Inc. New York. 1986, P. 1–40.
52. PEDROCHE, J., M. M. Yust, H. Lqari, C. Megias, J. Giron-Calle, M. Alaiz, J. Vioque, F. Millan, Food Res. Int. 2007, Vol. 40, P. 931–938.
53. DURANTI, M., A. Scarafoni, A. Di Cataldo, F. Sessa. Interaction of metal ions with lupin seed conglutin g. Phytochemistry. 2001, Vol. 56, P. 529–533.
54. MAGNI, C., F. Sessa, E. Accardo, M. Vanoni, P. Morazzoni, A. Scarafoni, et al. Conglutin g, a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. Journal of Nutritional Biochemistry. 2004, Vol. 15, P. 646–650.
55. AMAROWICZ, R., J. Eur. Lipid Sci. Technol. 2008, Vol. 110, P. 489–490.
56. JAMDAR, S. N., V. Rajalakshmi, M.D. Pednekar, F. Juan, V. Yardi, A. Sharma, Food Chem. 2010, Vol. 121, P. 178–184.
57. DAMRONGSAKKUL, S., K. Ratanathammapan, K. Komolpis, W. Tanthapanichakoon, J. Ind. Eng. Chem. 2008, Vol. 14, P. 202–206.
58. SCARAFONI, A., A. Consonni, V. Galbusera, A. Negri, G. Tedeschi, P. Rasmussen, et al. Identification and characterization of a BowmaneBirk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in Lupinus albus seeds. Phytochemistry. 2008, Vol. 69, P. 1820–1825.
59. KLOMPONG, V., S. Benjakul, D. Kantachote, F. Shahidi, Food Chem. 2007, Vol. 102, P. 1317–1327.
60. CLEMENTE, A., C. Domoney. Therapeutic properties of legume protease inhibitors from the BowmaneBirk family. Recent Progress in Medicinal Plants. 2008, Vol. 20, P. 397–417.
61. KORHONEN, H. J. Funct. Food. 2009, Vol. 1, P. 177–187.
62. LI, G., G. Le, Y. Shi, S. Shrestha, Nutr. Res. 2004, Vol. 24, P. 469–486.
63. YUST, M. M., J. Pedroche, M.C. Millan-Linares, J.M. Alcaide-Hidalgo, F. Millan, Food Chem. 2010, Vol. 122, P. 1212–1217.
64. TURGEON, S. L., S. F. Gauthier, D. Molle, J. Leonil, J. Agric. Food Chem. 1992, Vol. 40, P. 669–675.

65. VIDMANTIENĖ, Daiva, Gražina Juodeikienė. Kai kurie biologiniai grūdinės žaliavos fermentacijos procesų inhibitoriai ir jų vertinimo aspektai. mokomoji knyga. Kaunas. Kauno Technologijos universitetas, 2012, ISBN 978-609-02-0741-3
66. RADCLIFFE, M. J., G. K. Scadding, H. Morrow-Brown, Lupin flour anaphylaxis. Lancet. 2005, Vol. 365, P. 1360.
67. LINDVIK, H., L. Holden, M. Levik, M. Cvancarova, R. Halvorsen. Lupin sensitisation and clinical allergy in food allergic children in Norway. Acta Paediatrica. 2008, Vol. 97, P. 91–95.
68. MAGNI, C., A. Herndl, E. Sironi, A. Scarafoni, C. Ballabio, P. Restani, et al. One- and two-dimensional electrophoretic identification of IgE-binding polypeptides of Lupinus albus and other legume seeds. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2005, Vol. 53, P. 4567–4571.
69. GALAN, A. M. G., M. Brohee, E. Scaravelli, A. J. Van Hengel, H. Chassaigne. Development of real-time PCR assay for the detection of lupin residues in food products. European Food Research and Technology. 2010, Vol. 230, P. 597–608.
70. MONSALVE, R. I., M. Villalba, M. Rico, P. R. Shewry, R. Rodrı´guez. The 2S albumin proteins. In E. N. Clare Mills, & P. R. Shewry (Eds.), Plant food allergens. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2004, P. 42–56.
71. DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. Fitoterapia. 2006, 77, 67–82.
72. FERREIRA, I. M. P. L. V. O., O. Pinho, M. V. Mota, P. Tavares, A. Pereira, M. P. Goncalves, D. Torres, C. Rocha, J. A. Teixeira, Int. Dairy J. 2007, Vol. 17, P. 481–487.
73. SCARAFONI, A., C. Magni, , M. Duranti. Molecular nutraceutics as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health. Trends in Food Science and Technology. 2007, Vol. 18, P. 454–463.
74. SCHMELZER, C. E. H., R. Schops, L. Reynell, R. Ulbrich-Hofmann, R. H. H. Neubert, K. Raith, J. Chromatogr. A 2007, Vol. 1166, P. 108–115.
75. SIRTORI, C. R., M. R. Lovati, C. Manzoni, S. Castiglioni, M. Duranti, C. Magni, et al. Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. Journal of Nutrition. 2004, Vol. 134, P. 18–23.
76. PILVI, T. K., T. Jauhiainen, Z. J. Cheng, E. M. Mervaala, H. Vapaatalo, R. Korpela. Lupin protein attenuates the development of hypertension and normalises the vascular function of NaCl-loaded GotoeKakizaki rats. Journal of Physiology and Pharmacology. 2006, Vol. 57, P. 167–176.

77. YOSHIE-STARK, Y., J. Bez, Y. Wada, A. Wa¨sche. Functional properties, lipoxygenase activity, and health aspects of Lupinus albus protein isolates. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004, Vol. 52, P. 7681–7689.
78. KORHONEN, H., A. Pihlanto, Int. Dairy J. 2006, Vol. 16, P. 945–960.
79. PELGROM, P. J. M., A. M. Vissers, R. M. Boom, M. A. I. Schutyser. Dry fraction for production of functional pea protein concentraties. // Journal of Food Res Int. 2010, Vol. 53, P. 232–239.
80. KHATTAB, R. Y., S. D. Arntfield. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. // LWT - Food Sci. Emerg. Technol. 2009, Vol. 42, P. 1113–1118.
81. MONDOR, M., S. Aksay, H. Drolet, S. Roufik, E. Farnworth, J. I. Boye. Influence of processing on composition and antinutritional factors of chickpea protein concentrates produced by isoelectric precipitation and ultrafiltration. // Journal of Innow. Food Sci. Emerg. Technol. 2009, Vol. 10, P. 342–347.
82. WANG, N., D. W. Hatcher, R. Toews, E. J. Gawalko. Influence of cooking and dehulling on nutritional composition of several varieties of lentils (Lens culinaris). // LWT - Food Sci. Technol. 2009, Vol. 42, P. 842–848.
83. BOYE, J. I., S. Aksay, S. Roufik, S. Ribereau, M. Mondor, E. R. Farnworth, S. H. Rajamohamed. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. // Journal of Food Res. Int. 2010, Vol. 43, P. 537–546.
84. EMABABY, H. E. Effect of soaking, dehulling and cooking methods on certain antinutrients and in vitro digestibility of bitter and sweet lupin seeds // Journal of Food Science. Biotechnology. 2010, Vol. 19, P. 1055–1062.
85. HASSAN, A. B., G. A. Osman, E. E. Babiker. Effect of domestic processing on antinutrients and availability of proteins and mineralsof lupin (Lupinus termis) seeds // Journal of Food Technologies. 2005, Vol. 3, P. 255–262.
86. BOYE, J., R. Wijesinha-Bettoni, B. Burlingame. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. // Journal of Brit. J. Nutr. 2012, Vol. 108, P. 183–211.
87. PELGROM, P. J. M., J. A. M. Berghout, A. J. van der Goot, R. M. Boom, M. A. I. Schutyser. Preparation of functional lupine protein fractions by dry separation // LWT – Food Science and Technology. 2014, Vol. 59, P. 680–688.

88. BARBANA, C., J. I. Boye. In vitro protein digestibility and psysico – chemical properties, and protein concentrates from two varietes of lentil (Lens culinaris) // Journal of Food and Function. 2013, Vol. 4, P. 310–319.
89. HOOVER, R., T. Hughes, H. J. Chung, Q. Liu. Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review // Journal of Food Research Int. 2010, Vol. 43, P. 399–413.
90. TOSH, S. M., S. Yada. Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications // Journal of Food Research Int. 2010, Vol. 43, P. 450–460.
91. DERVAS, G., G. Doxastakis, S. Hadjisavva-Zinoviadi, N. Triantafillakos. Lupine flour addition to wheat flour doughs and effect on rheological properties // Journal of Food Chemistry. 1999, Vol. 66, P. 67–73.
92. JAYASENA, V., H. J. Chih, S. M. Nasar-Abbas. Efficient isolation of lupin protein // Journal of Food Australia. 2011, Vol. 63 (7), P. 306–309.
93. HERNANDEZ-LEDESMA, B., M. M. Contreras, I. Recio, Adv. Colloid Interface Sci. 2011, Vol. 165, P. 23–35.
94. CHAPLEAU, N., M. de Lamballerie-Anton. Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation. Food Hydrocolloids. 2003, Vol. 17, P. 273–280.
95. XU, J., A. A. Mohamed, P. Hojilla-Evangelista, D.J. Sessa. Viscoelastic properties of lupin proteins produced by ultrafiltration-diafiltration. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2006, Vol. 83, P. 553–558.
96. GULEWICZ, P., C. Martinez-Villaluenga, J. Frias, D. Ciesiołka, K. Gulewicz, C. Vidal-Valverde. Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. Food Chemistry. 2008, Vol. 107, P. 830–844.
97. XU, J., A. A. Mohamed, D. J. Sessa. Rheological properties of lupin proteins suspensions. International Journal of Agricultural Research. 2008, Vol. 3, P. 317–324.
98. HRˇCKOVA, M., M. Rusˇnakova, J. Zemanoviˇc, Czech. J. Food Sci. 2002, Vol. 20, P. 207–14.
99. SCARAFONI, A., A. Ronchi, M. Duranti. A realtime PCR method for the detection and quantification of lupin flour in wheat flour-based matrices. Food Chemistry. 2009, Vol. 115, P. 1088–1093.
100. SATHE, K., G. M. Sharma, Mol. Nutr. Food Res. 2009, Vol. 53, P. 970–978.
101. HERNANDEZ-LEDESMA, B., M. M. Contreras, I. Recio, Adv. Colloid Interface Sci. 2011, Vol. 165, P. 23–35.

102. LQARI, H., J. Vioque, J. Pedroche, F. Millan. *Lupinus angustifolius* protein isolates: Chemical composition, functional properties and protein characterization. Food Chemistry. 2002, Vol. 76, P. 349–356.

103. TORRES, A., J. Frias, M. Granito, M. Guerra, C. Vidal-Valverd. Chemical, biological and sensory evaluation of pasta products supplemented with α-galactoside free lupine flours. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2007, Vol. 87, P. 74–81.

104. SICHERER S. H. Lancet 360 2002, P. 701–710.

105. WASCHE, A., K. Muller, U. Knauf. New processing of lupin protein isolates and functional properties. Die Nahrung. 2001, Vol. 45, P. 393–395.

106. KITTS, D. D., K. Weiler, Curr. Pharm. Des. 2003, Vol. 9, P. 1309–1323.

107. ENGEL E., C. Septier, N. Leconte, C. Salles, J. Le Quere, J. Dairy Res. 2001, Vol. 68, P. 675–688.

108. DURANTI, M., A. Consonni, Ch. Magni, F. Sessa, A. Scarafoni. The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. Trends in Food Science and Technology. 2008, Vol. 19, P. 624–633.

109. PASTOR-CAVADA, E., R. Juan, J. E. Pastor, M. Alaiz, J. Vioque. Analytical nutritional characteristics of seed proteins in six wild *Lupinus* species from Southern Spain. Food Chemistry. 2009, Vol. 117, P. 466–469.

110. POLLARD, N. J., F. L. Stoddard, Y. Popineau, C. W. Wrigley, F. MacRitchie. Lupin flours as additives: Dough mixing, breadmaking, emulsifying and foaming. Cereal Chemistry, 2002, Vol. 79, P. 662–669.

111. SINGH, T. K., M. A. Drake, K. R. Cadwallader, Comp. Rev. Food Sci. Food Safety. 2003, Vol. 2, P. 139–162.

112. WROBLEWSKA, B., M. Karamac, R. Amarowicz, A. Szymkiewicz, A. Troszynska, E. Kubicka, Int. J. Food Sci. Technol. 2004, Vol. 39, P. 839–850

113. DOXASTAKIS, G., I. Zafiriadis, M. Irakli, H. Marlani, C. Tananaki. Lupin, soya and triticale addition to wheat flour doughs and their effect on rheological properties. Food Chemistry. 2002, Vol. 77, P. 219–227.

114. KODERA, T., M. Asano, N. Nio, J. Food Sci. 2006, Vol. 71, P. 609–614.

115. SAHA, B. C., K. Hayashi, Biotechnol. Adv. 2001, Vol. 19, P. 355–370.

116. MAEHASHIA, K., L. Huang, Cell. Mol. Life Sci. 2009, Vol. 66, P. 1661–1671.

117. GUEMES-VERA, N., R. J. Peňa-Bautista, C. Jimenez-Martinez, G. Davila-Ortiz, G. Caderon-Dominguez. Effective detoxification and decoloration of *Lupinus mutabilis* seed

derivates, and effect of these derivatives on bread quality and acceptance. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2008, Vol. 88, P. 1135–1143.

118. DOXASTAKIS, G., M. Papageorgiou, D. Mandalou, M. Irakli, E. Papalamprou, A. D'Agostina, D. Resta, G. Boschin, A. Arnoldi. Technological properties and nonenzymatic browning of white lupin protein enriched spaghetti. Food Chemistry. 2007, Vol. 101, P. 57–64.

119. CAMPOS-VEGA, R., G. Loarca-Piña, B. D. Oomah Minor components of pulses and their potential impact on human health. Food Research International. 2010, Vol. 43, P. 461–482.

120. OOMAN, B. D., N. Tiger, M. Olson, P. Balasubramanian. Phenolics and antioxidative activities in narrowleafed lupins (*Lupinus angustifolius* L.). Plant Foods for Human Nutrition. 2006, Vol. 61, P. 91–97.

121. HOJILLA-EVANGELISTA, M. P., D. J. Sessa, A. Mohamed. Functional properties of soybean and lupin protein concentrates produced by ultrafiltration-diafiltration. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2004, Vol. 81, P. 1153–1157.

122. XU, J., A. A. Mohamed. Thermal and rheological properties of *Lupinus albus* flour. Journal of the American Oil Chemists Society. 2003, Vol. 80, P. 763–766.

123. CORDLE, C. T. J. Nutr. 2004, Vol. 134, P. 1213–1219.

124. PINTO, S. E. S. C., V. A. Neves, B. M. M. Medeiros, J. Agric. Food Chem. 2009, Vol. 57, P. 1070–1075.

125. RAYMONDO, A., J. Franco, C. Gallegos, J. Empis, I. Sousa. Effect of thermal denaturation of lupin protein on its emulsifying properties. Nahrung/Food. 1998b, Vol. 42, P. 220–224.

126. CABANILLAS, A., M. M. Pedrosa, J. Rodriguez, M. Muzquiz, S. J. Maleki, C. Cuadrado, C. Burbano, J. F. Crespo, Int. Arch. Allergy Immunol. 2012, Vol 157, P. 41–50.

127. VAN BOEKELI, M., V. Fogliano, N. Pellegrini, C. Stanton, G. Scholz, S. Lalljie, V. Somoza, D. Knorr, P. Rao, J. G. Eisenbrand, Mol. Nutr. Food Res. 2010, Vol. 54, P. 1215–1247.

128. BURTON, S. G., D. A. Cowan, J. M. Woodley, Nat. Biotechnol. 2002, Vol. 20, P. 37–45.

129. DU TOIT, G., R. Meyer, N. Shah, R. G. Heine, M. A. Thomson, G. Lack, A. T. Fox, Arch. Dis. Child Educ. Pract. Ed. 2010, Vol. 95, P. 134–144.

130. JUNG, S., P. A. Murphy, L. A. Johnson, J. Food Sci. 2005, Vol. 70, P. 180–187.

131. EL-AGAMY, E. I., Small Rumin. Res. 2007, Vol. 68, P. 64–72.

132. CREUSOT, N., H. Gruppen, J. Agric. Food Chem. 2008, Vol. 56, P. 10332–10339.

133. AMAROWICZ, R., J. Eur. Lipid Sci. Technol. 2010, Vol. 112, P. 695–696.

134. ZHAO, G., Y. Liu, M. Zhao, J. Ren, B. Yang. Food Chem. 2011, Vol. 127, P. 1438–1443.

135. CONDE, J. M., M. M. Y. Escobar, J. J. Pedroche Jimenez, F. M. Rodriguez, J. M. Rodriguez Patino, J. Agric. Food Chem. 2005, Vol. 53, P. 8038–8045.

136. APAR, D. K., B. Ozbek, J. Chem. Technol. Biotechnol. 2007, Vol. 82, P. 1107–1114.

137. CHEN, C., Y. Chi, M. Zhao, W. Xu, Food Sci. Biotechnol. 2012, Vol. 21, P. 27–34.

138. CREUSOT, N., H. Gruppen, G. A. van Koningsveld, C. G. de Kruif, A. G. J. Voragen. Int. Dairy J. 2006, Vol. 16, P. 840–849.

139. PARAMAN, I., N. S. Hettiarachchy, C. Schaefer, M. I. Beck, Cereal Chem. 2007, Vol. 84, P. 343–349.

140. POMMER, K. New proteolytic enzymes for the production of savory ingredients. Cereal Foods World. 1995, Vol. 40, P. 745–748.

141. ABDEEN, E. M. I. Studies on chemistry and technology of some plant foods. MSc thesis, Faculty of Agriculture, Kafr El-Sheikh, Egypt, Tanta University, 1987.

142. SATHE, S. K., S.S. Deshpande, D.K. Salunkhe. Functional properties of black gram (*Phaseolous mungo L.*) proteins. Lebensmittel-Wiss and Technologic. 1983, Vol. 16, P. 69–72.

143. RAWLINGS, N. D., A. J. Barrett, A. Bateman, Nucleic Acids Res. 2012, Vol. 40, P. 343–350.

144. EIJSINK, V. G. H., A. Bjørk, S. Gaseidnes, R. Sirevag, B. Synstad, B. van den Burg, G. Vriend, Biotechnol. 2004, Vol. 113, P. 105–120.

145. JAENICKE, R., H. Lilie. Adv. Protein Chem. 2000, Vol. 53, P. 329–362.

146. SANGEETHA, K. T. E., J. Abraham, Mol. Catal. B: Enzym. 2006, Vol. 38, P. 171–177.

147. EL-ADAWY, T. A., E. H. Rahma, A. A. El-Bedawy, A. M. Gafar. Properties of some citrus seeds. Part 2. Functional propertiesof seed flours. Nahrung. 1999, Vol. 43, P. 379–384.

148. MATOS, M. E., C. M. Rosell. Chemical composition and starch digestibility ofvdifferent gluten-free breads. Plant Food for Human Nutrition. 2011, Vol. 66, P. 224–230.

149. SANZ, T., A. Salvador, R. Baixauli, S. M. Fiszman. Evaluation of four types of resistant starch in muffins. II. Effects in texture, colour and consumer response. European Food Research and Technology. 2009, Vol. 229, P. 197–204.

150. NACHAY, K. Gluten-free offerings increase. Food Technology. 2010, Vol 64, P. 13–14.

151. TURABI, E., G. Sumnu, S. Sahin. Rheological properties and quality of rice cakes formulated with different gums and an emulsifier blend. Food Hydrocolloids. 2008a, Vol. 22, P. 305–312.

152. TURABI, E., G. Sumnu, S. Sahin. Optimization of baking of rice cakes in infrared-microwave combinationovenby response surfacemethodology. Food and Bioprocess Technology. 2008b, Vol. 1, P. 64–73.

153. GULARTE, M. A., M. Gómez, C. M. Rosell. Impact of legume flours on quality and in vitro digestibility of starch and protein from gluten-free cakes. Food Bioprocess Technology. An International Journal. 2012, Vol. 5, P. 3142–3150.

154. GULARTE, M. A., E. de la Hera, M. Gómez, C. M. Rosell. Effect of different fibers on the enrichment of gluten-free layer cake. LWT e Food Science and Technology. 2012, Vol. 48, P. 209–214.

155. PARK, S. J., Ki-Y. Ha, M. Shin. Properties and qualities of rice flours and gluten-free cupcakes made with higher-yield rice varieties in Korea. Food Science Biotechnology. 2012, Vol. 21, P. 365–372.

156. RONDA, F., B. Oliete, M. Gómez, P. A. Caballero, V. Pando. Rheological study of layer cake batters made with soybean protein isolate and different starch sources. Journal of Food Engineering. 2011, Vol. 102, P. 272–277.

157. MARIOTTI, M., M. Lucisano, M. A. Pagani, P. K. W. Ng. The role of cornstarch, amaranth flour, pea isolate, and Psyllium flour on the rheological properties and the ultrastructure of gluten-free doughs. Food Research International. 2009, Vol. 42, P. 963–975.

158. GEERA, B., J. A. Reiling, M. A. Hutchison, D. Rybak, B. Santha, W. S. Ratnayake. A comprehensive evaluation of egg and egg replacers on the product quality of muffins. Journal of Food Quality. 2011, Vol. 34, P. 333–342.