

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

IEVA BRINK

IŠRŪGŲ BALTYMŲ VALGOMOSIOS
PLĖVELĖS SU FUNKCINIAIS PRIEDAIS:
SUDĖTIS, SAVYBĖS, PANAUDOJIMAS
MAISTO PRODUKTŲ GAMYBOJE

Daktaro disertacija
Technologijos mokslai, Chemijos inžinerija (05T)

2016, Kaunas

UDK 637.344 (043.3)

Disertacija rengta 2009–2016 metais Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakultete Maisto mokslo ir technologijos katedroje.

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. Daiva LESKAUSKAITĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T)

Interneto svetainės, kurioje skelbiama disertacija, adresas: <http://ktu.edu>

Redagavo: Virginija STANKEVIČIENĖ (Leidykla “Technologija”)

© I. Brink, 2016

ISBN 978-609-02-1259-2

TURINYS

SUTRUMPINIMAI	5
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
1.1. Valgomųjų plėvelių apibrėžimas ir medžiagos	8
1.2. Baltymų valgomosios plėvelės: privalumai ir trūkumai	10
1.2.1. Išrūgų baltymų gebėjimas formuoti plėveles.....	10
1.2.2. Išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių barjerinės ir mechaninės savybės	12
1.2.3. Išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių antimikrobinės savybės	15
1.2.4. Išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių savybių modifikavimas.....	16
1.3. Polisacharidų valgomosios plėvelės: privalumai ir trūkumai.....	20
1.3.1. Chitozano savybės ir gebėjimas formuoti plėveles.....	21
1.4. Daugiakomponentės išrūgų baltymų ir polisacharidų valgomosios plėvelės.....	23
1.5. Valgomųjų plėvelių ir dangų naudojimas maisto pramonėje.....	25
1.6. Literatūros analizės apibendrinimas ir darbo tikslo pagrindimas	26
2. TYRIMŲ KRYPTYS, OBJEKTAI IR METODAI.....	27
2.1. Tyrimų schema	27
2.2. Tyrimų objektai	30
2.2.1. Medžiagos.....	30
2.2.2. Šilumos ir fermento transglutaminazės poveikio įtakos pieno baltymams ir išrūgų baltymams bei iš išrūgų baltymų pagamintoms plėvelėms tyrimų objektai	32
2.2.3. Funkcinių priedų įtakos išrūgų baltymų plėvelėms tyrimų objektai.....	33
2.2.4. Valgomųjų dangų įtakos šviežiams obuoliams tyrimų objektai	36
2.2.5. Valgomųjų plėvelių įtakos mikroskopinio grybo <i>Penicillium expansum</i> augimui obuoliuose tyrimų objektai	36
2.2.6. Valgomųjų dangų įtakos šviežioms braškėms tyrimų objektai.....	37
2.2.7. Valgomųjų plėvelių įtakos šviežiai kalakutienai tyrimų objektai.....	37
2.3. Tyrimų metodai	39
2.3.1. Šilumos ir fermentinio poveikio įtakos pieno baltymams ir išrūgų baltymams bei iš išrūgų baltymų pagamintų plėvelių fizikinėms cheminėms savybėms tyrimų metodai	39
2.3.2. Funkcinių priedų įtakos valgomųjų plėvelių savybėms tyrimų metodai ..	41

2.3.3.	Valgomųjų dangų įtakos šviežiams obuoliams tyrimų metodai	42
2.3.4.	Valgomųjų plėvelių įtakos mikroskopinio grybo <i>Penicillium expansum</i> augimui obuoliuose tyrimų metodai	43
2.3.5.	Valgomųjų dangų įtakos šviežioms braškėms tyrimų metodai	44
2.3.6.	Valgomųjų plėvelių įtakos kalakutienai tyrimų metodai	45
2.3.7.	Statistinė analizė	46
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	47
3.1.	Sudėties ir gamybos sąlygų įtaka išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių su funkciniais priedais fizikinėms cheminėms ir mikrobiologinėms savybėms	47
3.1.1.	Terminio ir fermentinio apdoravimo įtaka fizikinėms cheminėms išrūgų baltymų tirpalų savybėms	47
3.1.2.	Šiluma ir fermentu apdorotų išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių barjerinės, mechaninės savybės ir tirpumas	57
3.1.3.	Išrūgų baltymų plėvelių barjerinių bei mechaninių savybių modifikavimas plastikiais ir polisacharidu chitozanu	60
3.1.4.	Išrūgų baltymų plėvelių antimikrobinių savybių modifikavimas antimikrobinių medžiagų priedais	62
3.1.5.	Vaisių ir uogų sulčių įtaka išrūgų baltymų bei išrūgų baltymų ir chitozано valgomųjų plėvelių savybėms	64
3.2.	Išrūgų baltymų valgomųjų dangų ir plėvelių su funkciniais priedais įtaka kai kurių maisto produktų kokybei.....	68
3.2.1.	Išrūgų baltymų ir chitozано valgomųjų dangų įtaka šviežių pjaustytų obuolių fizikiniams cheminiam pokyčiams laikymo skirtingose sąlygose metu	68
3.2.2.	Išrūgų baltymų dangos, susidariusios elektriniame lauke, įtaka šviežių pjaustytų obuolių fizikiniams cheminiam pokyčiams laikymo metu.....	72
3.2.3.	Išrūgų baltymų ir chitozано valgomųjų dangų su funkciniais priedais įtaka mikroskopinio grybo <i>Penicillium expansum</i> augimui obuoliuose.....	75
3.2.4.	Išrūgų baltymų valgomųjų dangų su funkciniais priedais įtaka šviežių braškių fizikiniams cheminiam pokyčiams laikymo metu.....	81
3.2.5.	Išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių su funkciniais priedais įtaka kalakutienos mikrobiologiniams, fizikiniams cheminiam pokyčiams laikymo metu	91
4.	IŠVADOS	105
5.	LITERATŪROS ŠALTINIŲ SĄRAŠAS.....	107
6.	MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS	124
	PRIEDAS 1.....	126

SUTRUMPINIMAI

AJM – atominės jėgos mikroskopas

Akt – aktinidijų sultys

α -La – α -laktoalbuminas

β -Lg – β -laktoglobulinas

CHIT – chitozanas

DP – deguonies pralaidumas

DTT – ditionitritolis

E – pailgėjimas tempiant iki sutrūkimo, t. y. elastingumas

e.l. – elektrinis laukas

G – glicerolis

IB – išrūgų baltymai

KSV – mikroorganizmų kolonijas sudarantys vienetai

LDS – ličio dodecilsulfatas

LDPE – mažo tankio polietilenas

LRR – lakiosios riebalų rūgštys

o.s. – oro srautas

PE – polietileninė plėvelė

PL – „polimerizacijos“ laipsnis

„polimerai“ – baltymų makromolekulės, susidariusios veikiant transglutaminazei

„polimerizacija“ – baltymų makromolekulių susidarymas veikiant transglutaminazei

Put – putino uogų sultys

RH – aplinkos santykinis oro drėgnis

S – sorbitolis

SM – sausosios medžiagos

Sva – svarainių sultys

Spa – spanguolių sultys

Šer – šermukšnių sultys

TG – transglutaminazė

TS – tempimo stiprumas

TV – tarptautinis aktyvumo vienetas

VGP – vandens garų pralaidumas

ĮVADAS

Maisto produktų kokybės išsaugojimas jų realizacijos metu yra vienas pagrindinių uždavinių maisto produktų gamintojams. Maisto technologijose sukurta ir pritaikyta įvairių fizikinių ir cheminių apdorojimo priemonių, naudojamų siekiant kuo ilgiau išsaugoti pirminę maisto žaliavų ir produktų kokybę. Vis dėlto ir toliau nuolat ieškoma tobulėsių, draugiškų aplinkai, saugių vartotojų sveikatai, patikimų daugiafunkcinių alternatyvų, galinčių ne tik kontroliuoti drėgmės ar dujų pernašos procesus maiste, bet kartu apsaugoti jį nuo žalingų mikroorganizmų poveikio. Viena iš tokių alternatyvių priemonių gali būti biopolimerinės valgomosios plėvelės ar dangos, apsaugančios nuo drėgmės, deguonies, anglies dioksido, riebalų ir nepageidaujamų aromato bei skonio komponentų pernašos procesų maiste. Jos gali būti ir įvairių maisto funkcinių ingredientų šaltinis, pavyzdžiui, antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių medžiagų, kurios padidina maisto produktų saugą ir stabilumą, antioksidantų, stabdančių riebalų oksidaciją, aromato/skonio medžiagų ir pigmentų, kurie pagerina produkto kokybę. Todėl biopolimerinės valgomosios plėvelės ir dangos galėtų būti naudojamos pailginti maisto žaliavų ar produktų laikymo terminus, išlaikyti jų kokybę realizacijos metu, taip pat leistų išvengti problemų, susijusių su į aplinką išmetamomis maisto pramonės atliekomis.

Išrūgų baltymai yra sūrių gamybos šalutinis produktas, turintis didelę maistinę vertę ir pasižymintis išskirtinėmis funkcinėmis savybėmis formuojant gelius, stabilizuojant emulsijas, putas. Dėl tokių funkcinių savybių ši antrinė žaliava galėtų būti panaudota valgomosioms plėvelėms ir dangoms gaminti. Tačiau išrūgų baltymų plėvelių ir dangų hidrofilinės savybės yra pagrindinis trukdis norint šias plėveles pritaikyti praktiniam panaudojimui. Siekiama surasti tokių išrūgų baltymų modifikavimo priemonių, kurios sumažintų iš jų pagamintų plėvelių ir dangų hidrofiliškumą, drėgmės absorbciją bei tirpumą vandenyje ir tokiu būdu susilpnintų jų jautrumą drėgmei.

Kitas labai svarbus mokslinis uždavinys yra valgomųjų plėvelių ir dangų praktinio panaudojimo galimybių ištyrimas. Mokslinėje spaudoje yra nedaug duomenų apie valgomųjų plėvelių ir dangų poveikį konkrečių maisto produktų kokybei. Būtina atlikti išsamius jų pritaikymo realiose maisto sistemose tyrimus: įvertinti jų barjerinių ir mechaninių savybių efektyvumą išlaikant maisto produkto vientisumą, stabdant drėgmės bei dujų pernašos procesus, cheminės sudėties pokyčius laikymo metu, apsaugant nuo spartaus žalingų mikroorganizmų vystymosi.

Šis darbas skirtas ištirti įvairių funkcinių priedų įtaką baltymų plėvelėms ir dangoms bei įvertinti plėvelių praktinio panaudojimo galimybes.

Darbo tikslas – sukurti ir ištirti valgomasias išrūgų baltymų plėveles ir dangas, skirtas apsaugoti įvairiems maisto produktams nuo nepageidautinų fizikinių cheminių ir mikrobiologinių pokyčių laikymo metu.

Darbo tikslui pasiekti buvo suformuluoti tokie **uždaviniai**:

1. Ištirti šilumos ir fermento transglutaminazės įtaką fizikinėms cheminėms pieno ir išrūgų baltymų tirpalų savybėms.
2. Ištirti išrūgų baltymų apdoravimo šiluma ir fermentu transglutaminaze, taip pat katijoninio polisacharido chitozono bei įvairių plastiklių įtaką išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių mechaninėms ir barjerinėms savybėms.
3. Ištirti išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių su įvairiais priedais, turinčiais antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių medžiagų, antimikrobinį poveikį prieš kai kuriuos mikroorganizmus.
4. Ištirti išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių ir dangų su įvairiais funkciniais priedais poveikį šviežių obuolių kokybei laikymo metu.
5. Ištirti išrūgų baltymų valgomųjų dangų su įvairiais funkciniais priedais poveikį šviežių braškių kokybei laikymo metu.
6. Ištirti išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių su įvairiais funkciniais priedais poveikį kalakutienos cheminiam ir mikrobiologiniam gedimui bei mikrobiologinei saugai.

Darbo mokslinis naujumas. Ištyrus fermento transglutaminazės poveikį išrūgų baltymų tirpalų dispersiškumui, nustatyta, kad didesnės molekulinės masės baltymų dariniai susiformavo didinant transglutaminazės kiekį, inkubavimo trukmę ir temperatūrą nepriklausomai nuo išankstinio baltymų denatūravimo šiluma. Nenustatyta patikimų skirtumų tarp plėvelių, pagamintų iš transglutaminaze apdorotų ir šiuo fermentu neapdorotų išrūgų baltymų tirpalų, fizikinių savybių. Pirmą kartą formuojant dangas ant pjaustytų obuolių, buvo pritaikytas išrūgų baltymų ir chitozono dangos džiovinimas elektriniame lauke. Nustatyta, kad išrūgų baltymų ir chitozono mišinio plėvelės inhibitoriškai veikė kai kurias patogenines bakterijas ir pieno rūgšties bakterijas. Jų teigiama įtaka buvo nustatyta realių maisto sistemų – pjaustytų obuolių, braškių ir kalakutienos – fizikinėms cheminėms savybėms bei mikrobiologinei saugai. Šių plėvelių sudėtį praturtinus svarainių ir spanguolių sultimis, jos slopino mikroskopinio grybo *P. expansum* augimą bei sulėtino patogeninių mikroorganizmų *S. typhimurium*, *E. coli* bei *C. jejuni* augimą tiek modelinėse maisto sistemose, tiek obuoliuose bei kalakutieneje.

Darbo praktinė vertė. Sukurtos ir pagamintos geromis mechaninėmis ir barjerinėmis savybėmis pasižyminčios valgomosios plėvelės ir dangos iš biopolimerų – išrūgų baltymų bei chitozono su sorbitolio, glicerolio, svarainių bei spanguolių sulčių priedais. Šios sudėties plėvelės ir dangos gali būti sėkmingai naudojamos kai kurių maisto produktų vartojimo terminams pailginti ir mikrobiologinei saugai užtikrinti. Parengta prototipinė pjaustytų obuolių dengimo valgomąja danga technologija, leidžianti išlaikyti šviežiai pjaustytus obuolius 12 val. 20 °C temperatūroje ir 24 val. 4 °C temperatūroje be išvaizdos ir skonio pakitimų. Taip pat sukurta prototipinė braškių dengimo valgomąja danga technologija, leidžianti sustabdyti uogų nokimo ir senėjimo procesus 2 paras 20 °C temperatūroje ir 6 paras 4 °C temperatūroje esant 80 % RH.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Valgomųjų plėvelių apibrėžimas ir medžiagos

Minimaliai apdorotuose maisto produktuose (supjaustytuose, nuluptuose, segmentuotuose) aktyviai vyksta įvairūs metabolitiniai procesai (kvėpavimas, etileno ir kitų lakiųjų junginių išsiskyrimas, fermentų veikla), juos veikia nepalankūs aplinkos veiksniai (deguonis, mažas santykinis oro drėgnis (toliau – RH), įvairūs mikroorganizmai), dėl kurių produktai genda, sensta, praranda ne tik savo prekinę išvaizdą, bet ir gali tapti pavojingi vartotojų sveikatai. Šių procesų kontroliavimas yra didelis uždavinys maisto pramonei bei mokslininkams. Viena iš maisto produktuose vykstančių negrįžtamų procesų kontroliavimo priemonių gali būti minimaliai apdorotų maisto produktų dengimas valgomosiomis plėvelėmis ir dangomis. Jos gali stabilizuoti maisto produktuose vykstančius metabolitinius ar aplinkos veiksnių sukeltus fizikinių cheminių pokyčių procesus ir tokiu būdu pailginti jų vartojimo trukmę ar padaryti patrauklesnius vartotojams.

Valgomoji plėvelė ar danga paprastai apibrėžiama kaip labai plonas vientisas maistinių biopolimerinių medžiagų sluoksnis, apsaugantis maisto produktus nuo išorinių veiksnių, sukeliančių jų senėjimo ar gedimo procesus (Baldwin, Nisperros-Cariedo ir Baker, 1995). Remiantis autoriais (Kester ir Fennema, 1986), biopolimerinės plėvelės ir dangos gali susiformuoti:

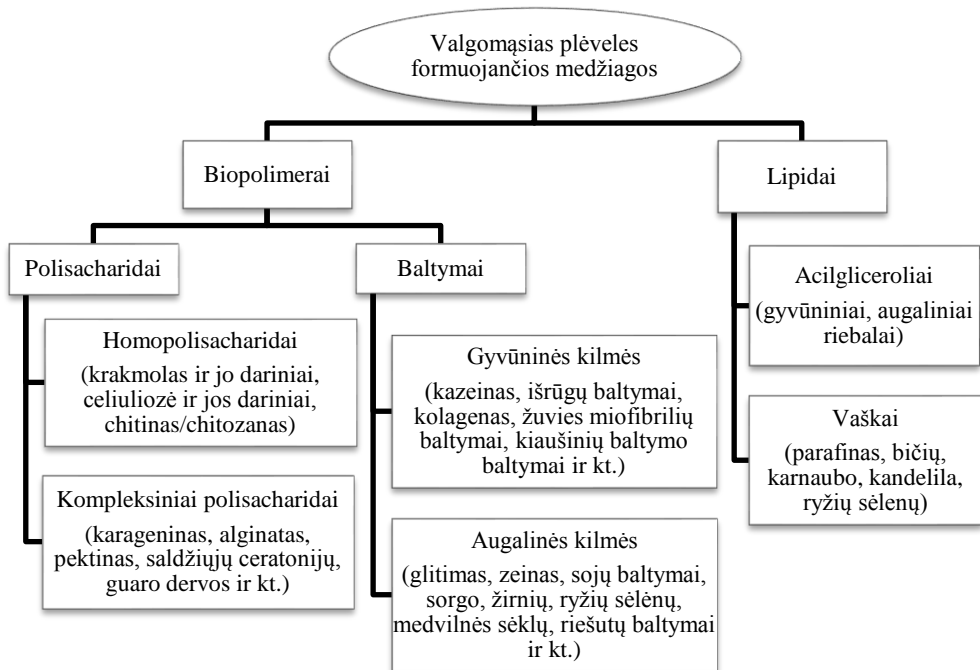
- a) savaime įvykus įprastai biopolimero agregacijai (išgaravus iš sistemos tirpikliui, susiformavus skersiniams ryšiams tarp biopolimero molekulių, įvykus pH pokyčiui sistemoje, pridėjus į sistemą nesimaišančio tirpiklio);
- b) įvykus kompleksinei kelių biopolimerų agregacijai (susiformavus tarpmolekuliniams ryšiams tarp skirtingų polimerų).

Pagrindinis skirtumas tarp valgomosios plėvelės ir dangos yra jų suformavimo ant produkto būdas (Falguera et al., 2011). Valgomoji plėvelė gaminama išliejant ją formuojančių medžiagų ar jų mišinių tirpalą ant lygaus ne maisto produkto paviršiaus, ant kurio yra išdžiovinama, vėliau nulupama ir dedama ant maisto produkto paviršiaus kaip vientisas sluoksnis (Krochta, de Mulder-Johnston, 1997; McHugh, Senesi, 2000). Valgomoji danga yra suformuojama produktą apliejus (dažniausiai merkimo ar užpurškimo būdu) dangą formuojančių medžiagų ar jų mišinių tirpalu ir išdžiovinus jį tiesiai ant produkto (Gonzalez-Aguilar et al., 2010).

Pagrindinės valgomasios plėvelės ir dangos formuojančios medžiagos yra baltymai, polisacharidai bei lipidai, kurie gali būti maišomi į kompozicinius mišinius arba naudojami individualiai (1.1 pav.). Kiti komponentai, tokie kaip plastikliai, emulsikliai, stabilizatoriai, naudojami plėvelių ir dangų fizikinių cheminių ir mechaninių savybių gerinimui (Baldwin et al., 1995), pavyzdžiui, vandens garų (toliau – VGP), deguonies (toliau – DP), anglies dioksido pralaidumo ar lipidų, kvapo ir skonio komponentų pernašos stabdymui iš/į maisto sistemas. Jose gali būti pridėta įvairių maisto funkcinių ingredientų: antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių medžiagų, kurios gali padidinti maisto produktų saugą ir stabilumą; antioksidantų, galinčių stabdyti riebalų oksidaciją; aromato ir skonio medžiagų bei pigmentų, galinčių pagerinti plėvelę ar dangą dengiamo maisto produkto juslines savybes (Ghanbarzadeh et al., 2007). Tokios biopolimerinės plėvelės ir dangos gali

būti naudojamos maisto produktų laikymo terminams pailginti, jų kokybei išlaikyti stabdant nepageidaujamus maisto komponentų masių pernašos procesus arba apsaugant produktus nuo mechaninių pažeidimų transportavimo ar apdorojimo metu. Be to, jos gali padėti išvengti problemų, susijusių su į aplinką išmetamomis maisto pramonės atliekomis (Krochta, de Mulder-Johnston, 1997). Valgomųjų plėvelių išskirtinumas yra tas, kad jos gaminamos iš atsinaujinančių šaltinių ir jas galima vartoti su maisto produktais, o išmestos į aplinką lengvai suyra. Dėl šių privalumų jos yra pranašesnės už tradicines sintetines polimerines plėveles (Bourtoom, 2008).

Valgomosios plėvelės ir dangos, skirtos maisto produktams apsaugoti ir vartojamos kartu su maisto produktu, turi pasižymėti geromis barjerinėmis (stabdyti O₂, CO₂, vandens, aliejaus pernašą), antimikrobinėmis savybėmis, išlaikyti biocheminį ir fizikinį cheminį stabilumą, turėti vartotojui priimtinių jausminių savybių ir būti saugios vartoti, o jų gamybos kaštai turi būti maži (Debeaufort, Queada-Gallo ir Voilley, 1998; Maftoonazad, Badii, 2009). Įvairios sudėties valgomųjų plėvelių savybės, jų įtaka maisto kokybei tiriama visame pasaulyje jau apytiksliai 50 metų. Studijos atliktos analizuojant plėvelių iš polisacharidų ir baltymų fizikines chemines savybes bei jų poveikį vaisių, daržovių, uogų, mėsos, žuvies ir kitų produktų kokybei laikymo metu.



1.1 pav. Biopolimerinių valgomųjų plėvelių struktūriniai komponentai (Han, Gennadios, 2005)

1.2. Baltymų valgomosios plėvelės: privalumai ir trūkumai

Įvairūs maisto baltymai yra aktyviai tyrinėjami siekiant juos pritaikyti valgomosioms plėvelėms ir dangoms gaminti. Tai kolagenas, žuvų miofibrilių, kiaušinio baltymo baltymai, kazeinas bei išrūgų baltymai (toliau – IB), zeinas, kviečių glitimo, sojos, medvilnės sėklų, žemės riešutų ir kiti baltymai (Reddy, Jiang ir Yang, 2012).

Mokslininkai vieningai sutaria, jog vien iš baltymų pagamintos plėvelės nepakankamai gerai sulaiko drėgmę, ypač didelio RH aplinkoje. Baltymų molekules pasižymi hidrofiliškumu, jos lengvai sąveikauja su polinės prigimties molekulėmis, dėl to plėvelės iš baltymų yra linkusios absorbuoti vandens molekules ir negeba stabdyti pastarųjų pernašos. Kita vertus, baltymų sistema gerai sulaiko nepolinės prigimties deguonį bei kitas dujas, aromato junginius ir riebalų molekules. Plėvelių iš baltymų mechaninio tempimo stiprumo (toliau –TS) riba yra daug mažesnė nei polisacharidinių plėvelių, o pailgėjimas tempiant iki sutrūkimo, t. y. elastingumas (toliau – E), yra žymiai mažesnis nei plėvelių iš sintetinių polimerų (Krochta, 2002). Siekiant pagerinti valgomųjų plėvelių iš baltymų barjerines ir mechanines savybes būtina modifikuoti baltymus arba plėvelių struktūrą papildyti medžiagomis, suteikiančiomis pageidaujamą savybių. Tam tikslui gali būti naudojamos tiek fizikinės, tiek cheminės priemonės.

1.2.1. Išrūgų baltymų gebėjimas formuoti plėveles

Didele maistine verte, stipriu biologiniu aktyvumu ir unikaliomis funkcinėmis savybėmis pasižymintys IB moksliniu požiūriu turi didelių pritaikymo galimybių maisto, farmacijos, biomedicinos (Marcelo, Rizvi, 2008) ir net lengvojoje pramonėje (Bosco et al., 2013). Tačiau tokių galimybių paieška ir analizė yra didelis iššūkis, reikalaujantis visų pirma gausybės mokslinių tyrimų. Pastaruosius kelis dešimtmečius mokslininkai tikrina idėją pieno IB panaudoti valgomosioms plėvelėms ir dangoms gaminti, nes šie baltymai tam tikromis sąlygomis (veikiami šiluma, fermentais, trumpųjų elektromagnetinių bangų spinduliuotės, įvairių oksidatorių ir kt.) yra linkę formuoti tinklinę struktūrą, kuri gali būti panaudota valgomųjų plėvelių ir dangų susidarymui (McHugh, Krochta, 1994a).

IB vadinama dalis pieno baltymų, kurie išlieka tirpūs pieno serume ar išrūgose, gautose (1) filtravimo ar lėto centrifugavimo proceso metu atskiriant išrūgas nuo kazeino, koaguliavusio rūgštiniu (pH 4,6) ar fermentiniu (šliužo fermentu) būdu arba išsodinto prisotintu NaCl tirpalu; (2) ultracentrifugavimo ($100000 \times g$) proceso metu atskiriant pieno serumą nuo išcentrinės jėgos veikiamų didelės molekulinės masės kazeino micelių; (3) mikrofiltracijos ir ultrafiltracijos procesų metu pirmiausia atskiriant pieno baltymus nuo laktozės ir tirpiųjų druskų, taip pat nuo bakterijų ląstelių ir kitų didesnių pieno priemaišų, vėliau išfrakcionuojant juos į kazeino ir IB frakcijas (Edwards, Creamer ir Jameson, 2009). Pastarąją IB frakciją tradiciškai sudaro β -laktoglobulino (toliau – β -Lg), α -laktalbumino (toliau – α -La), jaučio serumo albumino, imunoglobulinų, proteozo peptonų ir kitų mažais kiekiais esančių baltymų, kaip laktoferinas ar fermentai, mišinys (1.1 lent.). Be to, išrūgų sudėtyje gali būti ir apie 20 % glikomakropeptidų,

jei išrūgos yra sūrių gamybos šalutinis produktas (Regester, Smithers, 1991). IB sudaro beveik 0,55–0,85 % išrūgų, priklausomai nuo jų gamybos būdo (Huffman, de Barros Ferreira, 2011) arba maždaug 20 % bendro galvijų pieno baltymų kiekio.

1.1 lentelė. Išrūgų baltymų sudėtis (Edwards, Creamer ir Jameson, 2009; Farrell et al., 2004; Huffman, de Barros Ferreira, 2011; Swaisgood, 1996)

Baltymas	Masės dalis, %	Aminorūgščių kiekis	Molekulinė masė, Da	Disulfidiniai ryšiai/laisvos tiolo grupės
α -La	20–24	123	14178	4/0
β -Lg	55–60	162	18363 ^a	2/1
Jaučio serumo albuminas	5–8	583	66399	17/1
Imunoglobulinai	6–15	>500	161000 ^b	-
Laktoferinas	<0,1	689	76110	17/0
Proteozo peptonai	~10	n	n	n
Fermentai	n	n	n	n

a – molekulinė masė genetinio varianto A; iš viso yra 10 genetinių variantų;

b – molekulinė masė imunoglobulino G1, kuris yra pagrindinis imunoglobulinas; imunoglobulino M ir imunoglobulino A yra labai maži kiekiai.

n – nenurodyta šaltiniuose.

Cheminio, mechaninio bei terminio apdorojimo metu gali pasikeisti IB molekulių natyvi struktūra, taip pat ir jų fizikinės-cheminės, funkcinės savybės bei biologinis aktyvumas (Marcelo, Rizvi, 2008). Termiškai apdorojant baltymus, įvyksta jų denatūracija. Tokių pokyčių metu yra atidengiamos cisteino tiolo grupės, kurios gali dalyvauti disulfidų pakeitimų reakcijose ir sąlygoti baltymo molekulių tarpusavio jungimąsi (Alting et al., 2003). Aukštoje temperatūroje vykstančio baltymų terminio apdorojimo proceso metu susiformuoja nedidelis kiekis naujų molekulinų jungčių, baltymai agreguojasi įgaudami naują struktūrą. Tokių reakcijų vyksmas ir jų intensyvumas priklauso nuo šilumos poveikio sąlygų, t. y. temperatūros ir trukmės (Alting et al., 2003; Monahan, German ir Kinsella, 1995; Schmitt et al., 2007) bei nuo tokių veiksnių, kaip substrato sudėtis (Hillier et al., 1979; Kessler, Beyer, 1991), koncentracija (Anema, McKenna, 1996; Kessler, Beyer, 1991), pH (Anema, McKenna, 1996; Harb et al., 2002). Autoriai (Goetz ir Koehler, 2005), išanalizavę dešimtis mokslinių studijų, nustatė pagrindinių IB terminės denatūracijos temperatūras: β -laktoglobulinas denatūruojasi 70,5–81,5 °C temperatūros intervale, o α -laktoalbuminas – 58,6–61,0 °C temperatūros intervale.

Denatūruojantis IB gali formuotis jų tinklinė struktūra – gelis, tačiau tam reikalingas atskirų molekulių jungimasis tarpusavyje (Clark, Lee-Tuffnell, 1986; Mulvihill, Donovan, 1987). Esant neutraliam pH, geliui susidaryti trukdo denatūravusių globulių elektrostatinės stūmos jėgos. Denatūruotų baltymų molekulių agregaciją ir jungimosi į tinklą procesą gali paskatinti terpės rūgštingumo didinimas (artėjant prie izoelektrinio taško), sumažinantis baltymų molekulių bendrą krūvį (Boye et al., 1995), bei druskų, ekranuojančių jonines jėgas ir susilpninančių tarp molekulinės denatūravusių baltymų stūmos jėgas (Fitzsimons et al., 2007; Puyol,

Perez ir Horne, 2001), pridėjimas. Veikiant šilumai IB geliui susidaryti didelę įtaką turi baltymų koncentracija tirpale, t. y. aktyvių tiolo grupių kiekis, kurioms jungiantis pirmiausia formuojasi kovalentiniai ryšiai molekulių viduje, po to – tarpmolekuliniai disulfidiniai ryšiai, vadinamieji „tilteliai“ (Alting et al., 2003). Esant pakankamai dideliame jų skaičiui, baltymai jungiasi į didesnius agregatus, iš kurių susiformuoja tanki ir tolygi tinklinė struktūra (Purwanti et al., 2011), pasižyminti didele klampa (Mleko, Foegeding, 1999) ar didele tirštinimo geba (Mudgal, Daubert ir Foegeding, 2009). Apskritai, terminė baltymų agregacija (gelio susidarymas) vyksta, kai baltymų kiekis neviršija geliams formuoti reikalingos kritinės 12 % koncentracijos ir yra ne mažesnis kaip 8 % (Purwanti et al., 2011).

1.2.2. Išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių barjerinės ir mechaninės savybės

Barjerinės ir mechaninės savybės turi didžiausią įtaką plėvelių ir dangų pritaikymo ant maisto produktų perspektyvai. VGP ir įvairių lakiųjų junginių pralaidumo savybės riboja plėvelėmis ar dangomis dengtų maisto produktų sudėtinių dalių pernašą, daro įtaką kvėpavimo intensyvumui ir kitiems procesams, vykstantiems maisto produktuose laikymo metu. Mechaninės plėvelių ir dangų savybės (toliau – TS ir E) sąlygoja fizines jų pritaikymo galimybes, nes plėvelės ir dangos turi būti sąlyginai stiprios ir elastingos, kad atlaikytų mechanines apkrovas technologinio proceso metu jomis apdengtus maisto produktus, transportuojant ir laikant kintančiomis aplinkos sąlygomis.

Valgomųjų plėvelių ir dangų barjerinėms ir mechaninėms savybėms didžiausią įtaką turi jų struktūrinių komponentų cheminė prigimtis bei pačios struktūros fizinis būvis (McHugh, Krochta, 1994). IB plėvelės ir dangos pasižymi ypač geru deguonies, anglies dioksido ir kitų lakiųjų junginių sulaikymu, tačiau dėl savo hidrofiliinės prigimties nesugeba suformuoti plėvelių ir dangų, sulaikančių vandens garus. Be to, baltymų plėvelės ir dangos yra labai trapios ir lengvai sutrūksta veikiamos mechaninių jėgų, todėl jas būtina praturtinti plastikiais. Pastarieji taip pat turi didelę įtaką plėvelių ir dangų iš baltymų gebėjimui sulaikyti vandens garus. Todėl keičiant plastiklio rūšį ir jo kiekį plėvelėse ar dangose, galima modeliuoti ne tik jų mechanines savybes, bet ir VGP. Tokiu būdu galima surasti optimalią plėvelių ir dangų kompoziciją, pasižyminčią specifinėmis savybėmis, apsaugančiomis maisto produktus nuo gedimo ir pailginančiomis maisto produktų vartojimo terminą.

Plastiklių poveikis plėvelių ir dangų savybėms priklauso nuo trijų veiksnių: molekulių dydžio, formos ir suderinamumo su plėvelės struktūros komponentais (Sothornvit, Krochta, 2005). Plastiklio molekulės, įsiterpusios į biopolimero tinklą, sumažina tarpmolekulines jėgas tarp polimero grandinių, tokiu būdu pagerina tinklo lankstumą, tamprumą ir plėvelių ar dangų atsparumą sutrūkimui. Tačiau plastiklis gali labai susilpninti plėvelių ir dangų mechaninį stiprumą bei jų barjerines savybes (Karbowski et al., 2006). Dažniausiai naudojami plastikliai yra polioliai, pavyzdžiui, glicerolis, sorbitolis, polietilenglikolis 400, taip pat mono-, di-, tri- ar oligosacharidai, lipidai ar jų dariniai (Guilbert, 1986). Mažesnės molekulinės masės plastikliai lengviau įsijungia į baltymų sistemą nei didelės molekulinės masės

plastikliai, todėl turi geresnį plastifikavimo efektą (Sothornvit, Krochta, 2001). Autoriai (Sothornvit ir Krochta, 2001) pasiūlė glicerolį kaip tinkamiausią plastiklį baltymų plėvelėms, nes plėvelės su gliceroliu buvo reikšmingai elastingesnės negu su sorbitoliu. IB plėvelės su 30–60 % glicerolio pasižymėjo keletą kartų didesniu elastingumu lyginant su plėvelėmis, kuriose buvo analogiškas sorbitolio kiekis. Tačiau, didėjant glicerolio kiekiui plėvelėse, jų mechaninis stiprumas mažėjo ir buvo reikšmingai mažesnis už plėvelių su sorbitoliu. Vėliau autoriai (Kokoszka et al., 2010) nustatė, jog glicerolis daro neigiamą įtaką plėvelių VGP, t. y. daugėjant glicerolio molekulių plėvelės struktūroje, pralaidumas vandens garams didėjo. Glicerolis yra labai higroskopiška medžiaga, todėl lengvai prisijungia vandens molekulės. Tai skatina plėvelių ir dangų drėgmės absorbciją bei padidina jų pralaidumą vandens garams. Vis dėlto plėvelių mechaninės savybės buvo geriausios, kai plėvelės buvo gamintos iš 7 % koncentracijos IB izoliato tirpalo, kuriame glicerolio buvo 40 % pagal baltymų kiekį (Kokoszka et al., 2010). Autoriai (Ramos et al., 2013) taip pat nustatė, kad 10 % IB plėvelės su 40 % ar 50 % glicerolio (pagal baltymų kiekį), pasižymėjo geriausiomis mechaninėmis savybėmis, lyginant su plėvelėmis, turinčiomis mažesnę ar didesnę palstiklio kiekį.

Įvertinus glicerolio naudą mechaninėms plėvelių ir dangų savybėms, būtina atkreipti dėmesį į barjerinių savybių pokyčius atitinkamose sąlygose. Remiantis Vogler (1998) tyrimų išvadomis, tiriamas paviršius yra hidrofobiškas, kai jo ir vandens lašo kontaktinis kampas $\theta > 65^\circ$, ir hidrofiliškas, kai $\theta < 65^\circ$. Pasirodo, plėvelės, kurios pagamintos iš 10 % IB tirpalo, kuriame glicerolis sudaro 50 % ir didesnę dalį pagal baltymų kiekį, galima priskirti hidrofiliškiems paviršiams, o plėvelių ir dangų su 40 % gliceroliu (θ buvo $65,8 \pm 2,1^\circ$ – $69,5 \pm 2,6^\circ$) paviršius yra tik iš dalies hidrofiliškas. Tai parodo vandens lašo absorbcijos tyrimo rezultatai (1.2 pav.) (Ramos et al., 2013).

Išrūgų baltymų izoliato plėvelės paviršius



Išrūgų baltymų koncentrato plėvelės paviršius



40 50 60
Glicerolio kiekis, % (pagal išrūgų
baltymų sausųjų medžiagų kiekį)

1.2 pav. Vandens lašo forma ant išrūgų baltymų plėvelių (baltymų kiekis tirpale, skirtame plėvelėms gaminti, buvo 10 %) su gliceroliu po 5 s ekspozicijos (Ramos et al., 2013)

Bet kuriuo atveju galima teigti, kad plėvelės ir dangos su gliceroliu nors ir pasižymi dideliu elastingumu, tačiau yra linkusios absorbuoti vandens molekules, todėl palengvėja vandens molekulių pernaša pro jas, t. y. jos turi santykinai didelį VGP, kuris yra didžiausias jų trūkumas. Šis reiškinys gali būti aiškinamas tuo, kad dėl į sistemą įsiterpusio glicerolio sumažėja vidinių vandenilinių ryšių tarp baltymų molekulių, dėl to padidėja tarpmolekulinė erdvė, kuri leidžia vandens garų molekulėms lengviau difunduoti pro baltymų sistemos barjerą (Cuq et al., 1997).

Palyginti skirtingų mokslinių autorių plėvelių VGP tyrimų rezultatus yra sudėtinga, nes tyrimų metodai buvo taikyti nevienodomis sąlygomis. Pavyzdžiui, vien RH daro reikšmingą įtaką VGP rodikliui, kuris proporcingai didėja, didėjant RH. Todėl net maži RH svyravimai gali nulemti didelius VGP rodiklių verčių skirtumus (McHugh, Krochta, 1994; Schmid et al., 2015).

Baltymų plėvelių ir dangų higroskopiškumą sumažinti gali lipidai, kurie yra hidrofobinės prigimties ir mažina paviršių hidrofilumą. Labai gerai tai pastebima baltymų ir lipidų emulsijų plėvelėse. Tačiau lipidai susilpnina plėvelių ir dangų mechanines savybes bei padidina dujų pralaidumą (Yoshida, Antunes, 2004; McHugh, Krochta, 1994b). Apskritai baltymų plėvelės pasižymi labai geru deguonies, anglies dioksido bei kitų dujų sulaikymu dėl savo tankios, pakankamai tvarkingos vandenilniais ryšiais sujungtų molekulių struktūros. Pavyzdžiui, esant 23 °C temperatūrai ir 0 % RH sąlygoms, IB plėvelės praleidžia mažiau deguonies nei polietileno plėvelės esant toms pačioms sąlygoms. Didėjant RH, didėja ir dujų pralaidumas. Tačiau IB plėvelės ir dangos išskirtinai gerai sulaiko dujas net ir esant aukštam RH (McHugh, Krochta, 1994a). Tai turi ypač didelę reikšmę plėvelėmis ar dangomis dengtų maisto produktų oksidacijos ir kvėpavimo procesų kontrolei.

Autoriai (Oses et al., 2009) nustatė, jog sorbitolis plėvelių higroskopiškumui turi mažiau įtakos nei glicerolis galimai dėl to, jog glicerolis yra linkęs prisijungti daugiau vandens molekulių nei sorbitolis. Todėl didėjant glicerolio kiekiui plėvelėje, tolygiai didėja ir drėgmės kiekis joje, kai plėvelėse su sorbitoliu drėgmės kiekis nepriklauso nuo plastikinio kiekio, o tik nuo aplinkos RH. Optimalus sorbitolio kiekis IB plėvelėse svyruoja nuo 33 % iki 50 %, kuris statistiškai patikimai išlaiko stabilų drėgmės kiekį plėvelėse (Shaw et al., 2002). Mechaninių savybių tyrimas šiuo atveju parodė, kad glicerolis turėjo didesnę plastifikavimo efektą negu sorbitolis, nes plėvelės su gliceroliu buvo elastingesnės nei su tokiu pačiu sorbitolio kiekiu. Tačiau plėvelių su gliceroliu stiprumas buvo daug mažesnis. Pavyzdžiui, plėvelių su 40 % gliceroliu TS buvo 3,3 MPa, E – 98 %, o plėvelių su sorbitoliu šie rodikliai atitinkamai buvo 10 MPa ir 11 % (Oses et al., 2009). Tokį reiškinį autoriai grindžia tuo, jog sorbitolis, būdamas ne toks higroskopiškas, prisijungia mažesnę kiekį vandens, dėl to plėvelių E nėra toks didelis kaip plėvelių su gliceroliu (McHugh, Krochta, 1994a; Shaw et al., 2002). Panašias tendencijas nustatė ir kiti mokslininkai, atlikę tyrimus su plėvelėmis iš β -laktoglobulino (Sothornvit, Krochta, 2001), iš kiaušinių albumino (Gennadios, et al., 1996), iš žuvų baltymų miofibrilių (Cuq et al., 1997), iš kazeino (Chick, Ustunol, 1998) ir kt. Šį efektą autoriai (Cuq et al., 1997) bei autoriai (Thomazine, Carvalho ir Sobral, 2005) aiškina remdamiesi skirtinga plastiklių molekuline mase. Glicerolio $C_3H_5(OH)_3$ molekulinė masė (92,09 g/mol) yra mažesnė nei sorbitolio $C_6H_8(OH)_6$ (182,17 g/mol). Tame pačiame plastiklio kiekyje glicerolio molekulių skaičius yra didesnis už sorbitolio molekulių skaičių, dėl to glicerolio poveikis baltymų tarp molekulinėms jėgoms sumažėjimui yra didesnis, o plastifikavimo efektas stipresnis (Oses et al., 2009).

Siekiant padidinti plėvelių hidrofobiškumą ir sumažinti VGP į plėveles iš baltymų gali būti įdedama vaško. Autoriai (Ozdemir ir Floros, 2008a) nustatė, jog bičių vaškas neturėjo reikšmingos įtakos IB plėvelių mechaniniam stiprumui, tačiau padidino jų hidrofobiškumą. Soazo (2011) ištyrė, jog sumažinus tirpalų, skirtų

plėvelėms gaminti džiovinimo temperatūrą nuo 25 °C iki 5 °C, sumažėjo IB plėvelių su vašku VGP ir padidėjo jų TS. Tačiau plėvelės su vašku yra neskaidrios, pasižymi specifiniu kvapu, dėl to gali pabloginti maisto produktų juslines savybes.

IB plėvelės yra atsparios šaldymui (sušaldymui, laikymui atšaldžius, atšildymui) ir išlaiko vientisumą žemose temperatūrose. Šaldytų plėvelių funkcionalumas yra toks pat kaip ir nepaveiktų šalčiu. Plėvelių TS kai kuriais atvejais net padidėja, tačiau E sumažėja. Įvertinus šiuos faktus galima teigti, jog IB plėvelės gali būti naudojamos padengti maisto produktus, laikomus labai žemose temperatūrose (Soazo et al., 2013).

Keičiant plėvelių ir dangų kompoziciją keičiasi ir jų funkcionalumas, todėl formuojant plėvelių ir dangų struktūrą būtina kompleksiskai įvertinti visų komponentų įtaką barjerinėms ir mechaninėms savybėms, nuo kurių priklauso plėvelių ir dangų pritaikymo galimybės.

1.2.3. Išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių antimikrobinės savybės

Vis didėjantis maisto pakuočių medžiagų poreikis, siekiant išsaugoti maisto produktų šviežumą ir saugą laikymo ir transportavimo metu, skatina naujos kartos „aktyvių“ apsauginių sistemų kūrimą, tobulinimą ir pritaikymą. Tokios „aktyvios“ sistemos turi gebėti sumažinti maiste esančių mikroorganizmų vystymąsi, tačiau jos neturėtų keisti maisto produktų juslinių savybių ar būti toksiškos vartotojams. Kol kas daugiausia mokslinės informacijos yra pateikta apie tokių modeliinių sistemų savybes, tačiau labai trūksta žinių apie jų apsaugos efektyvumą realiems maisto produktams, t. y. jų fizikiniams, cheminiams, mikrobiologiniams pokyčiams laikymo metu, maistinę naudą ir vartojimo saugą (Emamifar, 2011).

IB plėvelės ar dangos neturi antimikrobinų savybių, tačiau mokslinėje spaudoje yra duomenų apie valgomąsias plėveles ir dangas su organinės ir neorganinės kilmės priedais, suteikiančiais joms antimikrobinį aktyvumą. Pavyzdžiui, IB plėvelės ir dangos su organinėmis rūgštimis, tokiomis kaip pieno rūgštis, pasižymi labai stipriu antimikrobinu poveikiu prieš Gram teigiamas bakterijas. Plėvelės su chitooligosacharidais slopina Gram neigiamų bakterijų veiklą, o su natamicinu – mielių vystymąsi (Ramos, 2012 a). Mielių augimą ant produktų gali stabdyti ir plėvelės su chitooligosacharidais bei natrio benzoatu, o chitooligosacharidų ir pieno rūgšties mišinys IB plėvelėms gali suteikti sinergistinį baktericidinį aktyvumą ir prieš Gram neigiamas, ir prieš Gram teigiamas bakterijas (Ramos et al., 2012 b). Iš IB koncentrato pagamintos plėvelės su askorbo rūgšties ir cisteino priedais gali slopinti polifenoloksidazės veiklą (Altunkaya, 2011). Antibakteriškai veikia ir plėvelės iš baltymų su sorbo rūgštimi, benzenkarboksirūgštimi (Cagri, Ustunol ir Ryser, 2001), lizocimu (Kristo et al., 2008) ir daugeliu kitų antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių priedų.

Į valgomąsias IB plėveles ir dangas gali būti įterptos ir neorganinės kilmės nanodalelės – inertinių metalų oksidai, kurie paprastai maisto ir kosmetikos pramonėje naudojami kaip šviesą blokuojantys ir baltą spalvą produktams suteikiantys priedai. Į plėvelės ar dangos struktūrą įterptos titano dioksido (Li et al., 2011) arba aktyvu silicio dioksidu padengto titano dioksido nanodalelės (Kadam et

al., 2013), dėl fotokatalitinio aktyvumo veikiančios prieš žmogaus sveikatai pavojingus maistinės kilmės mikroorganizmus ir alergenų (Rajh et al., 1999; Zhou et al., 2009), gali plėvelėms ir dangoms suteikti antimikrobinių savybių (Chaurasia, Chand ir Bajpai, 2010; Zhou, Wang ir Gunasekaran, 2009). Remiantis JAV Maisto ir vaistų kontrolės tarnybos (FDA) reikalavimais, leidžiama titano dioksido koncentracija maisto produktuose yra 1 %. Autoriai (Li et al., 2011) nustatė, kad iš 10 % IB tirpalo su gliceroliu (santykis 2:1) ir 0,1–1 % TiO_2 pagamintų plėvelių mechaninis stiprumas buvo daug didesnis nei kontrolinių plėvelių be nanodalelių, o E plėvelių su 0,1–0,5 % TiO_2 išliko nepakitęs. Tokių plėvelių struktūros sustiprėjimą galėjo nulemti ryšių susidarymas tarp baltymo molekulių ir TiO_2 (baltymas- TiO_2 -baltymas), išskyrus plėveles su 2 % TiO_2 . Pastarųjų plėvelių E reikšmingai sumažėjo nuo 96 % iki 27 %. Ši žymų skirtumą tyrėjai grindžia nanodalelių agregacijos reiškiniu, dėl kurio baltymų tinklo mikrostruktūra buvo suardyta didelių TiO_2 aglomeratų. Priešingai nei mechaninėms savybėms, TiO_2 aglomeratai turėjo teigiamą įtaką VGP (kai koncentracija $\text{TiO}_2 >0,5\%$), nes užblokuodami mikrokanalus tinklinėje struktūroje, sumažino vandens molekulių pralaidumą. Panašias tendencijas gavo ir mokslininkų grupė (Zhou, Wang ir Gunasekaran, 2009), kuri ištyrė TiO_2 nanodalelių (0,5–4 % koncentracija pagal baltymų kiekį) įtaką IB plėvelėms, pagamintoms iš 5 % IB izoliato tirpalo su 5 % glicerolio. Deja, mokslinė grupė netyrė IB su TiO_2 kompozitinių plėvelių antimikrobinių savybių bei jų poveikio realiai maisto sistemai, tačiau nustatė, kad plėvelės su 1 % TiO_2 nanodalelėmis, pasižyminčiomis antimikrobiniu aktyvumu prieš daugelį mikroorganizmų rūšių, sulauko daugiau kaip 70 % matomos šviesos, dėl to gali apsaugoti maisto produktą ir nuo šviesos sukeltos oksidacijos.

1.2.4. Išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių savybių modifikavimas

Remiantis mokslininkais (Bouaouina et al., 2006), baltymų funkcines savybes galima klasifikuoti į tris pagrindines grupes: (a) hidratacinės savybės, priklausančias nuo sąryšio tarp baltymų ir vandens molekulių, ir apimančias baltymų higroskopiskumą, adheziškumą, tirpumą, brinkimą tirpaluose ir jų klampą; (b) paviršiaus aktyvumo savybės, pasireiškiančias gebėjimu emulsuoti ir formuoti putas; (c) agregavimosi ir gelių sudarymo savybės, priklausančias nuo sąveikos tarp baltymų molekulių. Plėvelių susidarymui svarbiausia yra baltymų molekulių jungimosi tarpusavyje savybė – gebėjimas agreguotis. Todėl kovalentinių skersinių ryšių buvimas baltymų struktūroje yra vienas iš pagrindinių veiksnių, nulemiančių plėvelių ir dangų struktūros stiprumą bei darantis įtaką jų barjerinėms savybėms. Norint sukurti geromis mechaninėmis savybėmis (Wang et al., 2013), mažu VGP ir atsparias proteolizei (Lacroix, Cooksey, 2005) IB plėveles, būtina modifikuoti jų struktūrą ir skatinti papildomų ryšių (tiek kovalentinių (disulfidinių), tiek nekovalentinių (joninių, vandenilinių)) tarp baltymų molekulių susidarymą (Jiang et al., 2012; Krochta, 2002). Padidinti baltymų grandinių tarpusavio sąveiką įmanoma pritaikius fizikines (šilumą, spinduliuotę, aukštą slėgį) ar chemines (organinius junginius, fermentus) priemones (Wihodo, Moraru, 2013).

Išrūgų baltymų modifikavimas šiluma

Baltymų terminio modifikavimo metu susidaro disulfidiniai ryšiai tarp molekulių, o jų susidarymo mastas priklauso nuo terminio apdorojimo proceso parametrų. Tačiau plėvelės nesiformuoja pašildžius IB 70 °C temperatūroje esant pH 6,8. IB apdorojimas aukštoje temperatūroje, silpnai šarminėje aplinkoje (90 °C ir pH 8,0), kai baltymai „išsivynioja“ ir negrįžtamai denatūruoja, yra tinkamiausias plėvelėms susidaryti. Tai nustatė mokslininkai (Wang et al., 2013).

Ši mokslininkų grupė išanalizavo šilumos ir radikalinio oksidavimo kombinuoto poveikio įtaką IB plėvelių susidarymui ir jų savybėms. IB izoliato tirpalai (6 % baltymų), kurių pH 6,8 ir 8,0 buvo pakaitinti 70 °C, 80 °C ar 90 °C temperatūroje 30 min bei oksidinti hidroksilo radikalų generavimo sistemoje (0,1 mM FeCl₃ / 1 mM askorbatas / 0–20 mM H₂O₂) 2 val. Toks poveikis paskatino papildomų disulfidinių skersinių ryšių susidarymą tarp baltymų molekulių, tačiau susilpnino iš tokių baltymų pagamintų plėvelių mechanines savybes bei padidino jų tirpumą vandeniniuose tirpaluose (kai kuriais atvejais iki 100 %). Tyrimo metu paaiškėjo, jog vien baltymų oksidavimo nepakanka plėvelėms susidaryti, nors ir įvyksta baltymų struktūriniai pokyčiai bei tarp baltymų susiformuoja skersiniai disulfidiniai ryšiai. Paprastai be disulfidinių ryšių IB plėvelių sistemoje veikia hidrofobinės sąveikos jėgos, elektrostatinės traukos jėgos, vandeniliniai bei kovalentiniai ryšiai. Radikalinis oksidavimas šiuo atveju pablogino plėvelių mechanines savybes galimai dėl gausesnio -SS- (disulfidinių) ryšių atsiradimo, dėl ko buvo suardytos baltymų tarpusavio sąveikos jėgos ir šių jėgų bei kitų ryšių pasiskirstymo pusiausvyrą. Oksidacinis poveikis IB gali būti taikytas tik tada, kai iš jų pagamintos plėvelės turi būti labai tirpios vandeniniuose tirpaluose. Pavyzdžiui, norint IB plėveles panaudoti sausiems ir biriems maisto ingredientams pakuoti ir laikyti, kurie skirti sriuboms, gėrimams ir kitiems maisto produktams gaminti, IB plėvelės turi būti tirpios vandenyje, kad į jas supakuotos sausos medžiagos galėtų patekti į maistą gamybos proceso metu (Wang et al., 2013).

Išrūgų baltymų modifikavimas slėgiu

Baltymų funkcines savybes galima modifikuoti aukšto hidrostatinio ar hidrodinaminio slėgio (100–1000 MPa) energija, kurios poveikiu mokslininkai susidomėjo dar prieš dešimtmetį. Jo efektyvumas labai priklauso tiek nuo baltymus veikiančių išorinių veiksnių, t. y. pH, temperatūros, aplinkos joninių jėgų, tiek ir nuo pačių baltymų struktūros charakteristikų, pavyzdžiui, disulfidinių ryšių kiekio, kuris nulemia molekulių lankstumą ir stabilumą (Smulders, 2000). Kadangi β-laktoglobulino molekulėje yra du disulfidiniai ryšiai ir trys laisvosios sulfhidrilo grupės, ji yra žymiai jautresnė slėgio poveikiui nei α-laktoalbuminas, kurio molekulės struktūroje yra keturi disulfidiniai ryšiai (Huppertz, Kelly ir Fox, 2002). Aukšto slėgio jėgos suardo globulinių baltymų vidinius hidrofobinius ir elektrostatinis molekulinis ryšius, tačiau vandenilinių ryšių nepaveikia. Tai reiškia, kad slėgis pajėgia suardyti baltymų ketvirtinę ir tretinę struktūras, o antrinė struktūra paveikiama labai mažai. Suirus baltymų sistemai įvyksta molekulių persitvarkymas, kurio metu susiformuoja nauji vidiniai ir tarpmolekuliniai ryšiai. IB

paveikus aukštu slėgiu labai padidėja jų molekulių paviršiaus hidrofobiškumas, nes struktūros persitvarkymo metu atsiveria hidrofobinės polipeptidų grupės. Dėl to pagerėja IB stabilizavimo, putų sudarymo ir kitos funkcinės savybės (Bouaouina et al., 2006). Tikėtina, jog padidėjęs IB hidrofobiškumas galėtų susilpninti valgomųjų plėvelių ir dangų jautrumą drėgmei ir sumažinti jų VGP. Tai praplėstų jų panaudojimo galimybes. Tačiau duomenų apie aukšto slėgio įtaką IB plėvelėms nėra.

Išrūgų baltymų modifikavimas spinduliuote

Mokslinėje spaudoje galima rasti γ -spinduliuotės poveikio studijų įvairių baltymų plėvelių ir dangų barjerinėms savybėms ir cheminėms sistemos charakteristikoms. γ -spinduliuotė gali inicijuoti baltymų molekulių konformacinius pokyčius, aminorūgščių oksidaciją, laisvųjų radikalų susidarymą, baltymų sistemos renkombinacijos reakcijas ir makromolekulių susidarymą (Urbain, 1986). Šie sistemos pokyčiai teigiamai veikia fizikines plėvelių savybes. Autoriai (Ouattara et al., 2002) nustatė, kad IB ir kalcio kazeinato (3:1) plėvelių VGP, paveikus baltymų tirpalą 32 kGy γ -spinduliuote, sumažėjo nuo 2,07 iki 1,38 g·mm/m²·d·mm·Hg (56 % RH, 23 °C). Be to, spinduliuotė inicijavo didelių agregatų $\geq 10^7$ Da susidarymą plėvelės baltymų sistemoje, kai tuo metu kontrolinėse plėvelėse didžiausi agregatai buvo $0,2 \cdot 10^6$ Da molekulinio dydžio. Vandeninių baltymų tirpalų švitinimas skatina hidroksilo radikalų susidarymą, kurie, reaguodami su aromatinius žiedus turinčių aminorūgščių liekanomis suformuoja kovalentinius ryšius. Pavyzdžiui, tirozinas gali reaguoti su hidroksilo grupe ir susijungti su kitoje polipeptidinėje grandinėje esančiu tirozinu (Brault, D'Aprano ir Lacroix, 1997; Ressousany et al., 1998). Tokie ryšiai sustiprina baltymų plėvelės struktūrą, todėl padidėja jų mechaninis stiprumas. Formuojantis kovalentiniais ryšiais sujungtiems didelės molekulinės masės baltymų polimerams, sistemoje mažėja vandens molekulės absorbuojančių aktyvių centrų, dėl to tokių plėvelių VGP yra mažesnis (Ouattara et al., 2002).

Naujausią studiją apie UV spinduliuotės poveikį IB tirpalams ir iš jų pagamintoms plėvelėms atliko autoriai (Diaz, Candia ir Cobos, 2016). Priešingai nei autoriai (Kristo, Hazizaj ir Corredig, 2012), jie pastebėjo, kad laisvųjų SH grupių 8 % IB tirpale padaugėjo tirpalus apdorojus 4 ir 12 J/cm² dozės UV spinduliuote, tačiau bendras jų kiekis buvo mažesnis nei tirpalus apdorojus vien šiluma (85 °C 15 min). Be to, veikiant UV spinduliuotei, formavosi skirtingo dydžio baltymų agregatai, kurie buvo mažesni už baltymų agregatus, susiformavusius veikiant vien šilumai. UV spinduliuote paveikta IB struktūra turėjo įtakos plėvelių fizikinėms savybėms: plėvelių TS, E, atsparumas sutrūkimui buvo didesni veikiant didesnei spinduliuotės dozei, o didžiausios dozės poveikis prilygo šilumos poveikiui. Tačiau šiuo atveju plėvelių optinės savybės blogėjo didėjant spinduliuotės dozei – plėvelių spalva pasikeitė, jos tapo tamsesnės. Nepaisant to, UV spinduliuotės poveikio plėvelių VGP ir tirpumui nebuvo pastebėta lyginant UV spinduliuote apdorotas plėveles su neapdorotomis.

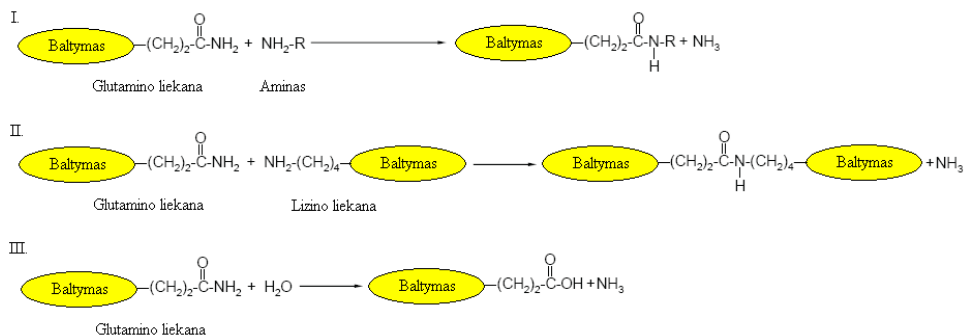
Apibendrinus galima teigti, jog IB apdorojimas spinduliuote yra viena iš priemonių, galinčių modifikuoti IB sistemos struktūrą ir taip pagerinti iš šių baltymų pagamintų plėvelių funkcines savybes.

Fermentinis išrūgų baltymų modifikavimas

Fermentai gali inicijuoti skersinių ryšių susidarymą tarp polipeptidines grandines sudarančių molekulių. Plėvelėse toks molekulių ryšių atsiradimas turėtų pagerinti jų mechanines bei barjerines savybes (Giancone et al., 2008).

Transglutaminazė (E.C. 2.3.2.13) (toliau – TG) yra vienas iš daugiausia dėmesio sulaukusių fermentų, galinčių formuoti kovalentinius skersinius ryšius tarp baltymų molekulių bei molekulių viduje ir taip modifikuoti daugumą maisto baltymų. Ji yra aktyvi plačiose temperatūros ir terpės rūgštingumo intervaluose, o didžiausiu aktyvumu pasireiškia 40–50 °C temperatūroje ir pH 5–8 intervale (Motoki, Serugo, 1998). Svarbu tai, jog TG veikia selektyviai, skirtingai nei sintetinės cheminės medžiagos, todėl nepageidaujamų ar toksiinių junginių susidarymo baltymų sistemoje tikimybė yra labai maža.

TG daugiausia katalizuoja acilo grupių pernešimą tarp baltymo grandinės glutamino liekanos γ -karboksi grupės (acilo donoro) ir pirminių amino grupių, esančių aminuose (acilo akseptorių), įskaitant baltymo grandinės lizino liekanos ϵ -amino grupes (1.3 pav. I ir II) ir tokiu būdu vykdo baltymų „polimerizaciją“. TG taip pat gali katalizuoti deaminavimo reakcijas, kai baltymų sistemoje nėra lizino liekanų ar kitų pirminių aminų (1.3 pav. III). Tokiu atveju vanduo dalyvauja reakcijose kaip nukleofilas. Tačiau dominuojanti TG veikla yra skersinių kovalentinių ryšių susidarymo inicijavimas baltymų sistemose (de Jong, Koppelman, 2002; Ohtsuka et al., 2001).



1.3 pav. Transglutaminazės inicijuojamos reakcijos: *I.* Acilo grupės pernešimas; *II.* Skersinio ryšio sudarymas tarp peptidų glutamino ir lizino liekanų; *III.* Baltymo deamininimas (de Jong, Koppelman, 2002)

Dėl tarpmolekulių ir molekulių viduje susidarančių kovalentinių ϵ -(γ -glutamil)lizino jungčių baltymai sujungiami į 10^6 – 10^7 g/mol dydžio „polimerus“. Įrodyta, kad toks TG poveikis maisto baltymų sistemose pakeičia jų funkcines savybes. TG inicijuotas baltymų molekulių susijungimas skersiniais ryšiais keičia baltymų tirpumą, higroskopiškumą ir terminį stabilumą, pagerina jų gelių

susidarymą, reologines, emulsavimo savybes (Lorenzen, 2000; Motoki, 1998). Tačiau TG poveikis labai priklauso nuo baltymų makromolekulių struktūros. Ji ypač gerai veikia pagrindinį pieno baltymą kazeiną, kuris dėl savo tretinės struktūros ypatybių, atsitiktinio aminorūgščių išsidėstymo grandinėse ir disulfidinių jungčių neturėjimo α_{S1} - bei β -kazeinuose, yra geras šio fermento substratas (Faergemand, 1999). Mokslinėje spaudoje yra duomenų apie didelę TG įtaką modelinėms pieno baltymų struktūroms (Rodriguez-Nogales, 2006). Tyrimai parodė neabejotiną kazeino, kuris veikiant šilumai neturi savybės suformuoti gelio, tinkamumą TG poveikiui. IB sujungti skersiniais ryšiais yra daug sunkiau. Jiems reikalingas struktūros modifikavimas (Faergemand, Otte ir Qvist, 1997), pavyzdžiui, terminė denatūracija, kad TG galėtų pasiekti aktyvius centrus ir inicijuoti baltymų susijungimą skersiniais ryšiais tarpusavyje ar su kitais baltymais (Nonaka, 1989; Traore, 1992). TG panaudojimo galimybės buvo tiriamos valgomosiose plėvelėse ir dangose iš kazeino (Bruno et al., 2008), sojų baltymų (Mariniello et al., 2003), kiaušinių baltymo (Lim, Mine ir Tung, 1998), kolageno (Lim, Mine ir Tung, 1999), išrūgų baltymų (Di Pierro et al., 2006; Mahmoud, Savello, 1993; Oh et al., 2004) gamyboje.

Be TG, skersinių ryšių susidarymo reakcijas tarp baltymų molekulių gali inicijuoti ir oksidoreduktazės, vykdančios oksidacinio pobūdžio reakcijas (Matheis, Whitaker, 1987). Mokslininkų (Faergemand, Otte ir Qvist, 1998) mokslinio tyrimo rezultatai parodė, kad oksidoreduktazės gali inicijuoti baltymų oligomerų ar polimerų susidarymą IB sistemoje. Fermentai specifiskai gali veikti kiekvieną baltymą: mikrobinės kilmės peroksidazė daugiausia veikė α -laktoalbuminą, lakazė – β -laktoglobuliną, o monoaminoksidazė veikė abu baltymus kartu. Nors IB gelio nesufurmavo, buvo nustatytas jų tirpalų klampos padidėjimas dėl baltymų „polimerizacijos“, kuri nebuvo tokia pat intensyvi kaip TG veikimo atveju (Faergemand, Otte ir Qvist, 1998). Panaudojus peroksidazę sojų baltymų plėvelių gamyboje buvo pastebėta, kad plėvelės dėl fermento poveikio tapo standesnės, bet trapesnės, o VGP nepakito (Stuchell, Krochta, 1994).

1.3. Polisacharidų valgomosios plėvelės: privalumai ir trūkumai

Pagrindiniai polisacharidai, naudojami plėvelėms ir dangoms gaminti, yra chitozanas, krakmolas, alginatas, karageninas, modifikuota celiuliozė, pektinas, pululanas, ksantano derva, gelano derva. Nors polisacharidų struktūrinių komponentų seka yra daug paprastesnė lyginant su baltymų struktūra, įvairūs aplinkos veiksniai gali paskatinti sudėtingus polisacharidų molekulių konformacinius pokyčius, turinčius įtakos jų funkcinėms savybėms (Han, Gennadios, 2005).

Polisacharidinių plėvelių ar dangų fizikinės savybės nulemia jų sudėtyje esančių monosacharidų pobūdis, grandinių kompozicija, forma, „polimerizacijos“ laipsnis. Formuojantis polisacharidų plėvelės ar dangos struktūrai svarbiausias vaidmuo tenka vandeniliniams ryšiams, kurių atsiradimą inicijuoja didelis kiekis hidroksilo ar kitų hidrofilinės prigimties grupių buvimas monosacharidų, susijungusių į grandines, struktūroje. Kaip ir baltymus, taip ir polisacharidus

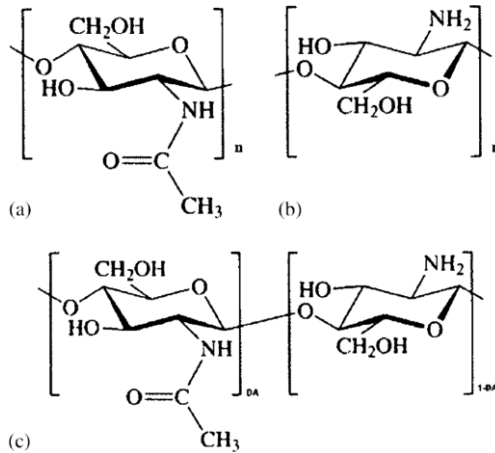
apdorojant fizikinėmis ar cheminėmis priemonėmis gali būti modifikuota jų struktūra, pakeistos jų natyvos savybės, tokiu būdu gali būti modeliuojamas iš jų gaminamų plėvelių ar dangų susidarymo proceso mechanizmas ir sukuriamos pageidaujamų charakteristikų plėvelės ar dangos. Polisacharidų struktūros modifikavimas gali būti atliekamas pridėjus į sistemą druskų, pakeičiant tirpiklį, apdorojant sistemą šiluma, keičiant sistemos pH, cheminėmis priemonėmis modifikuojant hidroksilo grupes, inicijuojant skersinių ryšių tarp monosacharidų grandinių susidarymą ar net polisacharidų hidrolizę, taip pat pridėjus kitų polisacharidų į sistemą. Tačiau šios priemonės turi būti netoksiškos ir leidžiamos naudoti maiste.

Dėl hidrofiliinės prigimties polisacharidų plėvelės ir dangos prastai sulaiko vandens garus (Gennadios, Hanna ir Kurth, 1997), tačiau tanki tinklinė polisacharidų struktūra yra selektyvus dujų barjeras, kuris sukuria modifikuotą aerobinę atmosferą, apsaugančią maisto produktą nuo gedimo ir pailginančią jo vartojimo trukmę. Tokios gali būti plėvelės ir dangos iš alginato, agarų, karagenino, pektino, chitozano (Baldwin et al., 1995; Lacroix, Le Tien, 2005) ar krakmolo (Shen et al., 2010).

1.3.1. Chitozano savybės ir gebėjimas formuoti plėveles

Chitozanas yra gaminamas daugiausia iš jūrų vėžiagyvių kiautų išgaunamo biopolimero chitino, deacetilinus chitiną 40–50 % natrio šarmu (Abdou, Nagy ir Elsabee, 2008). Jis turi dvinario kopolimero struktūrą, sudarytą iš β -(1-4)-2-acetamido-D-glukozės (N-acetil- β -D-gliukozamino, 5–25 %) ir β -(1-4)-2-amino-D-glukozės (β -D-gliukozamino, 75–95 %) monomerų, sujungtų atsitiktine tvarka (1.4 pav.) (Elsabee, Abdou, 2013).

Maži chitozano kiekiai randami ir kai kurių grybų, dumblių ląstelių sienelėse, vabzdžių skeletuose, net norvegiškame sūryje „Gamalost“, kurio gamybai naudojamas mikroskopinis grybas *Mucor mucedo*, turintis šio polisacharido lastelių sienelėse (Winterowd, Sanford, 1995). Chitozano struktūroje yra didelis kiekis pirminių amino grupių, linkusių prisijungti laisvuosius protonus, todėl jis, vienintelis iš polisacharidų, pasižymi katijoninėms molekulėms būdingomis savybėmis ir, sąveikaudamas su anijoninės prigimties junginiais, gali sudaryti druskas ar kompleksus, pavyzdžiui, su baltymais, lipidais ar kitais polisacharidais (Rinaudo, 2006). Chitozanui skiriamas didelis dėmesys dėl jam būdingų savybių įvairovės, kurios nulemia jo platų panaudojimą farmacijos, kosmetikos, biomedicinos, biotechnologijos, žemės ūkio, maisto ir ne maisto (vandens perdirdimo, popieriaus, tekstilės) pramonės šakose (Kumar, 2000). Maisto pramonėje jis dažniausiai naudojamas siekiant modifikuoti produktų tekstūrą ar apsaugoti juos nuo mikrobinio gedimo sukėlėjų (Shahidi, Arachchi ir Jeon, 1999). Vienintelis jo trūkumas tas, kad jis tirpsta tik rūgštinėje terpėje (pH <6), o gelį sudaro, kai pH <5, ir tai priklauso nuo jo molekulinės masės bei deacetilinimo laipsnio (Pillai, Paul ir Sharma, 2009). Be to, šis polisacharidas turi specifinį skonį ir aromatą, kurie gali turėti neigiamos įtakos maisto produktų juslinėms savybėms. Nepaisant šių trūkumų, chitozanas yra labai plačiai tyrinėjamas kaip plėvelės ar dangos formuojanti medžiaga.



1.4 pav. (a) N-acetil- β -D-gliukozamino ir (b) β -D-gliukozamino monomerai; (c) dvianario kopolimero chitozanas struktūra (DA – deacetilimo laipsnis) (Rinaudo, 2006)

Chitozanas plėvelės ir dangos pasižymi stipriu baktericidiniu poveikiu (Ferreira et al., 2009; Vartiainen et al., 2004), kuris, manoma, pasireiškia keliais būdais. Chitozanas gali užkirsti kelią mikroorganizmų vystymuisi prisijungdamas prie mikroorganizmų ląstelių sienelių kaip flokuliantas. Jis gali sudaryti kompleksus su metalų jonais, reikalingais mikroorganizmų gyvybinėms funkcijoms vykdyti. Taip pat chitozanas gali blokuoti mikroorganizmų išskiriamų fermentų, sukeliančių maisto produktų gedimą, aktyvumą (Vårum, Smidsrød, 2006). Analizuojant chitozanas plėvelių savybes buvo nustatyta jų priklausomybė nuo tirpiklių pobūdžio, plastikų rūšies ir kiekio, chitozanas molekulinės masės ir acetilimo laipsnio, taip pat įvertinta aplinkos sąlygų įtaka plėvelių fizikinėms cheminėms savybėms (Ferreira et al., 2009; Park, Marsh ir Rhim, 2002). Visų atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad chitozanas plėvelės ir dangos turi geras deguonies ir anglies dioksido sulaikymo savybes, o mechaninės savybės prilygsta vidutinio stiprumo sintetinių polimerų plėvelėms (Park et al., 2002; Suyatma et al., 2004). Be to, chitozanas plėvelės pakankamai gerai sulaiko vandens garus bei nepraleidžia UV spindulių, dėl ko gali apsaugoti maisto produktus nuo drėgmės išgaravimo bei UV šviesos sukeltamų fotooksidacinių pakeitimų (Leceta, Guerrero ir de la Caba, 2013).

Nors polisacharidinės plėvelės ir dangos yra linkusios absorbuoti vandenį ir gali lengvai ištirpti jame, yra vidutinio mechaninio stiprumo ir pusiau laidžios dujoms, tačiau absorbuodamos produkto paviršiaus drėgmę gali trukdyti ant jo vystytis nepageidaujamiems mikroorganizmams, apsaugoti jį nuo deguonies oksidacinio poveikio, suteikti produktui patrauklesnę išvaizdą bei supaprastinti jo apdorojimą vartotojui.

1.4. Daugiakomponentės išrūgų baltymų ir polisacharidų valgomosios plėvelės

Daugiakomponentės plėvelės iš baltymų ir polisacharidų turi daug geresnes mechanines, barjerines savybes nei polisacharidų ar baltymų vienkomentės plėvelės (Coughlan et al., 2004). Heterogeninės baltymai-polisacharidai-plastikliai sistemos plėvelėse yra geriau panaudojamos kiekvieno komponento fizikinės cheminės ir funkcinės savybės ir padidinamas jų poveikio maisto produktams efektyvumas (Letendre et al., 2002; Ressonany, Vachon ir Lacroix, 1998). Teigiama, jog tokie polisacharidai kaip karboksimetilceliuliozė, alginatas, pektinas su baltymais, suformuoja kompleksus, kurių struktūrą palaiko elektrostatinės jėgos (Imeson, Ledward ir Mitchell, 1977; Letendre et al., 2002; Sabato et al., 2001; Shih, 1994; Thakur, Singh ir Handa, 1997). Pektinas su baltymais gali susijungti skersiniais ryšiais (Thakur et al., 1997). Šiluma tokiose heterogeninėse sistemose gali inicijuoti trimačio makromolekulių tinklo susidarymą, kuris žymiai sustiprina plėvelių mechaninį stiprumą, kai tuo metu šiluma nepaveiktose sistemose polisacharidai stengiasi išlaikyti savo pirminį tvarkos laipsnį ir tokiu būdu apsaugo nuo sąveikos su baltymų funkcinėmis grupėmis (Letendre et al., 2002). Mokslininkai (Erdohan ir Turhan, 2005) nustatė, kad IB plėvelės su metilceliulioze buvo hidrofobiškesnės negu vienkomentės šių biopolimerų plėvelės, todėl jas buvo galima pritaikyti drėgmei jautriems maisto produktams apsaugoti nuo nepageidaujamo aplinkos oro drėgnio poveikio. Mažas kiekis pululano taip pat gali sumažinti IB plėvelių pralaidumą drėgmei ir deguoniui (Gounga, Xu ir Wang, 2007). Krakmolo ar alginato pridėjimas į IB ir kalcio kazeinato mišinio plėveles nežymiai susilpnina jų mechaninį stiprumą, bet pagerina klampiai elastingas savybes ir sumažina VGP (Ciesla, Salmieri ir Lacroix, 2006). Chitozanas IB plėvelėms gali suteikti antimikrobinių savybių (Ferreira et al., 2009). Jos yra ypač svarbios siekiant sukurti ir pritaikyti aktyvią pakuotę, kuri galėtų užkirsti kelią mikroorganizmų sukeltam maisto produktų gedimui ir maistu plintančioms ligoms.

Chitozanui sąveikaujant su baltymais gali susiformuoti arba tirpūs, arba netirpūs jų kompleksai (Delben, Stefancich, 1998). Šių makromolekulių sąveikos būna arba cheminės (pvz., Maillard tipo), arba fizikinės (pvz., elektrosstatinės). Veikiant šilumos energijai β -Lg ir chitozано sąveika yra cheminio pobūdžio, nes tokioje sistemoje vyksta Maillard tipo reakcijos, kurių metu susidaro β -Lg-chitozано kovalentiniai kompleksai (Hattori et al., 2000; Miralles et al., 2007). Kadangi IB bei chitozanas yra polielektrolitinės prigimties biopolimerai, vis tik joninė jėga bei pH yra svarbiausi faktoriai, nulemiantys jų tarpusavio sąveiką bei tirpalų ir emulsijų, paruoštų su šiais biopolimerais, reologines savybes ir stabilumą (Guzey, McClements, 2006; Laplante, Turgeon ir Paquin, 2004; Mounsey et al., 2008).

Mokslinėje literatūroje paskelbta nemažai publikacijų apie IB ir chitozано plėvelių savybes bei jų pritaikymą. Tačiau publikuojami rezultatai dažnai prieštarauja vieni kitiems dėl tyrimuose naudotų skirtingų plėvelių gamybos procedūrų ir naudotų biopolimerų sudėties. Taip pat skiriasi maisto sistemos, kuriose šios plėvelės buvo panaudotos. Vieni iš pirmųjų (Di Pierro et al., 2006) tyrėjų analizavo chitozано-išrūgų baltymų plėveles, paruoštas iš šių biopolimerų mišinio (pH 6) su skirtingu kiekiu baltymų, apdorotų TG fermentu. Analizuotose plėvelėse

chitozanas buvo dominuojantis komponentas ($9,2 \text{ mg/cm}^2$ plėvelės), o IB kiekis kito (nuo 0 iki 1 mg/cm^2 plėvelės). Buvo nustatyta, kad didėjant baltymų kiekiui plėvelėse, jų mechaninės savybės blogėjo, šiek tiek mažėjo deguonies pralaidumas (toliau – DP), tačiau žymiai didėjo VGP. Tyrėjai mano, jog tokie pokyčiai galėjo įvykti dėl baltymų molekulių įsiterpimo į polisacharido sistemą bei didesnio kiekio polinių grupių atsiradimo joje, daugėjant baltymų molekulių. Tačiau mokslininkai (Ferreira et al., 2009), analizavę chitozано ir IB plėveles, pirmiausia nustatė tai, kad sistemos pH didesnė už chitozано pI trukdo chitozanui visiškai ištirpti ir sudaryti makromolekulių tinklą, o sistemos pH, esanti arti baltymų izoelektrinio taško, trukdo baltymams formuoti tinklą. Jiems plėvelių iš chitozано ir IB mišinio, kurio pH 5–7 pagaminti nepavyko dėl vieno iš polimerų mažo tirpumo arba dėl netirpiųjų kompleksų susidarymo, priešingai nei nustatė mokslininkai (Pereda, Aranguren ir Marcovich, 2008), analizavę chitozано ir kazeino mišinio plėveles. Todėl būtina chitozано ir IB mišinio pH sumažinti iki žemesnio kaip baltymų pI siekiant visiškai ištirpinti chitozaną ir naudoti santykinai didelį kiekį IB. Tokioje sistemoje abu polimerai turi teigiamą krūvį, dėl kurio chitozanas lengvai ištirpsta ir yra užkertamas kelias nuosėdoms susidaryti, t. y. netirpiams polikatijono-polianijono kompleksams (Ferreira et al., 2009). Analizuodami plėveles, kuriose chitozано ir IB santykis buvo 6:0, 6:1, 6:2, 6:3, 6:6, 3:6 ir 2:6 pagal sausų medžiagų (toliau – SM) kiekį, mokslininkai (Ferreira et al., 2009) nustatė, kad, sumažinus chitozано ir IB mišinio tirpalo pH iki 3,5, galima suformuoti plėveles, kuriose baltymų būtų iki 75 %. Plėvelių džiovinimo metu didėjant biopolimerų koncentracijai, plėvelėse susiformuoja heterogeninė struktūra ir susidaro kompozicijos gradientas, dėl kurio gali nukentėti plėvelių funkcinės savybės, t. y. pablogėti plėvelių mechaninės savybės ir kai kuriais atvejais padidėti VGP (didesni neigiami pokyčiai buvo nustatyti, kai baltymų kiekis plėvelėje buvo didesnis nei 50 %). Panašius rezultatus gavo ir mokslininkai (Kurek, Galus ir Debeaufort, 2014).

Šių plėvelių praktinio pritaikymo pavyzdžių pavyko surasti vos vieną. Di Pierro ir kiti mokslininkai (2011) atliko rikotos sūrio vartojimo termino pailginimo, panaudojant chitozано ir IB mišinio valgomasias plėveles, tyrimą. Buvo nustatyta, kad $4 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje 40 % CO_2 / 60 % N_2 modifikuotoje aplinkoje laikyto rikotos sūrio bandiniuose dengtuose plėvele titruojamasis rūgštingumas didėjo lėčiau nei kontroliniuose bandiniuose be plėvelės. Plėvele dengtuose bandiniuose titruojamasis rūgštingumas nekito 21 dieną, kai tuo metu kontroliniuose bandiniuose jis buvo padidėjęs jau po 7 dienų. Tam įtakos turėjo pienarūgščių bakterijų augimo slopinimas veikiant plėvelėse esančiam chitozanui. Tiriamosios plėvelės stabdė ir mezofilinių bei psichrotrofinių mikroorganizmų augimą viso eksperimento metu (30 parų), kai tuo metu kontroliniame bandinyje šių mikroorganizmų kiekis pasiekė 7 log KSV/g atitinkamai per 7 ir 14 parų. Taigi, plėvelės iš chitozано ir IB apsaugojo rikotos sūrį nuo nepageidaujamo rūgštėjimo ir mikrobiologinio gedimo (Di Pierro et al., 2011).

Akivaizdu, jog daugiakomponentės bioplėvelės ir dangos gali pranokti savo savybėmis vienkomentes bioplėveles ir savo efektyvumu kai kuriais atvejais pralenkti sintetinių polimerų dangas ir apvalkalus, naudojamus maisto pramonėje.

1.5. Valgomųjų plėvelių ir dangų naudojimas maisto pramonėje

Didelis mokslininkų dėmesys yra skiriamas valgomosioms dangoms, kurios kaip alternatyvi priemonė gali sumažinti minimalaus apdorojimo žalingą poveikį šviežiai pjaustytiems vaisiams ir daržovėms. Kartu valgomosios dangos gali būti naudojamos maisto priedų, tokių kaip antirudavimo, antimikrobių, spalvinių, skonio, maistinių medžiagų ir prieskonių pernašai ant produkto (Pranoto et al., 2005). Dar 1994 m. buvo atlikti plėvelių iš polisacharidų tyrimai, kur buvo analizuota vaisių ir daržovių laikymo termino pailginimo galimybė selektyviai sumažinant jų kvėpavimo metu išskiriamų anglies doksido dujų ir deguonies mainus (Greener Donhowe ir Fennema, 1994). Tiriant polisacharidų valgomųjų plėvelių ir dangų įtaką vaisiams, daržovėms ar uogoms (Devlieghere et al., 2004), buvo tirti mango vaisiai (Chien et al., 2007), papajos (Tapia et al., 2008), kriaušės (Oms-Oliu et al., 2008), bananai (Bico et al., 2009), obuoliai (Rojas-Graü et al., 2007; Rojas-Graü et al., 2008), melionai (Raybaudi-Massilia et al., 2008), džiovinti ananasai (Talens et al., 2012), morkos (Durango et al., 2006), šparaginės pupelės (Tzoumaki et al., 2009), brokoliai (Ansorena et al., 2011), česnakai (Geraldine et al., 2008), mėlynės (Duan et al., 2011), braškės (Han et al., 2004; Hernandez-Munoz et al., 2008; Ribeiro et al., 2007; Vargas et al., 2006), vynuogės (Sanchez-Gonzalez et al., 2011). Teigiamą įtaką produktų vartojimo termino pailginimui turėjo ir iš įvairių baltymų pagamintos valgomosios plėvelės, skirtos apsaugoti vaisius ar daržoves: kaktuso vaisius (Correa-Betanzo et al., 2011), obuolius (Perez-Gago et al., 2006), žemės riešutus (Han et al., 2009), moliūgus (del R. Moreira et al., 2009) ir kt.

Siekiant pailginti mėsos ar žuvies bei jūros gėrybių vartojimo terminus, būtina apsaugoti produktus nuo deguonies oksidacinio poveikio, audinių drėgmės praradimo bei gedimą sukeliančių mikroorganizmų. Straipsnyje (Zinoviadou, Koutsoumanis ir Biliaderis, 2010) aprašomos fizikinės termomechaninės IB izoliato plėvelių su antimikrobinėmis medžiagomis savybės ir jų įtaka mikroorganizmų sukeliama jautienos gedimo procesui. Bandymų rezultatai parodė, kad polilizino ir IB plėvelės su natrio laktatu yra efektyvi priemonė, leidžianti pailginti šviežios jautienos vartojimo trukmę. Taip pat jie nustatė IB izoliato plėvelių su eteriniu raudonėlių aliejumi fizikines chemines savybes bei jų antimikrobinį poveikį šviežios jautienos gedimą sukeliančiai mikroflorai. Jautienos padengimas tokiomis plėvelėmis sumažino mėsoje bendrą mikroorganizmų skaičių ir pseudomonų skaičių 2 kartus, o pieno rūgšties bakterijų augimas buvo visiškai nuslopintas (Zinoviadou, Koutsoumanis ir Biliaderis, 2009). Autorių (Emiroglu et al., 2010) straipsnyje aprašomas valgomųjų plėvelių iš sojos baltymų su čiobrelių ir raudonėlių eteriniais aliejais antimikrobinis aktyvumas ant maltos jautienos paplotėlių. Tyrimų rezultatai parodė, kad plėvelės su čiobrelių ir raudonėlių eteriniais aliejais slopino *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas spp.* ir koliforminių bakterijų aktyvumą šaldytuve laikomuose mėsos paplotėliuose. Kiti tyrėjai baltymų plėveles bandė pritaikyti įvairių žuvų (tilapijų, lašišos) (Paschoalick et al., 2003; Rodriguez-Turienzo et al., 2013), paukštienos (Fernandez-Pan, Carrion-Granda ir Mate, 2014) šviežumui išsaugoti. Polisacharidų valgomosios plėvelės eksperimentiniuose tyrimuose buvo naudotos apsaugoti kiaulieną (Songchai Yingyuad et al., 2006), jautieną (Beverly et al., 2008) bei paukštieną (Jiang et al., 2011) ir iš jų pagamintus produktus, taip pat

kai kuriuos žuvies produktus (Gomez-Estaca et al., 2010; Kilinceker, Dogan ir Kucukoner, 2009).

Kai kurių plėvelių sudėtis ir gamybos procesas yra užpatentuoti. Europos patentų biure buvo užpatentuotos plėvelės iš modifikuoto krakmolo, želatinos, plastiklio, lipidų ir vandens, skirtos apsaugoti maisto produktus nuo nepageidaujamų įvairių fizikinių ir mikrobiologinių veiksnių žalingo poveikio (Lazard, Doreau ir Nadison, 1993). JAV patentų biuro duomenų bazėje galima rasti du patentus, susijusius su valgomosiomis plėvelėmis. US5620757A patente (Ninomiya, Suzuki ir Ishii, 1997) aprašomos vienasluoksnės polisacharido karagenino plėvelės bei dvisluoksnės – iš polisacharido karagenino ir įvairių baltymų. Šios plėvelės skirtos pakuoti sausus miltinius arba aliejingus maisto produktus. US8282954B2 patente (Bogue, Myers, 2012) aprašytas plėvelių gamybos metodas, kuriame nurodyti atskiri plėvelių iš įvairių medžiagų gamybos proceso etapai ir sąlygos jiems vykdyti.

1.6. Literatūros analizės apibendrinimas ir darbo tikslo pagrindimas

Mokslininkų susidomėjimas valgomosiomis plėvelėmis bei dangomis yra didelis. Iki šiol atlikti tyrimai rodo, kad, priklausomai nuo sudėties bei praktinio panaudojimo sąlygų, jos gali sulėtinti įvairių maisto produktų cheminį gedimą, apsaugoti juos nuo mikrobinės taršos bei kitų nepageidaujamų aplinkos veiksnių, taip užtikrinant produktų saugą ir geras juslines savybes bei maistinę vertę. Naudojant tokias plėveles taip pat būtų galima sumažinti maistinių atliekų kiekį ir tokiu būdu tausoti gamtą.

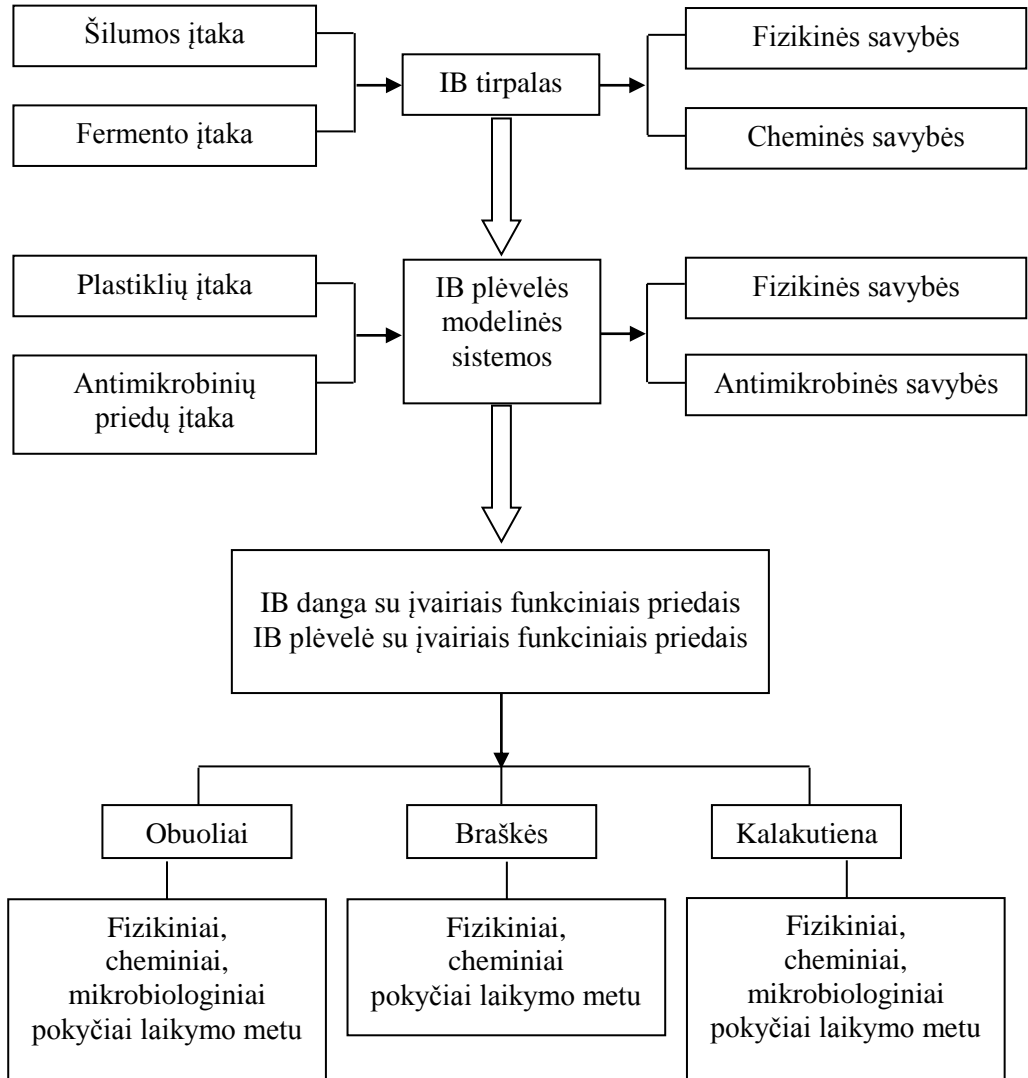
Tačiau biopolimerinės plėvelės ir dangos turi nemažai trūkumų, kurie riboja jų panaudojimo galimybes. Pavyzdžiui, vienas iš pagrindinių baltymų plėvelių ir dangų trūkumų yra didelis VGP, dėl kurio šiomis plėvelėmis ar dangomis dengtuose maisto produktuose gali sparčiau keistis drėgmės kiekis bei atsirasti masės nuostoliai produktų laikymo metu. Siekiant išvengti šios problemos yra bandoma baltymų plėvelių ir dangų struktūrą papildyti įvairiais funkciniais priedais. Remiantis literatūros analizės duomenimis, tokie priedai gali turėti ne tik teigiamos, bet ir neigiamos įtakos ne tik VGP, bet ir mechaninėms, juslinėms, morfologinėms jų savybėms. Funkcinių priedų įtaka baltymų plėvelių ir dangų fizikinėms ir cheminėms savybėms turi būti įvertinta atsižvelgiant ne į vieną plėvelių ir dangų funkciją, o kompleksiskai. Tokių tyrimų publikacijų yra nedaug, o praktinio panaudojimo objektai dažniausia yra vienos rūšies maisto produktai. Be to, labai mažai studijų yra atlikta pritaikant IB valgomosioms plėvelėms ir dangoms gaminti. Taip pat labai svarbu yra iširti šių plėvelių ir dangų praktinio panaudojimo sąlygas, kuriose plėvelės ir dangos suteiktų maisto produktams didžiausią įmanomą teigiamą apsauginį poveikį, o jų gamybos ir suformavimo ant produkto technologija būtų nesudėtinga ir pritaikoma praktikoje.

Atlikus literatūros analizę iškeltas tikslas – iširti IB valgomųjų plėvelių ir dangų su įvairiais funkciniais priedais fizikines ir mikrobiologines savybes. Taip pat labai svarbu buvo iširti jų įtaką įvairių greitai gendančių maisto produktų fizikinėms savybėms ir saugai bei pasiūlyti prototipines IB plėvelių ir dangų gamybos technologijas, pritaikomas maisto produktų gamyboje.

2. TYRIMŲ KRYPTYS, OBJEKTAI IR METODAI

2.1. Tyrimų schema

Įvairių veiksnių įtakos IB valgomųjų plėvelių ir dangų savybėms ir praktinio plėvelių ir dangų pritaikymo galimybių tyrimo schema pateikta 2.1 pav., o tiriamųjų objektų savybių analizės metodai pateikti 2.1 lentelėje.



2.1 pav. Tyrimų schema

2.1 lentelė. Tiriamų objektų analizuojamos savybės ir jų tyrimo metodai

Objektai	Savybės	Tyrimo metodai
Liesas pienas	Baltymų „polimerizacija“	Gelio chromatografija
IB tirpalas	Optinis tankis Koncentracija Morfologija Dalelių masė (kDa) Reologinės savybės	Spektrofotometrinis metodas Spektrofotometrinis metodas Atominės jėgos mikroskopija Elektroforezė (SDS-PAGE) Tekėjimo kreivės Dinaminė klampa
IB plėvelės	Mechaninis stiprumas ir elastingumas Vandens garų pralaidumas Deguonies pralaidumas Tirpumas Antimikrobinės savybės	Tekstūros analizė: dūrimo testas Gravimetrinis metodas ASTM F2622-08 standartinis metodas Elektroforezė (SDS-PAGE) Difuzijos į agarą metodas
Obuoliai	Spalva Morfologija Mechaninis tvirtumas Drėgmės kiekis Fenolinių junginių kiekis Atsparumas prieš <i>P. expansum</i>	Spektrofotometrinis metodas Fotografavimas Tekstūros analizė: dūrimo testas Gravimetrinis metodas Folin-Ciocalteu metodas Sėjimas modelinėje ir realioje sistemose
Braškės	Spalva Morfologija Mechaninis tvirtumas Masės kitimas Antocianinų kiekis Fenolinių junginių kiekis Vitamino C kiekis	Spektrofotometrinis metodas Fotografavimas Tekstūros analizė: dūrimo testas Gravimetrinis metodas Spektrofotometrinis metodas Folin-Ciocalteu metodas Titravimo metodas
Kalakutiena	Drėgmės kiekis pH Lakių riebalų rūgščių kiekis Mikrobiologinis užterštumas Atsparumas prieš <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. jejuni</i>	Gravimetrinis metodas Potenciometrinis metodas Distiliacija vandens garais Sėjimas ant agarų terpės Sėjimas ant selektyvios terpės

Tyrimų laboratorijos

Kopenhagos universiteto Fizinių ir gamtos mokslų fakulteto Maisto mokslo katedros tyrimų laboratorijose (Kopenhaga, Danija) buvo atlikti TG įtakos IB tirpalų ir plėvelių savybėms tyrimai (baltymų masės, tirpalų optinio tankio ir jų koncentracijos, atominės jėgos mikroskopijos, plėvelių DP).

Miuncheno technologijos universiteto Maisto procesų inžinerijos ir pieno technologijos instituto tyrimų laboratorijose (Freising, Vokietija) buvo atlikti lieso pieno baltymų „polimerizacijos“ tyrimai.

Nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute (Vilnius, Lietuva) buvo atliktas plėvelių poveikis bendram mikrobiologiniam šviežios kalakutienos gėdimui laikymo metu.

LAMMC Sodininkystės ir daržininkystės instituto Biochemijos ir technologijos laboratorijoje (Babtai, Lietuva) buvo atlikti braškių fenolinių junginių ir antocianinų kiekio bei braškių spalvos tyrimai.

Kauno technologijos universitete (Kaunas, Lietuva) buvo atlikti šie tyrimai:

- Dizaino ir technologijų fakulteto Skenuojančios elektroninės mikroskopijos laboratorijoje (Kaunas, Lietuva) buvo atliktas plėvelių morfologijos tyrimas skenuojančiu elektroniniu mikroskopu.
- Cheminės technologijos fakulteto Maisto mokslo ir technologijos katedros Mikrobiologijos laboratorijoje buvo atlikti plėvelių antimikrobinių savybių, obuolių atsparumo prieš mikroskopinio grybo augimą ir kalakutienos atsparumo prieš patogeninių mikroorganizmų augimą tyrimai.
- Cheminės technologijos fakulteto Maisto mokslo ir technologijos katedros Cheminės analizės laboratorijoje buvo atliktas kalakutienos lakiųjų riebalų rūgščių tyrimas.
- Cheminės technologijos fakulteto Maisto mokslo ir technologijos katedros Maisto struktūros ir reologijos tyrimų laboratorijoje buvo atlikti IB tirpalų reologinių savybių, plėvelių mechaninių ir vandens pralaidumo savybių, obuolių spalvos, morfologijos, mechaninio stiprumo, drėgmės kiekio, fenolinių junginių kiekio, braškių morfologijos, mechaninio stiprumo, masės kitimo, kalakutienos drėgmės kiekio, pH tyrimai.

2.2. Tyrimų objektai

2.2.1. Medžiagos

Medžiagos plėvelėms gaminti

Išrūgų baltymų (IB) izoliatas buvo pirktas iš Arla Foods Ingredients ambu (Danija). Pagal gamintojo pateiktą sertifikata, IB izoliato sudėtyje buvo 88,5 % IB, 0,1 % laktozės, 0,1 % riebalų, 4,0 % pelenu, 6,0 % vandens. Fermento transglutaminazės (TG) preparatas *Activa® YG* buvo dovanotas Ajinomoto Foods Europe S.A.S (Prancūzija). TG aktyvumas buvo deklaruotas 85–121 TV/g preparato. Glicerolis (G) buvo pirktas iš Chempur (Lenkija), sorbitolis (S) – iš Fluka (Italija). Chitozono (CHIT) preparatas, sudarytas iš rupių dribsnių ir miltelių, kurio deacetilinimo laipsnis >75 % ir vidutinė molekulinė masė (190–310 kDa), buvo pirktas iš Sigma Aldrich (Airija). Ledinė acto rūgštis buvo pirktas iš Lach-ner (Čekijos Respublika). Natūralios spanguolių sultys „Rabenhorst“ (toliau – Spa) (Vokietija), pagamintos iš Šiaurės Amerikoje surinktų uogų buvo pirktos iš vietinio prekybos centro (Kaunas, Lietuva). Natūralios svarainių (toliau – Sva), aktinidijų (toliau – Akt), šermukšnių (toliau – Šer) ir putino uogų (toliau – Put) sultys buvo gautos iš LAMMC Sodininkystės ir daržininkystės instituto (Lietuva). Propolio etanolinis tirpalas (10 %) buvo pirktas iš Medicata Filia (Lietuva), nizino preparatas (2,5 %, Nisin from *Lactococcus lactis*) – iš Sigma Aldrich (Danija), kalcio laktatas – iš Sigma Aldrich (Nyderlandai), benzenkarboksirūgštis – iš Reachem (Slovakija), askorbo rūgštis – iš Sigma Aldrich (Didžioji Britanija), kalio sorbatas – iš Sigma Aldrich (Vokietija). Visi tyrimuose naudoti cheminiai reagentai buvo analitinio grynumo.

Polietileninė maisto pakavimo plėvelė (toliau – PE) (Metsä Tissue, Suomija) buvo pirktas vietiniame prekybos centre (Kaunas, Lietuva).

Medžiagos tyrimams

NuPAGE 4–12 % Bis-Tris elektroforezės mini gelis (1 mm storio, 12 šulinėlių), ličio dodecilsulfato (toliau – LDS) buferis buvo pirkti iš Novex (Kalifornija, JAV), *MOPS SDS* buferinis tirpalas, redukuojantis agentas – iš Invitrogen (Kalifornija, JAV), baltymų standartas (6,5–200 kDa) – iš Bio-Rad Laboratories Inc. (Kalifornija, JAV), 1,4-ditiotreitolis (toliau – DTT) – iš Applichem GmbH (Vokietija), dinatrio fosfatas, [(3cholamidopropil)-dimetilamonio]-1-propansulfonatas (Chaps) – iš Sigma Aldrich (Vokietija), karbamidas, natrio chloridas, 2,6-dichlorfenolindofenolio natrio druska – iš Merck (Vokietija), tris-(hidroksimetil)-aminometanas (Tris bazė), natrio dodecilsulfatas – iš Sigma Aldrich (Vokietija), *Folin-Ciocalteu* reagentas – iš Fluka (Šveicarija).

Pasterizuotas (74 °C temperatūroje 30 s) liesas pienas (3,4 % baltymų, <0,05 % riebalų) buvo pirktas iš vietinės pieninės (Freising, Vokietija). Švieži *Ligol* veislės obuoliai bei šviežios *Elkat* veislės braškės buvo gauti iš LAMMC Sodininkystės ir daržininkystės instituto (Lietuva). Šviežia kalakutienos krūtinėlių mėsa, kurioje baltymų buvo 26,9±1,5 %, riebalų – 1,30±0,01 %, buvo pirktas tiesiogiai iš gamintojų UAB „Arvi kalakutai“ (Lietuva). Mikrobiologiniam tyrimui naudoti mikroorganizmai ir kultivavimo terpės yra pateikti 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Tyrimams naudoti mikroorganizmai ir jų kultivavimo terpės

Mikroorganizmai	Padernė	Kultivavimo terpė	Tyrimams naudota terpė
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	Mitybos agaras (REF 310040, Liofilchem, Italija)	Mitybos agaras; <i>Xylose lysine deoxycholate (XLD)</i> agaras (REF 610060, Liofilchem, Italija)
<i>Salmonella agona</i>	PT 43	Mitybos agaras	Mitybos agaras
<i>Esherichia coli</i>	ATCC 25922	Mitybos agaras	Mitybos agaras; <i>Tryptone bile X-Gluc (TBX)</i> agaras (REF 4021562, Biolife, Italija)
<i>Campylobacter jejuni</i>	CCM 6214 (ATCC 33560)	Boltono sultinys (CM0983 su priedu SR0183, Oxoid, Italija)	<i>Campylobacter Blood Free Medium Base</i> agaras (REF 610130, Liofilchem, Italija) su priedu <i>CCDA</i> (REF 81037, Liofilchem, Italija)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Išskirtas nuo maisto produktų paviršiaus (KTU Maisto institutas)	<i>MRS</i> agaras (REF 401728, Biolife, Italija)	
<i>Lactobacillus sakei</i>	Išskirtas nuo maisto produktų paviršiaus (KTU Maisto institutas)	<i>MRS</i> agaras (REF 401728, Biolife, Italija)	
<i>Penicillium expansum</i>	Išskirtas nuo obuolio paviršiaus (VDU Botanikos institutas)	<i>DG18</i> (REF 610238, Liofilchem, Italija)	<i>DG18</i> ; Obuolių tyrė-agaras

Salmonella, *Esherichia* ir *Lactobacillus* ląstelių suspensijoms paruošti bakterijų kultūros buvo augintos 37 °C *Termaks* termostate (Norvegija) 18 val. ant nuožulnių kultivavimo terpių. Nuplautos bakterijų suspensijos buvo praskiestos pagal McFarland standartą Nr. 0,5.

Campylobacter jejuni bakterijų ląstelių suspensijai paruošti bakterijų kultūra buvo sėta į *Boltono* sultinį su priedais ir 6 val. inkubuota 37 °C, po to – 48 val. 42 °C mikroaerofilinėmis sąlygomis *Termaks* termostate. Po inkubacijos bakterijų kultūra buvo gerai išmaišyta ir naudota tyrimams.

Mikroskopinių grybų kultūra *Penicillium expansum* buvo užauginta ant *DG 18* kultivavimo terpės 25 °C *Termaks* termostate kol susisporuliavo. Užaugusi kultūra buvo nuplauta steriliu fiziologiniu tirpalu ir paruošta jos suspensija (10^6 – 10^7 KSV/ml), sporų skaičių nustatčius naudojant skaičiavimo kamerą (Neubauer, Vokietija) (griovelių gylis 0,1 mm, plotas 0,0025 mm²) bei optinį mikroskopą *Optika B-290* (Italija).

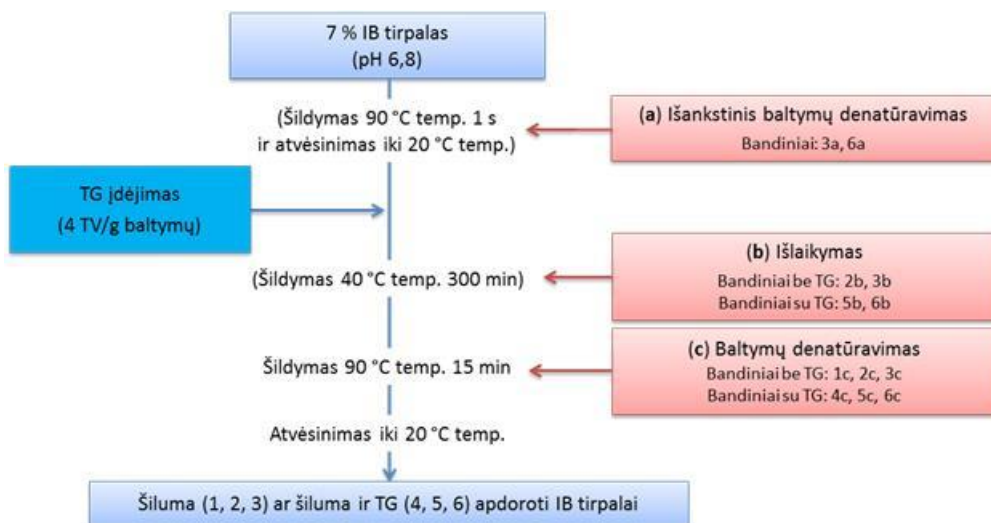
2.2.2. Šilumos ir fermento transglutaminazės poveikio įtakos pieno baltymams ir išrūgų baltymams bei iš išrūgų baltymų pagamintoms plėvelėms tyrimų objektai

Šiluma ir transglutaminaze paveikto lieso pieno bandinių paruošimas

Bandinių paruošimui žemoje temperatūroje pasterizuotas liesas pienas (3,4 % baltymų) buvo šildytas 80 °C temperatūroje 2 min, atvėsintas iki 40 °C ar 50 °C temperatūros ir išlaikytas su TG (0, 1, 2, 4 TV/g baltymų) 20, 30, 60 min. Po fermento inaktyvacijos (80 °C temperatūroje 2 min) mėginiai buvo užšaldyti ir išdžiovinti vakuuminėje džiovykloje (Martin Christ GmbH, Vokietija), o gauti TG paveikto pieno milteliai buvo panaudoti gelio chromatografijos analizės bandinių paruošimui. Jie buvo ištirpinti mėginio buferyje (baltymų koncentracija bandiniuose – 0,3 %), stipriai supurtyti purtykle ir ultragarso vonelėje iš jų buvo pašalinti susidarę oro ar kitų dujų burbulai. Prieš gelio chromatografinę analizę mėginiai buvo nufiltruoti 0,45 µm porų dydžio filtru.

Šiluma ir transglutaminaze paveiktų išrūgų baltymų dispersijų paruošimas

Ruošiant šiluma ir TG apdorotų IB dispersijas (7 %, pH 6,75), IB izoliatas buvo ištirpintas distiliuotame vandenyje, o gauta IB dispersija apdorota šiluma ir fermentu (2.2 pav.).



2.2 pav. Išrūgų baltymų apdorojimo šiluma ir transglutaminaze schema

IB dispersija buvo šildyta 3 skirtingais režimais:

1) maišant magnetine maišykle šildyta iki 90 °C temperatūros vidutiniškai 1 °C/5 s greičiu, išlaikyta šioje temperatūroje 15 min ir atvėsinta šalto vandens vonioje iki 20 °C temperatūros (mėginiai Nr. 1 ir 4);

2) maišant magnetine maišykle šildyta iki 40 °C temperatūros vidutiniškai 1 °C/5 s greičiu, išlaikyta šioje temperatūroje 300 min, po to pašildyta maišant

magnetine maišykle iki 90 °C temperatūros, išlaikyta tokioje temperatūroje 15 min ir atvėsinta šalto vandens vonioje iki 20 °C temperatūros (mėginiai Nr. 2 ir 5);

3) maišant magnetine maišykle šildyta iki 90 °C temperatūros vidutiniškai 1 °C/5 s greičiu, išlaikyta šioje temperatūroje 1 s ir atvėsinta šalto vandens vonioje iki 40 °C temperatūros, išlaikyta šioje temperatūroje 300 min, po to vėl pašildyta maišant magnetine maišykle iki 90 °C temperatūros, išlaikyta toje temperatūroje 15 min ir atvėsinta šalto vandens vonioje iki 20 °C temperatūros (mėginiai Nr. 3 ir 6).

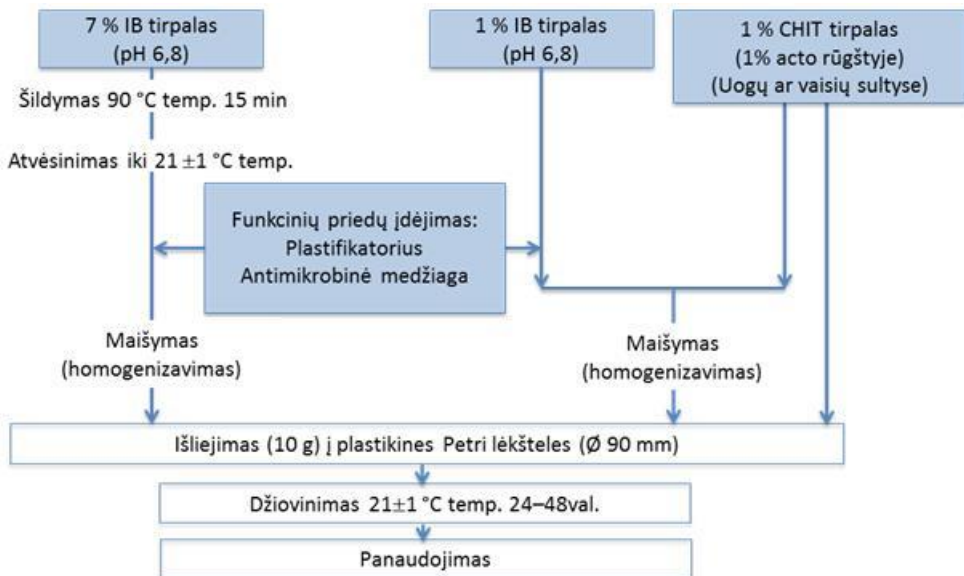
Į mėginius Nr. 4, 5 ir 6 prieš išlaikymą 40 °C temperatūroje buvo įdėta TG fermento 4 TV/g baltymų.

Šiluma ir transglutaminaze paveiktų išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių ruošimas (IB/TG/G)

Gaminant šiluma ir fermentu apdorotų IB plėveles, į paruoštas dispersijas buvo įdėtas plastiklis G santykiu $IB_{SM}:G_{SM}=1:1,43$, suteikiantis plėvelėms elastingumo. Gauti tirpalai buvo išlieti į *Petri* lėkšteles (Ø 90 mm) po 10 g ir džiovinti ventiliuojamoje kameroje (Binder, Vokietija) 21 ± 1 °C temperatūroje 24 val.

2.2.3. Funkcinių priedų įtakos išrūgų baltymų plėvelėms tyrimų objektai

Tyrimams naudotų IB, CHIT ir IB/CHIT valgomųjų plėvelių gamybos schema yra pavaizduota 2.3 paveiksle, o tirpaluose, skirtuose plėvelėms gaminti, esančių įvairių funkcinių priedų kiekiai yra pateikti 2.3 ir 2.4 lentelėse.



2.3 pav. Plėvelių su funkciniais priedais bendra gamybos schema

2.3 lentelė. Tirpalų, skirtų plėvelėms su įvairiais plastikiais gaminti, sudėtis

Plėvelė	IB kiekis tirpale, %	CHIT kiekis tirpale, %	G kiekis tirpale, %	S kiekis tirpale, %
IB/G	7	-	7	-
IB/S	7	-	-	7
	7	-	-	9,1
IB/G/S	7	-	3,5	3,5
	7	-	1,4	5,6
IB/CHIT/G	0,5	0,5	0,5	-
IB/CHIT/S	0,5	0,5	-	0,5

Chitozano bei išrūgų baltymų ir chitozano mišinio valgomųjų plėvelių su sultimis ruošimas (CHIT/Sultys ir IB/CHIT/Sultys)

Plėvelėms gaminti buvo naudotos Sva, Spa, Akt, Šer ir Put sultys. Pirmiausia, natūralios sultys buvo nucentrifuguotos centrifuga *Velocity 14* (Dynamica, Šveicarija) 6000 min⁻¹ greičiu per 10 min. Toliau Sva ir Spa sultys buvo išdžiovintos sublimatoriuje *Sublimator 3x4x5* (Zirbus Technology, Vokietija).

Gaminant plėveles buvo naudotos natūralios Akt, Šer ir Put sultys, o plėvelėms su Sva ar Spa sultimis, koncentruoti sulčių tirpalai (pH 2,0–2,5). Pastarieji buvo paruošti natūralių Sva ar Spa sulčių miltelius ištirpinus distiliuotame vandenyje. Natūraliose Sva sultyse SM buvo 6,47 g/100 g sulčių, o natūraliose Spa sultyse SM buvo 5,35 g/100 g sulčių. Paruoštuose koncentruotuose sulčių tirpaluose Sva sulčių SM kiekio santykis su vandens kiekiu buvo 1:16; 2:15; 3:14, o Spa sulčių – 1:19; 2:18; 3:17 (2.4 lent.).

Gaminant CHIT/Sultys plėveles, 1 % chitozano tirpalas buvo gamintas chitozaną ištirpinus natūraliose sultyse ir koncentruotuose sulčių tirpaluose maišant magnetine maišykle. Gauti mišiniai buvo išpilstyti į vienkartinės plastikines *Petri* lėkšteles (Ø 90 mm) po 10 g ir džiovinti ventiliuojamoje kameroje 21±1 °C temperatūroje 48 val.

Gaminant IB/CHIT/Sultys plėveles, 1 % IB tirpalas buvo gamintas IB izoliatą ištirpinant distiliuotame vandenyje, maišant magnetine maišykle. 1 % chitozano tirpalas buvo gamintas chitozaną ištirpinant natūraliose sultyse ir koncentruotuose sulčių tirpaluose, maišant magnetine maišykle. Gauti IB ir CHIT (sultys) mišiniai buvo sumaišyti santykiu 1:1 ir išpilstyti į vienkartinės plastikines *Petri* lėkšteles (Ø 90 mm) po 10 g, kurie toliau buvo džiovinti ventiliuojamoje kameroje 21±1 °C temperatūroje 48 val.

Išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių su antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčiais priedais paruošimas (IB/CHIT/S/antimikrobinis priedas)

Tiriant antimikrobinį medžiagų įtaką IB plėvelių antimikrobinėms savybėms, buvo naudotos 2.4 lentelėje pateiktos antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčios medžiagos.

2.4 lentelė. Įvairių antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių priedų kiekiai plėvelėse

Plėvelės sudėtis	Antimikrobinė medžiaga	Antimikrobinės medžiagos kiekis 100 g tirpale, skirtame plėvelėms gaminti, g
IB/CHIT/S	Chitozanas	0,50
IB/S/propolis	Propolis	1,00
IB/CHIT/S/propolis*		
IB/S/nizinas	Nizinas	0,00625 (2500 IU/g)
IB/CHIT/S/nizinas*		
IB/S/laktatas	Kalcio laktatas	0,50; 1,00
IB/CHIT/S/laktatas*		1,00
IB/S/benzenkarboksir.	Benzenkarboksirūgštis	0,015; 0,03
IB/CHIT/S/benzenkarboksir.*		0,03
IB/S/askorbo	Askorbo rūgštis	0,015; 0,03
IB/CHIT/S/askorbo*		0,03
IB/S/sorbatas	Kalio sorbatas	0,50; 1,00
IB/CHIT/S/sorbatas*		1,00
IB/CHIT(Sva 1:16; 2:15; 3:14)	Organinės rūgštys**	
IB/CHIT(Spa 1:19; 2:18; 3:17)	Organinės rūgštys, antocianinai**	

* – IB/CHIT/S/„antimikrobinis priedas“ plėvelėms chitozanas suteikia antimikrobinę savybę ir veikia sinergistiškai su „antimikrobinio priedo“;

** – organinių rūgščių ir antocianinų kiekiai sulytyse pateikti 2.5 lentelėje.

2.5 lentelė. Svarainių ir spanguolių sulčių cheminė sudėtis

Sultys	Vanduo, g/100 g	Angliavandeniai, g/100 g	Baltymai, g/100 g	Antocianinai, mg/100 g	Organinės rūgštys, mg/100 g		
					Benzenkarboksir.	Askorbo r.	Sorbo r.
Sva	93,53	6,11	0,16	ne	6,71	72,40	2,42
Spa	94,65	5,07	0,16	6,39	45,99	12,53	ne

ne – nerasta

Gaminant IB/CHIT/S plėveles su antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčiais priedais, 1 % IB ir 1 % CHIT tirpalai buvo pagaminti pagal anksčiau aprašytą metodiką. Antimikrobinėmis savybėmis pasižymintys priedai – propolis, nizinas, kalcio laktatas, benzenkarboksirūgštis, askorbo rūgštis, kalio sorbatas – buvo ištirpinti IB tirpale maišant magnetine maišykle. IB su antimikrobinėmis medžiagomis tirpalai ir CHIT tirpalas (IB_{SM}:CHIT_{SM}=1:1) buvo sumaišyti magnetine

maiškykle. Po to į mišinius buvo įmaišyta sorbitolio ($IB_{SM}:S_{SM}=1:1$). Mišiniai buvo išpilstyti į vienkartinės plastikines *Petri* lėkšteles ($\varnothing 90$ mm) po 10 g ir džiovinti ventiliuojamoje kameroje 21 ± 1 °C temperatūroje 48 val.

CHIT, IB/CHIT/S ir IB/CHIT/Sultys plėvelės buvo gamintos pagal anksčiau aprašytus metodus.

2.2.4. Valgomųjų dangų įtakos šviežiams obuoliams tyrimų objektai

Dangų sudėtis

Tyrimė buvo analizuota dviejų sluoksnių danga IB/S | CHIT, t. y. pirmas sluoksniu IB su S dangos ($IB_{SM}:S_{SM}=1:1$), antras sluoksniu CHIT dangos, liejimo būdu suformuotos ant pjaustytų obuolių paviršiaus. IB/S ir CHIT tirpalai, skirti dangoms gaminti, buvo gaminti pagal anksčiau aprašytus metodus.

Šviežių pjaustytų obuolių padengimas dv sluoksne išrūgų baltymų su sorbitoliu ir chitozano danga (IB/S | CHIT)

Šviežių pjaustytų obuolių laikymo sąlygų tyrimui obuoliai buvo nulupti, supjaustyti metaline pjaustykle $10\times 10\times 50$ mm lazdelėmis ir panardinti į 7 % IB/S tirpalą 10 s. Po to jie buvo džiovinti 10 min kambario temperatūroje oro srautu, kurio greitis 20 m/s. Susiformavus pirmajam dangos sluoksniui, obuolių gabalėliai buvo panardinti į 1 % CHIT tirpalą 10 s ir džiovinti 20 min kambario temperatūroje oro srautu. Kontroliniai bandiniai be dangos buvo apdoroti analogiškai, tačiau jie buvo nardinami į distiliuotą vandenį. Paruošti bandiniai buvo laikyti trijose skirtingose sąlygose: (1) kambario aplinkoje 21 ± 2 °C temperatūroje esant natūraliam RH, (2) klimatinėje kameroje (Ing.Climas, Ispanija) 21 ± 1 °C temperatūroje esant 75 % RH, (3) šaldytuve (Metos OY AB, Suomija) 4 ± 1 °C temperatūroje esant natūraliam RH.

Dangos susidarymo ant šviežių pjaustytų obuolių būdai tirti, obuoliai buvo paruošti ir padengti danga analogiškai kaip ir šviežių pjaustytų obuolių laikymo sąlygų tyrimui, tačiau danga buvo džiovinta dviem skirtingais būdais: (1) oro srautu 30 min, (2) 8 kV elektriniame lauke 30 min, t. y. 10 min pirmojo dangos sluoksniu susidarymui ir 20 min antrojo dangos sluoksniu susidarymui. Kontroliniai bandiniai be dangos buvo analogiškai apdoroti oro srautu ir elektriniame lauke. Paruošti bandiniai buvo laikyti 21 ± 1 °C temperatūroje esant 75 % RH.

2.2.5. Valgomųjų plėvelių įtakos mikroskopinio grybo *Penicillium expansum* augimui obuoliuose tyrimų objektai

Plėvelių sudėtis

Tyrimė buvo analizuotos IB/CHIT/Sultys ir CHIT/Sultys plėvelės, kuriomis buvo padengta obuolių modelinė sistema arba viso obuolio paviršius ir nustatytas jų slopinantis poveikis prieš *Penicillium expansum*. Plėvelės buvo gamintos pagal anksčiau aprašytą IB/CHIT/Sultys bei CHIT/Sultys valgomųjų plėvelių gamybos metodą.

2.2.6. Valgomųjų dangų įtakos šviežioms braškėms tyrimų objektai

Dangų sudėtis

Tyrimo buvo analizuotos trys skirtingos sudėties dviejų sluoksnių dangos, liejimo būdu suformuotos ant produktų paviršiaus:

- 1) IB/S | IB/S, t. y. du sluoksniai IB su S (1:1) dangos;
- 2) IB/S | CHIT, t. y. pirmas sluoksnis IB su S (1:1) dangos ir antras sluoksnis CHIT dangos;
- 3) IB/CHIT/S | IB/CHIT/S, t. y. du sluoksniai IB su CHIT bei S (IB:S=1:1) dangos.

IB/S, CHIT ir IB/CHIT/S tirpalai, skirti dangoms gaminti, buvo gaminti pagal anksčiau aprašytus metodus.

Šviežių braškių padengimas dvisluoksnėmis dangomis

Šviežios braškės buvo nuplaautos tekančia minkšto vandens srove ir nudžiovintos 25 °C temperatūroje. Paruoštos braškės buvo nardintos 2 kartus po 10 s į dangą formuojančias dispersijas, pirmą dangos sluoksnį išdžiovinant per 20 min, o antrą – per 40 min. Atitinkamai, kontroliniai bandiniai buvo nardinti į distiliuotą vandenį. Valgomąja danga padengtos braškės buvo laikytos klimatinėje kameroje 20 °C temperatūroje 80 % RH – 6 paras ir 4 °C temperatūroje 80 % RH – 13 parų.

2.2.7. Valgomųjų plėvelių įtakos šviežiai kalakutienai tyrimų objektai

Plėvelių sudėtis

Plėvelių poveikio kalakutienos mikrobiologiniam ir cheminiam (pažymėta *) gedimui tyrime buvo analizuotos tokios sudėties plėvelės su funkciniais priedais:

- 1) IB/S;
- 2) CHIT;
- 3) IB/CHIT/S*;
- 4) IB/CHIT(Sva 1:16)*;
- 5) IB/CHIT(Spa 1:19)*;
- 6) IB/CHIT/S/propolis;
- 7) IB/CHIT/S/nizinas;
- 8) IB/CHIT/S/laktatas*;
- 9) IB/CHIT/S/benzenkarboksirūgštis;
- 10) IB/CHIT/S/askorbo rūgštis;
- 11) IB/CHIT/S/sorbatas;
- 12) Maisto pakavimo plėvelė.

Plėvelės buvo gamintos pagal anksčiau aprašytus IB/S, CHIT, IB/CHIT/S, IB/CHIT/Sultys ir IB/CHIT/S valgomųjų plėvelių su antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčiais priedais gamybos metodus.

Šviežios kalakutienos bandinių padengimas valgomosiomis išrūgų baltymų su chitozanu bei įvairiais funkciniais priedais plėvelėmis

Tyrimams buvo naudota atšildyta kalakutienos krūtinėlės mėsa. Mikrobiologiniam gedimui tirti kalakutiena buvo supjaustyta į 10,00±0,01 g masės

bandinius ir ant bandinių tolygiai buvo paskleista patogeninių bakterijų *Salmonella typhimurium*, *Esheria coli*, *Campylobacter jejuni* suspensijos (100 g mėsos 100 μ l mikroorganizmų suspensijos, kurioje mikroorganizmų koncentracija buvo 10^6 KSV/ml). Mikroorganizmų suspensijos buvo paruoštos pagal 2.2.1 skyriuje aprašytus metodus. Kiekvieno bandinio visas paviršiaus plotas buvo apdengtas skirtingos sudėties valgomosiomis plėvelėmis. Cheminio gedimo tyrimui kalakutiena buvo supjaustyta į 45 ± 5 g masės bandinius, kurių kiekvieno visas paviršiaus plotas buvo apdengtas skirtingos sudėties valgomosiomis plėvelėmis. Kontroliniai bandiniai buvo paruošti analogiškai kaip ir kiti bandiniai, tačiau jie nebuvo padengti valgomosiomis plėvelėmis.

Taip paruošti bandiniai su plėvelėmis ir kontroliniai bandiniai be plėvelės buvo įdėti į vienkartinės plastikines *Petri* lėkšteles mikrobiologiniam gedimui tirti ir į sandariai uždaromas plastikines dėžutes cheminiam gedimui tirti. Bandiniai buvo sandariai uždaryti siekiant išvengti didelio drėgmės praradimo, galinčio daryti įtaką kalakutienos fizikiniams cheminiams ir mikrobiologiniams pokyčiams laikymo metu. Mikrobiologinio gedimo tyrimui bandiniai buvo laikyti tamsoje $+5$ °C bei $+16$ °C temperatūroje 6 paras, nes aukštesnėje nei $7-10$ °C temperatūroje pagreitėja mėsos ir paukštienos cheminio gedimo procesai, fermentinės reakcijos, aktyviai vystosi mikroorganizmai. Cheminio gedimo tyrimui bandiniai buvo laikyti tamsoje $+16$ °C temperatūroje 3 paras.

2.3. Tyrimų metodai

2.3.1. Šilumos ir fermentinio poveikio įtakos pieno baltymams ir išrūgų baltymams bei iš išrūgų baltymų pagamintų plėvelių fizikinėms cheminėms savybėms tyrimų metodai

Lieso pieno baltymų „polimerizacijos“ laipsnis

Pieno baltymų, apdorotų šiluma ir fermentu, „polimerizacijos“ laipsnis (toliau – PL) buvo nustatytas gelio chromatografijos metodu pagal mokslininko (Bönisch, 2004) aprašytą metodą. Tyrimas buvo atliktas su *ÄKTA Basic* (GE Healthcare, Vokietija) gelio chromatografijos sistema, kurioje analizuotas bandinys buvo frakcionuotas per *Superdex 200 HR 10/30* kolonėlę (GE Healthcare, Vokietija) dalelių molekulinės masės mažėjimo tvarka, o dalelių dydis frakcijose buvo identifikuotas 280 nm ilgio šviesos bangos detektoriumi. Bandinys per kolonėlę tekėjo 0,5 ml/min greičiu, judančiąją fazę sudarė 6 M karbamidas, 0,1 M NaCl, 0,1 M Na₂HPO₄ ir 0,1 % Chaps (pH 6,80), bandinio buferį sudarė 6 M karbamidas, 0,1 M NaCl, 0,1 M Na₂HPO₄, 0,1 % Chaps ir 1 % DTT (pH 6,8). DTT yra labai stiprus baltymų disulfidinius ryšius redukuojantis agentas. Paveikus juo tiriamas baltymų sistemas, buvo identifikuotos tik kovalentiniais ryšiais, atsiradusiais dėl TG poveikio, sujungtos baltymų molekulės.

Baltymai buvo išskirstyti į dimerų, trimerų ir didesnių baltymų makromolekulių – „polimerų“ – frakcijas. Baltymų PL procentais buvo apskaičiuotas pagal chromatogramų smailių ploto santykį tarp baltymų „polimerų“ frakcijų ir „polimerų“ bei monomerų frakcijų kartu sudėjus ((1) formulė).

$$PL = \frac{\sum S(\text{dimerai, trimerai, polimerai})}{\sum S(\text{monomerai, dimerai, trimerai, polimerai})} \cdot 100 \quad (1)$$

kur S – smailių plotas.

Išrūgų baltymų tirpalų optinis tankis

Tirpalų OT (arba drumstumo) nustatymas buvo atliktas matuojant IB tirpalų šviesos absorbciją *Varian Cary 3 UV-Vis* spektrofotometru (Mulgrave, Australija) 600 nm ilgio bangomis.

Išrūgų baltymų tirpalų elektroforezė

Baltymų kokybinė analizė buvo atlikta elektroforezės metodu frakcionuojant baltymus natrio dodecilsulfato (SDS) poliakrilamido gelyje (PAGE). Bandiniai buvo ištirpinti 100 mM Tris (tris-(hidroksimetil)-aminometano) buferyje, turinčiame 5 % natrio dodecilsulfato, ir praskiesti iki 0,7 mg/mL koncentracijos su LDS buferiu; bandiniai redukuojančiomis sąlygomis buvo paruošti praskiedžiant su LDS buferiu, turinčiu DTT. Paruošti elektroforezės bandiniai buvo centrifuguoti 15 s 13400 rpm greičiu ir pakaitinti 80 °C temperatūroje 10 min. Ledinio vandens vonioje atvėsinti bandiniai buvo dar kartą centrifuguoti ir patalpinti į *NuPAGE 4–12 % Bis-Tris* elektroforezės mini gelio (Invitrogen, Kalifornija, JAV) šulinėlius (5 µg). Elektroforezė buvo vykdyta naudojant *XCell II Mini-Cell* (Novex, Kalifornija, JAV)

sistemą, užpildytą MOPS SDS buferiniu tirpalu, esant 200 V įtampai 55 min iki kol dažo linija pasiekia frakcionuojančio gelio apačią.

Gelis buvo nudažytas 0,1 % *Coomassie R-250* poliakrilamido gelio dažu (2 % konc. fosforo r., 15 % amonio sulfato, 17 % etanolio, 0,1 % *Coomassie* briliantinio mėlio) 25 °C temperatūroje nuolat purtant 12 val. Po nudažymo gelis buvo blukintas ultrafiltruotame vandenyje 1–1,5 val. ir nuskenuotas.

Reologinės išrūgų baltymų tirpalų savybės

IB tirpalų takumo savybės buvo nustatytos matuojant bandinio poslinkio įtempio priklausomybę nuo deformacijos greičio (užrašant bandinio tekėjimo kreives). Matavimai buvo atlikti *Anton Paar Physica MCR 301* (Austrija) reometru naudojant cilindras-kūgis geometrinę sistemą (kūgio skersmuo – 50 mm, kampas – 2°, mėginio storis – 0,207 mm) ir joje palaikant 25 °C temperatūrą. Deformacijos greitis buvo didintas nuo 0 iki 500 1/s per 5 min.

IB tirpalų dinaminės klampos kitimas denatūracijos proceso metu buvo matuotas *Anton Paar Physica MCR 301* reometro cilindro ir mentinės maišyklės geometrinėje sistemoje. Tyrimo metu buvo vykdomas IB sistemos šiluminis apdorojimas keliant temperatūrą nuo 25 °C iki 90 °C ir išlaikant joje 15 min, po to mažinant temperatūrą nuo 90 °C iki 25 °C ir tuo pačiu metu maišant sistemą 160 1/min greičiu.

Išrūgų baltymų molekulių morfologija

Šiluma ir fermentu apdorotų IB tirpalo (be funkcinų priedų) sluoksnis buvo suformuotas ant Si kristalo paviršiaus, kurio plotas 2500 μm², pamerkus jį į IB tirpalą ir išdžiovinus susidariusį ploną tirpalo sluoksnį ventiliuojamoje kameroje 21±1 °C temperatūroje. Susiformavęs IB molekulių sluoksnis buvo skenuotas atominės jėgos mikroskopu (toliau – AJM) *Multimode 8 SPM* (Bruker Corporation, JAV) su *Nanoscope 5* (Veeco, JAV) valdikliu, bandinio reljefą skenuojant silicio nitrido smaigaliu su gembine spyruokle. Buvo užfiksuotas trimatis bandinio reljefo vaizdas smaigaliui judant visų trijų koordinačių (x, y ir z) kryptimis. AJM aukščio vaizdas parodo reljefo gylį, AJM amplitudės vaizdas, gaunamas registruojant smaigalio virpesių amplitudės kitimą, parodo reljefo briaunas (aštrias vietas), o AJM fazių vaizdas, gaunamas registruojant fazių poslinkį, parodo paviršiaus zonas, kurios skiriasi savo tamprumu, tačiau nėra susijęs su bandinio reljefu.

Plėvelių deguonies pralaidumas

Plėvelių DP matavimai buvo atlikti pagal standartizuotą metodą ASTM F2622-08 prietaisu *Lysy OPT-5000* (PBI-Dansensor, Danija). Skritulio formos 42 cm² plėvelės mėginys buvo įdėtas į prietaiso kamerą, kurioje palaikoma 23 °C temperatūra, 101325 Pa atmosferos slėgis ir 50 % RH. Buvo naudotos >99,999 % švarumo deguonies ir azoto dujos. Prieš pradėdant DP matavimą kiekvienas mėginys buvo išlaikytas 23 °C temperatūroje esant 50 % RH mažiausiai 15 val, po to DP matuotas 60 min, pakartojant matavimą mažiausiai 5 kartus. Sistemos kalibravimui buvo naudota 25 μm storio PET standartinė plėvelė.

Plėvelių vandens garų pralaidumas

Plėvelių VGP buvo matuotas gravimetriniu metodu, aprašytu mokslininkų (Aydt, Weller ir Testin, 1991), atlikus keletą pakeitimų. Tam buvo naudotos 30 mm gylio ir 60 mm skersmens apvalios stiklinės su 10 g distiliuoto vandens. Stiklinės su vandeniu buvo sandariai uždengtos plėvelėmis ir laikytos termostate 21 ± 1 °C temperatūroje 24 val. Stiklinių svorio pokytis laikymo metu atitiko išgaravusio per plėvelės vandens masės pokytį. VGP buvo išreikštas vandens mase g, išgaravusia per 1 cm² plėvelės plotą per 24 val. veikiant vidutiniam atmosferos slėgiui.

Plėvelių mechaninės savybės

Plėvelių mechaninės savybės buvo nustatytos *TA.XTplus* tekstūros analizatoriumi (Stable Micro Systems, Anglija) su 30 kg jėgos cele, naudojant 10 mm skersmens žiedinės atramos su 5 mm skersmens sferiniu darbinium kūnu sistemą. 80×40 mm dydžio bandinys buvo įtvirtintas žiedinėje atramoje ir, darbiniam kūnui judant žemyn statmenai bandinio paviršiaus 1 mm/s greičiu, buvo deformuotas iki sutrūkimo. Analizės metu buvo nustatyta kiekvienos plėvelės sutrūkimo jėga ir išsitempimo atstumas iki sutrūkimo. Gauti duomenys buvo panaudoti plėvelių TS (MPa) ir E (%) skaičiavimams. Matavimams atlikti buvo paimti mažiausiai 5 kiekvienos rūšies plėvelių bandiniai, kurie buvo deformuoti 3 taškuose.

Plėvelių tirpumas

Plėvelės buvo tirpintos 7 paras neredukuojančiomis sąlygomis Tris buferiniame tirpale (pH 6,75) ir redukuojančiomis sąlygomis Tris buferiniame tirpale (pH 6,75), turinčiame 5 % natrio dodecilsulfato. Be redukuojančio agento visiškai ištirpinti plėvelių nepavyko. Buvo gautos tirpiųjų ir netirpiųjų baltymų frakcijos. Tris buferiniame tirpale ištirpusių baltymų frakcijos elektroforezė (pagal jau aprašytą Baltymų elektroforezės metodą) buvo atlikta baltymus neredukuojančiomis ir redukuojančiomis sąlygomis, o netirpiosios baltymų frakcijos bandinių elektroforezė buvo atlikta tik baltymus redukuojančiomis sąlygomis.

Tris buferiniame tirpale tirpintų plėvelių ištirpusių baltymų kiekis mg/ml buvo nustatytas UV-Vis spektrofotometru *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific, JAV), esant 280 nm bangos ilgiui. Plėvelių tirpiųjų baltymų frakcijos koncentracijos analizės rezultatai parodė, koks kiekis baltymų atsiskyrė nuo plėvelės struktūros.

2.3.2. Funkcinių priedų įtakos valgomųjų plėvelių savybėms tyrimų metodai

Tiriant plastikų ir antimikrobinių komponentų įtaką plėvelių mechaninėms savybėms ir VGP buvo naudoti anksčiau aprašyti metodai.

Plėvelių antimikrobinis poveikis

IB plėvelių su antimikrobiniais komponentais poveikis bakterijoms ir mikroskopiniams grybams buvo nustatytas difuzijos į agarą metodu. Tyrimams naudoti mikroorganizmai bei jiems kultivuoti reikalingos mitybos terpės yra

pateiktos 2.2 lentelėje. Standartinės terpės buvo paruoštos laikantis gamintojų rekomendacijų.

Agarizuota terpė, atvėsinta iki 52 °C temperatūros, buvo sumaišyta su kiekviena mikroorganizmų suspensija atskirai (1 ml/100 ml). Terpė su skirtingais mikroorganizmais buvo išpilstyta po 10 ml į 90 mm skersmens plastikines *Petri* lėkštes. Plėvelių tyrimo atveju, terpei sustingus ant jos paviršiaus, buvo padėti 10x10 mm dydžio skirtingos sudėties plėvelių bandiniai. Tiriamų medžiagų poveikis tiriamoms kultūroms buvo įvertintas pagal skaidrių zonų, susidariusių aplink plėvelių bandinius, skersmenį (mm): *Salmonella* bakterijų kultūroms buvo įvertintas po kultivavimo 24 val. 37 °C; *Esherichia coli* kultūrai – po kultivavimo 4 val. 37 °C ir 18–22 val. 44 °C; *Campylobacter jejuni* kultūrai – po kultivavimo 37 °C 6 val. ir 42 °C 42 val. mikroaerofilinėmis sąlygomis; mikroskopinių grybų ir pieno rūgšties bakterijų kultūroms – po kultivavimo 48 val. 30 °C temperatūroje. Jei skaidri zona nesusidarė aplink plėvelę, tuomet buvo daroma išvada, jog tiriamoji plėvelė neturėjo antimikrobinio poveikio tirtai mikroorganizmų kultūrai.

2.3.3. Valgomųjų dangų įtakos šviežiams obuoliams tyrimų metodai

Spalva

Šviežių pjaustytų obuolių, padengtų valgomąja danga ir be dangos, paviršiaus spalvos pokyčiai buvo nustatyti *Chroma meter CR-410* (Konica Minolta Sensing, Japonija) spalvos intensyvumo matuokliu pagal modifikuotą mokslininkų (McHugh ir Senesi, 2000) metodą. Pagal CIELab spalvų sistemą buvo išmatuotas bandinių šviesumas L*, bandinius padėjus ant juodo paviršiaus.

Mechaninės savybės

Šviežių pjaustytų obuolių, su valgomąja danga ir be jos, paviršiaus mechaninės savybės laikymo metu buvo nustatytos *TA.XTplus* tekstūros analizatoriumi (Stable Micro Systems Ltd, Anglija) su 30 kg jėgos cele, naudojant 2 mm adatos smaigalio darbinį kūną. Šviežių pjaustytų obuolių bandiniai buvo badyti adatos darbinio kūnu, smeigiant jį į bandinį 0,5 mm/s greičiu į 5 mm gylį. Tekstūros analizės metu buvo brėžta (*Texture Exponent* programa) jėgos priklausomybės nuo adatos darbinio kūno smigimo gylio diagrama, kurios aukščiausias taškas rodė didžiausią jėgą (N), kurios reikėjo suardyti (pradurti) bandinio paviršinį sluoksnį ir kuri charakterizavo bandinio paviršinio sluoksnio tvirtumą. Matavimai buvo atlikti mažiausiai 4 kiekvienos rūšies bandiniams, kurie buvo deformuoti 3 taškuose.

Drėgmės kiekis

Danga padengtų pjaustytų obuolių drėgmės kiekis buvo nustatytas gravimetriniu metodu, kaitinant mėginius (su smėliu) 102±2 °C temperatūroje ir nustatant jų masės pokyčius.

Bendras fenolinių junginių kiekis

Šviežių pjaustytų obuolių laikymo metu fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas su *Folin-Ciocalteu* reagentu, remiantis mokslininkų (Slinkard ir Singleton, 1977) metodu ir išreikštas mg galo rūgšties 100 g produkto.

2.3.4. Valgomųjų plėvelių įtakos mikroskopinio grybo *Penicillium expansum* augimui obuoliuose tyrimų metodai

Valgomųjų plėvelių antimikrobinio poveikio obuolių gedimui tyrimai buvo vykdyti modelinėje (obuolių tyrė) ir natūralioje (švieži obuoliai) sistemose.

Plėvelių poveikis *Penicillium expansum* augimui modelinėje sistemoje

Modelinė sistema buvo paruošta iš obuolių tyrės ir agarų terpės pagal modifikuotą mokslininkų (Baert et al., 2007) metodą. Obuoliai buvo nuplauti, nusausinti, nulupti ir sutrinti į tyrę. Obuolių tyrė (100 g) buvo sterilizuota autoklave (Vapormatic, Italija) 45 min 99 °C temperatūroje ir sumaišyta su steriliu agaru (50 ml) (Liofilchem, Italija), kuris buvo paruoštas laikantis gamintojų rekomendacijų. 20 g obuolių tyrės-agarų terpės buvo įpilta į *Petri* lėkštelę, o terpei atvėsus, jos centre buvo užpilta 20 µl sporų tirpalo ir visa terpė apdengta tiriamąja plėvele. Paruošti bandiniai buvo inkubuoti 25 °C temperatūroje. Pradėjus dygti mikroskopiniam grybui, buvo matuotas jo augančių kolonijų skersmuo (mm) bei remiantis (2) formule paskaičiuotas jo augimo greitis (mm/h), o pagal (3) formulę – jo augimo slopinimas (%).

$$v = \frac{d_2 - d_1}{T} \quad (2)$$

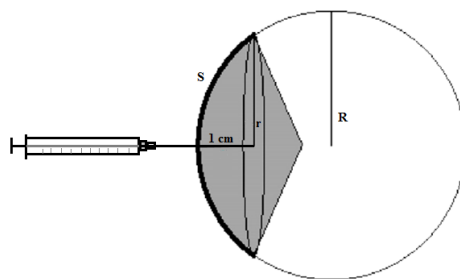
kur v – mikroskopinio grybo augimo greitis, mm/h; d_2 – didesnis mikroskopinio grybo skersmuo, mm; d_1 – mažesnis mikroskopinio grybo skersmuo, mm; T – trukmė, per kurią mikroskopinis grybas paaugo nuo d_1 iki d_2 skersmens, h.

$$I = \frac{d_k - d}{d_k} \times 100 \quad (3)$$

kur I – mikroskopinio grybo augimo slopinimas, %; d_k – kontrolinio bandinio maksimalus mikroskopinio grybo augimo skersmuo, mm; d – bandinio su plėvele maksimalus mikroskopinio grybo augimo skersmuo, mm; 100 – koeficientas, perskaičiavimui į procentus.

Plėvelių poveikis *Penicillium expansum* augimui natūralioje sistemoje

Tyrimas buvo atliktas pagal modifikuotą mokslininkų (Baert et al., 2008) aprašytą metodą. Obuoliai buvo nuplauti, nusausinti ir apipurkšti 70 % etanolio tirpalu. 20 µl mikroskopinio grybo sporų suspensijos buvo išvirkšta chromatografiniu švirkštu (SGE, Australija) į obuolius 1 cm gylyje kaip parodyta 2.4 pav. Mikroskopiniu grybu užkrėsta vieta buvo uždengta tiriamąja valgomąja plėvele. Paruošti bandiniai buvo inkubuoti 25 °C temperatūroje.



2.4 pav. *Penicillium expansum* suspensijos įšvirkštimo į obuolius schema

Mikroskopiniam grybui pradėjus augti, buvo matuotas pažeistos obuolių dalies skersmuo (mm), apskaičiuotas mikroskopinio grybo augimo greitis (mm/h) ir augimo slopinimas (%) remiantis anksčiau pateiktomis (2) ir (3) formulėmis. Mikroskopinio grybo pažeistos obuolių dalies skersmuo buvo apskaičiuotas pagal (4) formulę:

$$S = 2 \times R \times \sin^{-1} \frac{r}{R} \quad (4)$$

kur R – obuolio spindulys, mm; r – mikroskopinio grybo pažeistos obuolių dalies spindulys, mm.

2.3.5. Valgomųjų dangų įtakos šviežioms braškėms tyrimų metodai

Spalva, mechaninės savybės ir fenolinių junginių kiekis

Šviežių braškių spalvos, paviršiaus mechaninių savybių ir fenolinių junginių kiekio kitimas laikymo metu buvo nustatyti metodais, aprašytais 2.3.3 skyriuje, juos šiek tiek pakeitus. Šviežių braškių spalvos tyrimui buvo naudota uogų tyrė, o jų paviršiaus mechaninių savybių tyrimui adatos darbinio kūno smaigalys buvo smeigiamas į bandinius 1 mm/s greičiu į 1 mm gylį.

Masės kitimas

Šviežių braškių masės mažėjimas laikymo metu buvo nustatytas sveriant bandinius 0,0001 g tikslumu. Buvo analizuota po 10 kiekvienos rūšies bandinių.

Antocianinų kiekis

Šviežiose braškėse antocianinų kiekis laikymo metu buvo nustatytas spektrofotometriniu metodu, išekstrahavus šiuos junginius parūgštintu etanolio pagal metodą, aprašytą Jasutienės ir Viškelienės (2006). Ekstraktų šviesos (544 nm bangos ilgis) absorbcija išmatuota *Cintra 202* UV-Vis spektrofotometru (GBC Scientific Equipment, Australija). Antocianinų koncentracija produkte buvo nustatyta pagal cianidin-3-rutinozido kalibravimo kreivę ir išreikšta mg cianidin-3-rutinozidu 100 g produkto.

Askorbo rūgšties kiekis

Šviežių braškių askorbo rūgšties koncentracija laikymo metu buvo nustatyta titruojant su 2,6-dichlorfenolindofenolio natrio druska (Benassi, Antunes, 1988; Marfil, Santos ir Telis, 2008).

2.3.6. Valgomųjų plėvelių įtakos kalakutienai tyrimų metodai

Plėvelių poveikis mikrobiologiniam kalakutienos gedimui

Šviežia kalakutienos krūtinėlės mėsa buvo įsigyta iš gamintojo ir užšaldyta, o prieš tyrimą buvo atšildyta +5 °C temperatūroje. Atšildytos kalakutienos bandiniai buvo supjaustyti po 10,00±0,01 g ir įvynioti į skirtingos sudėties valgomąją arba polietileno plėvelę. Kontrolinis bandinys buvo paruoštas be plėvelės. Bandiniai buvo laikyti +5 °C temperatūroje 6 paras ir periodiškai (po 0, 2, 3, 6 parų) nustatytas bendras mikroorganizmų skaičius juose (LST EN ISO 4833:2003¹).

Plėvelių poveikis patogeninių mikroorganizmų vystymuisi kalakutienoje

Šviežia kalakutienos krūtinėlės mėsa buvo įsigyta iš gamintojo ir užšaldyta, o prieš tyrimą buvo atšildyta +5 °C temperatūroje ir supjaustyta gabalėliais po 10,00±0,01 g. Ant bandinių tolygiai buvo paskleista patogeninių bakterijų *Salmonella typhimurium*, *Esherichia coli*, *Campylobacter jejuni* suspensijos (100 g mėsos 100 µl mikroorganizmų suspensijos, kurioje mikroorganizmų koncentracija buvo 10⁶ KSV/ml) ir kiekvienas bandinys buvo įvyniotas į skirtingos sudėties valgomąją arba polietileno plėvelę. Kontrolinis bandinys buvo paruoštas be plėvelės. Bandiniai buvo laikyti +5 °C (su *S. typhimurium* ir *E. coli*) arba +16 °C temperatūroje (su *S. typhimurium* ir *C. jejuni*) 6 paras ir periodiškai (po 0, 2, 3, 6 parų) nustatytas mikroorganizmų, kuriais buvo užkrėsti, skaičius lėkštelėse ant atrankių terpių, nurodytų 2.2 lentelėje.

Salmonella bakterijų, užaugusių ant kalakutienos, KSV/1g skaičius buvo nustatytas po kultivavimo 24 val. 37 °C temperatūroje; *Esherichia coli* – po kultivavimo 4 val. 37 °C ir 18–22 val. 44 °C temperatūroje; *Campylobacter jejuni* – po kultivavimo 6 val. 37 °C ir 42 val. 42 °C temperatūroje mikroaerofilinėmis sąlygomis.

Drėgmės kiekis

Šviežios kalakutienos be ir su skirtingos sudėties plėvelėmis drėgmės kiekis laikymo metu buvo nustatytas pagal standartą LST ISO 1442:2000². Paruošti bandiniai buvo džiovinti 103 °C temperatūroje iki pastovios masės.

¹ LST EN ISO 4833:2003 „Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis metodas. Kolonijų skaičiavimo 30 °C temperatūroje metodas.“

² LST ISO 1442:2000 „Mėsa ir mėsos produktai. Drėgmės kiekio nustatymas.“

pH

Šviežios kalakutienos be ir su skirtingos sudėties plėvelėmis pH laikymo metu buvo nustatytas pagal standartą LST ISO 2917:2002³, naudojant pH-metrą „Inolab pH 720“ (WTW, Vokietija). Tam buvo ruošta 1:10 vandeninė susmulkinto kalakutienos tiriamojo bandinio ištrauka ją periodiškai maišant 30 min.

Lakiųjų riebalų rūgščių kiekis

Šviežios kalakutienos be ir su skirtingos sudėties plėvelėmis lakiųjų riebalų rūgščių kiekis (toliau – LRR) laikymo metu buvo nustatytas vandens garais distiliuojant 2 % sieros rūgštimi parūgštintą tiriamojo bandinio vandeninę ištrauką. Gautas distiliatas titruotas 0,1 M NaOH tirpalu, indikatoriumi naudojant fenolftaleiną. LRR kiekis išreikštas miligramais NaOH, sunaudotais 100 g mėsos esančioms LRR neutralizuoti. Distiliavimui naudota distiliavimo vandens garais automatinė įranga „S4“ (Berh Labor Technik, Vokietija).

2.3.7. Statistinė analizė

Kiekvienas matavimas buvo kartotas mažiausiai 3 kartus. Rezultatai pateikti kaip mažiausiai 3 kartotinumų vidurkiai su standartiniais kvadratiniais nuokrypiais.

Eksperimentinių duomenų statistinė analizė buvo atlikta *SPSS 9.0* programa, taikant vienfaktorinės dispersinės analizės (ANOVA) metodą. Statistinių hipotezių tikrinimui, priklausomai nuo duomenų kiekio ir verčių dydžio, buvo pasirinkti *Student's t*, *Tykey*, *Dunnett's T3* arba *Dunnett's C* kriterijai ir 0,05 reikšmingumo lygmuo.

³ LST ISO 2917:2002 „Mėsa ir mėsos produktai. pH nustatymas.“

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Sudėties ir gamybos sąlygų įtaka išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių su funkciniais priedais fizikinėms cheminėms ir mikrobiologinėms savybėms

3.1.1. Terminio ir fermentinio apdorojimo įtaka fizikinėms cheminėms išrūgų baltymų tirpalų savybėms

IB plėvelių barjerines ir mechanines savybes nulemia plėvelių mikrostruktūra, kuri susiformuoja cheminio ar fizikinio IB apdorojimo metu. Todėl pirmiausia buvo iširta, kaip IB sistemą paveikia šilumos energija ir papildomų skersinių molekulių ryšių atsiradimas.

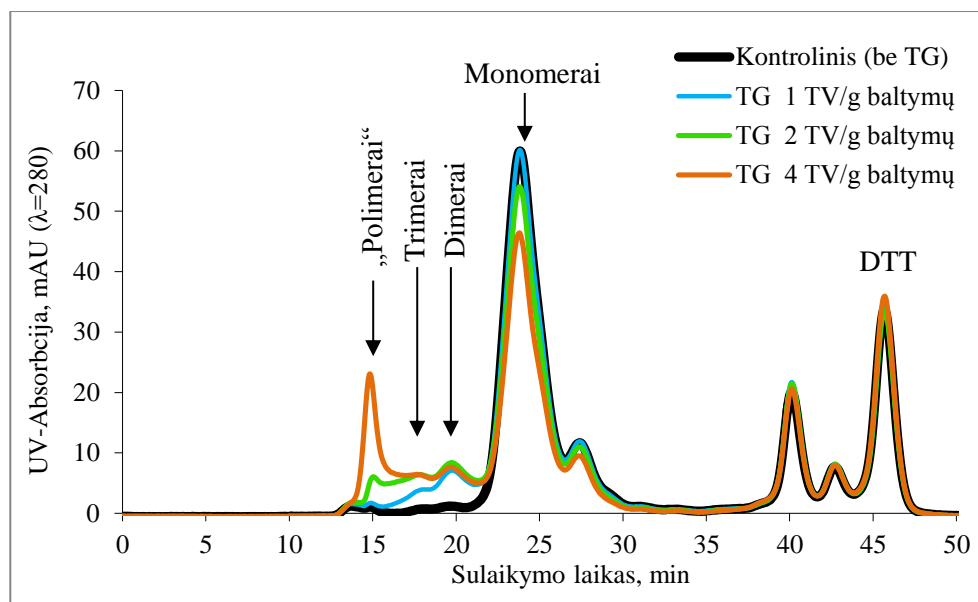
Veikiant šilumos energijai IB keičia savo struktūrą ir savybes. Pirma, pasikeičia baltymų tretinė struktūra – baltymai denatūruoja. Antra, baltymų molekulėms denatūravus atsiveria aktyvios jų grupės, kurios gali sąveikauti su kitomis aktyviomis sistemos grupėmis ir suformuoti papildomais kovalentiniais ir nekovalentiniais ryšiais bei tarpmolekulinėmis sąveikos jėgomis sutvirtintą struktūrą. Ypač svarbų vaidmenį šiame procese atlieka laisvosios tiolo grupės. Jos dalyvauja disulfidinių ryšių pakeitimo reakcijose arba reaguoja su kitomis aktyviomis tiolo grupėmis ir baltymų molekules sujungia stipriais kovalentiniais disulfidiniais ryšiais į didelius agregatus ar agregatų grandines (Purwanti et al., 2011). Priklausomai nuo baltymų koncentracijos sistemoje ir jos terpės sąlygų (pH, joninės jėgos, terpėje esančių jonų rūšies) IB gali jungtis į erdvines struktūras, t. y. „polimerizuotis“ ir suformuoti klampų tirpalą (<8 % baltymų koncentracija sistemoje) arba gelį (≥8 % baltymų koncentracija sistemoje). Yra žinoma, kad IB α -laktalbuminas turi 8 glutamino ir 12 lizino liekanų, o β -laktoglobulinas turi 16 glutamino ir 15 lizino liekanų, kuriose yra labai mažas kiekis laisvųjų tiolo grupių (1.1. lent.), galinčių formuoti disulfidinius ryšius. Be to, IB yra globulinės struktūros, todėl aktyvių grupių prieinamumas labai priklauso nuo jo grandinių išsilankstymo. Siekiant padidinti šių baltymų PL, gali būti naudojamos įvairios fizikinės ar cheminės priemonės, inicijuojančios papildomų tarpmolekulių ir molekulių vidinių ryšių susidarymą. Viena iš jų – TG, transferazių klasės fermentas.

TG katalizuoja baltymų „polimerizacijos“ reakcijas inicijuodama kovalentinių ryšių susidarymą tarp baltymo glutamino ir lizino liekanų arba tarp baltymo glutamino liekanos ir pirminių aminių. Be šių skersinių ryšių baltymuose susidarymo inisijavimo, TG gali vykdyti ir deaminavimo reakcijas, tačiau tik tuo atveju, kai sistemoje nėra pirminių aminių.

Literatūroje skelbiami prieštaringi duomenys apie IB „polimerizavimą“ panaudojant TG. Kai kurių autorių duomenimis IB grandinėje $-NH_2$ grupės lengviau prieinamos fermentui, kai aktyvios tiolo grupės yra blokuotos denatūravus baltymus (Eissa, Khan, 2005; Gauche, Barreto ir Bordignon-Luiz, 2010). Kiti autoriai įrodė IB „polimerizaciją“ veikiant TG, be išankstinės baltymų denatūracijos arba $-SH$ grupės redukuojančių medžiagų panaudojimo (Agyare, Damodaran, 2010). Literatūros duomenų interpretavimą ir palyginimą sunkina skirtingos aprašytų eksperimentų atlikimo sąlygos, ypač naudojamos skirtingos IB tirpalų koncentracijos, fermento kiekiai. Todėl prieš nagrinėdami TG įtaką IB plėvelių savybėms siekta išsiaiškinti:

- 1) kokia TG kiekio ir jo veikimo temperatūros įtaka pieno baltymų PL;
- 2) kokie fizikiniai cheminiai pokyčiai vyksta plėvelių liejimui skirtame IB tirpale, apdorotame TG, priklausomai nuo fermento įdėjimo sąlygų ir pradinio IB tirpalo apdorojimo šiluma.

Ieškant atsakymo į pirmąjį klausimą šilumos energija ir fermentu TG paveiktų pieno baltymų PL nustatyti, pasterizuotas (80 °C temperatūroje 2 min) liesas pienas (3,4 % baltymų) buvo išlaikytas su 1, 2, 4 TV/g baltymų fermento 40 °C bei 50 °C temperatūroje. 20, 30, 60 min. Po fermento inaktyvavimo (80 °C temperatūroje 2 min) mėginiai buvo liofilizuoti ir išanalizuoti gelio chromatografijos metodu. 3.1 pav. yra pateikta chromatograma, kurios kairėje pusėje yra matomos didelės molekulinės masės molekulių frakcijų smailės (tarp 12 ir 22 min). Matyti, jog didėjant fermento kiekiui tiriamoje baltymų sistemoje, susidarė didesnis kiekis di-, tri- ir „polimerų“. Priešingai, monomerinių baltymų dalelių atitinkamai mažėjo. Tokią pačią tendenciją nustatė ir kiti mokslininkai, analizavę transglutaminazės poveikį pieno baltymams (Guyot ir Kulozik, 2011).



3.1 pav. Transglutaminazės įtaka pieno baltymų „polimerizacijos“ laipsniui: liesas pienas buvo išlaikytas be ir su transglutaminaze (1–4 TV/g baltymų) 40°C temperatūroje 60 min

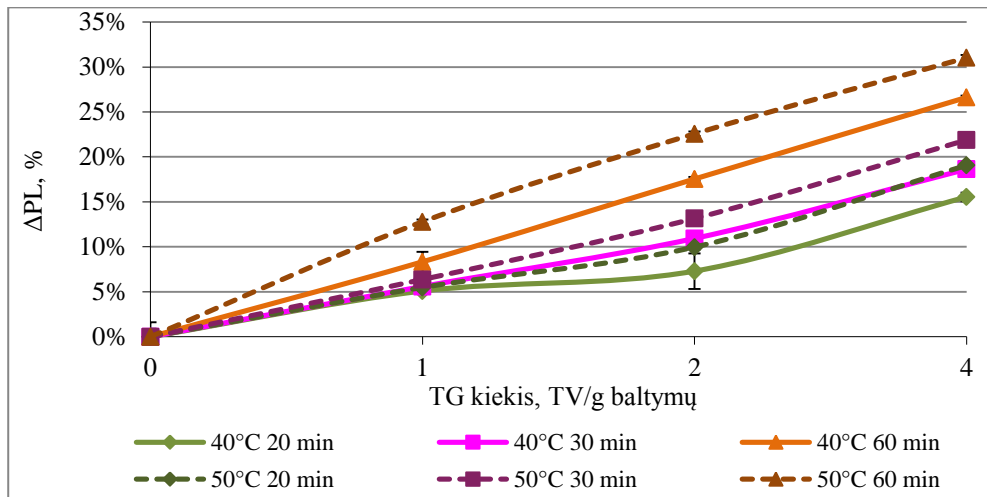
Toliau buvo apskaičiuotas baltymų PL skirtumas, ΔPL (%), pagal (5) formulę:

$$\Delta PL = PL_{TG} - PL_0 \quad (5)$$

kur PL_0 – kontrolinio bandinio be fermento „polimerizacijos“ laipsnis (%); PL_{TG} – bandinio su TG fermentu „polimerizacijos“ laipsnis (%).

3.2 paveiksle pavaizduota di-, tri- ir „polimerų“ kiekio priklausomybė nuo fermento kiekio, sistemos terminio apdorojimo temperatūros ir laiko. Matomas

tolygus PL skirtumo didėjimas didėjant visiems parametrams. Akivaizdu, jog fermentui veikiant ilgesnį laiką, baltymų sistemoje susiformuoja didesnis kiekis kovalentinių ϵ -(γ -glutamil)lizino ryšių, o esant 50 °C temperatūrai procesas vyksta greičiau nei esant 40 °C temperatūrai, todėl daugiausia di-, tri- ir „polimerų“ susiformavo baltymų sistemą paveikus 4 TV/g baltymų fermento 50 °C temperatūroje 60 min.



3.2 pav. Lieso pieno baltymų „polimerizacijos“ laipsnio priklausomybė nuo apdorojimo transglutaminaze

3.1 lentelėje pateikti skaičiavimų rezultatai rodo, jog baltymų sistemą išlaikius 40 °C 60 min su 1 TV/g balt. TG, susijungė 8 % daugiau baltymų, o su 4 TV/g balt. TG susijungė beveik 27 % daugiau baltymų lyginant su baltymų sistema, paveikta tik šilumos energija.

3.1 lentelė. Transglutaminazės įtaka (40 °C 60 min) lieso pieno baltymų „polimerizacijos“ laipsniui

TG kiekis bandinyje, TV/g baltymų	PL _{TG}	ΔPL
	%	%
0	6,03±0,53 ^D	0,00 ^D
1	14,37±1,10 ^C	8,34 ^C
2	23,58±0,21 ^B	17,55 ^B
4	32,65±0,18 ^A	26,62 ^A

A, B, C, D – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$; Tukey).

Įvertinus gautus rezultatus, tolesniuose tyrimuose naudotos pieno baltymų apdorojimo TG sąlygos, kuriose baltymų makromolekulių formavimasis 40 °C temperatūroje vyko intensyviausiai, t. y. 4 TV/1 g baltymų, išlaikant 60 ir daugiau min.

Siekiant nustatyti TG poveikį fizikinėms cheminėms IB tirpalo savybėms, buvo tirti skirtingomis sąlygomis apdoroti IB tirpalai:

- 1) tik skirtingu terminiu režimu apdoroti IB tirpalai (mėginiai Nr. 1, 2, 3);
- 2) tik TG apdoroti IB tirpalai (mėginiai Nr. 4, 5);
- 3) termiškai apdoroti ir TG paveikti IB tirpalai (mėginys Nr. 6).

IB tirpalų paruošimo sąlygos pateiktos 2.2.2. poskyryje. Fizikiniai cheminiai IB tirpalų pokyčiai vertinti matuojant jų optinį tankį, reologines savybes, juose susidariusių baltymų makromolekulių masę bei jų mikroskopinius vaizdus.

Šilumos ir fermento įtaka išrūgų baltymų tirpalų optiniam tankiui

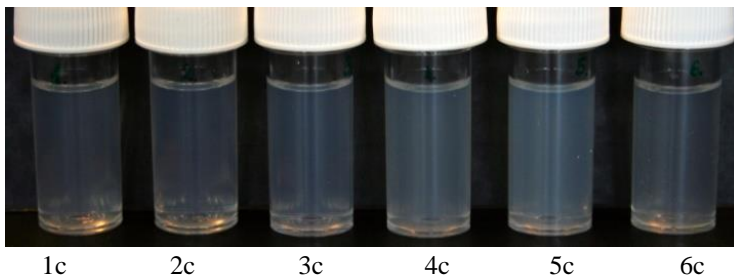
Globuliniai IB veikiami šilumos denatūruojasi, t. y. dėl šilumos energijos inicijuotų makromolekulių konformacinių kitimų keičiasi jų tretinė struktūra, globulės išsivynioja ir įgauna ne tokią tvarkingą struktūrą. Be to, į paviršių atsivėrusios laisvosios tiolo grupės jungiasi, formuodamos disulfidinius ryšius ir globulės agreguojasi į di-, tri-, „polimerus“. Priklausomai nuo pH, joninės jėgos ir temperatūros, agregatai gali būti nedideli ir tirpūs vandenyje arba gali suformuoti tankų baltymų tinklą – gelį (Ryan et al., 2012). Atlikti tyrimai parodė, kad 7 % koncentracijos IB tirpalai, pH 6,75, apdoroti šiluma keičia optinį tankį dėl baltymų molekulių denatūravimosi ir nedidelių bei iš dalies tirpiųjų agregatų susidarymo. Baltymų gelis minėtomis sąlygomis nesusidaro – tai patvirtino ir reologinių tyrimų rezultatai.

Skirtingu terminiu režimu apdoroti IB tirpalai (3.3 pav.) po galutinio terminio apdorojimo etapo (c) buvo nežymiai susidrumstę (1, 2, 3), jų optinis tankis pakito nuo $OT_{Ipr} = 0,033$ (termiškai neapdorotų natyvių IB tirpalas, *Ipr*) iki $OT_{1c,2c,3c} = 0,08$ (3.2 lent.).

40 °C temperatūroje 300 min išlaikymo procesas (b), kurio metu prasideda IB konformaciniai pokyčiai (daugiausia α -laktoalbumino), galutiniam rezultatui didelės įtakos nepadarė. O IB terminis apdorojimas 90 °C temperatūroje 1 s (3a) OT vertę padvigubino iki 0,069. Tai reiškia, jog aukštoje temperatūroje per trumpą laiką tiriamoje sistemoje įvyko didesnio masto IB konformaciniai pokyčiai nei per ilgą laiką žemesnėje temperatūroje. Nepaisant to, po denatūracijos 90 °C temperatūroje 1 s, mėginį 3 išlaikius 40 °C temperatūroje 300 min (3b), jo OT padidėjo nežymiai, kaip ir mėginio 2 atveju. Tai rodo, jog sistema po denatūracijos 90 °C temperatūroje 1 s nėra visiškai stabilizuota ir veikiant šilumai (40 °C) įvyksta baltymų molekulių struktūriniai pokyčiai, molekulės išsivynioja ir/arba agreguojasi.

Įdėjus į baltymų sistemą TG, kuri formuoja kovalentinius ryšius tarp baltymo aminorūgščių glutamino ir lizino liekanų, priklausomai nuo aplinkos sąlygų sistemoje suformuojami didelės molekulinės masės baltymų junginiai, kurie turi įtakos tirpalo fizikinėms cheminėms bei funkcinėms savybėms. Nors pats fermento preparatas (9 ir 10) yra gelsvos spalvos ir vandeninis jo tirpalas turi 0,223 optinį tankį, tačiau jo vykdomų baltymų „polimerizavimo“ reakcijų rezultatas atsispindi ir šių tirpalų OT pokyčiuose (4, 5, 6). Mėginys 4, įdėjus į jį 4 TV/g baltymų fermento, buvo iš karto termiškai apdorotas ir tokiu būdu fermentas jame buvo inaktyvuotas. Padidėjęs šio mėginio OT nuo 0,226 iki 0,271 vertės bei vizualiai matomas drumstumas (3.3 pav.) gali būti aiškinamas tuo, kad fermentas spėjo suformuoti tik

mažą kiekį didelės molekulinės masės baltymų, sujungdamas vien tik baltymų molekulių paviršiuje esančius aktyvius centrus, dėl to padidėjo bendras baltymų sistemos tinkamumo laipsnis ir kartu optinio tankio vertė bei drumstumas.



3.3 pav. Terminio (mėg. 1c, 2c, 3c) ir fermentinio (mėg. 4c, 5c, 6c) išrūgų baltymų apdorojimo įtaka tirpalų optiniam tankiui: 1c – 7 % IB tirpalas-90°C 15min; 2c – 7 % IB-40°C 300 min-90°C 15min; 3c – 7 % IB-90°C 1s-40°C 300 min-90°C 15min; 4c – 7 % IB+4 TV/g baltymų TG-90°C 15min; 5c – 7 % IB+4 TV/g baltymų TG-40°C 300 min-90°C 15min; 6c – 7 % IB-90°C 1s+4 TV/g baltymų TG-40°C 300 min-90°C 15min

3.2 lentelė. Terminio ir fermentinio išrūgų baltymų tirpalų apdorojimo įtaka jų optiniam tankiui

Nr.	Tirpalas	Optinis tankis				
		Pradinis (pr)	Po 90 °C 1s (a)	Įdėjus TG (4 TV/g balt.) (d)	Po 40 °C 300 min (b)	Po 90 °C 15 min (c)
1.	7 % IB	0,033 ±0,001 ^a	-	-	-	0,081±0,001 ^b
2.	7 % IB	0,033 ±0,001 ^a	-	-	0,037±0,001 ^b	0,079±0,001 ^c
3.	7 % IB	0,033 ±0,001 ^a	0,069±0,001 ^b	-	0,077±0,001 ^c	0,081±0,001 ^d
4.	7 % IB	0,033 ±0,001 ^a	-	0,226±0,001 ^b	-	0,271±0,001 ^c
5.	7 % IB	0,033 ±0,001 ^a	-	0,226±0,001 ^b	0,224±0,001 ^c	0,258±0,001 ^d
6.	7 % IB	0,033 ±0,001 ^a	0,069 ±0,001 ^b	0,245±0,005 ^c	0,236±0,002 ^d	0,242±0,001 ^{cd}
7.	7 % IB	0,033 ±0,001 ^a	-	-	-	-
8.	7 % IB	0,033 ±0,001 ^a	-	0,226±0,001 ^b	-	-
9.	Vanduo	0,0000	-	0,223±0,001 ^a	-	-
10.	Vanduo	0,0000	-	0,223±0,001 ^a	-	0,228±0,002 ^a

^{a, b, c, d} – eilutėse skirtingomis mažosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$; Tukey).

Mėginių 5 ir 6 atvejais fermentas veikė ilgą laiką jo aktyvumui palankiausiomis sąlygomis, tik mėginio 6 baltymai buvo iš anksto denatūruoti, siekiant globulinę jų struktūrą išvynioti ir atverti molekulių viduje esančias baltymų aminorūgščių glutamino ir lizino liekanas, taip paruošiant sistemą aktyvesniam fermento veikimui. Galutinis rezultatas po baltymų denatūracijos (5c ir 6c) rodo, jog baltymų „polimerizacijos“ procesas vyko šiek tiek skirtingai. Mėginio 6 atveju fermentas suveikė iš karto jį įdėjus į sistemą, nes OT padidėjo iki 0,245 ir išliko

nepakitęs net po galutinės denatūracijos (6c). Mokslininkai (Gauche, Barreto ir Bordignon-Luiz, 2010), atlikę tyrimus su 10 % IB tirpalu, apdorotu labai dideliu kiekiu TG (50 TV/g baltymų), taip pat nustatė, jog TG veikiant ilgesniam laikui (24 val. lyginant su 4 val.), IB tirpalų drumstumas statistiškai reikšmingai didėja dėl didelės molekulinės masės junginių susidarymo. Tačiau jie teigia, jog IB turėjo būti paveikti šiluma ar kitu būdu denatūruoti prieš fermento veikimą, kad būtų pasiektas didžiausias disulfidinių ryšių susidarymo laipsnis.

Tyrimas parodė, jog mėginio 5 atveju didžiausias pokytis įvyko galutinio terminio apdoravimo metu. Pastarąjį rezultatą galima aiškinti tuo, kad 40 °C temperatūroje veikdamas fermentas turėjo pakankamai laiko suformuoti ryšius tarp baltymų molekulių išorėje esančių glutamino ir lizino liekanų aktyvių grupių. Įvykę molekulių struktūros pokyčiai galėjo daryti įtaką laisvųjų tiolo grupių atsivėrimui, dėl to denatūracijos metu galėjo būti suformuota daugiau disulfidinių ryšių ir didesnis kiekis „polimerų“, kurie padidino mėginio OT lyginant su visais kitais mėginiais.

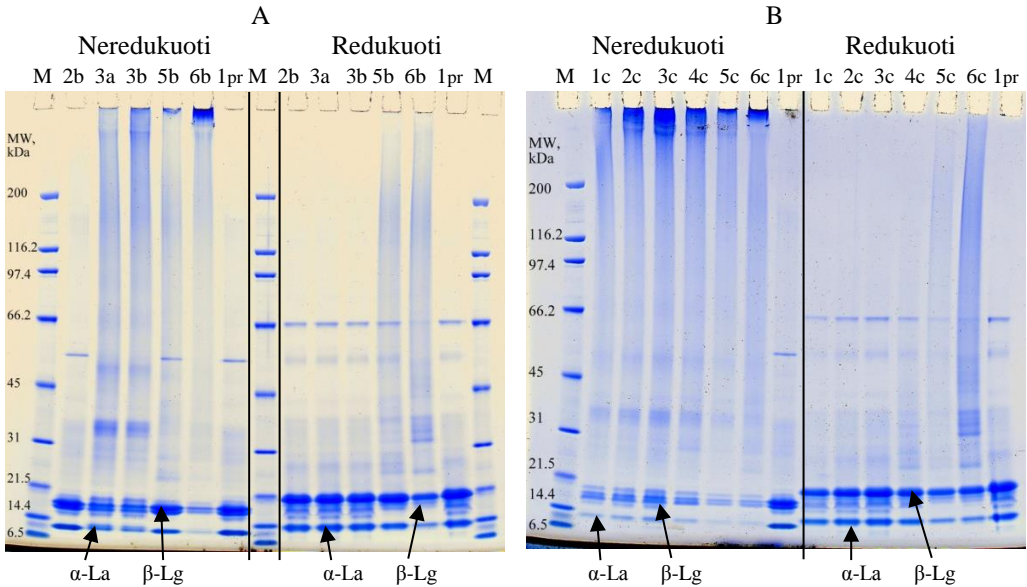
Šilumos ir fermento įtaka išrūgų baltymų makromolekulių masei

Veikiant šilumai ir TG fermentui IB jungiasi tarpusavyje, formuodami didelės molekulinės masės junginius. Šių makromolekulių masė buvo iširta elektroforezės metodu. 3.4 pav. A ir B pateiktuose elektroforezės geliuose išskirstyti baltymai buvo neredukuoti (kairėje) ir redukuoti (dešinėje) tam, kad būtų galima nustatyti TG įtaką baltymų molekulėms. Baltymų redukcijai buvo naudotas stiprus redukcinis agentas DTT, kuris redukuoja disulfidines jungtis. Dėl tokio šio reagento poveikio, analizuotose baltymų sistemose disulfidiniai ryšiai buvo suardyti, todėl buvo identifikuotos tik skersiniais kovalentiniais ryšiais, atsiradusiais dėl fermento poveikio, sujungtos baltymų molekulės.

Baltymų elektroforezės rezultatai patvirtina baltymų tirpalų OT rezultatus. Analizuojant gelį A matyti, kad IB išlaikymas 40 °C temperatūroje 300 min nepadaro didelės įtakos molekulių masei lyginant mėginio 2b takelį su kontrolinio mėginio 1pr takeliu, kuriame yra išskirstyti natyvūs IB. Tačiau IB terminio apdoravimo 90 °C temperatūroje 1 s metu susiformuoja įvairaus molekulinio dydžio baltymų agregatai. Tai parodo mėlyna juosta, susiformavusi išilgai 3a takelio (kuris atitinka ir 6a bandinį), išsiskirstant įvairios molekulinės masės molekulėms.

Panašus vaizdas yra ir 3b takelyje, t. y. po sistemos išlaikymo 40 °C temperatūroje 300 min, nors šiek tiek paryškėja išilginė takelio juosta bei jos viršus, kas parodo ten pasilikusius didelės molekulinės masės junginius, nepatekusius į gelį. Redukuotų baltymų gelis (A dešinė) parodo, jog IB agregatai buvo suardyti DTT, vadinasi juose vyravo disulfidiniai ryšiai, susiformuojantys IB terminio apdoravimo metu. Įdėjus į sistemą fermento, vaizdas kiek pasikeičia. Terminio apdoravimo metu susiformavusių agregatų nesuardė redukuojantis agentas, nes ten susiformavę kovalentiniai skersiniai ryšiai išliko stabilūs ir išlaikė naujų darinių struktūrą. Įdomu tai, kad tiek 5b, tiek 6b atvejais yra susiformavusių didelės molekulinės masės molekulių, nors 5b takelyje dar matoma juosta ties 50 kDa riba, kuri parodo, jog dalis baltymų sistemoje išliko nepakitę. Gelyje B (kairėje) matomas galutinio terminio apdoravimo poveikis baltymų molekulėms. Akivaizdu, jog baltymų

agregatai susiformavo labai dideli, o jų molekulinė masė buvo didesnė už 200 kDa. Tuo metu redukuoti bandiniai (dešinėje) rodo, jog TG stipriai paveikė mėginį 6c lyginant su kontroliniu mėginiu 1pr. Mėginyje 5c TG taip pat inicijavo didelės molekulinės masės molekulių susidarymą, nes gelio 5c takelyje matoma išilginė juosta >100 kDa srityje.

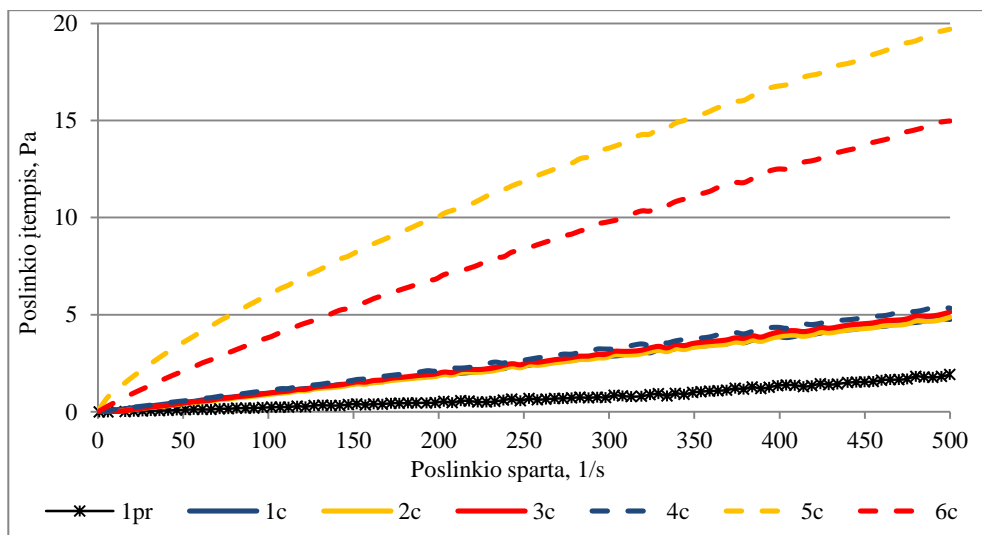


3.4 pav. Terminio (mėg. 1, 2, 3) ir fermentinio (mėg. 4, 5, 6) išrūgų baltymų tirpalo apdorojimo įtaka baltymų molekulinei masei. *A* – išrūgų baltymų molekulinė masė po atskirų terminio ir fermentinio apdorojimo etapų (*a* – po šildymo 90 °C temperatūroje 1 s, *b* – po išlaikymo 40 °C temperatūroje 300 min); *B* – išrūgų baltymų molekulinė masė po galutinio terminio apdorojimo (*c* – po šildymo 90 °C temperatūroje 15 min). *1pr* – IB izoliato natyvūs baltymai. *M* – standartinių baltymų mišinys (6,5–200 kDa). *MW* – molekulinė baltymų masė

Ryškos juostos, matomos gelių apačioje, yra α -laktoalbumino (α -La) (14,2 kDa) ir β -laktoglobulino (β -Lg) (18,4 kDa) frakcijos. Fermentinės IB baltymų „polimerizacijos“ metu tiek α -La, tiek β -Lg frakcijų juostų ryškumas keičiasi priklausomai nuo sistemos apdorojimo sąlygų. Akivaizdžiai sumažėjęs α -La juostos ryškumas (6b, 5c, 6c bandiniuose) rodo, kad α -La aktyviau dalyvavo IB „polimerizacijos“ reakcijose nei β -Lg. Tai patvirtina ir kitų tyrėjų eksperimentų rezultatai, kuriuose teigiama, kad α -La yra geresnis substratas TG katalizuojamose reakcijose nei β -Lg (Agyare, Damodaran, 2013).

Šilumos ir fermento įtaka išrūgų baltymų reologinėms savybėms

Išvadas apie IB „polimerizaciją“ veikiant TG patvirtina ir IB tirpalų reologinių savybių tyrimo rezultatai. 7 % IB tirpalo, apdoroto šiluma ir fermentu, tekėjimo kreivės pavaizduotos 3.5 paveiksle.



3.5 pav. Išrūgų baltymų tirpalo, apdoroto šiluma ir fermentu, tekėjimo kreivės

Lyginant tik šiluma apdorotų IB tirpalų (*1c*, *2c*, *3c*) tekėjimo kreives su natyviųjų IB tirpalo (*1pr*) kreive matyti, kad šiluma apdorotų IB tirpalų klampa buvo didesnė. Tačiau skirtingi šilumos režimai didelės įtakos IB tirpalų reologinėms charakteristikoms nepadarė. Remiantis ankstesniais tyrimais tokį rezultatą galima paaiškinti tuo, kad visais atvejais baltymų struktūriniai pokyčiai įvyko dėl disulfidinių ryšių susidarymo ir panašios molekulinės masės IB agregatų susiformavimo.

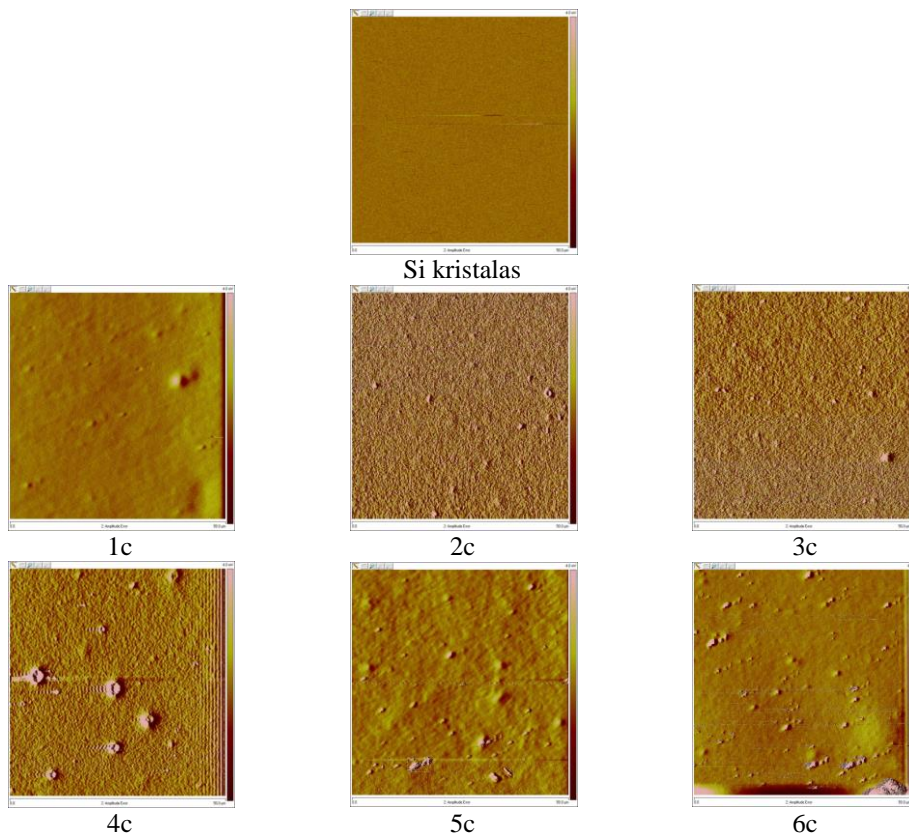
TG apdoroti IB tirpalai, kurie buvo išlaikyti su fermentu 40 °C temperatūroje 300 min (*5c* ir *6c*), pasižymėjo pseudoplastiniu elgesiu ir daug didesne klampa, palyginti su IB tirpalais, kurie buvo apdoroti tik šiluma (*2c*, *3c*) ar fermentu be išlaikymo 40 °C temperatūroje 300 min (*4c*). Manoma, jog tokie IB tirpalų klamos pokyčiai buvo gauti dėl baltymų „polimerizacijos“ veikiant TG. Šiuos rezultatus patvirtina ir kitų autorių darbuose skelbiama informacija apie denatūrotų ir TG paveiktų baltymų tirpalų didesnę dinaminę klampą nei TG neapdorotų baltymų tirpalų klampą (Gauche, Barreto ir Bordignon-Luiz, 2010; Wang, Zhong ir Hu, 2013). Tačiau skirtingai nei buvo tikėtasi, nustatyta, jog didesne klampa pasižymėjo IB tirpalas (*5c*), kuriame baltymai fermentu buvo paveikti be išankstinės denatūracijos.

Siekiant nustatyti, kaip IB tirpalų klampa keitėsi galutinės jų denatūracijos metu, buvo ištirta dinaminė šių IB tirpalų klampa jų terminio apdorojimo metu šildant sistemas iki 90 °C temperatūros, išlaikant šioje temperatūroje 15 min ir po to atvėsinant (galutinis IB tirpalų paruošimo etapas prieš plėvelių gamybą). IB tirpalų dinaminės klamos kreivės pateiktos 3.6 pav.

5 bandinyje buvo palankiausios sąlygos disulfidiniams ryšiams susidaryti lyginant su kitais bandiniais ir didelės molekulinės masės IB makromolekulėms susiformuoti.

Šilumos ir fermento įtaka išrūgų baltymų makromolekulių dydžiui

AJM nuotraukos 3.7 paveiksle iliustruoja IB makromolekulių, susiformavusių veikiant šilumai ir TG, dispersiškumą. IB tirpalai buvo išlieti ant labai lygaus Si kristalo paviršiaus, išdžiovinti ir skenuoti AJM.



3.7 pav. Šiluma ir fermentu apdorotų išrūgų baltymų tirpalų dalelių dydžio mikroskopinis vaizdas ant Si kristalo paviršiaus (nuskenuoto vaizdo dydis 50x50 μm)

Mėginiai *1c*, *2c*, *3c*, paveikti tik šiluma, skiriasi savo paviršiaus grublėtumu ir dalelių dydžiu nuo mėginių *4c*, *5c*, *6c*, kuriuose TG paveikti baltymai „polimerizavosi“ ir suformavo didelės molekulinės masės baltymų daleles, matomas nuotraukose. Lyginant bandinius *5c* ir *6c*, bandinyje *5c* matosi mažesnė dalelių dydžių įvairovė, patvirtinanti elektroforezės ir reologinių savybių tyrimų rezultatus, nes mažiau dispersiškos arba monodispersinės sistemos yra klampesnės nei polidispersinės sistemos, kuriose dalelių dydis yra įvairus (Barthelmes, Pratsinis ir Buggisch, 2003).

Išanalizavus tyrimų duomenis galima daryti išvadą, jog tiek terminis, tiek fermentinis poveikis modifikavo IB, dėl to keitėsi baltymų molekulių struktūra ir jų aktyvumas. Tačiau TG apdoroti IB tirpalai pasižymėjo pseudoplastiniu elgesiu ir didesne klampa, didesniu optiniu tankiu bei dispersiškumu nei IB tirpalai, apdoroti tik šiluma. TG inicijavo skersinių ryšių tarp baltymų molekulių susidarymą ir, priklausomai nuo IB sistemos terminio paruošimo TG veikimui, suformavo įvairaus dydžio molekulinės masės junginius. IB terminis apdorojimas (pašildymas iki 90 °C temperatūros ir staigus atvėsinimas) prieš fermento įdėjimą į sistemą paskatino baltymų „polimerizaciją“. Tačiau ir be išankstinio IB terminio apdorojimo analizuotoje sistemoje (Nr. 5) susidarė didelės molekulinės masės baltymų junginiai.

3.1.2. Šiluma ir fermentu apdorotų išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių barjerinės, mechaninės savybės ir tirpumas

Išrūgų baltymų plėvelių deguonies pralaidumas

Valgomųjų plėvelių ir dangų barjerinėms ir mechaninėms savybėms didžiausią įtaką padaro jų struktūrinių komponentų cheminė sudėtis (McHugh, Krochta, 1994). Iš mokslinės literatūros žinoma, jog baltymų plėvelių DP yra labai mažas (Krochta, 2002). Kaip šių IB plėvelių barjerinę savybę gali pakeisti baltymus modifikuojantis šilumos ir TG poveikis, parodo 3.3 lentelėje pateiktos plėvelių DP rodiklio vertės.

3.3 lentelė. Šiluma ir fermentu apdorotų išrūgų baltymų plėvelių deguonies pralaidumas

Plėvelės Nr.	DP
	$\text{cm}^3 \cdot \text{mm} / \text{m}^2 \cdot 24 \text{ h} \cdot \text{kPa}$
1c	$0,093 \pm 0,011^{\text{AB}}$
5c	$0,105 \pm 0,003^{\text{B}}$
6c	$0,079 \pm 0,014^{\text{A}}$

^{A, B} – stulpelyje skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$; Tukey).

Visos tirtos plėvelės pasižymėjo labai mažu DP, kuris buvo apie 20 kartų mažesnis už mažo tankio polietileno plėvelės (toliau – LDPE) DP tomis pačiomis sąlygomis ($\text{DP}_{\text{LDPE}} = 1,870 \text{ cm}^3 \cdot \text{mm} / \text{m}^2 \cdot 24 \text{ h} \cdot \text{kPa}$) (Krochta, 2002). Šiluma ir fermentu TG paveiktų baltymų plėvelės (6c) buvo ne tokios pralaidžios deguoniui kaip kontrolinės plėvelės (1c) ir plėvelės, kurių baltymai nebuvo termiškai apdoroti prieš TG įdėjimą į sistemą (5c). Pastarųjų (5c) DP buvo didžiausias lyginant su kitomis plėvelėmis, tačiau statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo kontrolinių plėvelių DP. 25 % didesnę DP 5c plėvelėse, lyginant su 6c plėvelėmis, galėjo nulemti mažesnis sistemos polidispersiškumas bei didelis kiekis didelės molekulinės masės baltymų „polimerų“, dėl kurių 5c sistemoje galėjo susiformuoti didesnės poros, pro kurias deguonies molekulėms buvo lengviau prasiskverbti nei pro polidispersiškesnę ir tankesnę sistemą 6c (Di Pierro et al., 2013).

Išrūgų baltymų plėvelių vandens garų pralaidumas ir mechaninės savybės

IB plėvelės dėl savo hidrofiliinės prigimties blogai sulaiko vandens garus, o jei jų sudėtyje nėra plastifikuojančių medžiagų, tai veikiant mechaninėms jėgoms jos lengvai sutrūksta. Šiame darbe ištirta, kaip IB tirpalų, skirtų plėvelėms gaminti, apdorojimas šiluma ir TG paveikia jų VGP ir mechanines savybes.

Iš 3.4 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad IB terminis apdorojimas priklausomai nuo sąlygų turėjo reikšmingą neigiamą poveikį plėvelių VGP. Ir išlaikymas 40 °C temperatūroje 300 min ir išankstinė IB denatūracija padidino plėvelių VGP. Didžiausią VGP turėjo 3c ir 6c plėvelės. Taip galėjo nutikti dėl IB konformacinių pokyčių veikiant šilumos energijai; IB sistemoje galėjo atsiverti didesnis kiekis hidrofiliinių grupių, dėl kurių vandens molekulėms yra lengviau prasiskverbti pro IB tinklą. Tačiau reikia paminėti tai, kag skirtingai nei nustatė mokslininkai (Di Piero et al., 2013), TG reikšmingos įtakos IB plėvelių VGP savybei nepadarė.

3.4 lentelė. Šiluma ir fermentu apdorotų išrūgų baltymų plėvelių vandens garų pralaidumas ir mechaninės savybės

Plėvelės Nr.	VGP*	TS**	E**
	g/cm ² ·24 h	MPa	%
1c	0,074±0,002 ^A	2,685±0,178 ^B	80,95±8,09 ^A
2c	0,094±0,001 ^B	2,245±0,647 ^{AB}	86,97±7,48 ^A
3c	0,112±0,003 ^C	2,592±0,196 ^{AB}	82,94±4,31 ^A
4c	0,074±0,002 ^A	2,512±0,235 ^{AB}	82,76±2,44 ^A
5c	0,094±0,000 ^B	1,901±0,731 ^A	89,10±9,63 ^A
6c	0,109±0,003 ^C	2,810±0,344 ^B	84,84±7,50 ^A

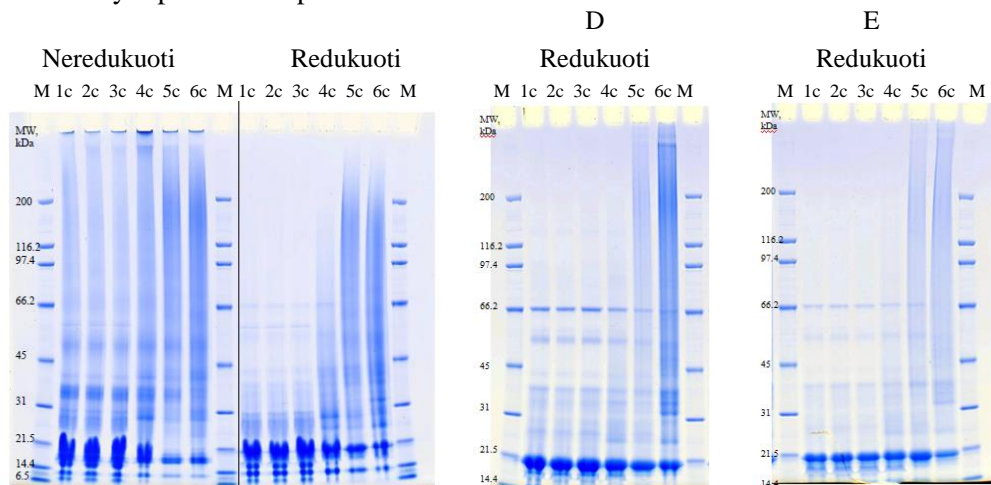
^{A, B, C} – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$; *Dunnett T3, **Dunnett C).

TG poveikis neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos ir plėvelių mechaninėms savybėms, t. y. TS ir E, lyginant plėveles be ir su TG, kuriose IB buvo apdoroti vienodu terminiu režimu. Panašų TG poveikį nustatė ir mokslininkai (Di Piero et al., 2013). Tačiau 5c plėvelės TS statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo kontrolinės ir 6c plėvelių. 5c plėvelės, kurios IB nebuvo termiškai apdoroti prieš fermento įdėjimą, TS buvo 29 % mažesnis nei kontrolinės plėvelės. O plėvelė, kurios IB buvo denatūruoti prieš TG įdėjimą (6c), pasižymėjo didžiausiu TS, kuris statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo 5c plėvelės TS 32 %. Tokias išskirtines pastarųjų plėvelių mechanines savybes nulėmė baltymų molekulių struktūros pokyčiai, įvykę terminio ir fermentinio apdorojimo metu. Remiantis baltymų tirpalų reologinių savybių bei molekulių dydžio tyrimo rezultatais galima daryti išvadą, kad tokiam 5c plėvelių TS įtaką padarė IB „polimerizacija“ (kovalentinių skersinių ryšių tarp IB molekulių bei jų viduje susidarymas), vykusi kartu su baltymų denatūracija (disulfidinių ryšių tarp IB molekulių susidarymas) galutinio sistemos terminio apdorojimo metu.

Išrūgų baltymų plėvelių tirpumas

IB tirpalų, skirtų plėvelėms gaminti, džiovavimo metu vyksta molekulių oksidacija, kurios metu susiformuoja nekovalentiniai ryšiai tarp baltymų molekulių bei atsiranda papildomų elektrosstatinių jėgų, palaikančių plėvelių struktūrą (Jiang et al., 2012; Krochta, 2002). Tirpinant plėveles vandeniniuose tirpaluose galima sužinoti, kokie pokyčiai įvyko drėgmės išgarinimo metu formuojantis plėvelėms ir kokie komponentai suformavo plėvelių struktūrą (Wang et al., 2013).

Plėvelės buvo tirpintos 7 paras neredukuojančiomis sąlygomis Tris buferiniame tirpale (pH 6,75) ir redukuojančiomis sąlygomis Tris buferiniame tirpale (pH 6,75), turinčiame 5 % natrio dodecilsulfato. Be redukuojančio agento visiškai ištirpinti plėvelių nepavyko. Tris buferiniame tirpale ištirpusių (disocijavusių) baltymų frakcijos elektroforezė buvo atlikta baltymus neredukuojančiomis (3.8 pav. *C Neredukuoti*) ir redukuojančiomis (3.8 pav. *C Redukuoti*) sąlygomis, o netirpiosios baltymų frakcijos elektroforezė buvo atlikta tik baltymus redukuojančiomis sąlygomis (3.8 pav. *D Redukuoti*). Plėvelių, tirpintų Tris buferiniame tirpale su baltymus redukuojančiu agentu, baltymų elektroforezės rezultatai yra pateikti 3.8 pav. *E Redukuoti*.



3.8 pav. Terminio (mėg. Nr. 1c, 2c, 3c) ir fermentinio (mėg. Nr. 4c, 5c, 6c) išrūgų baltymų (7 % konc., pH 6,75) apdorojimo įtaka baltymų molekulinei masei: *C* – plėvelės, tirpintos neredukuojančiomis sąlygomis, tirpūs baltymai; *D* – plėvelės, tirpintos neredukuojančiomis sąlygomis, netirpūs baltymai; *E* – plėvelės, tirpintos redukuojančiomis sąlygomis, baltymai. *M* – standartinių baltymų mišinys (6,5 – 200 kDa), *MW* – molekulinė baltymų masė

Išskirsčius plėvelių baltymų frakcijas nustatyta, kad džiovavimo metu baltymų sistemoje įvyko tam tikri pokyčiai, kuriuos parodo elektroforezės geliuose atsiradusios juostos tarp 20–50 kDa. Manoma, jog šio plėvelių gamybos proceso metu įvyko baltymų oksidacinio tipo „polimerizacija“, per kurią susiformavo mažesnės molekulinės masės oligomerai lyginant su TG suformuotais baltymų „polimeriniais“ dariniais. Nepaisant to, tiek ištirpusių, tiek neištirpusių baltymų molekulių frakcijose buvo įvairaus dydžio baltymų „polimerų“, susidariusių

baltymus veikiant TG, nes redukuotų baltymų elektroforezės gelių takeliuose išliko tos pačios juostos kaip ir 3.4 pav. pavaizduotuose geluose A ir B.

Tris buferiniame tirpale ištirpusių plėvelių baltymų frakcijos koncentracijos analizės rezultatai parodė (3.5 lent.), koks kiekis baltymų atsiskyrė nuo plėvelės struktūros ir kokią įtaką šiam procesui padarė skirtingi terminio ir fermentinio baltymų apdorojimo režimai. Tirpalų, skirtų plėvelėms gaminti, pradinis baltymų kiekis buvo 54 ± 1 mg/ml. Iš 3.5 lentelėje pateiktų rezultatų galima matyti, jog nuo plėvelių nutirpusių baltymų kiekis visais atvejais buvo labai mažas. Tai rodo, kad plėvelės buvo labai mažai tirpios vandens terpėje. Akivaizdu, jog šiluma apdorotų ir TG paveiktų baltymų tinklas (6c) buvo mažiausiai tirpus dėl jame esančių stiprių kovalentinių jungčių, neleidusių baltymų tinklui suirti. Įdomu tai, kad 4c mėginio atveju atsiskyrė didžiausias kiekis baltymų. Šį rezultatą galima interpretuoti kaip didelės molekulinės masės baltymų atsiskyrimo nuo plėvelės tinklo pasekmę.

3.5 lentelė. Buferinėje sistemoje (pH 6,75) ištirpusių plėvelių baltymų kiekis

Plėvelės Nr.	Ištirpusių baltymų kiekis	
	mg/ml	%
1c	$3,61 \pm 0,03^C$	6,69
2c	$3,20 \pm 0,01^{AB}$	5,93
3c	$3,42 \pm 0,18^{BC}$	6,33
4c	$4,63 \pm 0,17^D$	8,57
5c	$3,48 \pm 0,25^{BC}$	6,44
6c	$2,84 \pm 0,07^A$	5,26

A, B, C, D – stulpelyje skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$; Tukey).

IB plėvelių tyrimų rezultatai rodo, kad tiek šiluma, tiek TG paveikti IB suformavo patvarią ir vandenyje labai sunkiai tirpstančią struktūrą. Deja, TG poveikis nesumažino nei IB plėvelių DP, nei VGP, bet priešingai, skirtingas IB terminis apdorojimas (pašildymas iki 90 °C ir staigus atvėsinimas bei išlaikymas 40 °C temperatūroje 300 min) padidino VGP iki 51 % ir 47 %, atitinkamai IB apdorojus vien šiluma ir apdorojus šiluma bei TG. Tiek šilumos, tiek TG poveikis statistiškai reikšmingai nepakeitė plėvelių E. Apibendrinus galima teigti, kad TG teigiamos įtakos iš IB tirpalų išlietų plėvelių mechaninėms, struktūrinėms bei barjerinėms savybėms nepadarė, todėl tolesniuose tyrimuose ieškota kitų būdų kaip pagerinti IB plėvelių savybes.

3.1.3. Išrūgų baltymų plėvelių barjerinių bei mechaninių savybių modifikavimas plastikliais ir polisacharidu chitozanu

Valgomosios plėvelės, skirtos apsaugoti maisto produktus nuo išorinių veiksnių, galinčių pažeisti maisto produkto vientisumą ir inicijuoti įvairius nepageidautinus fizikinius cheminius pokyčius, turi būti atsparios mechaninėms deformacijoms ir išlaikyti savo vientisumą praktinio naudojimo metu. Žinoma, kad plastikliai didina polimero grandinių mobilumą (Vieira et al., 2011), dėl to padidėja

polimerinių plėvelių E ir sumažėja jų TS (Siew et al., 1999; Sothornvit ir Krochta, 2001). Priklausomai nuo plastiklių molekulių struktūros ir sudėties jie skirtingai gali paveikti biopolimerinių plėvelių mechanines savybes.

IB plėvelių mechaninės savybės ir jų priklausomybė nuo plėvelių sudėties vertinta matuojant plėvelių TS ir E. Tyrimo rezultatai pateikti 3.6 lentelėje rodo, jog IB plėvelėms būdingas mažas stiprumas ir didelis elastingumas. Plėvelių su gliceroliu TS buvo $3,872 \pm 0,320$ MPa, o E – $33,13 \pm 3,20$ %. Pakeitus IB plėvelėse glicerolį sorbitoliu, TS padidėjo 58,91 %, o E padidėjo 8,81 %. Didinant sorbitolio kiekį plėvelėje 30 %, jų TS didėjo vidutiniškai 87,45 %, o E sumažėjo 7,66 %. Dar didesnis plėvelės TS padidėjimas buvo pasiektas įdėjus glicerolio ir sorbitolio mišinį santykiu 1:1 arba 1:4.

Katijoninio polisacharido CHIT plėvelės be plastiklių yra stiprios ($31,277 \pm 2,952$ MPa) ir neelastingos ($4,56 \pm 1,01$ %). Pagaminus plėveles iš IB ir CHIT biopolimerų mišinio, gautos stipresnės ir elastingesnės plėvelės nei CHIT plėvelė ar IB plėvelės su plastikliais, tačiau E jų buvo gerokai mažesnis nei IB plėvelių. IB/CHIT plėvelių elastingumą padidino įdėtas plastiklis nepriklausomai nuo jo rūšies, o atspariausios mechaninėms deformacijoms buvo IB/CHIT plėvelės su sorbitoliu $47,261 \pm 3,264$ MPa, kurios pasižymėjo pakankamai dideliu elastingumu $35,26 \pm 7,56$ %.

3.6 lentelė. Išrūgų baltymų, chitozano ir jų mišinio plėvelių su skirtingais plastikliais mechaninės savybės

Plėvelės sudėtis	TS	E
	MPa	%
IB/G (1:1)	$3,872 \pm 0,320^A$	$33,13 \pm 3,20^{CD}$
IB/S (1:1)	$6,153 \pm 0,615^B$	$36,05 \pm 2,77^D$
IB/S (1:1,3)	$11,534 \pm 0,313^C$	$33,29 \pm 0,91^{CD}$
IB/G/S (G:S=1:1)	$16,348 \pm 0,838^D$	$29,77 \pm 1,60^C$
IB/G/S (G:S=1:4)	$14,961 \pm 0,526^D$	$33,13 \pm 1,30^{CD}$
IB/CHIT	$36,478 \pm 1,970^E$	$8,23 \pm 0,42^B$
IB/CHIT/G (IB:G=1:1)	$32,458 \pm 5,460^{EF}$	$38,97 \pm 11,21^{CD}$
IB/CHIT/S (IB:S=1:1)	$47,261 \pm 3,264^F$	$35,26 \pm 7,56^{CD}$
CHIT	$31,277 \pm 2,952^E$	$4,56 \pm 1,01^A$

A, B, C, D, E, F – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$; Dunnett C).

Kita svarbi plėvelių charakteristika yra jų VGP, nuo kurios priklauso plėvelių praktinio panaudojimo sąlygos ir galimybės. Žinoma, kad IB ir chitozano plėvelių pagrindiniai komponentai yra hidrofilinės prigimties, todėl šios plėvelės prastai sulaiko vandens garus (Lacroix ir Cooksey, 2005) ir ši jų savybė labai priklauso nuo kitų komponentų prigimties, pavyzdžiui plastiklio. Iš tyrimų rezultatų, pateiktų 3.7 lentelėje matyti, kad mažiausiai pralaidžios vandens garams buvo IB plėvelės su sorbitoliu ($0,039$ – $0,040$ g/cm²·24 h). Glicerolis statistiškai reikšmingai padidino IB

plėvelių VGP. Šią tendenciją patvirtina ir kitų tyrimų rezultatai (Kokoszka et al., 2010; Oses et al., 2009).

CHIT plėvelių VGP statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo IB/S plėvelių (0,043 g/cm²·24 h), tačiau pagaminus plėveles iš IB ir CHIT mišinio, VGP padidėjo 55,81 % lyginant su CHIT plėvelių VGP. Plastiklių – sorbitolio ar glicerolio – pridėjimas į IB/CHIT plėveles, turėjo panašų poveikį kaip ir IB plėvelėms: su sorbitoliu plėvelių VGP buvo statistiškai reikšmingai mažesnis nei su gliceroliu.

3.7 lentelė. Išrūgų baltymų, chitozano ir jų mišinio plėvelių su skirtingais plastikliais vandens garų pralaidumas

Plėvelės sudėtis	VGP
	g/cm ² ·24 h
IB/G (1:1)	0,074 ± 0,002 ^A
IB/S (1:1)	0,040 ± 0,002 ^B
IB/S (1:1,3)	0,039 ± 0,001 ^B
IB/G/S (G:S=1:1)	0,059 ± 0,002 ^C
IB/G/S (G:S=1:4)	0,046 ± 0,002 ^B
IB/CHIT	0,067 ± 0,002 ^D
IB/CHIT/G (IB:G=1:1)	0,090 ± 0,003 ^E
IB/CHIT/S (IB:S=1:1)	0,060 ± 0,001 ^C
CHIT	0,043 ± 0,002 ^B

A, B, C, D, E, F, G, H – stulpelyje skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$; Dunnett T3).

Taigi, ištyrus plastiklių įtaką plėvelių fizikinėms savybėms buvo nustatyta, kad IB plėvelėse glicerolį pakeitus sorbitoliu, padidėjo šių plėvelių TS ir E, kai plastiklio ir IB kiekis plėvelėse buvo vienodas. Padidinus sorbitolio kiekį šiose plėvelėse 30 %, jų TS padidėjo, o E sumažėjo. Plastiklių mišinys (G:S=1:1) dar labiau padidino plėvelių TS lyginant su plėvelėmis, kuriose buvo vienos rūšies plastiklis. Nepaisant to, IB plėvelių stiprumas buvo gerokai mažesnis nei IB ir CHIT mišinio plėvelių, iš kurių stipriausios buvo IB/CHIT/S plėvelės (47,261±3,264 MPa), turinčios pakankamai didelį elastingumą (35,26±7,56 %). Mažiausiu VGP pasižymėjo IB plėvelės su sorbitoliu nepriklausomai nuo jo kiekio.

3.1.4. Išrūgų baltymų plėvelių antimikrobinų savybių modifikavimas antimikrobinų medžiagų priedais

Plėvelių gebėjimas slopinti mikroorganizmų augimą pasiekiamas įvairiais būdais: gaminant plėveles iš medžiagų, kurios pasižymi antimikrobinėmis savybėmis (Ferreira et al., 2009; Vartiainen et al., 2004; Vårum ir Smidsrød, 2006), pridodant į plėveles inhibitoriniu efektu prieš tam tikrus mikroorganizmus pasižyminčių medžiagų (Altunkaya, 2011; Cagri, Ustunol ir Ryser, 2001; Kristo et al., 2008; Ramos et al., 2012).

Eksperto metu buvo nustatytas IB, CHIT bei IB/CHIT plėvelių su maisto pramonėje plačiai naudojamomis antimikrobinėmis medžiagomis – propoliu, nizinu, kalcio laktatu, kalio sorbatu, benzenkarboksirūgštimi bei askorbo rūgštimi – antibakterinis poveikis prieš *S. typhimurium*, *S. agona*, *P. expansum*, *L. sakei*, *L. plantarum*, *C. jejuni* (3.8 lent.).

3.8 lentelė. Išrūgų baltymų plėvelių su įvairiais priedais antibakterinės savybės

Plėvelės sudėtis	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. agona</i>	<i>P. expansum</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>C. jejuni</i>
	Slopinimo zona, įskaitant plėvelės paviršiaus plotį, mm					
IB/S	0	n	0	0	0	n
IB/S/propolis (1 %)	N	N	N	-	-	N
IB/S/nizinas (2500 U/g)	0	N	N	-	-	N
IB/S/kalcio laktatas (1 %)	0	N	N	-	-	N
IB/S/kalcio laktatas (0,5 %)	0	N	N	-	-	N
IB/S/benzenkarboksir. (0,03 %)	n	N	0	-	-	N
IB/S/benzenkarboksir. (0,015 %)	0	N	0	-	-	N
IB/S/askorbo r. (0,015 %)	0	N	0	-	-	N
IB/S/askorbo r. (0,03 %)	0	N	0	-	-	N
IB/S/kalio sorbatas (1 %)	n	N	32±5,83	-	-	N
IB/S/kalio sorbatas (0,5 %)	n	N	N	-	-	N
CHIT	N	N	0	N	13,33±1,03 _A	N
IB/CHIT/S	N	N	0	14,50±0,84 _A	17,17±1,17 _{BC}	N
IB/CHIT/S/propolis (1 %)	N	N	N	15,50±0,55 _{AB}	16,33±1,86 _B	N
IB/CHIT/S/nizinas (2500 U/g)	N	N	N	38,50±1,76 _C	48,33±1,97 _D	N
IB/CHIT/S/kalcio laktatas (1 %)	N	N	N	14,33±0,52 _A	15,00±1,41 _{AB}	N
IB/CHIT/S/benzenkarboksir. (0,03 %)	N	N	N	14,50±0,55 _A	16,83±0,75 _{BC}	N
IB/CHIT/S/askorbo r. (0,03 %)	n	n	N	15,67±1,21 _{AB}	19,17±1,72 _C	N
IB/CHIT/S/kalio sorbatas (1 %)	15,00±0,63	15,83±1,17	20,17±0,41	16,33±1,03 _B	17,67±1,51 _{BC}	28,17±2,23

N – mikroorganizmai neaugo po plėvele.

n – mikroorganizmai neaugo po plėvele, tačiau zona po plėvele buvo ne visiškai skaidri.

„-“ – netirta.

A, B, C, D – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey).

Tyrimo duomenys rodo, kad IB plėvelės be antimikrobinų medžiagų antimikrobinu poveikiu nepasižymėjo. Tuo metu CHIT ir IB/CHIT plėvelės slopino visų tirtų mikroorganizmų vystymąsi, išskyrus *Penicillium expansum*.

Plėvelių su įvairiais antimikrobiniais priedais poveikis analizuotiems mikroorganizmams buvo skirtingas: aplink vienas plėvelės formavosi skaidrios mikroorganizmų augimo slopinimo zonos, kitais atvejais mikroorganizmai neaugo tik po plėvelėmis. CHIT ir visos IB/CHIT plėvelės su antimikrobiniais priedais labai gerai slopino pieno rūgšties mikroorganizmų vystymąsi, nes aplink plėvelių bandinius susiformavo skaidrios zonos. *S. agona* ir *C. jejuni* neaugo po visomis tirtomis plėvelėmis, *S. typhimurium* buvo jautri CHIT ir IB/CHIT plėvelėms, taip pat IB plėvelėms su propoliu, benzenkarboksirūgštimi ir kalio sorbatu. Apskritai, kalio sorbatas veikė slopinančiai prieš visus tirtus mikroorganizmus visose plėvelėse. Plėvelėse su CHIT jis veikė sinergistiškai su chitozanu, nes mikroorganizmai ne tik neaugo po plėvelėmis, bet ir susidarė jų slopinimo zonos.

Penicillium expansum augimo neslopino nei IB, nei CHIT, nei IB/CHIT plėvelės. Tik įdėjus į jas kai kurių priedų, mikroskopinio grybo augimas po plėvele buvo nuslopintas. IB plėvelėse *Penicillium expansum* slopino propolio, nizino, kalcio laktato ir kalio sorbato priedai, o į IB/CHIT plėveles – visi tirti priedai.

3.1.5. Vaisių ir uogų sulčių įtaka išrūgų baltymų bei išrūgų baltymų ir chitozano valgomųjų plėvelių savybėms

Vaisių ir uogų sultyse yra daugybė biologiškai aktyvių junginių, tokių kaip organinės rūgštys ir fenoliniai junginiai, kurie maisto pramonėje naudojami kaip maisto priedai. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad įdėtos į IB plėveles benzenkarboksirūgštis ir sorbo rūgštis slopina *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* bei *Salmonella typhimurium* (Cagri, Ustunol ir Ryser, 2001; Richards, 1995) ir stabdo mielių augimą (Arroyo-Lopez et al., 2008). O citrinų rūgštis, esanti daugumoje sulčių, slopina bendrą bakterijų vystymąsi, sierą redukuojančių bakterijų ir enterobakterijų augimą (Schirmer et al., 2009). Mokslinėje literatūroje yra duomenų ir apie fenolinių junginių antibakterines savybes (Puupponen-Pimiä et al., 2001; Rauha et al., 2000). Pavyzdžiui, spanguolių fenoliniai junginiai slopina *Escherichia*, *Salmonella* genties bakterijų veiklą (Puupponen-Pimiä et al., 2001, 2005a, 2005b). Tačiau mokslinėje literatūroje nepavyko rasti informacijos apie galimybę pagerinti valgomųjų plėvelių antimikrobines savybes gaminant plėveles su natūraliomis sultimis.

Šiame tyrimo etape buvo bandoma papildyti plėvelių kompoziciją Sva, Spa, Akt, Šer ir Put uogų sultimis. Deja, pagaminti plėvelių su Put sultimis nepavyko dėl tirpaluose, skirtuose plėvelėms gaminti susidariusių klampių nuosėdų. Todėl toliau eksperimentai atlikti be šių uogų sulčių. Tyrimams gamintos dviejų tipų plėvelės:

- 1) tirpinant chitozaną natūraliose ar koncentruotose sultyse (CHIT/Sultys);
- 2) chitozaną ištirpinant natūraliose sultyse ir maišant su šiluma neapdorotu IB tirpalu (IB/CHIT/Sultys).

Eksperimento pradžioje nustatytos plėvelių mechaninės savybės – TS ir E (3.9 lent.). Iš pateiktų duomenų matyti, kad plėvelių su natūraliomis

(nekoncentruotomis) sultimis TS buvo didesnis nei plėvelių su dvigubai ar trigubai didesniu sulčių SM kiekiu. Didesnis sulčių SM kiekis, įsiterpęs į chitozano ar IB ir chitozano sistemą, blokuoja molekulių tinklo ryšių susidarymą ir silpnina jo struktūrą. IB/CHIT plėvelės su svarainių, spanguolių ir šermukšnių sultimis buvo mechaniškai stipresnės nei CHIT plėvelės su tomis pačiomis sultimis. Lyginant skirtingų sulčių įtaką plėvelių stiprumui matyti, kad plėvelės su aktinidijų sultimis visais atvejais buvo mechaniškai silpniausios, o stipriausios buvo plėvelės su spanguolių sultimis.

3.9 lentelė. Išrūgų baltymų su chitozanu ir chitozano valgomųjų plėvelių su sultimis mechaninės savybės

Plėvelės sudėtis	TS	E
	MPa	%
CHIT (Sva 1:16)	8,802±0,044 ^{CD}	37,13±0,14 ^{EFG}
CHIT (Sva 2:15)	5,091±0,023 ^{ABCD}	52,21±1,49 ^{DEFG}
CHIT (Sva 3:14)	3,670±0,024 ^{ABC}	59,59±1,57 ^{CDE}
IB/CHIT (Sva 1:16)	9,914±0,062 ^D	84,05±1,56 ^B
IB/CHIT (Sva 2:15)	5,548±0,050 ^{ABC}	93,49±2,65 ^{AB}
IB/CHIT (Sva 3:14)	4,111±0,064 ^{ABC}	86,98±7,92 ^{AB}
CHIT (Spa 1:19)	7,661±0,057 ^{BCD}	55,28±0,47 ^{DEF}
CHIT (Spa 2:18)	3,412±0,028 ^{AB}	67,43±0,48 ^{CD}
CHIT (Spa 3:17)	1,365±0,010 ^A	58,24±2,68 ^{CDE}
IB/CHIT (Spa 1:19)	10,273±0,057 ^D	86,66±2,18 ^{AB}
IB/CHIT (Spa 2:18)	4,275±0,022 ^{ABC}	89,55±1,05 ^{AB}
IB/CHIT (Spa 3:17)	3,602±0,023 ^{ABC}	110,93±0,36 ^A
CHIT/Akt	1,019±0,010 ^A	48,82±0,03 ^{DEFG}
IB/CHIT/Akt	1,043±0,006 ^A	32,98±0,07 ^{FG}
CHIT/Šer	2,371±0,018 ^{AB}	74,06±2,64 ^B
IB/CHIT/Šer	4,036±0,024 ^{ABC}	90,48±0,97 ^{AB}

A, B, C, D, E, F, G – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Dunnett C).

Tų pačių plėvelių su sultimis elastingumo (išsitempimo iki sutrūkimo) tyrimai parodė, kad visos plėvelės buvo pakankamai elastingos, nors plastikio jose nebuvo. Manoma, jog didesnę elastingumą plėvelėms galėjo suteikti sultyse esantys pektinai ir cukrūs. Kadangi IB/CHIT plėvelės buvo elastingesnės už CHIT plėveles, teigiamos įtakos pirmosioms galėjo turėti IB hidrofiliškumas. Dėl šios savybės plėvelėse galėjo būti daugiau vandens molekulių, įsiterpusių į molekulių tinklą, kurios ir suteikė didesnę struktūros lankstumą. Mažiausiai elastingos buvo plėvelės su aktinidijų sultimis, o elastingiausios buvo plėvelės su spanguolių ir svarainių sultimis.

Mokslinėje literatūroje yra duomenų apie vaisių ir daržovių nuostolius dėl mikroskopinių grybų sukeltų ligų, kurios labai sutrumpina jų vartojimo trukmę (He et al., 2003). *Penicillium expansum* buvo pripažintas pačiu žalingiausiu, kuris

labiausiai pažeidžia obuolius, sukelia didelių ekonominių nuostolių augintojams bei dėl toksino patulino gamybos gali stipriai pakenkti žmonių sveikatai (Pitt ir Hocking, 1997). Todėl tyrimų metu siekta nustatyti IB ir chitozano bei jų mišinių plėvelių su įvairiomis sultimis poveikį *Penicillium expansum* augimui difuzijos į agarą metodu. Tyrimų rezultatai pateikti 3.10 lentelėje.

3.10 lentelė. Išrūgų baltymų su chitozanu ir chitozano plėvelių su sultimis poveikis *Penicillium expansum*

Plėvelės sudėtis	<i>Penicillium expansum</i>
	Slopinimo zona, įskaitant plėvelės paviršiaus plotį, mm
CHIT (Sva 1:16)	N
CHIT (Sva 2:15)	N
CHIT (Sva 3:14)	N
IB/CHIT (Sva 1:16)	N
IB/CHIT (Sva 2:15)	N
IB/CHIT (Sva 3:14)	N
CHIT (Spa 1:19)	16,6±0,1 ^A
CHIT (Spa 2:18)	21,0±0,1 ^B
CHIT (Spa 3:17)	N
IB/CHIT (Spa 1:19)	0
IB/CHIT (Spa 2:18)	N
IB/CHIT (Spa 3:17)	N
CHIT/Akt	0
IB/CHIT/Akt	0
CHIT/Šer	0
IB/CHIT/Šer	0

N – mikroorganizmai neaugo po plėvele.

^{A, B} – stulpelyje skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey).

Nustatyta, kad *Penicillium expansum* augimą slopinančiu poveikiu pasižymėjo beveik visos plėvelės su svarainių ir spanguolių sultimis, nes po jomis mikroskopinis grybas neaugo. Tačiau chitozano plėvelės su spanguolių sultimis padarė stipresnį poveikį, nes aplink jas susiformavo mikroskopinio grybo augimo slopinimo zonos: su CHIT (Spa 1:19) plėvele susiformavo 16,6±0,1 mm slopinimo zona, o su CHIT (Spa 2:18) – 5,5±0,01 mm slopinimo zona (įskaitant plėvelės bandinio paviršiaus plotį).

Deja, plėvelės su aktinidijų ir šermukšnių uogų natūraliomis sultimis mikroskopinio grybo augimo neslopino galimai dėl per mažo bioaktyvių medžiagų kiekio. Plėvelių su Sva ir Spa sultimis stiprų *Penicillium expansum* augimą slopinantį poveikį nulemia bioaktyvios medžiagos – benzenkarboksirūgštis, sorbo rūgštis, antocianinai ir askorbo rūgštis. Plėvelėse su Sva askorbo rūgšties kiekis yra beveik 6 kartus didesnis nei plėvelėse su Spa (2.5 lent.). Be to, jose yra ir

benzenkarboksirūgštis bei sorbo rūgštis, kurios pasižymi antimikrobinėmis savybėmis. Plėvelėse su Spa, priklausomai nuo plėvelėse esančių sulčių SM kiekio, didžiausią aktyviųjų medžiagų kiekį sudaro benzenkarboksirūgštis (nuo 22,77 iki 127,50 mg/100 g) bei antocianinai (nuo 3,16 iki 17,71 mg/100 g).

Mokslinėje literatūroje teigiama, kad spanguolių uogų fenoliniai junginiai, antocianinai veikia antibakteriškai ne tik prieš mikroskopinius grybus (Vedenskaya ir Vorsa, 2004), bet ir prieš Gram teigiamas ir Gram neigiamas bakterijas (Cote et al., 2011; Česonienė, Jasutienė ir Šarkinas, 2009). Spanguolių fenoliniai junginiai uogų sulčių koncentratuose bei ekstraktuose slopina netgi patogeninių bakterijų dauginimąsi (Caillet et al., 2012; Šarkinas ir Jasutienė, 2009; Wu et al., 2008). Mokslininkai (Lacombe et al., 2010) nustatė, kad spanguolių uogų bioaktyvūs junginiai yra efektyvūs prieš *Escherichia coli* bakterijas. Šiose uogose esantys cukrūs su organinėmis rūgštimis sukelia bakterijoms osmosinį šoką, fenoliai ir antocianinai padeda suardyti išorines šių mikroorganizmų lastelių membranas, tokiu būdu slopindami jų vystymąsi. Svarainių žievės ekstrakte esantys bioaktyvūs junginiai taip pat slopina bakterijų augimą, o efektyviausiai veikia prieš *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Bacillus cereus* (Fattouch et al., 2008).

3.11 lentelėje pateikti tyrimo duomenys rodo, kad natūralios svarainių ir spanguolių uogų sultys IB/CHIT plėvelių sudėtyje gerai slopina ir patogenines bakterijas *Salmonella typhimurium*, *Salmonella agona*, *Campylobacter jejuni*, ir pieno rūgšties bakterijas *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*.

3.11 lentelė. Išrūgų baltymų su chitozanu bei Sva ir Spa antibakterinis poveikis prieš patogenines ir pieno rūgšties bakterijas

Plėvelės sudėtis	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. agona</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>C. jejuni</i>
	Slopinimo zona, įskaitant plėvelės paviršiaus plotį, mm				
IB/CHIT/Sva	18,17±2,14 ^A	25,17±0,75 ^A	18,50±0,84 ^A	16,67±1,37 ^A	27,50±1,36 ^A
IB/CHIT/Spa	14,33±0,52 ^B	19,00±0,63 ^B	17,17±1,17 ^B	19,50±1,22 ^B	25,00±1,10 ^B

^{A, B} – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey).

Taigi, IB/CHIT plėvelės su natūraliomis svarainių ir spanguolių sultimis gerai slopino *Penicillium expansum* augimą ir inhibitoriškai veikė tiek patogenines bakterijas, tiek ir pieno rūgšties bakterijas. Įvertinus plėvelių su aktinidijų ir šermukšnių uogų natūraliomis sultimis visų tirtų savybių rezultatus (mažas TS ir E, nepasižymi antimikrobinio poveikiu), jos nebuvo naudojamos tolesniuose tyrimuose. Taip pat tyrimuose nebuvo naudojamos plėvelės su svarainių bei spanguolių sultimis, kuriose SM kiekis buvo 3 kartus didesnis už natūralių sulčių, nes jų funkcinės savybės buvo labai panašios į plėvelių su 2 kartus didesniu SM kiekiu nei natūralių sulčių SM.

3.2. Išrūgų baltymų valgomųjų dangų ir plėvelių su funkciniais priedais įtaka kai kurių maisto produktų kokybei

3.2.1. Išrūgų baltymų ir chitozano valgomųjų dangų įtaka šviežių pjaustytų obuolių fizikiniams cheminiams pokyčiams laikymo skirtingose sąlygose metu

Vaisių ir daržovių kokybę bei galiojimo laiką lemia keletas veiksnių: vandens pasišalinimas, fermentinis rudavimas, tekstūros savybių pablogėjimas, kiti senėjimo procesai bei žalingų mikroorganizmų augimas. Šviežiuose pjaustytuose vaisiuose šie procesai pagreitėja dėl audinių pažeidimo pjaustymo metu. Siekiant sulėtinti tokius procesus ir pailginti šviežių produktų galiojimo laiką, gali būti naudojamos valgomosios dangos. Jos gali sumažinti drėgmės ir ištirpusių medžiagų pernašą produkto viduje ir pasišalinimą iš jo, sulėtinti kvėpavimo ir oksidacijos procesus, apsaugoti nuo fiziologinio šviežių pjaustytų vaisių ar uogų irimo (Baldwin et al., 1995; Park, 1999; Wong, Camirand ir Pavlath, 1994).

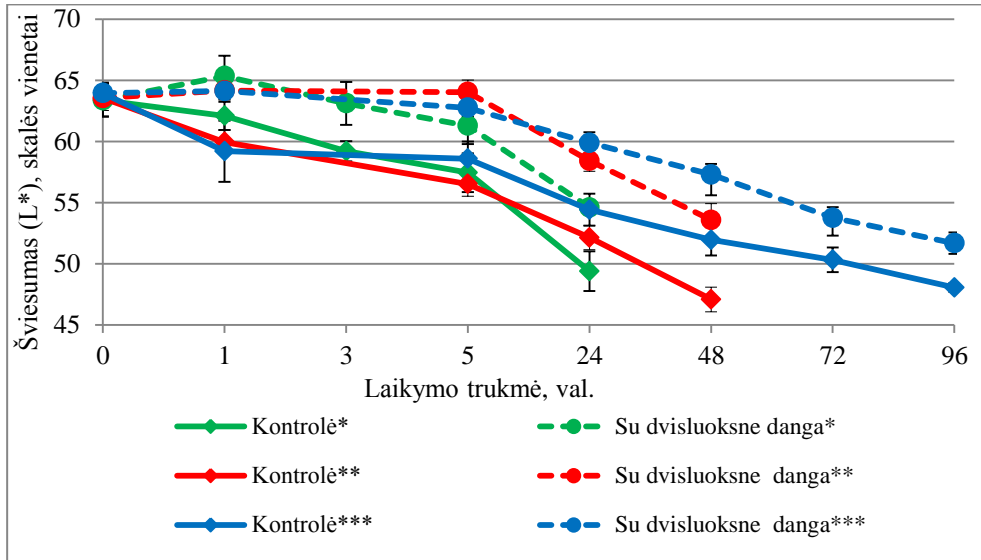
Pjaustyti vaisiai ir daržovės laikymo metu ruduoja juose vykstant fermentinių ir nefermentinių aktyvių junginių reakcijoms. Pavyzdžiui, pjaustant obuolius pažeidžiamos jų ląstelės, todėl ląstelių plastidėse esanti polifenoloksidazė reaguoja su vakuolėse esančiais fenoliniais junginiais, kurie veikiant deguoniui oksiduojasi į silpnai spalvotus chinonus. Šie toliau polimerizuojasi į rudus pigmentus (melaninus), dėl kurių atsiradimo obuoliai tampa rudi (Landrigan et al., 1996). Fermentinio rudavimo reakcijos ne tik pablogina vaisių ar daržovių audinių spalvą, bet ir pakeičia skonį, sumažina askorbo r. kiekį, biologinę ir maistinę vaisių ar daržovių vertę.

Šioje eksperimento dalyje iškeltas tikslas apsaugoti šviežius pjaustus obuolius nuo parudavimo padengiant juos dangomis ir taip pailginti jų tinkamumo vartoti trukmę. Tikslui pasiekti būtina surasti tokias dangas, kurios sudarytų apsauginį barjerą nuo deguonies, inicijuojančio fermentinio parudavimo reakcijas obuolių audiniuose. Taip pat svarbu, kad danga padengti švieži pjaustyti obuoliai išliktų kieti ir nesumažėtų jų drėgnumas. Eksperimentui švieži pjaustyti obuoliai buvo padengti dviejų sluoksnių danga (IB/S|CHIT): pirmoji – IB su sorbitoliu, antroji – CHIT. Kontrolė buvo pjaustyti obuoliai be dangos. Tokių dangos parinkimą lėmė ankstesnių tyrimų rezultatai apie IB ir CHIT formuojamų plėvelių barjerines ir mechanines savybes. Obuoliai laikyti skirtingomis sąlygomis: 1) kambario aplinkoje – 21 ± 2 °C temperatūroje ir esant natūraliam RH; 2) klimatinėje kameroje – 21 ± 1 °C temperatūroje ir esant 75 % RH; 3) šaldytuve – 4 ± 1 °C temperatūroje ir esant natūraliam RH.

Obuolių spalvos pokyčiai

Pirmiausia įvertintas valgomosiomis dangomis padengtų pjaustytų obuolių spalvos kitimas laikymo metu pagal šviesumo rodiklio vertes, kurios yra pateiktos 3.9 pav. Susiformavus dvisluoksnei dangai (po 30 min) obuolių paviršius buvo šviesesnis už pradinį, tačiau tolygiai tamsėjo laikymo metu. Dangomis padengti obuoliai viso laikymo periodo metu buvo šviesesni nei kontroliniai bandiniai. Dėl deguonies poveikio greičiausiai patamsėjo kambario temperatūroje laikyti bandiniai.

Šaldytuve laikyti bandiniai buvo šviesiausi, nes obuolių kvėpavimą ir fiziologinius procesus stabdė ir danga, ir žema aplinkos temperatūra.



3.9 pav. Pjaustytų obuolių, padengtų dvisluoksne IB/S|CHIT danga ir be dangos (kontrolė), šviesumo priklausomybė nuo laikymo sąlygų. * – bandiniai laikyti 21 ± 2 °C temperatūroje; ** – bandiniai laikyti 21 ± 1 °C temperatūroje esant 75 % RH; *** – bandiniai laikyti 4 ± 1 °C temperatūroje.

Fenolinių junginių kiekio pokyčiai obuoliuose

Obuolių fenoliniai junginiai, esant deguoniui, dalyvauja fermentinio rudavimo reakcijose kaip substratai (Son, Moon ir Lee, 2001). Todėl tai, kad valgomoji dvisluoksni danga stabdo fermentinio rudavimo reakcijas pjaustytuose obuoliuose, patvirtino ir duomenys apie fenolinių junginių kitimo dinamiką bandinių laikymo metu 21 ± 1 °C temperatūroje ir 75 % RH (3.12 lent.).

3.12 lentelė. Fenolinių junginių kiekis pjaustytų obuolių bandiniuose su dvisluoksne danga ir be dangos (kontrolė) laikymo metu 21 ± 1 °C temperatūroje ir 75 % RH

Dangos sudėtis	Fenolinių junginių kiekis, mg/100 g SM		
	Laikymo trukmė, val.		
	Pradinis	24	48
Kontrolė**	549,52±27,47 ^a	439,74±21,99 ^{bB}	291,65±14,58 ^{cB}
Su dvisluoksne danga**		477,27±23,86 ^{aA}	397,57±19,88 ^{bA}

^{a, b, c} – eilutėse skirtingomis mažosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p\leq 0,05$, Tukey).

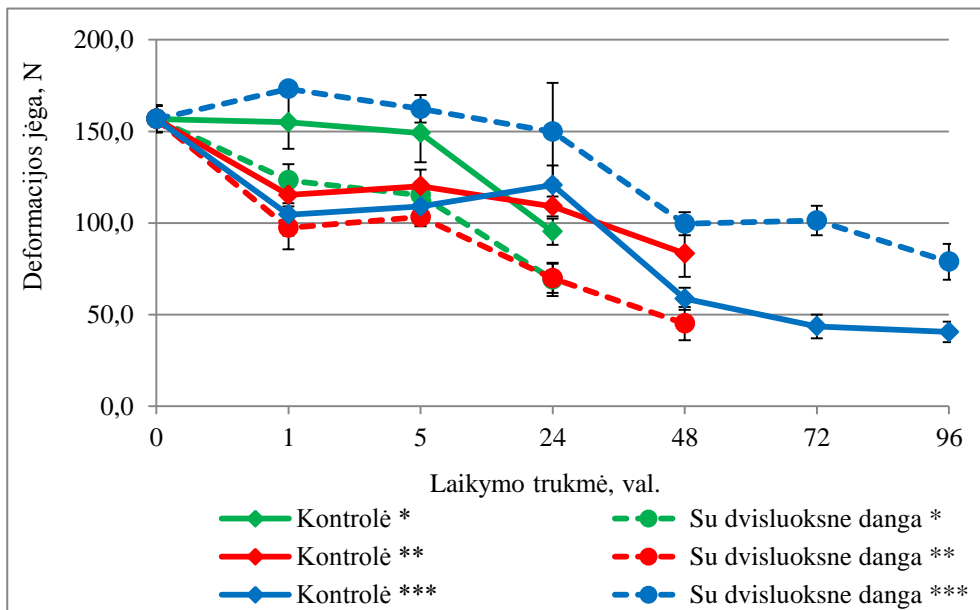
^{A, B} – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p\leq 0,05$, Tukey).

Atliktų tyrimų duomenys rodo, kad pjaustytuose obuoliuose be dangos (kontrolė) bendras fenolinių junginių kiekis mažėjo greičiau nei bandiniuose su danga. Kontroliniuose bandiniuose fenolinių junginių kiekis per 24 ir 48 val. sumažėjo atitinkamai 109,78 ir 257,88 mg/100 g SM, o IB/S|CHIT danga padengtuose – atitinkamai 72,26 ir 115,95 mg/100 g SM. Dvisluoksnė danga apsaugojo fenolinius junginius nuo oksidacijos, todėl jų kiekis bandiniuose su danga laikymo metu mažėjo lėčiau.

Obuolių paviršiaus mechaninės savybės

Tekstūros pokytis yra vienas iš geriausiai pastebimų vaisių išorinių pokyčių laikymo metu. Jis susijęs su medžiagų apykaitos pokyčiais ir vandens pernaša iš audinių (Garcia, Martino ir Zaritzky, 1998). Be to, pjaustyti vaisiai minkštėja dėl pektino rūgšties hidrolizės proceso (Ponting, Jackson ir Watters, 1971).

Ekspimento metu buvo nustatyta (3.10 pav.), kad didžiausiu tvirtumu pasižymėjo obuoliai su dvisluoksne danga, laikyti 4 °C temperatūroje nepaisant to, kad jis viso laikymo metu palaipsniui mažėjo. 21 °C temperatūroje nepriklausomai nuo RH, kontroliniai bandiniai (be dangos) turėjo tvirtesnę paviršių lyginant su dvisluoksne danga padengtais bandiniais.



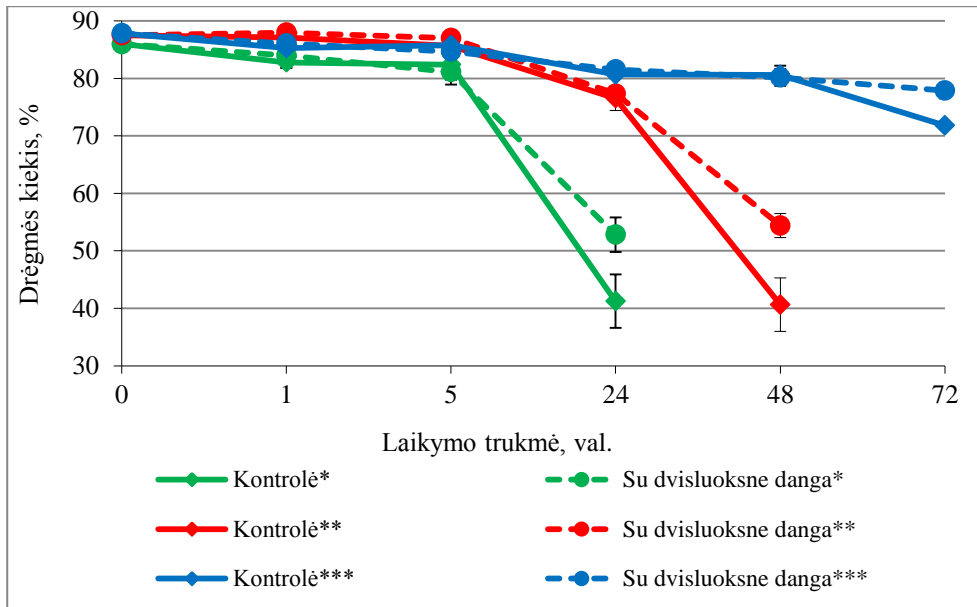
3.10 pav. Pjaustytų obuolių su danga ir be dangos (kontrolė) tvirtumo priklausomybė nuo laikymo laiko. * – bandiniai laikyti 21±2 °C temperatūroje; ** – bandiniai laikyti 21±1 °C temperatūroje esant 75 % RH; *** – bandiniai laikyti 4±1 °C temperatūroje

Manoma, kad iš kontrolinių bandinių paviršinė drėgmė greitai pasišalino, dėl to susiformavo tvirtas natūralus apsauginis paviršinis sluoksnis. Dvisluoksnė danga šiomis laikymo sąlygomis išsaugojo pjaustytų obuolių paviršių minkštesnę, todėl ir tvirtumas jo buvo mažesnis. Nekontroliuojamo RH aplinkoje skirtumas tarp

pjaustytų obuolių nepadengtų ir padengtų danga buvo didesnis nei 75 % RH aplinkoje. Todėl galima manyti, jog dangos apsauginis poveikis pasireiškė daugiau, kai RH buvo nekontroliuojamas.

Drėgmės kiekio pokyčiai obuoliuose

3.11 pav. iliustruoja, kaip kinta dvisluoksne danga padengtų ir nepadengtų pjaustytų obuolių drėgmės kiekis juos laikant skirtingomis sąlygomis. Eksperimento metu nustatyta, jog pjaustyti obuoliai daugiausia drėgmės neteko, kai buvo nepadengti valgomąją danga ir laikyti kambario temperatūroje. Drėgmę pjaustytuose obuoliuose galima išsaugoti laikant juos kontroliuojamo RH aplinkoje arba žemesnėje temperatūroje net ir nepadengus jų paviršiaus danga. Tyrimo rezultatai rodo, jog 21±1 °C temperatūroje 75 % RH aplinkoje ir 4±1 °C temperatūroje šaldytuvo aplinkoje laikyti pjaustyti obuoliai (nepadengti ir padengti danga) po 24 val. laikymo turėjo atitinkamai 36 % ir 40 % daugiau drėgmės nei laikytieji 21±1 °C temperatūroje kambario sąlygomis. Didesnis RH arba žemesnė aplinkos temperatūra sulėtino drėgmės pernašos procesus obuolių audiniuose.



3.11 pav. Obuolių gabalėlių drėgmės kiekio priklausomybė nuo laikymo laiko. * – bandiniai laikyti 21±2 °C temperatūroje; ** – bandiniai laikyti 21±1 °C temperatūroje esant 75 % RH; *** – bandiniai laikyti 4±1 °C temperatūroje

Valgomųjų dangų apsauginis poveikis pasireiškė visuose tirtuose bandiniuose, laikytuose 21±1 °C temperatūroje. Drėgmės kiekis pjaustytuose obuoliuose su danga, išlaikytuose 24 val. kambario aplinkoje ir išlaikytuose 48 val. 75 % RH aplinkoje, buvo atitinkamai vidutiniškai 12 % ir 14 % didesnis nei kontroliniuose bandiniuose, laikytuose tose pačiose sąlygose. Šiuo atveju valgomoji danga dėl barjerinių savybių sulėtino drėgmės išgaravimą iš pjaustytų obuolių.

Mėginiams, laikytiems 4 ± 1 °C temperatūroje šaldytuve, danga teigiamo poveikio nepadarė pirmas dvi bandinių laikymo paras. Tačiau po trečios paros laikymo kontroliniuose bandiniuose drėgmės kiekis sumažėjo iki $71,81\pm 0,14$ % ir buvo 6 % mažesnis nei danga dengtuose bandiniuose.

Taigi, dvisluoksnė danga turėjo teigiamą poveikį šviežių pjaustytų obuolių fizikiniams cheminiams pokyčiams jų laikymo metu. Priklausomai nuo aplinkos sąlygų ji sumažino obuolių parudavimą, paviršinio sluoksnio sukietėjimą bei drėgmės nuostolius ir išsaugojo didesnę kiekį fenolinių junginių laikymo metu.

3.2.2. Išrūgų baltymų dangos, susidariusios elektriniame lauke, įtaka šviežių pjaustytų obuolių fizikiniams cheminiams pokyčiams laikymo metu

Eksperimento tikslas buvo rasti greitesnę dangos ant obuolių paviršiaus nudžiūvimo būdą. Tam naudota elektrodų sistema „laidas šalia plokštumos“ (elektrodų skersmuo 0,05 mm, atstumas iki plokštumos 12,0 mm), kurioje 8 kV elektrinės įtampos sukurtas elektrinis laukas sukuria oro srautą. Oro srovė teka vidutiniškai 2,5 m/s greičiu statmenai ir lygiagrečiai paviršiaus plotui, todėl hidrodinaminiai procesai veikiant tokiam oro srautui vyksta sparčiau (Marciulionis ir Zebrauskas, 2011).

Eksperimentui švieži pjaustyti obuoliai buvo padengti dvisluoksne danga IB/S | CHIT, kuri ant obuolių gabalėlių buvo suformuota dviem skirtingais būdais: 1) džiovinant dangos tirpalą oro srautu (toliau – o.s.), 2) džiovinant dangos tirpalą elektriniame lauke (toliau – e.l.). Kontroliniai bandiniai be plėvelės buvo paruošti analogiškai: apdorojant juos oro srautu ar elektriniame lauke. Paruošti bandiniai buvo laikyti 21 ± 1 °C temperatūroje 75 % RH aplinkoje.

Nustatyta (3.13 lent.), kad viso tyrimo metu kontrolinių bandinių, apdorotų elektriniu lauku (kontrolė e.l.), šviesumas buvo didesnis nei kontrolinių bandinių, apdorotų oro srautu (kontrolė o.s.). O obuolių bandinių su danga, džiovinta oro srautu (su dvisluoksne danga o.s.) ar elektriniame lauke (su dvisluoksne danga e.l.), šviesumas nesiskyrė. Todėl galima teigti, kad dvisluoksnės dangos džiovinimo būdas obuolių paviršiaus šviesumui įtakos nepadarė. Elektrinio lauko paveiktas kontrolinių bandinių paviršius galėjo išlikti šviesesnis dėl dviejų priežasčių. Veikiant elektrinio lauko sukurtam oro srautui drėgmė išgaravo iš obuolio paviršinio sluoksnio ir jo paviršiuje susidarė natūralus apsauginis sluoksnis, blokavęs deguonies patekimą į obuolio gilesnius audinius ir fenolinius junginius apsaugojęs nuo oksidacijos. Antroji priežastis gali būti elektrinio lauko aplinka, kurioje fermentinio rudavimo reakcijas inicijuojantys fermentai galėjo būti inaktyvuoti (Castro et al., 2004).

Fenolinių junginių tyrimų duomenys rodo, kad pjaustytuose obuoliuose be dangos (kontrolė o.s.) bendras fenolinių junginių kiekis po 24 val. laikymo 21 ± 1 °C temperatūroje 75 % RH aplinkoje buvo mažesnis nei bandiniuose be dangos, apdorotuose elektriniame lauke (kontrolė e.l.). Galima daryti prielaidą, jog fenoliniai junginiai „kontrolė e.l.“ bandiniuose oksidavosi lėčiau, nes elektrinio lauko sukuriamas oro srautas greičiau suformavo natūralų apsauginį paviršinį sluoksnį,

kuris ekranavo deguonies molekules. Dėl to fenolinių junginių kiekis juose buvo didesnis.

3.13 lentelė. Fizikiniai cheminiai pokyčiai pjaustyuose obuoliuose, dengtuose skirtingu būdu suformuota dvisluoksne danga

Dangos sudėtis	Laikymo trukmė, val.				
	0	1	5	24	48
	Šviesumas, skalės vienetai *				
Kontrolė o.s.	63,90±1,04 ^a	60,55±2,23 ^{abA}	57,33±1,71 ^{bA}	52,14±2,24 ^{cA}	47,08±2,85 ^{dA}
Kontrolė e.l.		60,95±1,60 ^{aA}	58,63±1,16 ^{abA}	55,32±0,14 ^{bAB}	50,90±0,46 ^{cAB}
Su dvisluoksne danga o.s.		64,17±0,93 ^{aAB}	64,04±0,11 ^{aB}	58,43±0,79 ^{bB}	53,58±0,69 ^{cB}
Su dvisluoksne danga e.l.		66,23±0,58 ^{abB}	64,37±1,34 ^{abB}	58,78±1,21 ^{bB}	53,17±1,87 ^{bB}
	Fenolinių junginių kiekis, mg/100 g SM *				
Kontrolė o.s.	549,52±27,47 ^a	-	-	439,74±21,99 ^{bA}	291,65±14,58 ^{cA}
Kontrolė e.l.		-	-	462,45±23,12 ^{aA}	112,99±5,65 ^{bB}
Su dvisluoksne danga o.s.		-	-	477,27±23,86 ^{aA}	397,57±19,88 ^{aC}
Su dvisluoksne danga e.l.		-	-	465,12±23,26 ^{aA}	111,23±5,56 ^{bB}
	Paviršinio sluoksnio mechaninis tvirtumas, N **				
Kontrolė o.s.	157±7 ^a	115±5 ^{bAB}	120±9 ^{bAC}	109±5 ^{bcA}	83±13 ^{cA}
Kontrolė e.l.		188±19 ^{aA}	172±15 ^{aB}	76±11 ^{bAB}	50±7 ^{cB}
Su dvisluoksne danga o.s.		97±12 ^{aB}	103±5 ^{aA}	70±8 ^{bB}	45±9 ^{cB}
Su dvisluoksne danga e.l.		125±9 ^{abAB}	130±7 ^{aC}	87±15 ^{bAB}	48±6 ^{cB}
	Drėgmės kiekis, % *				
Kontrolė o.s.	87,52±0,56 ^a	87,12±0,64 ^{aA}	85,67±1,04 ^{aA}	76,55±2,13 ^{bA}	40,63±4,64 ^{cA}
Kontrolė e.l.		86,51±0,66 ^{aA}	86,46±0,01 ^{aA}	79,35±0,09 ^{bA}	53,75±3,21 ^{cA}
Su dvisluoksne danga o.s.		87,95±0,44 ^{aA}	87,01±0,46 ^{aA}	77,35±0,98 ^{bA}	54,41±2,09 ^{cA}
Su dvisluoksne danga e.l.		86,37±0,23 ^{aA}	86,30±0,38 ^{aA}	77,42±0,21 ^{bA}	53,79±1,78 ^{cA}

a, b, c, d, e, f, g – eilutėse skirtingomis mažosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, * Tukey, ** Dunnett C);

A, B, C, D, E, F, G – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, * Tukey, ** Dunnett C).

Tačiau bandiniuose, paveiktuose elektriniu lauku (kontrolė e.l.), fenolinių junginių kiekis po 48 val. laikymo buvo 2,5 karto mažesnis nei bandiniuose, paveiktuose oro srautu. Tam įtakos galėjo turėti elektriniame lauke apdoravimo metu susidaręs ozonas, kuris, prasiskverbęs pro natūralų apsauginį paviršinį sluoksnį, oksidavo fenolinius junginius. Bandiniuose „su dvisluoksne danga o.s.“ ir „su

dvisluoksne danga e.l.“ fenolinių junginių kiekis po 24 val. mažai skyrėsi nuo “kontrolė e.l.”. Tačiau po 48 val. elektriniame lauke apdorotų bandinių su danga fenolinių junginių kiekis buvo mažesnis 3,5 karto nei oro srautu apdorotuose bandiniuose su danga.

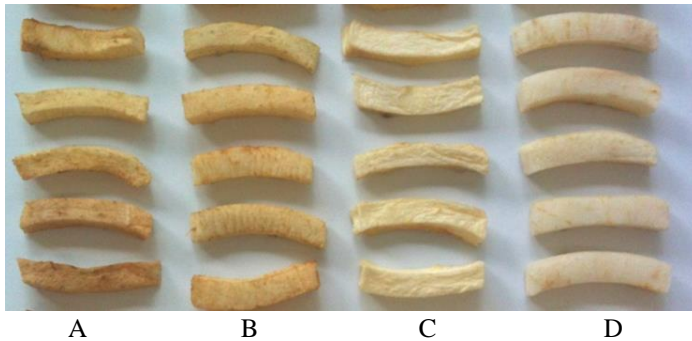
Analizuojant pjaustytų obuolių paviršiaus mechaninio tvirtumo rezultatus matyti, kad praėjus 5 val. po obuolių apdorojimo oro srautu ar elektriniame lauke, tvirčiausias buvo obuolių be dangos, apdorotų elektriniame lauke (kontrolė e.l.), paviršinis sluoksnis. Veikiant elektriniam laukui vandens molekulės iš obuolių paviršiaus pasišalino greičiau, dėl to bandinio paviršiuje susiformavo natūralus tvirtas apsauginis paviršius. Praėjus dar 19 val., šie bandiniai pirminį tvirtumą buvo praradę, nes iš bandinių gilesnių sluoksnių migravus vandens molekulėms, arčiau išorės esantys audiniai suminkštėjo. Bandinių su dvisluoksne danga, suformuota o.s. ar e.l., paviršiaus tvirtumas buvo mažesnis nei kontrolinių bandinių per pirmas 5 val. Per šį laiką bandinių paviršiuje susiformavo tvirta dvisluoksnė danga. Nepaisant to, laikymo metu danga dengtuose bandiniuose paviršinio sluoksnio tvirtumas mažėjo, manoma, dėl drėgmės migracijos iš obuolių gabalėlių vidinių audinių.

Drėgmės kiekio bandiniuose tyrimo rezultatai rodo, jog didelių pokyčių per pirmąsias 5 val. visuose bandiniuose neįvyko. Po 24 val. laikymo bandiniuose drėgmės sumažėjo vidutiniškai 10 % lyginant su pradiniu drėgmės kiekiu šviežiuose pjaustytuose obuoliuose. Tačiau po 48 val. buvo nustatyta daugiau drėgmės sumažėjimo. „Kontrolinio o.s.“ bandinio drėgmės kiekis lyginant su kitais bandiniais sumažėjo daugiausia, t. y. 47 %, kai visuose kituose bandiniuose tuo metu jis sumažėjo vidutiniškai 34 %. Tačiau skirtumas tarp skirtingų bandinių drėgmės kiekio po 48 val. nebuvo statistiškai reikšmingas. Tiek bandinių apdorojimas elektriniame lauke, tiek dvisluoksnės dangos, nepriklausomai nuo jų džiovavimo būdo, išsaugojo 13 % drėgmės obuoliuose, išlaikytuose 48 val. 21 ± 1 °C temperatūroje 75 % RH aplinkoje.

Įvertinus visų tyrimų rezultatus galima daryti išvadą, jog šviežių pjaustytų obuolių apdorojimas elektriniame lauke gali apsaugoti juos nuo spartaus parudavimo ir drėgmės nuostolių. Elektriniame lauke išdžiovinta danga didesnių apsauginių savybių pjaustytų obuolių fizikiniams cheminiams pokyčiams laikymo metu nesuteikė. Tačiau eksperimento metu nustatyta, jog dangos ant bandinių greičiau susiformavo džiovinant elektriniame lauke nei džiovinant oro srautu. Todėl eksperimento pabaigoje buvo atliktas vizualus tyrimas dangų, suformuotų ant bandinių elektriniame lauke per 30 min (pirmas dangos sluoksnis buvo džiovinamas 10 min, antras – 20 min) ir elektriniame lauke kartu su oro srautu per 15 min (pirmas dangos sluoksnis buvo džiovinamas 5 min, antras – 10 min). 3.12 pav. yra pateiktas vizualinio tyrimo rezultatas.

Vizualiai *D* bandiniai su danga, džiovinama oro srautu kartu veikiant elektriniam laukui, buvo šviesesni nei *A* ir *B* bandiniai be dangos, o *D* bandiniai nesiskyrė nuo *C* bandinių su danga, džiovinama vien elektriniame lauke. Dėl to daroma prielaida, jog dangai ant *D* bandinių susiformuoti pakako 15 min, kad obuolių paviršius būtų apsaugotas nuo fermentinio parudavimo (vertinant vizualiai). Norint ištirti dangos, suformuotos džiovinant oro srautu elektriniame lauke (o.s. +

e.l.), poveikį šviežių obuolių fizikiniams cheminiams pokyčiams laikymo metu, reikia atlikti naujų tyrimų.



3.12 pav. Obuolių bandiniai po 48 val. laikymo 21 ± 1 °C temperatūroje 75 % RH aplinkoje: A – kontrolė o.s., B – kontrolė e.l., C – su dvisluoksne danga e.l., D – su dvisluoksne danga o.s.+e.l.

Atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad IB su S ir CHIT dvisluoksne danga gali apsaugoti šviežiai pjaustytus obuolius nuo fermentinio parudavimo 12 val. laikant juos 21 ± 1 °C temperatūroje nekontroliuojamo RH aplinkoje, 14 val. – 21 ± 1 °C temperatūroje 75 % RH aplinkoje, ir 24 val. – 4 ± 1 °C temperatūroje šaldytuve. Dvisluoksne danga gali sumažinti pjaustyto obuolių drėgmės nuostolius 12 % laikant juos 21 ± 1 °C temperatūroje nekontroliuojamo RH aplinkoje 24 val., 14 % laikant juos 21 ± 1 °C temperatūroje 75 % RH aplinkoje 48 val. ir 6 % laikant pjaustytus obuolius 4 ± 1 °C temperatūroje šaldytuve 72 val. Dangos džiovavimo būdas obuolių šviesumui įtakos nedaro, tačiau greitesnis dangos susidarymas ant pjaustyto obuolių paviršiaus padeda geriau apsaugoti juos nuo aplinkos poveikio laikant 21 ± 1 °C temperatūroje 75 % RH aplinkoje. Remiantis tyrimo rezultatais buvo sukurta prototipinė šviežių pjaustyto obuolių dengimo valgomoji danga technologija (Priedas 1).

3.2.3. Išrūgų baltymų ir chitozano valgomųjų dangų su funkciniais priedais įtaka mikroskopinio grybo *Penicillium expansum* augimui obuoliuose

Mikroskopinis grybas *Penicillium expansum* yra viena iš pagrindinių priežasčių, sukeliančių šviežių vaisių, daugiausia obuolių, ir jų produktų gedimą. Šis gedimas pasireiškia mėlynojo pelėsio augimu vaisių audiniuose (Baert et al., 2012; Chen, Ingham ir Ingham, 2004). *Penicillium expansum* buvimas maiste sukelia ne tik didelių ekonominių nuostolių, bet ir riziką žmonių sveikatai dėl mikotoksino patulino gamybos (Morales et al., 2008); patulinas sukelia didelę žalą ne tik mažų vaikų, bet ir suaugusių žmonių organizmams (Brandon et al., 2012).

Daugelyje šalių mikotoksino patulino kiekis maiste yra reguliuojamas, o Europos sąjungoje maksimalus jo leistinas kiekis vaisių sultyse, nektaruose, fermentuotuose obuolių gėrimuose yra 50 µg/kg produkto, obuoliuose – 25 µg/kg obuolių, obuolių turinčiuose produktuose, skirtuose vaikų mitybai, – 10 µg/kg

produkto (KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 1425/2003⁴; KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 1881/2006⁵; Tannous et al., 2014).

Siekiant sumažinti *Penicillium expansum* žalos riziką, buvo atliktas tyrimas, kurio metu nustatytas IB/CHIT ir CHIT valgomųjų plėvelių ir dangų su svarainių ir spanguolių sultimis inhibitorinis poveikis šio mikroskopinio grybo augimui modelinėje sistemoje, pagamintoje iš obuolių tyrės ir natūralioje sistemoje – obuoliuose. Plėvelių ir dangų inhibitorinis poveikis pasireiškia mikroskopinio grybo augimo greičio arba jo populiacijos sumažėjimu bei pailgėjusia jo augimo lag faze (Quintavalla ir Vicini, 2002).

Plėvelių antimikrobinis poveikis prieš mikroskopinį grybą obuolių modelinėje sistemoje

Šiame etape buvo siekiama surasti būdus, kaip padidinti plėvelių slopinantį poveikį *Penicillium expansum* augimui. Remiantis difuzijos į agarą metodu gautais rezultatais apie plėvelių su svarainių ir spanguolių sultimis antimikrobinį poveikį, toliau tirtas šių plėvelių poveikis mikroskopinio grybo augimui obuoliuose. Pirmiausia tyrimai atlikti su modeline sistema, pagaminta iš mikroskopiniu grybu užkrėstos obuolių tyrės-agaro terpės. Ant sustingusios terpės paviršaus buvo uždėtos skirtingos sudėties valgomosios plėvelės. Tokiu būdu mikroskopiniam grybui buvo sukurta modifikuota atmosfera su mažesniu deguonies kiekiu ir bioaktyviųjų junginių slopinančiu poveikiu. Šios modifikuotos atmosferos įtaka mikroskopinio grybo augimui nustatyta išmatuojant laiką iki jo susisporuliavimo ant terpės (3.14 lent.).

Greičiausiai mikroskopinio grybo augimas buvo pastebėtas kontroliniame bandinyje be plėvelės, kuriame sporos susidarė jau po 3 parų. CHIT plėvelės su svarainių sultimis mikroskopinio grybo sporų atsiradimą sulaukė 1–6 paras, o IB/CHIT plėvelės su šiomis sultimis buvo mažiau veiksmingos ir mikroskopinio grybo sporuliaciją sulaukė daugiausiai 2 paras.

Efektyviausios prieš mikroskopinio grybo sporų susidarymą buvo chitozano plėvelės su 2 ir 3 kartus didesniu spanguolių sulčių SM kiekiu. Spanguolių sultyse, lyginant su svarainių sultimis, nėra sorbo rūgšties, tačiau didelis kiekis benzenkarboksirūgšties ir antocianinų labai gerai nuslopino *Penicillium expansum* (sporos nesusidarė per visą tyrimo laikotarpį, t. y. 11 parų). Svarainių sultyse yra daugiau askorbo rūgšties, tačiau plėvelėse su šiomis sultimis, askorbo rūgšties poveikis mikroskopiniam grybui buvo mažas. Galima daryti išvadą, jog antocianinai ir benzenkarboksirūgštis yra efektyvesni prieš mikroskopinio grybo augimą nei askorbo rūgštis. Mažiausias efektyvus benzenkarboksirūgšties kiekis plėvelės tirpale buvo 91,07 mg/100 g, o antocianinų – 12,65 mg/100 g.

⁴ KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 1425/2003, 2003 m. rugpjūčio 11 d., iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 466/2001 dėl patulino.

⁵ KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 1881/2006, 2006 m. gruodžio 19 d., nustatantis didžiausias leistinas tam tikrų teršalų maisto produktuose koncentracijas.

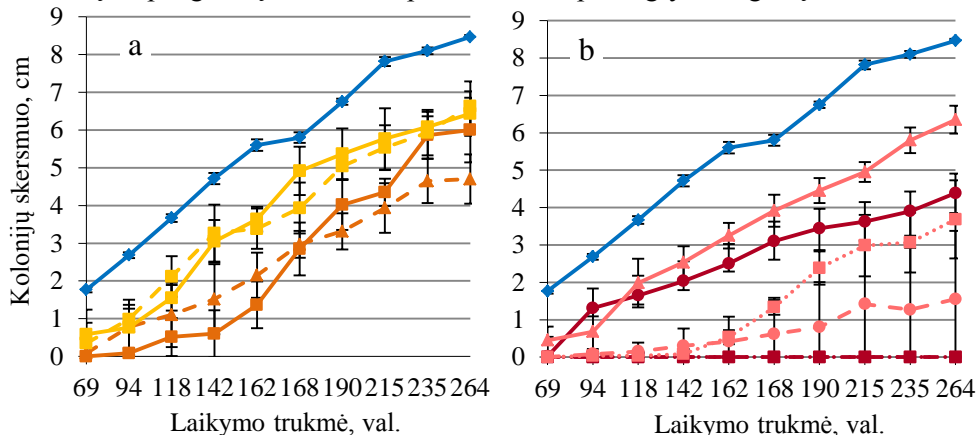
3.14 lentelė. *Penicillium expansum* sporuliavimosi modelinėje obuolių sistemoje pradžios laiko priklausomybė nuo plėvelių sudėties

Plėvelės sudėtis	<i>P. expansum</i> sporuliavimosi pradžia	
	Trukmė, para	
Kontrolė	3	
CHIT(Sva 1:16)	6–9	
CHIT(Sva 2:15)	4–6	
IB/CHIT(Sva 1:16)	3–5	
IB/CHIT(Sva 2:15)	3–4	
CHIT(Spa 1:19)	5	
CHIT(Spa 2:18)	>11	
CHIT(Spa 3:17)	>11	
IB/CHIT(Spa 1:19)	3–5	
IB/CHIT(Spa 2:18)	5–11*	
IB/CHIT(Spa 3:17)	8*	

* – 33 % bandinių nesusisporuliuo per visą tyrimo laiką.

Chitozono plėvelės su natūraliomis Spa sultimis mikroskopinio grybo sporuliaciją slopino 2 paras, o į sistemą įdėjus IB, antimikrobinis poveikis sumažėjo. Tačiau pastarosiose didinant spanguolių sulčių SM kiekį, sporos pradėjo formotis vėliau – po 2–8 parų.

Analizuojant modelinėje sistemoje užaugusių *Penicillium expansum* kolonijų skersmens priklausomybę nuo laiko (3.13 pav. a ir b) matyti, kad didžiausios mikroskopinio grybo kolonijos užaugo kontroliniuose bandiniuose, o plėvelės su svarainių ir spanguolių sultimis slopino mikroskopinio grybo augimą.



3.13 pav. Plėvelių su sultimis poveikis *Penicillium expansum* kolonijų dydžiui modelinėje sistemoje. —◆— kontrolė; (a) —■— CHIT(Sva 1:16), —▲— CHIT(Sva 2:15), —■— IB/CHIT(Sva 1:16), —■— IB/CHIT(Sva 2:15); (b) —●— CHIT(Spa 1:19), —■— CHIT(Spa 2:18), —●— CHIT(Spa 3:17), —▲— IB/CHIT(Spa 1:19), —●— IB/CHIT(Spa 2:18), —■— IB/CHIT(Spa 3:17)

3.15 lentelėje pateikti duomenys rodo, jog kontroliniame bandinyje *Penicillium expansum* augimo lag fazė buvo trumpiausia, o greitis – didžiausias lyginant su bandiniais, dengtais valgomosiomis plėvelėmis su sultimis. Plėvelės su sultimis slopino *Penicillium expansum* augimą, o slopinančios savybės priklausė nuo sulčių rūšies bei keliais atvejais ir nuo jų SM kiekio plėvelėje.

3.15 lentelė. *Penicillium expansum* augimo modelinėje sistemoje priklausomybė nuo valgomųjų plėvelių sudėties

Plėvelės sudėtis	<i>P. expansum</i> augimo lag fazė	<i>P. expansum</i> augimo greitis	<i>P. expansum</i> augimo slopinimas
	h	mm/h	%
Kontrolė	28±12 ^C	0,33±0,5 ^C	-
CHIT(Sva 1:16)	123±21 ^A	0,16±0,02 ^A	32,6±11,2 ^A
CHIT(Sva 2:15)	107±17 ^A	0,17±0,03 ^A	44,5±7,5 ^A
IB/CHIT(Sva 1:16)	98±15 ^A	0,19±0,30 ^A	21,0±7,1 ^B
IB/CHIT(Sva 2:15)	54±14 ^B	0,19±0,03 ^A	21,6±7,6 ^B
CHIT(Spa 1:19)	51±14 ^B	0,11±0,02 ^A	48,2±5,8 ^A
CHIT(Spa 2:18)	0 ^D	0,0 ^D	100,0 ^D
CHIT(Spa 3:17)	0 ^D	0,0 ^D	100,0 ^D
IB/CHIT(Spa 1:19)	115±18 ^A	0,14±0,02 ^A	25,0±4,2 ^B
IB/CHIT(Spa 2:18)	152±25 ^A	0,03±0,01 ^B	81,7±18,3 ^C
IB/CHIT(Spa 3:17)	159±20 ^A	0,04±0,01 ^B	56,5±11,4 ^A

A, B, C, D – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey).

Penicillium expansum augimo lag fazė ir augimo greitis bandiniuose su CHIT(Sva 1:16) ir CHIT(Sva 2:15) plėvelėmis skyrėsi mažai, o CHIT(Sva 2:15) plėvelės slopinimo poveikis buvo nustatytas didesnis. Tačiau šiuose bandiniuose mikroskopinio grybo augimo ir jo slopinimo parametrų skirtumai lyginant tarpusavyje buvo statistiškai nereikšmingi. Panašūs skirtumai buvo pastebėti ir tarp bandinių su IB/CHIT(Sva 1:16) ir IB/CHIT(Sva 2:15) plėvelėmis.

CHIT(Sva) ir IB/CHIT(Sva) plėvelėmis dengtuose bandiniuose statistiškai reikšmingų skirtumų tarp mikroskopinio grybo augimo lag fazės ir greičio nebuvo nustatyta, tačiau CHIT(Sva) jo augimą slopino daug stipriau, t. y. 32,6±11,2 % ir 44,5±7,5 % nei IB/CHIT(Sva), t. y. 21,0±7,1 % ir 21,6±7,6 %, o skirtumai tarp šių parametrų buvo statistiškai reikšmingi. Stipresnį *Penicillium expansum* augimo slopinimą bandiniuose su CHIT(Sva) plėvelėmis galėjo sukelti plėvelėse esantis dvigubai didesnis chitozano kiekis, tačiau plėvelėse svarainių sulčių dvigubai didesnis SM kiekis neturėjo tam įtakos.

Lyginant visus bandinius, padengtus plėvelėmis su spanguolių sultimis, galima teigti, jog mikroskopinio grybo lag fazė ir plėvelių slopinimo poveikis juose didėjo, o augimo greitis mažėjo didėjant plėvelėse spanguolių sulčių SM kiekiui. *Penicillium expansum* augimo šiuose bandiniuose parametrai dažniausiai skyrėsi statistiškai reikšmingai. Bandiniuose, padengtuose IB/CHIT plėvelėmis su du ir tris

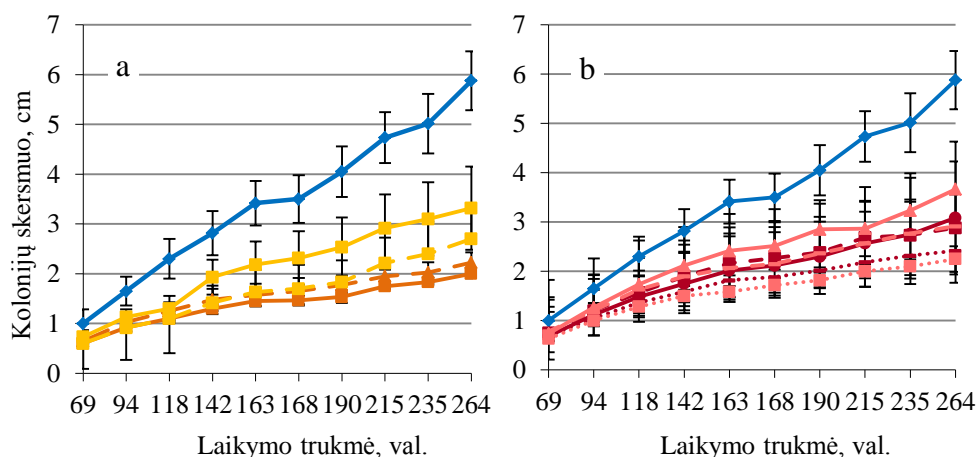
kartus didesniu spanguolių sulčių SM kiekiu, mikroskopinio grybo augimo greitis buvo atitinkamai 0,03 ir 0,04 mm/h, o bandiniuose, padengtuose CHIT plėvelėmis su tokiu sulčių SM kiekiu, mikroskopinis grybas neužaugo viso eksperimento metu, t. y. 11 parų. Todėl galima teigti, jog *Penicillium expansum* augimo modelinėje sistemoje greitį labiau stabdė CHIT ir IB/CHIT plėvelės su spanguolių sultimis nei su svarainių sultimis. Tam įtakos galėjo turėti spanguolių sultyse esančios veikliosios medžiagos, t. y. antocianinai ir beveik 7 kartus didesnis benzenkarboksirūgšties kiekis (2.5 lent.). Organinės rūgštys mikroorganizmams sukelia osmosinį šoką, o antocianinai ir kiti fenoliniai junginiai suardo jų ląstelių sienelės (Lacombe et al., 2010). Svarainių sultyse yra didesnis kiekis sorbo ir askorbo rūgščių. Kitų mokslinių tyrimų rezultatai rodo, jog spanguolių fenoliniai junginiai efektyviai slopina Gram teigiamų ir Gram neigiamų bakterijų (Cote et al., 2011), mikroskopinių grybų (Vedenskaya ir Vorsa, 2004) bei kai kurių patogeninių mikroorganizmų veiklą (Caillet et al., 2012; Wu et al., 2008). O svarainių ekstraktai antimikrobinį poveikį turi *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Bacillus cereus* bakterijoms (Fattouch et al., 2007).

Bandiniuose, dengtuose CHIT ir IB/CHIT plėvelėmis su spanguolių sultimis, kurių SM kiekis buvo du (Spa 2:18) ir tris (Spa 3:17) kartus didesnis nei natūraliose sultyse, tarp *Penicillium expansum* augimo parametrų statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo. Todėl galima teigti, jog plėvelės su dvigubai didesniu spanguolių sulčių SM kiekiu maksimaliai slopino mikroskopinio grybo augimą, o jų veikliosios medžiagos kartu su chitozanu turėjo sinergistinį inhibitorinį poveikį.

Plėvelių antimikrobinis poveikis prieš mikroskopinį grybą obuoliuose

Valgomųjų plėvelių su sultimis antimikrobinis poveikis obuoliuose, t. y. natūraliomis sąlygomis buvo tirtas įsvirkščiant *Penicillium expansum* kultūros suspensijos į obuolius ir uždengiant užkrėtimo vietas skirtingos sudėties valgomosiomis plėvelėmis. Mikroskopiniu grybu užkrėsti obuoliai buvo laikyti 25 °C temperatūroje 11 parų ir vizualiai stebėtas mikroskopinio grybo augimas bandinių paviršiuje bei nustatyti jo augimo parametrai. Didžiausias mikroskopinio grybo pažeistas plotas susiformavo kontroliniame bandinyje be plėvelės. Po IB/CHIT plėvelėmis su sultimis mikroskopinio grybo obuoliuose pažeistas plotas buvo mažesnis už kontrolinio bandinio, o mažiausias – bandiniuose, padengtuose CHIT plėvelėmis su svarainių sultimis. Šiuos rezultatus patvirtina ir 3.14 pav. a ir b bei 3.16 lentelėje pateikti duomenys.

Kaip modelinėje sistemoje, taip ir natūralioje sistemoje CHIT ir IB/CHIT plėvelės lėtino mikroskopinio grybo augimo greitį. Bandiniuose, dengtuose plėvelėmis su svarainių sultimis, jis buvo 0,07–0,11 mm/h, su spanguolių sultimis – 0,08–0,18 mm/h. Lyginat su kontroliniu bandiniu (0,22 mm/h) šie mikroskopinio grybo augimo greičiai buvo statistiškai patikimai mažesni. Mokslininkai (Li et al., 2015) taip pat nustatė chitozано dangų teigiamą poveikį *Penicillium expansum* augimo slopinimui ant obuolių. Laikant mikroskopiniu grybu užkrėstus obuolius 10 ir 15 dienų, chitozано dangos sulėtino mikroskopinio grybo augimo zonos skersmenį atitinkamai 19,1 % ir 37,7 %.



3.14 pav. Plėvelių su sultimis poveikis *Penicillium expansum* kolonijų dydžiui obuoliuose.

—◆— kontrolė; (a) —■— CHIT(Sva 1:16), —▲— CHIT(Sva 2:15),
 —■— IB/CHIT(Sva 1:16), —■— IB/CHIT(Sva 2:15); (b) —●— CHIT(Spa 1:19),
 —■— CHIT(Spa 2:18), —●— CHIT(Spa 3:17), —▲— IB/CHIT(Spa 1:19),
 —●— IB/CHIT(Spa 2:18), —■— IB/CHIT(Spa 3:17)

3.16 lentelė. *Penicillium expansum* augimo obuoliuose priklausomybė nuo valgomųjų plėvelių sudėties

Plėvelės sudėtis	<i>P. expansum</i> augimo lag fazė	<i>P. expansum</i> augimo greitis	<i>P. expansum</i> augimo slopinimas
	h	mm/h	%
Kontrolė	55±17 ^C	0,22±0,03 ^C	-
CHIT(Sva 1:16)	124±22 ^A	0,07±0,03 ^A	70,2±3,9 ^A
CHIT(Sva 2:15)	127±25 ^A	0,09±0,04 ^A	69,1±3,5 ^A
IB/CHIT(Sva 1:16)	94±16 ^{AB}	0,11±0,03 ^{AB}	50,5±7,8 ^B
IB/CHIT(Sva 2:15)	120±18 ^{AB}	0,11±0,03 ^{AB}	60,2±6,5 ^B
CHIT(Spa 1:19)	87±12 ^B	0,13±0,04 ^{AB}	53,1±5,7 ^B
CHIT(Spa 2:18)	85±10 ^B	0,13±0,05 ^{AB}	57,9±7,2 ^B
CHIT(Spa 3:17)	89±12 ^{AB}	0,18±0,03 ^B	64,1±11,4 ^{AB}
IB/CHIT(Spa 1:19)	98±20 ^{AB}	0,12±0,04 ^{AB}	44,5±3,4 ^B
IB/CHIT(Spa 2:18)	93±22 ^{AB}	0,10±0,03 ^{AB}	56,4±5,1 ^B
IB/CHIT(Spa 3:17)	94±18 ^{AB}	0,08±0,04 ^A	66,1±1,8 ^{AB}

A, B, C – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey).

Mikroskopinio grybo augimo lag fazė bandiniuose su plėvelėmis (3.16 lent.) buvo reikšmingai ilgesnė, tačiau šioje sistemoje, priešingai nei modelinėje sistemoje, plėvelės su Sva sultimis jai turėjo didesnę poveikį nei plėvelės su Spa sultimis. Reikšmingas skirtumas buvo nustatytas tarp CHIT plėvelių poveikio *Penicillium expansum* augimui ir slopinimui. Bandiniuose, padengtuose CHIT(Sva 1:16; 2:15) plėvelėmis, lag fazė buvo ilgesnė vidutiniškai 40 val. nei bandiniuose, padengtuose

CHIT(Spa 1:19; 2:18) plėvelėmis, o plėvelių su Sva slopinimas buvo vidutiniškai 14 % didesnis nei plėvelių su Spa. Tačiau didesnis sulčių SM kiekis reikšmingos įtakos inhibitoriniam poveikiui šiuose bandiniuose neturėjo.

IB/CHIT plėvelių su skirtingomis sultimis ir skirtingu jų SM kiekiu inhibitorinio poveikio reikšmingų skirtumų nebuvo nustatyta, todėl galima daryti išvadą, jog CHIT(Sva 1:16; 2:15) plėvelių slopinimas buvo didžiausias iš visų tirtų plėvelių obuolių natūralioje sistemoje. 3.14 pav. a ir b pateikti duomenys rodo, jog visos tirtos plėvelės šiomis sąlygomis slopino mikroskopinio grybo augimą obuoliuose, tačiau jo augimo visiškai sustabdyti nei vienu atveju nepavyko. Didžiausią slopinantį poveikį *Penicillium expansum* augimui padarė CHIT plėvelės su svarainių sultimis.

Tyrimų rezultatai rodo, kad chitozano arba IB ir chitozano mišinio su svarainių ar spanguolių sultimis valgomosios plėvelės efektyviai slopina *Penicillium expansum* augimą tiek modelinėje (obuolių tyrės), tiek ir natūralioje (obuoliuose) sistemoje. Modelinėje sistemoje plėvelių su spanguolių sultimis, kurios turi didesnę benzenkarboksirūgšties ir antocianinų kiekį, slopinantis poveikis yra didesnis nei plėvelių su svarainių sultimis. Tačiau natūralioje sistemoje didžiausią inhibitorinį poveikį turi chitozano plėvelės su svarainių sultimis.

3.2.4. Išrūgų baltymų valgomųjų dangų su funkciniais priedais įtaka šviežių braškių fizikiniams cheminiams pokyčiams laikymo metu

Šviežių braškių vartojimo trukmė laikant jas kambario temperatūroje yra vos kelios valandos arba laikant šaldytuve – 1–2 dienos, todėl ieškoma efektyvių jų apdorojimo būdų bei laikymo sąlygų norint kuo ilgiau išsaugoti šių uogų tinkamą vartoti kokybę (Viškelis, 2013).

Mokslininkai (Lowings ir Cutts, 1982) rašė, kad CO₂, O₂ ir etileno dujoms pusiau pralaidi danga ant šviežio vaisiaus, uogos ar daržovės sukuria jam modifikuotą atmosferą, kurioje sulėtėja produkto metabolitiniai procesai, nulemiantys jo nokimo spartą ir senėjimą. Ankstesnių tyrimų (Han et al., 2004; Hernandez-Munoz et al., 2008; Ribeiro et al., 2007; Vargas et al., 2006) rezultatai rodo, jog tam tikros sudėties dangos gali sulėtinti braškių džiūvimo procesą, sudarydamos barjerą vandens molekulėms pasišalinti iš produkto. Jos gali slopinti mikroskopinių grybų augimą, kai sudėtyje turi baktericidinėmis savybėmis pasižyminčių komponentų. Dangos gali daryti įtaką šviežių uogų kvėpavimo procesui selektyviai praleisdamos ir sulaikydamos skirtingos sudėties dujas, todėl gali stabdyti braškių metabolitinius procesus, apsaugoti uogas nuo deguonies žalingo poveikio ir tokiu būdu lėtinti jų nokimą ir gedimą (Reddy et al., 2000).

Šiame tyrimų etape, remiantis IB ir CHIT bei jų mišinių formuojamų plėvelių savybių tyrimų rezultatais, iškeltas tikslas – nustatyti IB ir CHIT dvisluoksnių valgomųjų dangų poveikį *Elkat* veislės braškėms 20 °C ir 4 °C temperatūroje ir 80 % RH laikymo sąlygomis.

Dangų įtaka braškių masės nuostoliams laikymo metu

Dvigubo sluoksnio IB ir CHIT bei jų mišinio dangos, suformuotos ant šviežių braškių paviršiaus, buvo vientisos, bespalvės ir blizgios. Uogų su eksperimentinėmis dangomis masės kitimas laikymo metu parodė (3.17 lent.), kad dangos sumažino uogų masės nuostolius. Po 1 paros laikymo 20 °C temperatūroje braškių be dangos masė sumažėjo 3,14 %, t. y. dvigubai daugiau nei braškės su skirtingos struktūros dangomis: IB/S | IB/S – 1,38 %, IB/S | CHIT – 1,54 %, IB/CHIT/S | IB/CHIT/S – 1,54 %. Valgomosios dangos stabdė vandens molekulių pernašą iš uogų audinių, todėl uogų masė mažėjo lėčiau. Tačiau reikšmingo poveikio tarp skirtingos sudėties dangų braškių masės nuostoliams nebuvo pastebėta.

Lyginant skirtingomis sąlygomis laikytus bandinius, nustatyta, jog efektyviau dangos saugojo uogas 20 °C temperatūroje nei 4 °C temperatūroje. Žemoje temperatūroje sulėtėja biocheminiai procesai, vykstantys dėl uogose esančių fermentų veiklos. Pastebėta, kad visų bandinių, laikomų žemoje temperatūroje, masės nuostoliai buvo mažesni. Po 10 dienų laikymo 4 °C temperatūroje braškių su dvisluoksne IB/CHIT/S | IB/CHIT/S danga masės nuostolis buvo mažiausias, nors 1–7 dienų laikymo periodu didelių skirtumų tarp skirtingos sudėties dangų apsauginio poveikio nebuvo pastebėta.

3.17 lentelė. Šviežių braškių su dvisluoksnėmis valgomosiomis dangomis masės sumažėjimas laikant 20 °C ir 4 °C temperatūroje 80 % RH aplinkoje, lyginant su pradine uogų mase

Dangos sudėtis	Masės skirtumas, ΔM, %					
	Laikymo trukmė, para					
	1	2	3	4	6	
20 °C temperatūroje						
Kontrolinis (be dangos)	3,14±0,67 ^{aA}	6,08±0,59 ^{bA}	8,97±1,05 ^{cA}	12,05±1,30 ^{cA}	18,23±2,30 ^{dA}	
IB/S IB/S	1,38±0,08 ^{aB}	5,06±0,96 ^{bB}	7,30±0,94 ^{cB}	9,90±1,33 ^{cdB}	15,93±3,02 ^{dB}	
IB/S CHIT	1,54±0,27 ^{aB}	4,64±0,58 ^{bB}	7,48±0,91 ^{cB}	10,13±1,20 ^{dB}	15,41±1,65 ^{eB}	
IB/CHIT/S IB/CHIT/S	1,54±0,17 ^{aB}	4,60±0,51 ^{bB}	7,49±0,88 ^{cB}	10,16±1,23 ^{dB}	15,27±1,56 ^{eB}	
4 °C temperatūroje						
	1	2	4	7	10	13
Kontrolinis (be dangos)	1,14±0,04 ^{aA}	2,41±0,32 ^{bAB}	4,96±0,06 ^{cA}	8,66±0,11 ^{dA}	12,30±0,22 ^{dA}	16,04±0,27 ^{eA}
IB/S IB/S	0,84±0,06 ^{aC}	2,21±0,22 ^{bB}	4,37±0,47 ^{cB}	7,75±0,92 ^{cAB}	11,55±1,57 ^{cdAB}	15,84±2,13 ^{dA}
IB/S CHIT	0,89±0,06 ^{aBC}	2,65±0,10 ^{bA}	5,28±0,39 ^{cA}	8,97±0,97 ^{cA}	11,93±1,07 ^{dA}	15,67±1,06 ^{eA}
IB/CHIT/S IB/CHIT/S	0,96±0,03 ^{aB}	2,19±0,16 ^{bB}	4,50±0,44 ^{cAB}	7,33±0,58 ^{dB}	10,03±0,74 ^{deB}	12,71±0,86 ^{eB}

a, b, c, d, e – eilutėse skirtingomis mažosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Dunnett T3).

A, B, C – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Dunnett T3).

Dangų įtaka braškių mechaninio paviršiaus tvirtumui laikymo metu

Uogų audinių tvirtumui laikymo metu didelę įtaką daro nuolat juose vykstančios fermentinės reakcijos veikiant endogeniniams fermentams, labiausiai poligalakturonazei ir celiulazei. Šie fermentai ardo ląstelių sienelių struktūrinius komponentus (pektiną, celiuliozę). Tokias reakcijas skatina aerobinio kvėpavimo metu susidarę laisvieji radikalai (Kon ir Schwimmer, 1977). Taip pat didelį poveikį audinių stangrumui turi drėgmės pasišalinimas iš ląstelių, kurios susitraukia sumažėjus jose turgorui (Bourne, 1983). Šie procesai intensyvėja uogoms nokstant.

Šviežių braškių paviršinio sluoksnio (odelės) mechaninio tvirtumo tyrimo rezultatai (3.18 lent.) parodė, kad po pirmos dienos laikymo 20 °C temperatūroje kontrolinių braškių odelės mechaninis tvirtumas sumažėjo nuo 141 iki 139 N, o 4 °C temperatūroje – sumažėjo iki 123 N, tačiau šie tvirtumo sumažėjimai nebuvo statistiškai reikšmingi.

3.18 lentelė. Skirtingos sudėties dangomis dengtų braškių paviršiaus sluoksnio mechaninis tvirtumas

Dangos sudėtis	Braškių paviršinio sluoksnio mechaninis tvirtumas, N				
	Laikymo trukmė, para				
	0	1	3	4	6
	20 °C temperatūroje				
Kontrolė	141±20 ^a	139±28 ^{aA}	141±25 ^{aA}	133±23 ^{aA}	136±21 ^{aA}
IB/S IB/S	-	146±29 ^{aA}	156±30 ^{aA}	154±33 ^{aA}	156±38 ^{aA}
IB/S CHIT	-	161±38 ^{aA}	175±39 ^{aA}	167±43 ^{aA}	164±39 ^{aA}
IB/CHIT/S IB/CHIT/S	-	158±35 ^{aA}	173±35 ^{aA}	166±27 ^{aA}	170±39 ^{aA}
	4 °C temperatūroje				
	0	1	7	10	13
Kontrolė	141±20 ^a	123±28 ^{aA}	133±23 ^{aA}	125±26 ^{aA}	114±21 ^{aB}
IB/S IB/S	-	148±28 ^{aA}	150±26 ^{aA}	163±30 ^{aA}	153±27 ^{aAB}
IB/S CHIT	-	146±26 ^{aA}	151±27 ^{aA}	166±34 ^{aA}	161±29 ^{aA}
IB/CHIT/S IB/CHIT/S	-	153±23 ^{aA}	145±32 ^{aA}	159±46 ^{aA}	152±29 ^{aAB}

^{a, b} – eilutėse skirtingomis mažosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Dunnett C).

^{A, B} – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Dunnet C).

Viso eksperimento metu dangomis dengtų braškių paviršius buvo tvirtesnis nei braškių be dangos. Šiuo atveju bandinių paviršiaus tvirtumui dangos turėjo dvigubą efektą. Pirma, ant braškės paviršiaus susiformavusios dangos lėtino drėgmės išgaravimą iš braškių audinių, dėl to audiniai išliko tvirtesni nei kontrolinių bandinių. Antra, pačios dangos yra mechaniškai stiprios ir suformavo tvirtą paviršinį apsauginį sluoksnį braškių paviršiuje. Taip pat pastebėta tendencija, jog braškių su įvairios sudėties valgomosiomis dangomis 20 °C temperatūroje paviršius tvirtėjo 3

paras, po to, pradėjo minkštėti, o laikytų 4 °C temperatūroje paviršiaus tvirtumas didėjo 10 parų, nors statistškai reikšmingų skirtumų tarp skirtingomis dangomis dengtų bandinių nebuvo. Statistiškai reikšmingas skirtumas buvo nustatytas tik tarp kontrolinių bandinių ir IB/S | CHIT danga dengtų braškių tvirtumo po 13 parų laikymo 4 °C temperatūroje. Vis tik galima daryti išvadą, kad dangos turi tendenciją išlaikyti ir sustiprinti braškių mechaninį paviršių jų laikymo metu tiek kambario, tiek šaldytuvo aplinkoje.

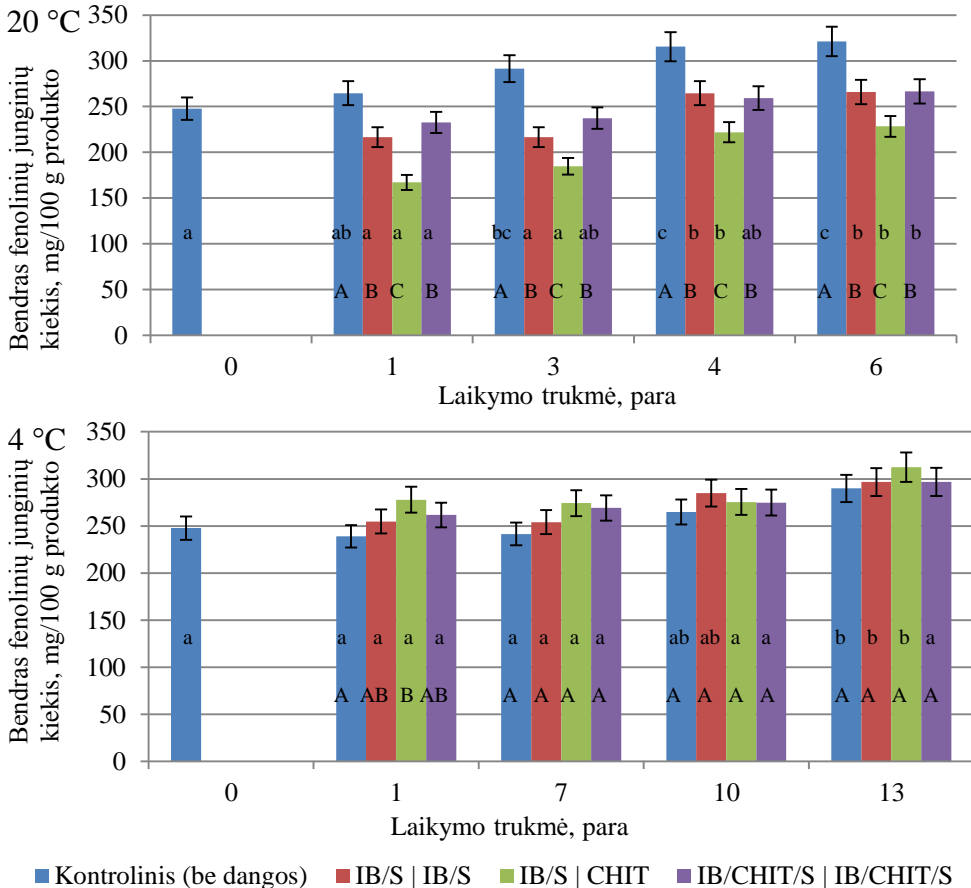
Dangu įtaka cheminiams pokyčiams braškėse laikymo metu

Uogoms augant ir nokstant jose vyksta intensyvūs biocheminiai procesai, kurių metu keičiasi uogų cheminių medžiagų sudėtis. Nokimo metu daugiausiai formuojasi įvairios biologiškai aktyvios medžiagos, pavyzdžiui, antioksidantai, kurių didžiausią dalį sudaro fenoliniai junginiai, askorbo rūgštis, apsaugantys uogas nuo mikroorganizmų, oksidacinio streso ir kitų aplinkos veiksnių žalingo poveikio (Korkina, 2007). Vieni iš svarbiausių flavonoidų grupei priklausančių fenolinių junginių yra antocianinai. Pagrindinis braškių antocianinas, suteikiantis uogoms raudoną spalvą, yra pelargonidin-3-O-gliukozidas (Aaby, Ekeberg ir Skrede, 2007), kurio kiekis uogose kinta priklausomai nuo uogų veislės, jų apdoravimo ir laikymo sąlygų (Kosar et al., 2004).

Tyrimo metu buvo nustatyta skirtingos sudėties dangu įtaka braškių bendram fenolinių junginių (3.15 pav.) ir antocianinų (3.16 pav.) kiekiui laikymo metu 20 °C ir 4 °C temperatūrų sąlygomis. Gauti rezultatai rodo, jog per 6 paras 20 °C temperatūroje danga nepadengtų braškių (kontrolė) bendras fenolinių junginių kiekis padidėjo nuo 247,7 iki 321,3 mg/100 g uogų, o antocianinų – nuo 36,8 iki 56,7 mg/100 g uogų. Braškių su skirtingos sudėties dangomis šių rodiklių vertės buvo daug mažesnės. Juose bendras fenolinių junginių kiekis pirmomis laikymo 20 °C temperatūroje paromis mažėjo arba nesikeitė ir tik po 3 paras pradėjo didėti, o po 6 parų svyravo nuo 228,3 mg/100 g (su IB/S | CHIT danga) iki 266,6 mg/100 g (su IB/CHIT/S | IB/CHIT/S danga). Antocianinai braškėse, dengtose IB/S | IB/S ir IB/CHIT/S | IB/CHIT/S dangomis, per pirmąsias paras didėjo, tačiau mažesniu kiekiu nei kontroliniuose bandiniuose. Po 6 parų antocianinų kiekis braškėse atitinkamai buvo 50,2 mg/100 g ir 50,6 mg/100 g uogų. Tačiau braškėse su IB/S | CHIT danga antocianinų kiekis pradžioje sumažėjo, o po 6 parų pasiekė tik 39,4 mg/100 g uogų lygį. Spartesnė fenolinių junginių, tarp jų ir antocianinų, sintezė braškėse be dangos (kontrolė) rodo, jog nokimo ir senėjimo procesai jose vyko greičiau nei braškėse su dangomis laikant uogas 20 °C temperatūroje.

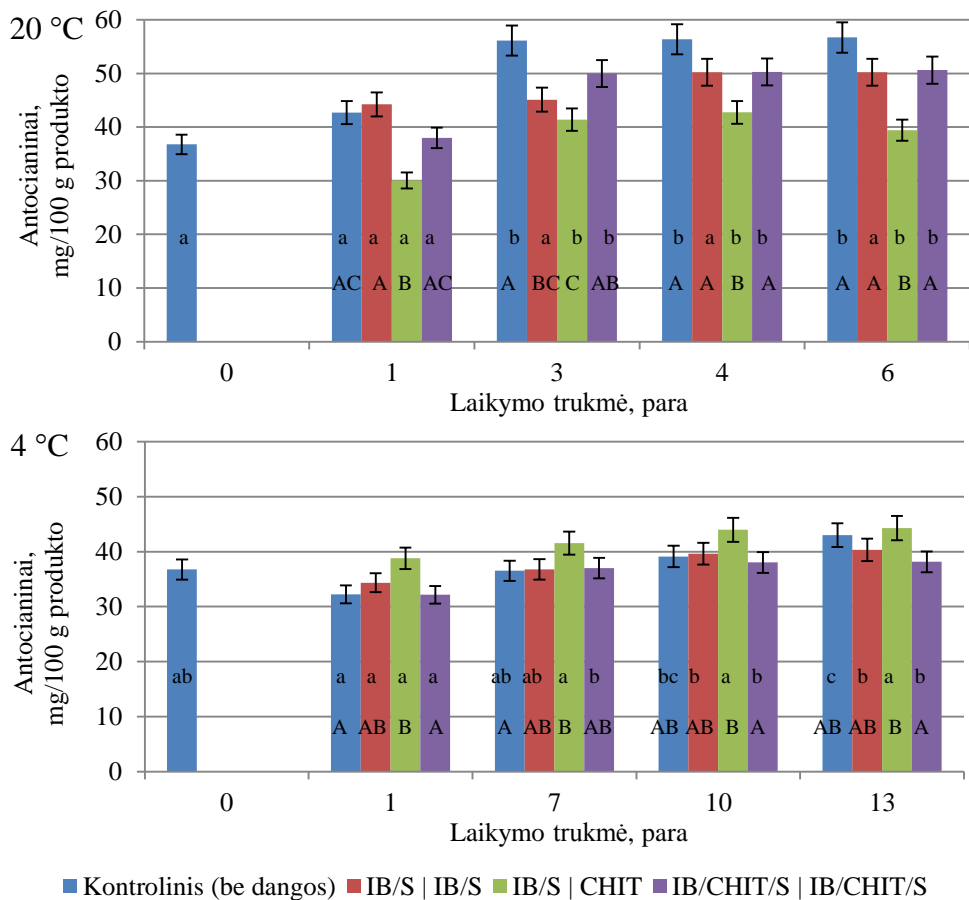
Žemoje temperatūroje sulėtėja braškių medžiagų apykaita, todėl fenolinių junginių pokyčiai uogose, laikytose 4 °C temperatūroje, buvo mažesni lyginant su šių medžiagų pokyčiais uogose 20 °C temperatūros sąlygomis (3.15 pav.). Temperatūros įtaką braškių cheminiams pokyčiams patvirtina (Ayala-Zavala et al., 2004; Kalt et al., 1999; Shin et al., 2007) mokslinių grupių tyrimai, kurių išvados teigiama, jog aukštesnėje temperatūroje laikyti vaisiai lyginant su žemoje temperatūroje laikytaisiais turi daugiau fenolinių junginių, antocianinų ir flavonoidų bei pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu. Žemesnėje temperatūroje uogų

kvėpavimo procesas yra lėtesnis, be to, šaltis joms sukelia stresą, dėl to sparčiau veikia uogų apsauginės funkcijos, kurių metu fenolinių junginių kiekis didėja lėčiau.



3.15 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis (mg/100 g) braškėse be dangos ir su skirtingos sudėties dangomis laikymo metu 20 °C ir 4 °C temperatūroje

Eksperimento rezultatai (3.15 pav.) rodo, jog pirmąsias 7 paras 4 °C temperatūroje visų bandinių fenolinių junginių kiekis mažai keitėsi, tačiau kontroliniuose bandiniuose jis buvo mažesnis nei dangomis dengtuose bandiniuose. Tai leidžia daryti išvadą, jog dangos sumažino braškių jautrumą šalčiui ir apsaugojo fenolinius junginius nuo destruktinių reakcijų, dėl to jų kiekis bandiniuose buvo didesnis nei kontroliniuose. Panašius rezultatus pastebėjo ir (Reddy et al., 2000) mokslininkų grupė, kuri nustatė teigiamą chitozono dangos poveikį braškių kokybei esant laikymo sąlygų temperatūrai 3 °C ir 13 °C.



3.16 pav. Antocianinų kiekis (mg/100 g) braškėse be dangos arba su skirtingos sudėties danga laikymo metu 20 °C ir 4 °C temperatūroje

a, b, c – diagramose skirtingomis mažosiomis raidėmis pažymėtų kiekvienos rūšies (vienodos spalvos diagramos stulpeliai) bandinių analizuotų rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey).

A, B, C – diagramose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtų kiekvienos dienos (vienos dienos bandinių grupė) bandinių analizuotų rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey).

Apibendrinant gautus rezultatus galima daryti išvadą, jog didžiausią poveikį braškių, laikytų 20 °C temperatūroje (kambario sąlygomis), nokimo procesui padarė dvisluoksnė IB/S | CHIT danga, kuri labiausiai sulėtino uogose fenolinių junginių sintezę. 4 °C temperatūroje (šaldytuvo sąlygomis) laikytoms braškėms didžiausią įtaką padarė taip pat IB/S | CHIT danga, sumažinusi uogoms šalčio streso poveikį, nes šia danga dengtose uogose viso eksperimento metu fenolinių junginių koncentracija buvo didžiausia. Tačiau šios dangos apsauginis poveikis buvo didesnis 20 °C temperatūroje, o ne 4 °C temperatūroje laikytoms braškėms. Iš to galima

daryti išvadą, kad IB/S|CHIT danga gali kompensuoti aukštesnės laikymo temperatūros poveikį braškių senėjimui (Reddy et al., 2000).

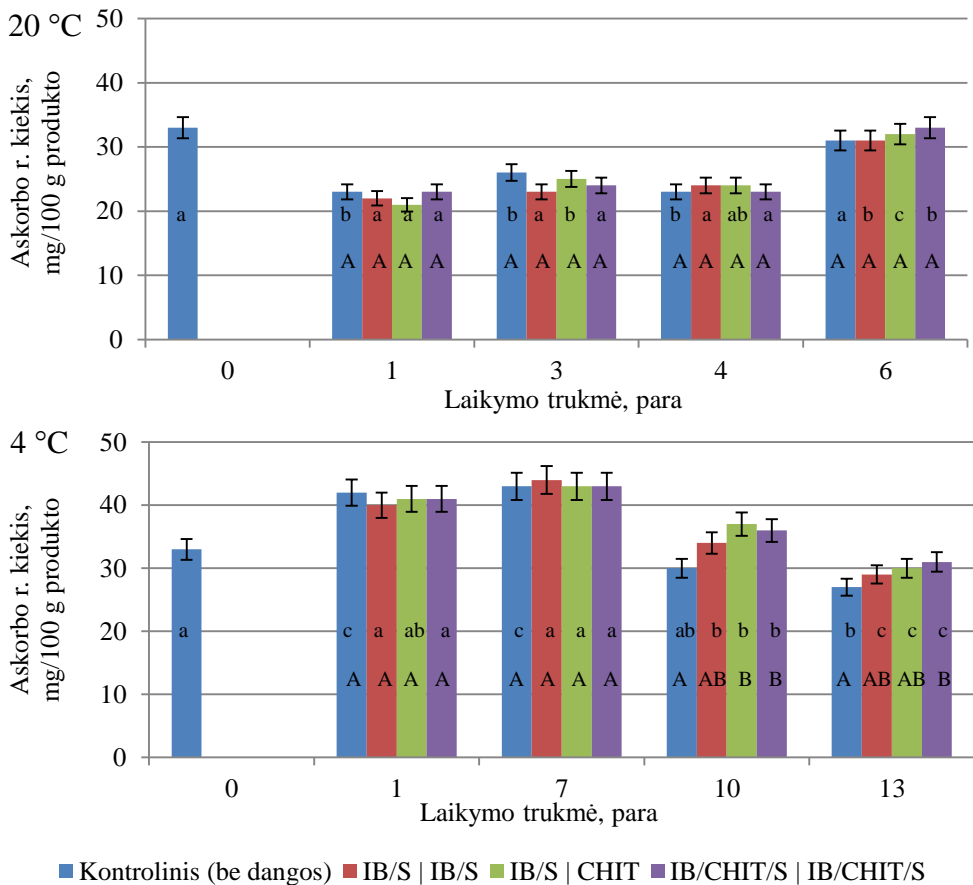
Uogoms nokstant spartėja jų ląstelių kvėpavimo procesai, kurių metu be fenolinių junginių vyksta cukrų ir organinių rūgščių kiekybiniai pokyčiai. Mokslinėje literatūroje minima, jog bendras cukrų kiekis uogose sparčiai didėja, o rūgštingumas mažėja kol uogos sunoksta. Tačiau vienos iš organinių rūgščių – askorbo rūgšties – kiekis šio proceso metu didėja (Avigdori-Avidov, 1986; Montero et al., 1996). Manoma, jog askorbo rūgšties sintezė uogose ir daržovėse prasideda nuo D-gliukozės sintezės. Todėl nokimo metu suintensyvėjus monosacharidų sintezei, kartu suintensyvėja ir askorbo rūgšties gamyba ląstelėse (Nunes et al., 1998, 2006; Reyes, 1982). Lyginant su neprinokusiomis ugomis matyti, kad didesni askorbo rūgšties kiekiai pastebimi labiau prinokusiose uogose (Cordenunsi et al., 2002, Kafkas et al., 2007, Montero et al., 1996; Olsson et al., 2004; Shin et al., 2007). Nepaisant to, kai kurių tyrimų rezultatai rodo askorbo rūgšties nedidelį mažėjimą uogų laikymo metu. Jis siejamas su vandens pašalinimu iš audinių, kuriuose dėl šios priežasties suaktyvėja oksidaciniai procesai (Nunes et al., 1998; Shin et al., 2007).

Lyginant vaisius ir uogas su lapiniais maisto produktais, askorbo rūgšties kiekis vaisiuose ir uogose yra pakankamai stabilus dėl juose esančios didelės koncentracijos organinių rūgščių (Perkins-Veazie, 1995) ir fenolinių junginių antioksidacinio apsauginio veikimo (Miller ir Rice Evans, 1997). Braškėse askorbo rūgštis yra pagrindinis nefenolinės prigimties antioksidantas, kuris turi labai didelę įtaką šių uogų maistinei vertei (Aaby et al., 2007). Jos kiekis braškėse priklauso nuo uogų veislės, sunokimo laipsnio, augimo, brendimo, apdorojimo ir laikymo sąlygų (Kafkas et al., 2007; Nunes et al., 2002; Olsson et al., 2004; Shin et al., 2007).

Tirdami dangų įtaką askorbo rūgšties kiekiui braškėse (3.17 pav.) jas laikant 20 °C temperatūroje, buvo nustatyta, kad per pirmą parą askorbo rūgšties kiekis kontroliniuose bandiniuose (be dangos) sumažėjo nuo 33 iki 23 mg/100 g, o dangomis dengtuose bandiniuose – iki 21–23 mg/100 g ir su labai mažais pasikeitimais išsilaikė dar 3 paras. Skirtumai tarp kontrolinio ir dangomis dengtų braškių askorbo rūgšties kiekio buvo statistiškai nereikšmingi. Tačiau staigus askorbo rūgšties sumažėjimas per pirmą parą galėjo įvykti dėl pasikeitusių aplinkos sąlygų (po uogų derliaus nuėmimo), kuriuose askorbo rūgštis buvo oksiduota (Nunes et al., 1998; Shin et al., 2007). Po 6 parų askorbo rūgšties vertės pakilo iki pradinių verčių, t. y. 31 mg/100 g kontroliniame ir 31–33 mg/100 g dangomis dengtuose bandiniuose. Toks askorbo rūgšties kiekio didėjimas visuose bandiniuose po 4 paras gali būti siejamas su sparčiau vykstančiais anaboliniiais procesais, kurie labiau pasireiškė mažiau prinokusiose uogose (dangomis dengtuose bandiniuose) ir kurių metu buvo intensyviau sintetinama askorbo rūgštis (Liao ir Seib, 1988; Loewus ir Loewus, 1987; Nunes et al., 1998; Seib ir Tolbert, 1982).

4 °C temperatūros laikymo sąlygomis 7 paras visuose bandiniuose buvo stebėtas askorbo rūgšties kiekio didėjimas: per 1 parą kontrolinio bandinio askorbo rūgšties kiekis padidėjo nuo 33 iki 42 mg/100 g, o bandiniuose su dangomis – iki 40–41 mg/100 g; per kitas 6 paras kontroliniame bandinyje askorbo rūgšties padidėjo labai mažai – iki 43 mg/100 g, o dangomis dengtuose bandiniuose iki 43–

44 mg/100 g. Galima teigti, jog 2–7 parų laikotarpiu esant 4 °C temperatūrai, askorbo rūgšties kiekis išsilaikė stabilus. Askorbo rūgšties sintezė per 1 parą galėjo vykti dėl užsitęsusio braškių nokimo, kuri vėliau, dėl žemoje uogų laikymo temperatūroje sulėtėjusių kvėpavimo procesų, buvo sustabdyta. Po 7 laikymo paros buvo nustatytas spartus askorbo rūgšties kiekio mažėjimas, kurį galėjo nulemti askorbo oksidazės veikla. Šiame etape buvo nustatytas didesnis skirtumas tarp kontrolinių bandinių ir dangomis dengtų bandinių, nes pastaruosiuose askorbo rūgšties mažėjimas buvo lėtesnis.



3.17 pav. Askorbo rūgšties kiekis (mg/100 g) braškėse be dangos arba su skirtingos sudėties danga laikymo metu 20 °C ir 4 °C temperatūroje

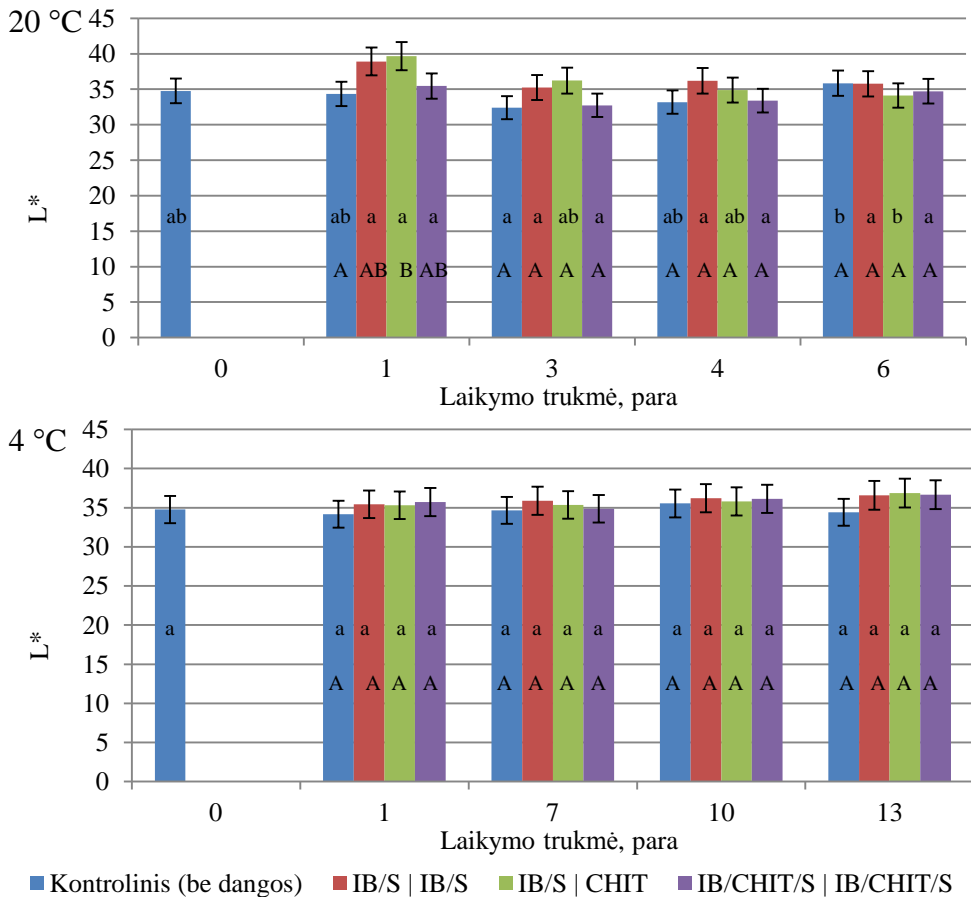
a, b, c – diagramose skirtingomis mažosiomis raidėmis pažymėtų kiekvienos rūšies (vienodos spalvos diagramos stulpeliai) bandinių analizuotų rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey).

A, B, C – diagramose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtų kiekvienos dienos (vienos dienos bandinių grupė) bandinių analizuotų rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey).

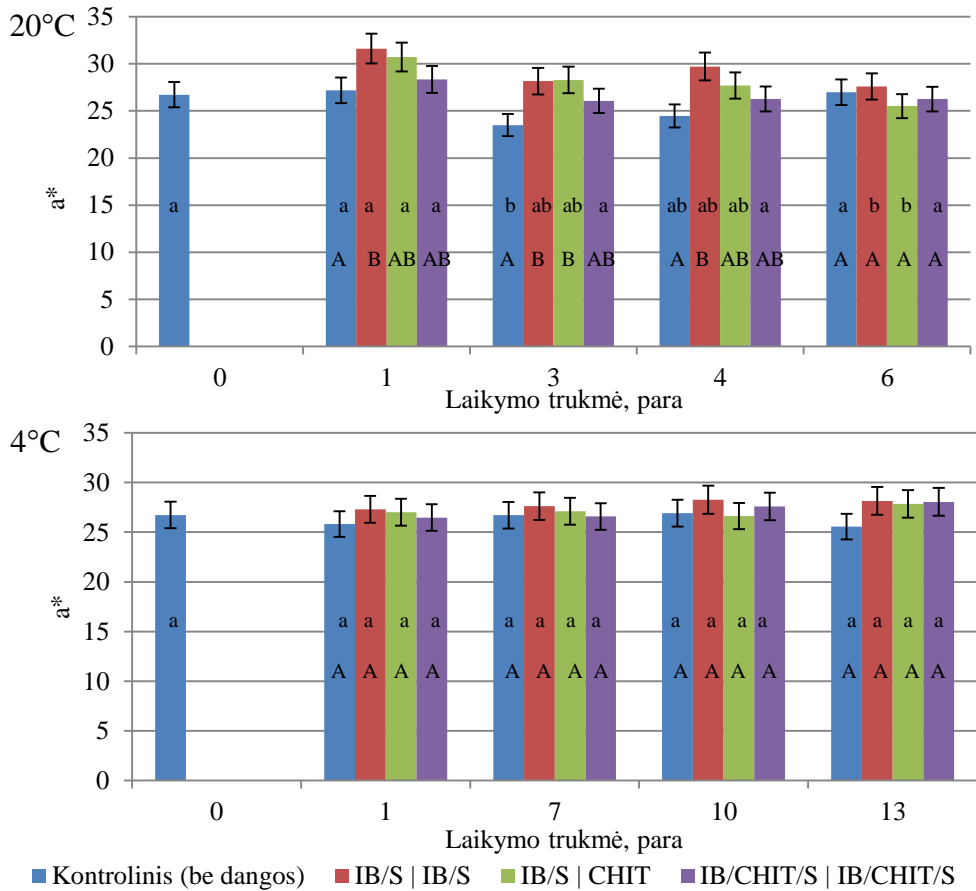
Tyrimo metu buvo nustatyta, jog didesnę įtaką askorbo rūgšties kiekiui braškėse padarė ne dangos, o uogų laikymo temperatūra (20 °C ir 4 °C) uogas laikant ne ilgiau kaip 6 paras. Dangų poveikis askorbo rūgšties koncentracijai braškėse buvo nustatytas uogas laikant ilgiau kaip 7 paras 4 °C temperatūroje. Tačiau skirtumo tarp skirtingos sudėties dangų pastebėta nebuvo.

Dangų įtaka braškių spalvos pokyčiams laikymo metu

Braškių be dangos ir su skirtingos sudėties dangomis, laikytų 6 dienas 20 °C temperatūroje ir 13 dienų 4 °C temperatūroje 80 % RH aplinkoje, tyrės spalvos matavimo rezultatai yra pateikti 3.18 pav. ir 3.19 pav. Šviesumo rodiklio vertės mažėjimas laikymo metu rodo analizuojamo bandinio tamsėjimą ($L^*=100$ – balta, $L^*=0$ – juoda) ir atvirkščiai. Raudono atspalvio rodiklio vertės didėjimas laikymo metu rodo raudonos spalvos ryškėjimą, kuri nulemia raudono pigmento (braškių antocianinų) koncentracija bandinyje ($a^*>0$ – raudona, $a^*<0$ – žalia).



3.18 pav. Skirtingos sudėties dangomis dengtų braškių tyrės šviesumas (L^*). Bandiniai buvo laikyti 6 paras 20 °C temperatūroje ir 13 parų 4 °C temperatūroje 80 % RH



3.19 pav. Skirtingos sudėties dangomis dengtų braškių tyrės raudonas atspalvis (a^*). Bandiniai buvo laikyti 6 paras 20 °C temperatūroje ir 13 parų 4 °C temperatūroje 80 % RH. a, b, c – diagramose skirtingomis mažosiomis raidėmis pažymėtų kiekvienos rūšies (vienodos spalvos diagramos stulpeliai) bandinių analizuotų rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey). A, B, C – diagramose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtų kiekvienos dienos (vienos dienos bandinių grupė) bandinių analizuotų rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey).

Braškių spalvos pokyčiams didelę įtaką turėjo laikymo temperatūra. Žemoje temperatūroje braškių spalvos pokyčiai buvo labai maži (Wang ir Camp, 2000) ir statistiškai patikimai nesiskyrė tarpusavyje. Priešingai, aukštesnėje temperatūroje (20 °C) laikytų braškių spalvai kai kurios dangos padarė įtaką. Per pirmą laikymo 20 °C temperatūroje parą kontrolinių bandinių šviesumas ir raudonas atspalvis išliko stabilūs. Skirtingos sudėties dangomis dengtų braškių šviesumas padidėjo galimai dėl dangas formuojančių medžiagų poveikio nuo 34,77 iki 35,45 su IB/CHIT/S | IB/CHIT/S, iki 38,92 su IB/S | IB/S, o su IB/S | CHIT danga statistiškai

reikšmingai padidėjo iki 39,66 nepaisant to, kad vizualiai visos dangos buvo skaidrios, blizgios, tolygiai apdengusios braškių paviršių.

Po trečios paros visų bandinių L^* ir a^* vertės sumažėjo. Tai rodo, jog bandinių spalva patamsėjo galimai dėl padidėjusio pigmento (antocianinų) kiekio uogoms nokstant ar drėgmės netekimo, dėl kurio uogų audiniuose esančios spalvą suteikiančios medžiagos galėjo susikoncentruoti.

Po 4 paros IB/S | IB/S, IB/S | CHIT dangomis dengtų bandinių šviesumo rodiklis mažėjo nežymiai, o po 6 paros priartėjo prie pradinės L^* vertės. Tai rodo, jog šios dangos apsaugojo braškių spalvą nuo didelių pokyčių 6 paras. IB/CHIT/S | IB/CHIT/S danga dengtų braškių šviesumo rodiklis po 3 parų pradėjo kilti, nors raudono atspalvio rodiklis išliko stabilus. Tokiems spalvos pokyčiams įtakos galėjo turėti nustojęs keistis (stabilizavęsis) antocianinų kiekis.

Tyrimų rezultatai rodo, kad uogų su dangomis masė mažėjo lėčiau, nors didelio skirtumo tarp skirtingos sudėties dangų įtakos braškių nudžiūvimui nebuvo. Viso eksperimento metu dangomis dengtų braškių paviršius buvo šiek tiek tvirtesnis nei be dangos: pirma, ant braškių paviršiaus susiformavusios dangos apribojo drėgmės išgaravimą iš jų audinių, dėl to jie galėjo išlikti tvirtesni nei kontroliniuose bandiniuose; antra, pačios dangos galėjo suformuoti tvirtesnę apsauginę sluoksnį braškių paviršiuje nei natūraliai susiformavęs paviršinis sluoksnis. Spartesnė fenolinių junginių, tarp jų ir antocianinų, sintezė braškėse be dangos leido daryti išvadą, jog nokimo ir senėjimo procesai jose vyko greičiau nei braškėse su dangomis. Askorbo rūgšties kiekiui braškėse didesnę įtaką padarė ne dangos, o uogų laikymo temperatūra (20 °C ir 4 °C), uogas laikant ne ilgiau kaip 6 paras. Dangų poveikis askorbo rūgšties koncentracijai braškėse buvo pastebėtas uogas laikant ilgiau kaip 7 paras 4 °C temperatūroje, tačiau skirtumo tarp skirtingos sudėties dangų pastebėta nebuvo.

Nepaisant visų analizuotų kokybės parametrų svyravimų, dangomis dengtos braškės buvo apsaugotos nuo spartaus gedimo, o didžiausią teigiamą poveikį padarė IB/S|CHIT danga. Tačiau lyginant skirtingomis sąlygomis laikytus bandinius, efektyviau dangos saugojo uogas 20 °C temperatūroje nei 4 °C. Remiantis tyrimo rezultatais buvo sukurta prototipinė šviežių braškių dengimo valgomąja danga technologija (Priedas 1).

3.2.5. Išrūgų baltymų valgomųjų plėvelių su funkciniais priedais įtaka kalakutienos mikrobiologiniams, fizikiniams cheminiams pokyčiams laikymo metu

Mėsos ar paukštienos cheminis gedimas pasireiškia baltymų, riebalų fizikinių cheminių savybių pokyčiais, kuriuos sukelia keletas veiksnių: šiluma, atmosferinis deguonis, endogeniniai fermentai, drėgmė, šviesa. Visi jie, atskirai ar kartu, sąlygoja mėsos ar paukštienos spalvos, kvapo, skonio, tekstūros pokyčius, dėl kurių paukštienos kokybė suprastėja ir sutrumpėja jos vartojimo trukmė. Nepaisant to, svarbiausias mėsos ar paukštienos tinkamumo vartoti rodiklis yra mikrobiologinės taršos lygis, turintis didelę įtaką jos vartojimo saugai (Zhou, Xu ir Liu, 2010).

Siekiant apsaugoti mėsą ar paukštieną nuo gedimo, yra kontroliuojama jos laikymo temperatūra, drėgmė bei slopinamas mikroorganizmų vystymasis baktericidinėmis ar bakteriostatinėmis priemonėmis (Quintavalla ir Vicini, 2002). Mėsos ar paukštienos apdorojimas aukštu slėgiu, pakavimas modifikuotoje atmosferoje ar aktyvioje pakuotėje, apdorojimas natūraliomis antimikrobinėmis medžiagomis yra alternatyvios ne terminės konservavimo priemonės, kurios naikina mėsos ar paukštienos gedimą sukeliančius mikroorganizmus ir patogeninius mikroorganizmus bei apsaugo ją nuo cheminio gedimo. Pavyzdžiui, pakuojant mėsą ar paukštieną modifikuotoje atmosferoje, yra sumažinamas deguonies kiekis ir padidinamas anglies dioksido kiekis aplink ją. Anglies dioksidas stipriai slopina aerobinių bakterijų dauginimąsi, o sumažėjus deguonies kiekiui mėsos ar paukštienos paviršius yra apsaugomas nuo intensyvių oksidacinių procesų, jo spalva išlieka nepakitusi ilgesnį laiką. Tai leidžia ilgiau išlaikyti gerą mėsos ar paukštienos kokybę, prekinę išvaizdą, pailginti vartojimo trukmę.

Viena iš alternatyvių mėsos ar paukštienos saugojimo priemonių yra valgomosios biopolimerinės plėvelės, kurios dėl barjerinių apsauginių funkcijų gali sulėtinti maisto produkto drėgmės praradimą, lipidų oksidaciją bei spalvos pokyčius, pagerinti produkto išvaizdą, pernešti bioaktyvias medžiagas, slopinančias mikroorganizmų veiklą (Gennadios, Hanna ir Kurth, 1997, 1997). Mokslinėje spaudoje yra nedaug informacijos apie polisacharidų ar baltymų plėvelių, dangų poveikį šviežios paukštienos kokybei (Guo et al., 2014; Latou et al., 2014; Natrajan ir Sheldon, 1995), nes dauguma studijų buvo atlikta su šviežia jautiena ar kiauliena (Beverly et al., 2008; Emiroglu et al., 2010; Millette et al., 2007; Ouattara et al., 2002; Oussalah et al., 2004; Zinoviadou et al., 2009, 2010). Siekiant įvertinti baltymų plėvelių su įvairiais antimikrobiniais priedais įtaką paukštienos kokybei jos laikymo metu, tirta jų įtaką kalakutienos mikrobiologinėms bei fizikinėms cheminėms savybėms.

Valgomųjų plėvelių su antibakteriniais priedais įtaka kalakutienos bendram bakteriniam užterštumui

Šviežios paukštienos mikrobiologiniam gedimui didžiausią įtaką daro paukštienos laikymo sąlygos ir jos pirminis bakterinis užterštumas. Jį dažniausiai sudaro aerobinės besporės *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* genčių lazdelės, fakultatyvios anaerobinės *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella* genčių bakterijos, kampilobakterijos ir kt. Aktyviai besivystančių mikroorganizmų veikla sukelia paukštienos skonio, aromato, spalvos ir kitų juslinių savybių nepageidaujamų pokyčių, dėl kurių jos kokybė blogėja ir vartojimo trukmė trumpėja (Petrou et al., 2012; Samelis, 2006). Be to, patogeniniai mikroorganizmai sukelia didelę riziką vartotojų sveikatai.

Valgomosios plėvelės ir dangos dėl savo barjerinių savybių neleidžia mikroorganizmams iš aplinkos patekti ant maisto paviršiaus, o susiformavusi modifikuota aplinka slopina ant produkto esančių mikroorganizmų veiklą. Plėvelių ir dangų sudėtyje esančios antimikrobinės medžiagos yra palapsniui atpalaiduojamos ir efektyviau paveikia maisto paviršiuje esančius mikroorganizmus (Quintavalla ir Vicini, 2002) nei bioaktyvių medžiagų koncentruoti tirpalai,

pavyzdžiui, ekstraktai ar eteriniai aliejai, kurie dėl didelės koncentracijos, užtikrinančios jų antimikrobinį poveikį, gali produktą sugadinti nemaloniu skoniu ir aromatu (Petrou et al., 2012; Sanchez-Gonzalez et al, 2011).

Tyrimo metu siekta nustatyti, kaip IB, CHIT ir IB/CHIT valgomosios plėvelės su įvairiais antimikrobiniais priedais slopina kai kurių bakterijų vystymąsi kalakutienoje. Eksperimentas atliktas trimis etapais. Pirmiausia nustatytas plėvelių su įvairiomis antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčiomis medžiagomis, plačiai naudojamomis maisto pramonėje, poveikis kalakutienos bendram bakteriniam užterštumui laikymo metu. Antrame etape tirta, kokią įtaką laikymo metu IB/CHIT plėvelės su antimikrobinėmis medžiagomis turėjo tokiems patogeniniams mikroorganizmams kaip *S. typhimurium*, *E. coli* bei *C. jejuni*, kuriais buvo užkrėsta kalakutiena. Trečiame etape tirta IB/CHIT plėvelių su svarainių ir spanguolių sultimis (natūraliais antimikrobinėmis medžiagų šaltiniais) antimikrobinį savybių įtaka kalakutienos bendram bakteriniam užterštumui ir patogeniniams mikroorganizmams laikymo metu. Tyrimų metu kalakutiena buvo laikyta 6 paras +5 °C ir +16 °C temperatūroje.

Bendro bakterijų KSV skaičiaus kalakutienos tyrimo rezultatai (3.19 lent.) parodė, jog per dvi laikymo +5 °C temperatūroje paras kalakutienos be plėvelės (kontrolė) bendras bakterinis užterštumas nesikeitė ir buvo vidutiniškai 5,7±0,1 lg KSV/1 g. Per 3–6 laikymo paras jis sparčiai didėjo ir eksperimento pabaigoje pasiekė 8,23 lg KSV/1 g. Tai reiškia, jog kalakutiena (kontrolė) be antimikrobinėmis medžiagų laikoma žemoje temperatūroje (šaldytuve) yra saugi vartoti tik pirmąsias dvi paras. Tuo metu CHIT, IB/CHIT/S, IB/CHIT/S/propolis, IB/CHIT/S/laktatas, IB/CHIT/S/benzenkarboksir., IB/CHIT/S/askorbo, IB/CHIT/S/sorbatas valgomosiomis plėvelėmis dengtuose bandiniuose bendras mikroorganizmų KSV skaičius po dviejų laikymo parų buvo daug mažesnis, t. y. 2,2–3,85 lg KSV/1 g. Joms antibakterinių savybių suteikė natūralios ar sintetinės kilmės priedai. Kalio sorbatas (E202, konservantas), benzenkarboksirūgštis (E210, konservantas), askorbo rūgštis (E300, antioksidatorius) bei kalcio laktatas (E327, rūgštingumą reguliuojanti medžiaga) yra Europos sąjungoje ir Lietuvoje leistini naudoti maisto priedai, kurie pailgina maisto produktų vartojimo terminus, stabdydami jų cheminį ar mikrobiologinį gedimą. Propolis arba bičių pikis yra natūralios kilmės dervingas bioaktyvių medžiagų (polifenolių, fenolinių rūgščių, fenolinių aldehydų, ketonų ir kt.) mišinys, bičių surinktas nuo įvairių medžių pumpurų, pasižymintis stipriu antimikrobinio poveikiu (Castaldo ir Capasso, 2002).

Eksperimento rezultatai rodo, jog IB/CHIT plėvelės sudėtyje esantys antibakteriniai priedai, išskyrus niziną, sinergistiškai su chitozanu veikė prieš kalakutienoje buvusius mikroorganizmus ir sėkmingai stabdė mikrobiologinį jos gedimą visą 6 parų tyrimo laikotarpį. Plėvelės su nizinu per pirmąsias dvi paras antibakterinio aktyvumo neparodė, nors nizinas yra žinomas kaip natūralus mikrobinės kilmės antibakterinis maisto priedas, vadinamas lantibiotiku. Jį gamina pieno rūgšties bakterijos *L. lactis* ir jis daugiausia veikia prieš Gram teigiamas bakterijas bei sporas, tačiau visiškai neveikia arba silpnai veikia Gram neigiamas bakterijas, mieles ir mikroskopinius grybus (Delves-Broughton, 2005). Antimikrobinį nizino efektyvumą gali paveikti jo molekulių susijungimas su

glutatioono molekūlėmis, mažos molekulinės masės tiolo junginiais (Rose et al. 1999; Millette et al., 2007), kurios užblokuoja nizino aktyvius centrus. Šių molekulių buvimas IB struktūroje ir galėjo paveikti nizino antibakterinį aktyvumą. Vėliau, po trečios paros bandiniuose, dengtuose IB/CHIT/S/nizinas plėvele, bendras mikroorganizmų KSV skaičius sumažėjo iki 3,62 lg KSV/1 g. Toks efektas gali būti aiškinamas nizino atsipalaidavimu iš baltymų sistemos. Toliau laikant bandinius, plėvelės su nizinu antibakterinis poveikis sumažėjo galimai dėl mikroorganizmų prisitaikymo prie šio lantibiotiko.

3.19 lentelė. Bendro bakterijų kiekio pokyčiai kalakutienoje +5 °C temperatūroje

Plėvelės sudėtis	Bendras bakterijų kiekis, log ₁₀ KSV/1 g				
	Laikymo trukmė, para				
	0,125 (3 val.)	1	2	3	6
	+5 °C temperatūroje				
Kontrolė (be plėvelės)	5,57±0,28 aA	5,81±0,29 aA	5,62±0,28 aA	6,62±0,33 bA	8,23±0,41 cA
PE	5,57±0,28 aA	4,80±0,24 abBCD	4,00±0,20 bB	5,98±0,30 cB	8,48±0,43 dA
IB/S	5,57±0,28 abA	5,04±0,25 abBC	3,81±0,19 cB	5,66±0,29 bB	4,90±0,25 aB
CHIT	5,57±0,28 aA	4,41±0,23 bcDE	2,20±0,11 cdC	1,75±0,09 cC	2,38±0,12 dCD
IB/CHIT/S	5,57±0,28 aA	4,62±0,19 bcDE	3,85±0,20 cB	2,61±0,23 dD	2,32±0,15 dCD
IB/CHIT/S/propolis	5,57±0,28 aA	4,32±0,22 bDE	2,60±0,13 cC	2,49±0,12 cD	3,34±0,17 dE
IB/CHIT/S/nizinas	5,57±0,28 aA	5,32±0,27 aAB	5,56±0,27 aA	3,62±0,18 bE	7,04±0,35 cF
IB/CHIT/S/laktatas	5,57±0,28 aA	4,11±0,21 bE	2,58±0,13 cC	2,60±0,12 cD	2,74±0,14 cCDE
IB/CHIT/S/benzenkarboksir.	5,57±0,28 aA	2,88±0,15 bF	2,26±0,12 cC	2,30±0,11 cCD	2,11±0,10 cC
IB/CHIT/S/askorbo	5,57±0,28 aA	3,30±0,16 bF	2,68±0,14 cC	2,81±0,14 cD	2,54±0,12 cCD
IB/CHIT/S/sorbatas	5,57±0,28 aA	4,32±0,22 bDE	2,71±0,13 cC	2,68±0,14 cD	2,83±0,14 cDE

a, b, c, d – eilutėse skirtingomis mažosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey).

A, B, C, D, E, F – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Tukey).

Maistine PE ir valgomąja IB/S plėvelėmis dengtuose bandiniuose bendras bakterinis užterštumas per pirmas dvi paras buvo sumažėjęs atitinkamai iki 4,00 ir 3,81 lg KSV/1 g, tačiau per trečią parą gerokai padidėjo. Šios plėvelės eksperimento pradžioje dėl barjerinių savybių (dujų pernašos sustabdymo) galėjo suformuoti modifikuotą atmosferą, kuri slopino mikroorganizmų veiklą bandiniuose, o per trečią parą šiuose bandiniuose mikroorganizmai galimai prisitaikė prie pasikeitusių sąlygų ir pradėjo intensyviai daugintis. Po 6 laikymo parų kalakutienoje su PE

plėvele bendras mikroorganizmų kiekis padidėjo ir pasiekė 8,48 lg KSV/1 g vertę, artimą kontroliniam bandiniui. Tačiau IB/S plėvelė 4–6 laikymo paras neleido mikroorganizmas sparčiai vystytis kalakutienoje ir po 6 parų bandinyje buvo tik 4,90 lg KSV/1 g, t. y. mažiau nei eksperimento pradžioje. Vadinasi, IB/S plėvelė gali apsaugoti kalakutieną nuo mikrobinės taršos didėjimo 2 paras, kai ji laikoma +5 °C temperatūroje.

Valgomųjų plėvelių su antibakteriniais priedais įtaka *S. typhimurium*, *E. coli* bei *C. jejuni* augimui kalakutienoje

Siekiant įvertinti valgomųjų plėvelių poveikį patogeniniams mikroorganizmams, kalakutiena buvo užkrėsta *S. typhimurium*, *E. coli* bei *C. jejuni* bakterijomis. Uždengus bandinius skirtingos sudėties plėvelėmis buvo ištirtas šių mikroorganizmų KSV kitimas per 6 paras. Rezultatai pateikti 3.20, 3.21, 3.22 lentelėse.

Ištyrus *S. typhimurium* augimą ant kalakutienos +16 °C ir +5 °C temperatūroje (3.20 lent.) matyti, jog žemesnėje temperatūroje šios bakterijos dauginosi daug lėčiau nei aukštesnėje temperatūroje lyginant su kontroliniais bandiniais. +5 °C temperatūroje per 6 paras nuo eksperimento pradžios *S. typhimurium* KSV skaičius, nors ir statistiškai nereikšmingai, padidėjo 2,01 lg KSV/1 g, o +16 °C – statistiškai reikšmingai padidėjo 3,66 lg KSV/1 g. Tačiau +5 °C sąlygose statistiškai reikšmingai teigiamo antibakterinio plėvelių poveikio nebuvo pastebėta, išskyrus po 3 laikymo parų IB/CHIT/sorbatas plėvele dengtuose bandiniuose *S. typhimurium* KSV buvo statistiškai patikimai mažesnis nei kontroliniuose bandiniuose.

Skirtingos sudėties valgomosios plėvelės *S. typhimurium* augimą sulėtino, tačiau slopinimo efektyvumas priklausė nuo plėvelių sudėties. Bandiniuose su IB/S ir IB/CHIT/S/nizinas plėvelėmis po 3 laikymo parų +16 °C temperatūroje *S. typhimurium* KSV skaičius buvo mažesnis nei kontrolinio bandinio – atitinkamai 2,22 ir 2,37 lg KSV/1 g, o po 6 parų – atitinkamai 0,91 ir 0,78 lg KSV/1 g. Per pirmas tris paras, lyginant su pradiniu *S. typhimurium* kiekiu eksperimento pradžioje jis padidėjo – atitinkamai 1,20 ir 1,41 lg KSV/1 g, per visas šešias paras – atitinkamai 2,64 ir 3,14 lg KSV/1 g. Šių plėvelių sukurta modifikuota aplinka sulėtino *S. typhimurium* dauginimąsi, deja, plėvelė su nizinu didesnio poveikio šioms bakterijoms nepadarė, nes nizinas Gram neigiamų bakterijų neveikia.

Mėginiuose su kitomis valgomosiomis plėvelėmis *S. typhimurium* kiekis keitėsi labai mažai. Per pirmas dvi paras kalakutienoje, apdengtoje CHIT, IB/CHIT/S/propolis, IB/CHIT/S/laktatas, IB/CHIT/S/benzenkarboksir., IB/CHIT/S/askorbo, IB/CHIT/S/sorbatas plėvelėmis jis pasikeitė iki 0,34 lg KSV/1 g, po trečios paros jis skyrėsi iki 0,58 lg KSV/1 g nuo pradinio užterštumo, o po šeštos paros – atitinkamai iki 1,88 lg KSV/1 g, tačiau šie skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi. Lyginant su kontroliniais bandiniais, pastarosiomis plėvelėmis dengtuose bandiniuose buvo statistiškai reikšmingai mažesnis *S. typhimurium* KSV skaičius. Todėl galima daryti išvadą, jog plėvelės, savo sudėtyje turinčios chitozano, propolio, kalcio laktato, benzenkarboksirūgšties ar

askorbo rūgštis, kalio sorbato, slopino šių patogeninių mikroorganizmų veiklą viso eksperimento metu.

3.20 lentelė. *S. typhimurium* augimas kalakutienoje +5 °C ir +16 °C temperatūroje

Plėvelės sudėtis	<i>S. typhimurium</i> kiekis, log ₁₀ KSV/1 g			
	Laikymo trukmė, para			
	0,125 (3 val.)	2	3	6
	+5 °C temperatūroje			
Kontrolė (be plėvelės)	4,92±0,36 ^{aA}	5,77±1,33 ^{aA}	6,19±1,93 ^{aA}	6,93±2,61 ^{aA}
PE	4,97±0,89 ^{aA}	5,08±0,99 ^{aA}	5,50±1,56 ^{aA}	6,31±2,78 ^{aA}
IB/S	5,14±0,78 ^{aA}	4,97±0,65 ^{aA}	4,81±0,81 ^{aA}	5,51±1,77 ^{aA}
CHIT	4,59±0,44 ^{aA}	4,67±0,83 ^{aA}	4,60±0,32 ^{aA}	5,33±2,22 ^{aA}
IB/CHIT/S	4,76±0,59 ^{aA}	4,33±0,80 ^{aA}	4,30±0,87 ^{aA}	4,10±0,22 ^{aA}
IB/CHIT/S/propolis	4,51±0,67 ^{aA}	4,73±1,16 ^{aA}	4,16±0,23 ^{aA}	5,34±1,74 ^{aA}
IB/CHIT/S/nizinas	4,66±0,73 ^{aA}	4,43±0,49 ^{aA}	4,52±0,32 ^{aA}	4,44±0,57 ^{aA}
IB/CHIT/S/laktatas	3,85±0,92 ^{aA}	4,55±0,06 ^{aA}	4,45±0,98 ^{aA}	4,46±0,74 ^{aA}
IB/CHIT/S/benzenkarboksir.	4,27±1,09 ^{aA}	4,20±0,33 ^{aA}	4,16±0,47 ^{aA}	4,64±1,65 ^{aA}
IB/CHIT/S/askorbo	4,57±0,48 ^{aA}	4,35±0,69 ^{aA}	4,32±0,55 ^{aA}	4,54±0,43 ^{aA}
IB/CHIT/S/sorbatus	4,63±1,06 ^{aA}	4,80±0,89 ^{aA}	4,05±0,85 ^{aB}	4,37±0,55 ^{aA}
	+16 °C temperatūroje			
Kontrolė (be plėvelės)	5,33±0,04 ^{aA}	8,05±0,55 ^{bA}	8,85±0,42 ^{bA}	8,99±0,49 ^{bAB}
PE	5,29±0,30 ^{aA}	7,95±0,27 ^{bA}	8,86±0,17 ^{bcA}	9,10±0,58 ^{cA}
IB/S	5,44±0,56 ^{aA}	5,77±0,15 ^{aB}	6,64±0,84 ^{aB}	8,08±0,17 ^{bABC}
CHIT	4,99±0,26 ^{aA}	4,93±0,26 ^{aBC}	4,71±0,25 ^{aD}	6,09±1,29 ^{aCD}
IB/CHIT/S	4,75±0,64 ^{aA}	4,48±0,47 ^{aC}	4,98±0,27 ^{aCD}	6,20±1,49 ^{aCD}
IB/CHIT/S/propolis	4,83±0,40 ^{aA}	5,02±0,26 ^{aBC}	4,79±0,35 ^{aD}	6,37±0,37 ^{bCD}
IB/CHIT/S/nizinas	5,07±0,59 ^{aA}	6,03±1,88 ^{aB}	6,49±1,77 ^{aBC}	8,22±0,31 ^{aABC}
IB/CHIT/S/laktatas	4,83±0,15 ^{aA}	4,79±0,55 ^{aBC}	4,99±0,44 ^{aCD}	6,71±1,83 ^{aBCD}
IB/CHIT/S/benzenkarboksir.	4,97±0,29 ^{aA}	4,99±0,31 ^{aBC}	5,39±0,85 ^{aBCD}	5,92±1,02 ^{aCD}
IB/CHIT/S/askorbo	5,28±0,11 ^{aA}	5,00±0,11 ^{aBC}	5,85±0,69 ^{aBCD}	6,26±1,72 ^{aCD}
IB/CHIT/S/sorbatus	4,92±0,32 ^{aA}	4,59±0,24 ^{aBC}	4,73±0,34 ^{aD}	4,94±0,14 ^{aD}

^{a, b} – eilutėse skirtingomis mažosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Student's t).

A, B, C, D – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Student's t).

Kai kurios analizuotos valgomosios plėvelės slopino *E. coli* augimą kalakutienoje (3.21 lent.) nepaisant to, kad +5 °C temperatūroje kontroliniame

bandinyje po šešių parų *E. coli* KSV ne padidėjo, o sumažėjo 0,37 lg KSV/1 g, tačiau sumažėjimas nebuvo statistiškai reikšmingas.

3.21 lentelė. *E. coli* augimas kalakutienoje +5 °C temperatūroje

Plėvelės sudėtis	<i>E. coli</i> kiekis, log ₁₀ KSV/1 g			
	Laikymo trukmė, para			
	0,125 (3 val.)	2	3	6
	+5 °C temperatūroje			
Kontrolė (be plėvelės)	4,97±0,70 ^{aA}	4,90±0,20 ^{aA}	4,70±0,08 ^{aA}	4,60±0,37 ^{aA}
PE	4,74±0,43 ^{aA}	4,63±0,12 ^{aA}	4,50±0,77 ^{aA}	4,32±0,60 ^{aAB}
IB/S	4,90±0,65 ^{aA}	4,70±1,33 ^{aA}	4,57±0,54 ^{aA}	4,59±0,39 ^{aA}
CHIT	3,98±0,09 ^{aA}	4,25±0,10 ^{aA}	3,98±0,14 ^{aB}	3,94±0,24 ^{aB}
IB/CHIT/S	4,00±0,85 ^{aA}	3,88±0,81 ^{aA}	3,53±0,33 ^{aB}	4,02±0,27 ^{aAB}
IB/CHIT/S/propolis	4,03±0,24 ^{aA}	4,59±0,14 ^{aA}	4,12±0,16 ^{aAB}	4,24±0,46 ^{aAB}
IB/CHIT/S/nizinas	4,14±0,36 ^{aA}	4,62±0,59 ^{aA}	4,38±0,33 ^{aAB}	4,29±0,08 ^{aAB}
IB/CHIT/S/laktatas	4,26±0,78 ^{aA}	4,45±0,34 ^{aA}	4,42±0,47 ^{aAB}	4,41±0,10 ^{aAB}
IB/CHIT/S/benzenkarboksir.	4,04±0,51 ^{aA}	4,38±0,09 ^{aA}	4,31±0,64 ^{aAB}	4,36±0,03 ^{aAB}
IB/CHIT/S/askorbo	4,27±0,42 ^{aA}	4,09±0,34 ^{aA}	4,27±0,02 ^{aAB}	4,30±0,21 ^{aAB}
IB/CHIT/S/sorbatas	4,60±0,46 ^{aA}	4,30±0,01 ^{aA}	4,29±0,08 ^{aAB}	4,04±0,11 ^{aAB}

^a – eilutėse mažosiomis a raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai nereikšmingai ($p \leq 0,05$, Student's t).

^{A, B, C, D} – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Student's t).

Laiko atžvilgiu visų rūšių bandiniuose *E. coli* KSV skaičius keitėsi labai mažai ir statistiškai reikšmingų skirtumų per 6 eksperimento paras tarp vienoda plėvele dengtų bandinių nebuvo. Tačiau nustatyta, kad *E. coli* KSV skaičius bandiniuose su plėvelėmis buvo mažesnis nei kontrolinio bandinio. Šiuo atveju išskirtinį poveikį padarė CHIT plėvelė, nes ja apdengtoje kalakutienoje per 6 parų laikotarpį *E. coli* KSV skaičius išsilaiškė nepakitęs, lyginant su kontrole, ir pradėjo statistiškai reikšmingai skirtis nuo jo per 3 laikymo parą. Taip pat statistiškai patikimai mažesnis už kontrolinio bandinio buvo IB/CHIT/S plėvele dengto bandinio *E. coli* KSV skaičius, nors po 6 parų jis jau buvo pakilęs. Manoma, jog toks poveikis galėjo būti dėl mažesnio chitozono kiekio šios rūšies plėvelėse, dėl to mikroorganizmams buvo lengviau prisitaikyti.

Ištyrus *C. jejuni* augimą ant kalakutienos (3.22 lent.) matyti, jog esant +16 °C temperatūrai per 6 eksperimento paras kontroliniuose bandiniuose *C. jejuni* KSV skaičius padidėjo 5,48 lg KSV/1 g. PE padengtuose bandiniuose kampilobakterijos vystėsi tokiu pačiu tempu kaip ir kontroliniuose bandiniuose. IB/S valgomosios plėvelės neleido šiems mikroorganizmams daugintis ant kalakutienos 1 parą.

Didžiausiu slopinančiu poveikiu pasižymėjo IB/CHIT plėvelės su kalio sorbatu, kuris, kaip žinoma, slopina daugelį Gram teigiamų ir Gram neigiamų bakterijų. Šiomis plėvelėmis dengtuose bandiniuose *C. jejuni* KSV skaičius buvo

mažesnis nei 1,00 lg KSV/1 g viso eksperimento metu. Taip pat stipriau slopinančių poveikiu pasižymėjo IB/CHIT su kalcio laktatu, askorbo rūgštimi plėvelės bei CHIT plėvelės, kuriomis dengtuose kalakutienos bandiniuose *C. jejuni* augimas buvo slopintas statistiškai patikimai 3 paras.

3.22 lentelė. *C. jejuni* augimas kalakutienoje +16 °C temperatūroje

Plėvelės sudėtis	<i>C. jejuni</i> kiekis, log ₁₀ KSV/1 g			
	Laikymo trukmė, para			
	0,125 (3 val.)	2	3	6
	+16 °C temperatūroje			
Kontrolė (be plėvelės)	1,00±0,00 ^{aA}	4,12±0,74 ^{bA}	4,91±1,54 ^{bAB}	6,48±0,20 ^{bC}
PE	1,00±0,00 ^{aA}	4,46±0,40 ^{bA}	5,36±0,05 ^{cB}	6,46±0,36 ^{dC}
IB/S	1,00±0,00 ^{aA}	1,74±1,04 ^{aCD}	3,64±0,62 ^{bABD}	6,07±0,19 ^{cCE}
CHIT	1,00±0,00 ^{aA}	1,00±0,00 ^{aD}	1,80±1,13 ^{aCD}	3,70±0,54 ^{bB}
IB/CHIT/S	1,00±0,00 ^{aA}	1,74±1,04 ^{abCD}	3,10±0,28 ^{bAD}	4,82±0,41 ^{cDG}
IB/CHIT/S/propolis	1,00±0,00 ^{aA}	2,15±0,21 ^{bCD}	2,54±0,09 ^{bCD}	4,21±0,19 ^{cBD}
IB/CHIT/S/nizinas	1,00±0,00 ^{aA}	1,00±0,00 ^{aD}	2,57±0,38 ^{bCD}	5,08±0,47 ^{cGF}
IB/CHIT/S/laktatas	1,00±0,00 ^{aA}	1,00±0,00 ^{aD}	2,18±1,67 ^{aCD}	4,61±0,05 ^{bDG}
IB/CHIT/S/benzenkarboksir.	1,00±0,00 ^{aA}	2,87±0,24 ^{bC}	2,69±0,30 ^{bCD}	5,54±0,11 ^{cEF}
IB/CHIT/S/askorbo	1,00±0,00 ^{aA}	1,80±1,13 ^{aCD}	1,74±1,04 ^{aCD}	5,57±0,11 ^{bEF}
IB/CHIT/S/sorbatas	1,00±0,00 ^{aA}	1,00±0,00 ^{aD}	1,00±0,00 ^{aC}	1,00±0,00 ^{aA}

a, b, c, d – eilutėse skirtingomis mažosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Student'as t).

A, B, C, D – stulpeliuose skirtingomis didžiosiomis raidėmis pažymėtos rodiklių vertės skiriasi statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$, Student'as t).

Tyrimo rezultatai rodo, jog kalakutienoje, dengtoje IB/CHIT su antimikrobinėmis medžiagomis valgomosiomis plėvelėmis, kampilobakterijų KSV skaičius buvo statistiškai patikimai mažesnis viso eksperimento metu nei plėvelėmis nepadengtoje kalakutienoje.

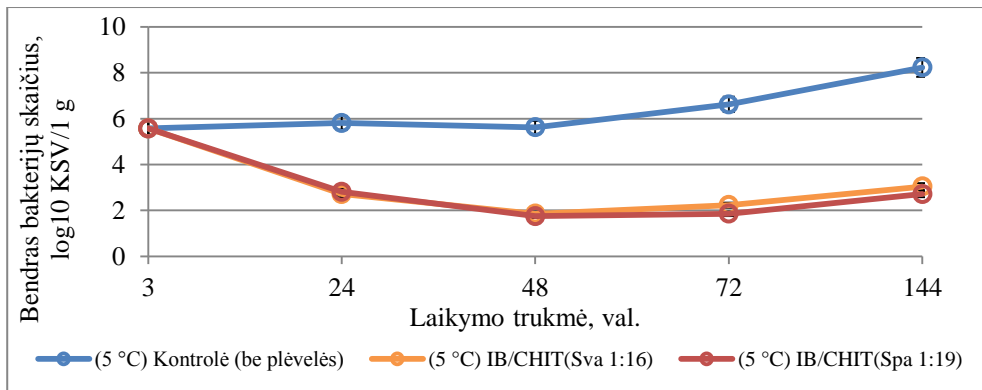
IB/CHIT plėvelių su svarainių ir spanguolių sultimis antibakterinių savybių įtaka bendram kalakutienos užterštumui ir *S. typhimurium*, *E. coli* bei *C. jejuni* augimui kalakutienoje

Žinoma, jog natūraliose svarainių ir spanguolių sultyse esantys bioaktyvūs junginiai, tokie kaip organinės rūgštys (benzenkarboksirūgštis, soro rūgštis ir kt.), fenoliai, stabdo mikroorganizmų veiklą. Plėvelių su šiomis sultimis antimikrobinų savybių poveikio jomis padengtai kalakutienai tyrimo rezultatai yra pateikti 3.20–3.23 paveiksluose. Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant *Studento t* kriterijų.

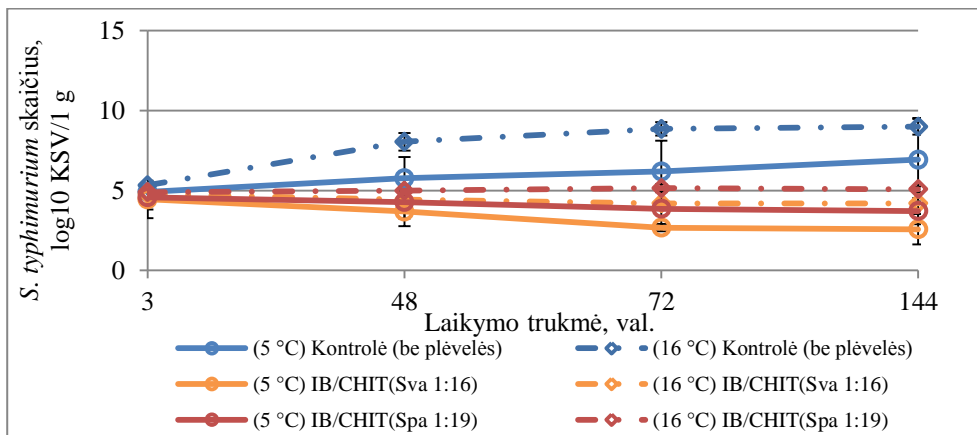
IB/CHIT plėvelės su Sva ir Spa turėjo antimikrobinį poveikį prieš visus tirtus patogeninius mikroorganizmus. Šiek tiek mažesnis jis buvo esant +5 °C temperatūrai, kurioje mikroorganizmai lėčiau vystosi. Nepaisant to, statistiškai reikšmingas šių plėvelių slopinantis poveikis pasireiškė bendram kalakutienos

užterštumui po pirmos eksperimento paros, bandinius laikant +5 °C, prieš *S. typhimurium* – po trečios paros bandinius laikant +5 °C, po antros paros bandinius laikant +16 °C temperatūroje ir prieš *C. jejuni* visą eksperimento laikotarpį. Nors salmonelių kiekis bandiniuose esant +5 °C temperatūrai buvo mažesnis nei +16 °C viso eksperimento metu, tačiau plėvelės jį dar labiau sumažino. Šiuo atveju plėvelė su Sva buvo efektyvesnė nei plėvelė su Spa, nors skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas.

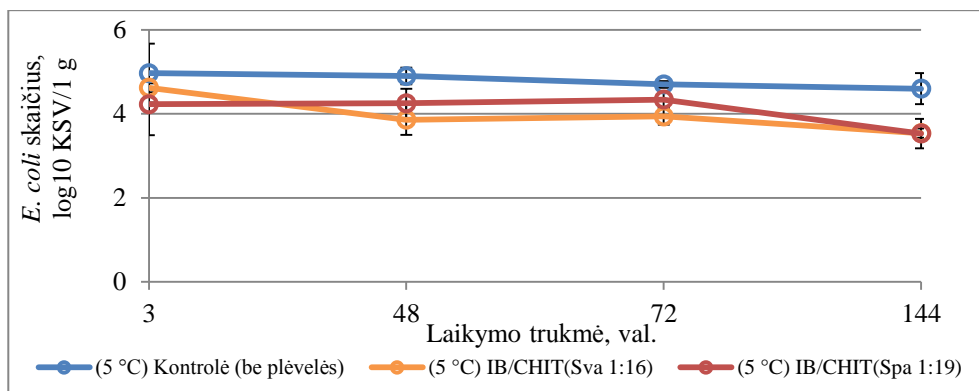
IB/CHIT valgomųjų plėvelių su Sva ir Spa slopinantis poveikis *E. coli* augimui kalakutienoje +5 °C temperatūroje buvo skirtingas. IB/CHIT/Sva plėvelėmis dengtoje kalakutienoje šių patogeninių mikroorganizmų KSV skaičius statistiškai patikimai mažesnis buvo po antros eksperimento paros ir išliko mažesnis visas 6 paras lyginant su kontroliniu bandiniu. IB/CHIT/Spa plėvelėmis dengtoje kalakutienoje *E. coli* KSV skaičius statistiškai patikimai mažesnis už kontrolinio bandinio buvo tik eksperimento pabaigoje, t. y. po 6 laikymo parų. Nepaisant to, šios valgomosios plėvelės veikė antimikrobiškai prieš *E. coli*.



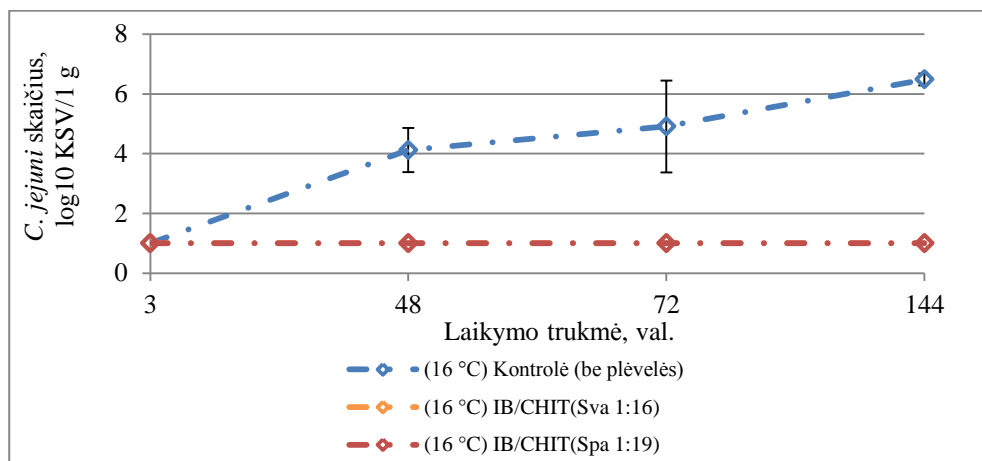
3.20 pav. Išrūgų baltymų su chitozanu bei Sva ir Spa plėvelių įtaka kalakutienos mikrobiologiniam gedimui



3.21 pav. Išrūgų baltymų su chitozanu bei Sva ir Spa plėvelių įtaka *S. typhimurium* augimui kalakutienoje



3.22 pav. Išrūgų baltymų su chitozanu bei Sva ir Spa plėvelių įtaka *E. coli* augimui kalakutienoje



3.23 pav. Išrūgų baltymų su chitozanu bei Sva ir Spa plėvelių įtaka *C. jejuni* augimui kalakutienoje

Apibendrinant tyrimo rezultatus galima teigti, jog svarainių ir spanguolių sultys gali būti natūralus antimikrobinis medžiagų šaltinis ir valgomųjų plėvelių sudėtyje gali apsaugoti šiluma neapdorotą kalakutieną nuo mikrobiologinio gedimo bei pailginti jos laikymo terminą mažiausiai 6 paras esant laikymo sąlygoms +5 °C ar +16 °C temperatūrai.

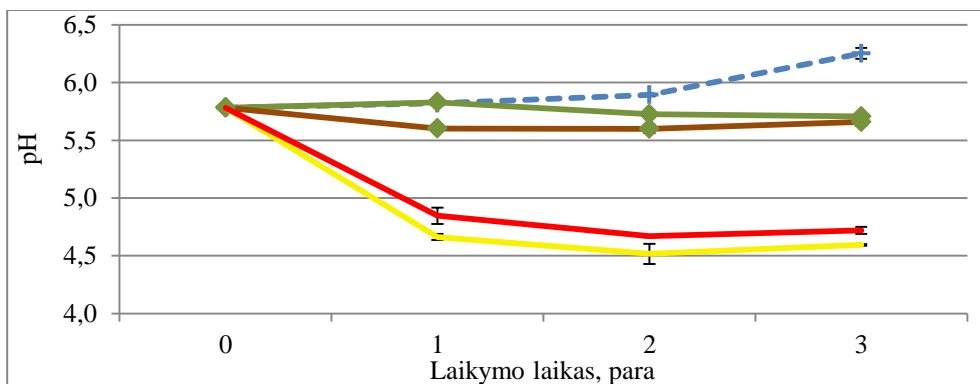
Valgomųjų plėvelių su funkciniais priedais poveikis kalakutienos fizikinėms cheminėms savybėms

Tyrimui naudotos kalakutienos krūtinėlės bandiniai be plėvelės (kontrolė) ir su skirtingos sudėties plėvelėmis (IB/CHIT/S, IB/CHIT/S/laktatas, IB/CHIT/Sva, IB/CHIT/Spa) buvo laikyti uždaroje plastikinėse dėžutėse esant +16 °C temperatūrai 3 paras.

Kalcio laktato naudojimas siekiant sumažinti mikrobiologinę galvijų skerdenų ar skerdenų pusių bei ketvirčių paviršių taršą skerdyklose yra reglamentuojamas ES

(KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 101/2013⁶). Anksčiau pieno rūgšties preparatų naudojimas šiems tikslams nebuvo leidžiamas. Tyrimų metu siekta išsiaiškinti, kaip kalcio laktatas plėvelės sudėtyje paveikia kalakutienos fizikines chemines savybes po to, kai buvo nustatytas jo teigiamas antibakterinis poveikis prieš kalakutienos bendrą mikrobiologinį užterštumą ir kai kuriuos patogeninius mikroorganizmus.

Kalakutienos laikymo metu baltymų hidrolizės produktus rodo įvykę pH pokyčiai, kurie pateikti 3.24 pav. Visomis tirtomis plėvelėmis uždengtos kalakutienos krūtinėlės pH kito lėčiau nei kontrolinio bandinio. Pradinė kontrolinio mėginio pH vertė buvo $5,78 \pm 0,01$ ir išliko statistiškai reikšmingai nepakitusi pirmą laikymo parą. Tačiau po antros laikymo paros ji jau statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo pradinės ($5,89 \pm 0,01$), o per trečią parą dar labiau pakilo iki $6,25 \pm 0,04$. Toks kontrolinio bandinio pH didėjimas po antros laikymo paros gali būti siejamas su prasidėjusiu mėsos ar paukštienos gedimu, pasireiškiančiu baltymų proteolize (Baston et al., 2008). Jos metu vyksta aminorūgščių deamininimosi procesai, pasigamina įvairūs skilimo produktai, tokie kaip amoniakas, ketorūgštys, aldehydai, ketonai, riebalų rūgštys (sočiosios ir nesočiosios) (Napravnikova et al., 2002). Todėl mėsos ar paukštienos audiniuose susikaupęs amoniakas sumažina jos rūgštingumą (Hagyard et al., 1993).



3.24 pav. Kalakutienos pH pokyčiai laikymo metu. Plėvelės: —+— kontrolė (be plėvelės), —◆— IB/CHIT/S, —◆— IB/CHIT/S/laktatas, —◆— IB/CHIT/S/va, —◆— IB/CHIT/Spa

Tuo metu IB/CHIT/S plėvele apdengtos kalakutienos pH po pirmos paros buvo $5,83 \pm 0,02$, o po trijų laikymo parų statistiškai patikimai sumažėjo iki $5,73 \pm 0,02$. IB/CHIT/S/laktatas plėvele dengtos kalakutienos pH išliko stabilus visą eksperimento laikotarpį ir po trečios paros buvo $5,66 \pm 0,04$. Lyginant IB/CHIT/S ir IB/CHIT/S/laktatas plėvelėmis dengtus bandinius su kontroliniais bandiniais laiko atžvilgiu matyti, jog plėvelėmis dengtų bandinių pH statistiškai patikimai buvo

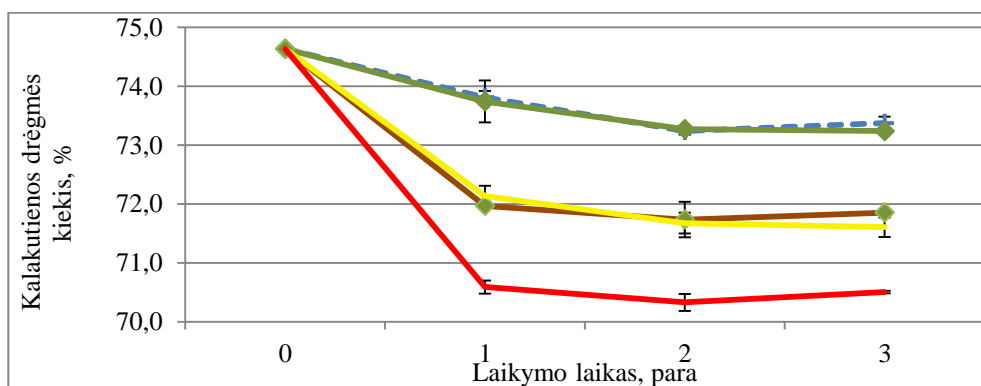
⁶ KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 101/2013, 2013 m. vasario 4 d., dėl pieno rūgšties naudojimo mikrobiologinių teršalų kaupimuisi ant galvijų skerdenų paviršių mažinti.

mažesnis už kontrolinių jau po antros paros, o su kalcio laktato turinčia plėvele – po pirmos paros. Antra vertus, tokiam bandinių pH pokyčiui galėjo turėti įtaką plėvelių sudėtyje esantys komponentai (rūgštyje ištirpintas chitozanas, IB/CHIT/S/laktatas plėvelėje esanti pieno rūgšties druska), kurie pačioms plėvelėms suteikė rūgštinių savybių ir galėjo padidinti bendrą bandinių rūgštingumą, t. y. sumažinti jų pH.

IB/CHIT/Sva ir IB/CHIT/Spa plėvelėmis apdengtos kalakutienos pH vertėms, statistiškai reikšmingai mažesnėms už kontrolinių bandinių pH, įtakos turėjo svarainių ir spanguolių sultys, kuriose yra gausu organinių rūgščių. Nepaisant to, po pirmos eksperimento paros IB/CHIT/Sva plėvele padengtų bandinių pH buvo $4,66 \pm 0,03$, o po trijų – $4,59 \pm 0,01$, t. y. pH išliko statistiškai patikimai stabilus. IB/CHIT/Spa plėvele apdengtos kalakutienos bandinio pH buvo statistiškai patikimai didesnis pirmas dvi paras nei IB/CHIT/Sva plėvele apdengto bandinio. Jo pH po pirmos eksperimento paros buvo $4,85 \pm 0,07$, po antros – statistiškai reikšmingai sumažėjo iki $4,67 \pm 0,01$, o po trijų parų buvo $4,72 \pm 0,03$.

Visų kalakutienos bandinių su skirtingos sudėties plėvelėmis pH kitimo tendencija buvo panaši: pirmas dvi paras paukštienos pH mažėjo ir tik po trečios paros pradėjo didėti, kai kontrolinio bandinio pH nuolat didėjo. Tam įtakos galėjo turėti plėvelių sudėtyje esantys komponentai, sulėtinę kalakutienos proteolitinių fermentų veiklą bei sumažėjęs drėgmės kiekis dėl plėvelių hidrofiliųjų savybių.

Vandens kiekis mėsoje ar paukštienoje daro įtaką jos kokybei ir funkcinių savybių stabilumui. Didžioji raumenų vandens dalis (90 %) yra skaidulose: mažiau jo randama sarkoplazmoje, o daugiau miofibrilėse, todėl vandens surišimas labiausiai priklauso nuo miofibrilių baltymų savybių bei būklės. Raumenyse vanduo yra susikaupęs tarp ląstelių arba ląstelių viduje. Vidinio vandens judėjimui trukdo jį sauganti sarkolema, o tarpląstelinis vanduo gali judėti laisvai. Todėl didžiausi mėsos ar paukštienos masės nuostoliai gaunami dėl laisvo vandens išgaravimo jos laikymo metu. Eksperimento metu buvo nustatyta skirtingos sudėties valgomųjų plėvelių barjerinių savybių įtaka bendram kalakutienos drėgmės kiekiui (3.25 pav.).

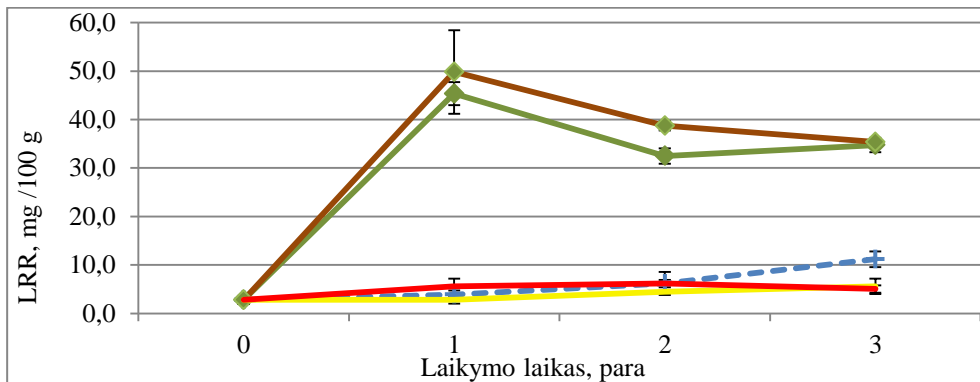


3.25 pav. Drėgmės pokyčiai kalakutienoje laikymo metu.

Plėvelės: —+— kontrolė (be plėvelės), —◆— IB/CHIT/S, —◆— IB/CHIT/S/laktatas, —◆— IB/CHIT/Sva, —◆— IB/CHIT/Spa

Pradinis atšildytos kalakutienos krūtinėlės drėgmės kiekis buvo 74,64 %±0,05 %. Per pirmąją eksperimento parą drėgmės kiekis visuose bandiniuose sumažėjo statistiškai reikšmingai, tačiau vėliau, per 1–3 eksperimento paras jis išliko statistiškai patikimai stabilus. Mažiausi drėgmės nuostoliai buvo bandiniuose, dengtuose IB/CHIT/S plėvelėmis bei kontroliniuose bandiniuose be plėvelės. Kontroliniuose bandiniuose po pirmos paros drėgmės kiekis buvo 73,81 %±0,11 %, po dviejų parų – 73,24 %±0,06 %, po trijų parų – 73,37 %±0,11 %, kurie tarpusavyje statistiškai patikimai nesiskyrė. Per pirmąją parą išgaravus drėgmei iš kontrolinių bandinių paviršinių audinių jie sutankėjo ir tapo ne tokie pralaidūs vandens molekulėms iš gilesnių sluoksnių, todėl drėgmės kiekis per kitas paras išliko beveik nepakitęs. Deja, IB/CHIT/S/laktatas, IB/CHIT/Sva ir IB/CHIT/Spa plėvelėmis dengtuose bandiniuose drėgmės nuostoliai laikymo metu buvo statistiškai reikšmingai didesni nei kontroliniuose bandiniuose. Šios valgomosios plėvelės dėl savo hidrofiliškos prigimties galėjo absorbuoti kalakutienos paviršiaus drėgmę ir tapti pralaidžiomis vandens garams.

Baltymų hidrolizės metu mėsoje ar paukštienoje vyksta pH ir LRR pokyčiai, o LRR kiekis apibūdina baltymų hidrolizės intensyvumą. Deaminantis aminorūgštims, susidaro riebalų rūgštys, kurių dauguma yra lakios, todėl turi įtakos mėsos ar paukštienos kvapo susidarymui. Remiantis LR žemės ūkio ministro 2002 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. 422 „Mėsos ir paukštienos šviežumo įvertinimo techninis reglamentas“, paukštienoje padidėjęs LRR kiekis daugiau nei 9 mg/100 g rodo prasidėjusį jos gedimą. 3.26 pav. pavaizduoti LRR pokyčiai iliustruoja kalakutienos baltymų hidrolizės proceso intensyvumą bei atspindi jos cheminio gedimo proceso spartą.



3.26 pav. LRR pokyčiai kalakutienoje laikymo metu.

Plėvelės: -+- kontrolė (be plėvelės), ◆ IB/CHIT/S, ◆ IB/CHIT/S/laktatas, ◆ IB/CHIT/Sva, ◆ IB/CHIT/Spa

Kontrolinio mėginio pradinis LRR kiekis buvo 2,80±0,80 mg/100 g kalakutienos ir tolygiai didėjo laikymo metu: po pirmos paros iki 3,91±0,80, po antros paros iki 6,16±0,79 mg/100 g, po trečios paros iki 11,19±1,62 mg/100 g. Nors po dviejų parų laikymo nurodytomis sąlygomis kalakutiena (kontrolė) dar atitiko

šviežumo reikalavimus, tačiau gedimo procesas jame vystėsi sparčiai ir po trečios paros jos LRR kiekis statistiškai patikimai viršijo „šviežumo normą“.

Per pirmąją parą IB/CHIT/Sva plėvele apdengtos paukštienos LRR skaičius nepakito, o po trijų parų šia plėvele apdengtos kalakutienos LRR buvo $5,59 \pm 1,58$ mg/100 g, t. y. du kartus mažesnis lyginant su kontroliniu bandiniu ir statistiškai patikimai nesiskyrė nuo pradinio LRR kiekio. Panašūs LRR pokyčiai nustatyti ir bandiniuose, padengtuose IB/CHIT/Spa plėvele. Šios plėvelės statistiškai patikimai sulėtino lakiųjų riebalų rūgščių atsiradimą kalakutienoje, todėl galima teigti, jog stabdė jos gedimą.

Bandinių su IB/CHIT/S ir IB/CHIT/S/laktatas plėvelėmis LRR vertės buvo žymiai didesnės nei kontrolinių bandinių: po pirmos laikymo paros jos siekė atitinkamai $45,34 \pm 2,38$ mg/100 g ir $49,82 \pm 8,61$ mg/100 g kalakutienos, bet po antros laikymo paros jos buvo sumažėjusios atitinkamai iki $32,47 \pm 1,61$ mg/100 g ir $38,73 \pm 0,97$ mg/100 g. Plėvelių kompozicija galėjo turėti tam įtakos: LRR skaičių galėjo padidinti šių plėvelių sudėtyje esančio plastiklio skilimo produktai LRR nustatymo metu.

Tyrimų rezultatai rodo, jog plėvelėmis dengtos kalakutienos pH keitėsi mažai lyginant su kontrole, tačiau drėgmės kiekis bandiniuose su plėvelėmis buvo šiek tiek mažesnis. Svarbu tai, kad plėvelės slopino kalakutienoje lakiųjų riebalų rūgščių susidarymą laikymo metu. Todėl galima daryti prielaidą, kad plėvelėmis apdengtos kalakutienos baltymų hidrolizė vyko lėčiau nei kalakutienoje be plėvelės, o jos gedimas buvo sulėtintas.

4. IŠVADOS

1. Transglutaminaze (TG) paveikto lieso pieno (3,4 % baltymų) ir išrūgų baltymų tirpalo (7 % baltymų) dispersiškumo ir klampos pokyčiai nepriklausė nuo išankstinio baltymų denatūravimo šiluma, bet priklausė nuo TG kiekio, inkubacijos trukmės ir temperatūros. Nustatyta, kad išrūgų baltymų tirpale didelės molekulinės masės baltymų junginiai susiformavo išlaikius tirpalą su TG 40 °C temperatūroje 300 min, o liesame piene baltymų polimerizacijos laipsnis didėjo, didėjant fermento kiekiui (1–4 TV/g baltymų), ilgėjant jo veikimo trukmei (20–60 min) bei didėjant išlaikymo su fermentu temperatūrai (40–50 °C).
2. Palyginus mechanines bei barjerines savybes išrūgų baltymų plėvelių, pagamintų iš TG paveiktų ir nepaveiktų baltymų tirpalų, statistiškai patikimų skirtumų nenustatyta. Išrūgų baltymų plėvelių stiprumas padidėjo įdėjus plastiklių mišinio (sorbitolio ir glicerolio 1:1) priedo ($16,348 \pm 0,838$ MPa) ir chitozano priedo ($47,261 \pm 3,264$ MPa), o vandens garų pralaidumas sumažėjo iki $0,039 \pm 0,001$ g/cm²·24h pridėjus plastiklio sorbitolio.
3. Ištyrus plėvelių inhibitorinį poveikį prieš *S. typhimurium*, *S. agona*, *P. expansum*, *L. sakei*, *L. plantarum*, *C. jejuni* mikroorganizmus, nustatyta, kad išrūgų baltymų plėvelės be priedų antimikrobinėmis savybėmis nepasižymėjo, o chitozano ir išrūgų baltymų bei chitozano mišinio (1:1) plėvelės slopino visų tirtų mikroorganizmų vystymąsi, išskyrus *P. expansum*. Išrūgų baltymų plėvelėms inhibitorinį poveikį prieš analizuotus mikroorganizmus suteikė konservantai: propolis, nizinas, kalcio laktatas, kalio sorbatas, benzenkarboksirūgštis bei askorbo rūgštis. Išrūgų baltymų ir chitozano mišinio plėvelių sudėtį praturtinus svarainių ir spanguolių sultimis, jos inhibitoriškai veikė ir patogenines bakterijas *S. typhimurium*, *S. agona*, *C. jejuni*, ir pieno rūgšties bakterijas *L. sakei*, *L. plantarum* bei slopino *P. expansum* augimą.
4. Pjaustytus obuolius padengus dvisluoksne išrūgų baltymų ir chitozano danga, sulėtėjo obuolių rudavimo reakcijos (12–24 val.), sumažėjo paviršiaus sluoksnio kietumas ir drėgmės nuostoliai (6–14 %), obuoliuose išliko daugiau fenolinių junginių. Nustatyta, kad džiovinant dangas elektrinio lauko aplinkoje obuolių fizikinės savybės statistiškai reikšmingai nepakito, bet danga susiformavo greičiau. Svarainių ir spanguolių sulčių priedas išrūgų baltymų bei išrūgų baltymų ir chitozano plėvelėse sulėtino *P. expansum* augimą modelinėje obuolio sistemoje atitinkamai nuo $21,0 \pm 7,1$ % iki $44,5 \pm 7,5$ % ir nuo $25,0 \pm 4,2$ % iki 100,0 %. Skirtumus lėmė skirtingas antocianinų ir benzenkarboksi rūgšties kiekis sultyse. Tiriant plėvelių slopinantį poveikį *P. expansum* obuolių natūralioje sistemoje, nustatyta, kad visos tirtos plėvelės slopino mikroskopinio grybo augimą (nuo $44,5 \pm 3,4$ % iki $70,2 \pm 3,9$ %), tačiau visiškai jo sustabdyti nei vienu atveju nepavyko.
5. Ištyrus įvairios sudėties dvisluoksnių valgomųjų dangų poveikį braškėms, nustatyta, jog nokimo ir senėjimo procesai uogose su dangomis vyko lėčiau nei braškėse be dangos – užfiksuota lėtesnė fenolinių junginių, tarp jų ir antocianinų,

sintezė ir lėtesnis masės mažėjimas. Didžiausią apsauginį poveikį braškėms padarė dvisluoksnė išrūgų baltymų bei chitozано danga, tačiau efektyviau jos apsauginis poveikis pasireiškė 20 °C nei 4 °C temperatūroje dėl žemoje temperatūroje sulėtėjusių biocheminių procesų. Dangų poveikis askorbo rūgšties koncentracijai braškėse buvo pastebėtas uogas laikant ilgiau kaip 7 paras, tačiau skirtumo tarp skirtingos sudėties dangų nustatyta nebuvo.

6. Išrūgų baltymų ir chitozано bei chitozано plėvelės, pagamintos tiek su cheminiais konservantais (kalcio laktatu, kalio sorbatu, benzenkarboksirūgštimi bei askorbo rūgštimi), tiek su propoliu, svarainių arba spanguolių sultimis ir uždėtos ant šviežios kalakutienos, stabdė mikrobiologinį mėsos gedimą 6 paras – bendras bakterijų skaičius visuose mėginiuose buvo $<10^6$ KSV/1 g – ir mažiausiai 6 paras sulėtino patogeninių mikroorganizmų *S. typhimurium*, *E. coli* bei *C. jejuni*, kuriais buvo užkrėsta kalakutiena, vystymąsi. Nustatytas išrūgų baltymų ir chitozано plėvelių su kalcio laktatu ir svarainių arba spanguolių sultimis slopinantis poveikis kalakutienos cheminiam gedimui. Plėvelės slopino kalakutienoje lakiųjų riebalų rūgščių susidarymą laikymo metu, todėl plėvelėmis apdengtos kalakutienos baltymų hidrolizė vyko lėčiau nei kalakutienoje be plėvelės.

Apibendrinanti išvada

Pagamintos geromis mechaninėmis ir barjerinėmis savybėmis pasižyminčios išrūgų baltymų valgomosios plėvelės ir dangos su chitozано, sorbitolio bei glicerolio priedais. Nustatyta, kad spanguolių bei svarainių sulčių priedai išrūgų baltymų ir chitozано valgomųjų plėvelių ir dangų sudėtyje sulėtina kai kurių maisto produktų gedimą, pailgina jų tinkamumo vartoti laiką ir užtikrina jų mikrobiologinę saugą.

5. LITERATŪROS ŠALTINIŲ SARAŠAS

1. Aaby, K.; Ekeberg, D.; Skrede, G. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria ananassa*) fruits by different hplc detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, p. 4395–4406.
2. Aaby, K., et al. Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees; impact of achene level and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, p. 5156–5166.
3. Abdou, E.S.; Nagy, K.S.A.; Elsabee, M.Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 2008, 99, p. 1359–1367.
4. Agyare, K.K.; Damodaran, S. pH-stability and thermal properties of microbial transglutaminase-treated whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, p. 1946–1953.
5. Agyare, K.K.; Damodaran, S. Effect of microbial transglutaminase treatment on thermal stability and pH-solubility of heat-shocked whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30, p. 12–18.
6. Alting, A.C., et al. Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, 2003, 17, p. 469–479.
7. Altunkaya, A. Effect of whey protein concentrate on phenolic profile and browning of fresh-cut lettuce (*Lactuca Sativa*). *Food Chemistry*, 2011, 128, p. 754–760.
8. Anema, S.G.; McKenna, A.B. Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44, p. 422–428.
9. Ansorena, M.R.; Marcovich, N.E.; Roura, S.I. Impact of edible coatings and mild heat shocks on quality of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* L.) during refrigerated storage. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 59, p. 53–63.
10. Arroyo-Lopez, F.N., et al. Modelling the inhibition of sorbic and benzoic acids on a native yeast cocktail from table olives. *Food Microbiology*, 2008, 25, p. 566–574.
11. Avena-Bustillos, R.J.; Krochta, J.M. Water vapor permeability of caseinatebased edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content. *Journal of Food Science*, 1993, 58, p. 904–907.
12. Avigdori-Avidov, H. Strawberry. In: Monselise, S. (Editor), *Handbook of Fruit Set and Development*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1986, p. 419–448. ISBN 0-8493-3260-5.
13. Ayala-Zavala, J.F., et al. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *LWT-Food Science and Technology*, 2004, 37, p. 687–695.
14. Aydt, T.P.; Weller, C.L.; Testin, R.F. Mechanical and barrier properties of edible corn and wheat protein films. *Transactions of the ASAE*, 1991, 34, p. 207–211.
15. Baert, K., et al. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 119, p. 170–181.
16. Baert, K., et al. The effect of inoculum size on the growth of *Penicillium expansum* in apples. *Food Microbiology*, 2008, 25, p. 212–217.

17. Baert, K. et al. Evaluation of strategies for reducing patulin contamination of apple juice using a farm to fork risk assessment model. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 154, p. 119–129.
18. Baldwin, E.A.; Nisperros-Cariedo, M.O.; Baker, R.A. Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1995, 35, p. 509–524.
19. Barthelmes, G.; Pratsinis, S.E.; Buggisch, H. Particle size distributions and viscosity of suspensions undergoing shear-induced coagulation and fragmentation. *Chemical Engineering Science*, 2003, 58, p. 2893–2902.
20. Baston, O., et al. Refrigerated chicken meat freshness. Correlation between easily hydrolysable nitrogen, pH value and biogenic amines contents. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI - Food Technology*, New Series, II (XXXI), 2008, p. 37–43.
21. Benassi, M.T.; Antunes, A.J. A comparison of meta-phosphoric and oxalic acids as extractant solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 1988, 31, p. 507–513.
22. Beverly, R.L., et al. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 2008, 25, p. 534–537.
23. Bico, S.L.S., et al. Combined effects of chemical dip and/or carrageenan coating and/or controlled atmosphere on quality of fresh-cut banana. *Food Control*, 2009, 20, p. 508–514.
24. Bogue, Beuford A.; Myers, Garry L. *Method for manufacturing edible film*. Original Assignee: Monosol Rx, Llc. Int. Cl. A61F 13/00, A61K 47/00. 2012-10-09.
25. Bonilla, J., et al. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 2012, 26, p. 9–16.
26. Bosco, F., et al. Thermal stability and flame resistance of cotton fabrics treated with whey proteins. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 94, p. 372–377.
27. Bouaouina, H., et al. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal*, 2006, 16, p. 275–284.
28. Bourne, M.C. Physical properties and structure of horticultural crops. In: Peleg, M., Bagley, E.B. (Eds.), *Physical Properties of Foods*. AVI Publishing Co, Westport, CT, 1983, p. 207–228. ISBN 0-87055-418-2.
29. Bourtoom, T. Edible films and coatings: characteristics and properties (review article). *International Food Research Journal*, 2008, 15, p. 237–248.
30. Boye, J.I., et al. Factors affecting molecular characteristics of whey protein gelation. *International Dairy Journal*, 1995, 5, p. 337–353.
31. Brandon, E.F.A., et al. Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children. *World Mycotoxin Journal*, 2012, 5, p. 391–403.
32. Brault, D.; D'Aprano, G.; Lacroix, M. Formation of free-standing-sterilized films from irradiated caseinates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, p. 2964–2969.
33. Bruno, M., et al. Engineering properties of edible transglutaminase cross-linked caseinate-based films. *Food and Bioprocess Technology*, 2008, 1, p. 393–404.

34. Cagri, A.; Ustunol, Z.; Ryser, E.T. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing aminobenzoic or sorbic acids. *Journal of Food Science*, 2001, 66, p. 865–870.
35. Caillet, S., et al. Antimicrobial effects of fractions from cranberry products on the growth of seven pathogenic bacteria. *Food Control*, 2012, 23, p. 419–428.
36. Castaldo, S.; Capasso, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 2002, 73, p. 1–6.
37. Castro, I., et al. The effect of electric field on important food-processing enzymes: comparison of inactivation kinetics under conventional and ohmic heating. *Journal of Food Science*, 2004, 69, C696–C701.
38. Chaurasia, V.; Chand, N.; Bajpai, S.K.. Water sorption properties and antimicrobial action of zinc oxide nanoparticles-loaded cellulose acetate films. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 2010, 47, p. 309–317.
39. Chen, L.; Ingham, B.H.; Ingham, S.C. Survival of *Penicillium expansum* and patulin production on stored apples after wash treatments. *Journal of Food Science*, 2004, 69, p. C669–C675.
40. Chick, J.; Ustunol, Z. Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. *Journal of Food Science*, 1998, 63, p. 1024–1027.
41. Chien, P.J.; Sheu F.; Yang, F.H. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78, p. 225–229.
42. Ciesla, K.; Salmieri, S.; Lacroix, M. Modification of the properties of milk protein films by gamma radiation and polysaccharide addition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86, p. 908–914.
43. Clark, A.H.; Lee-Tuffnell, C.D. Gelation of globular proteins. In Mitchell, J.R.; Ledward, D.A. *Functional properties of food macromolecules*. London: Elsevier, 1986, p. 203–272.
44. Cordenunsi, B.R., et al. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, p. 2581–2586.
45. Cote, J., et al. Effect of juice processing on cranberry antibacterial properties. *Food Res Int*, 2011, 44, p. 2922–2929.
46. Correa-Betanzo, J., et al. Effect of a sodium caseinate edible coating on berry cactus fruit (*Myrtillocactus geometrizans*) phytochemicals. *Food Research International*, 2011, 44, p. 1897–1904.
47. Coughlan, K., et al. Combined effects of proteins and polysaccharides on physical properties of whey protein concentrate-based edible films. *Journal of Food Science*, 2004, 69, p. 271–275.
48. Cuq, B., et al. Relative humidity and temperature effects on mechanical and water vapor barrier properties of myofibrillar protein-based films. *Polymer Gels and Networks*, 1997, 5, p. 1–15.
49. Česonienė, L.; Jasutienė, I.; Šarkinas, A. Phenolics and anthocyanins in berries of European cranberry and their antimicrobial activity. *Medicina*, 2009, 45, p. 992–999.
50. Dannenberg, F.; Kessler, H.G. Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Food Science*, 1988a, 53, p. 258–263.

51. Dannenberg, F.; Kessler, H.G. Application of reaction kinetics to the denaturation of whey proteins in heated milk. *Milchwissenschaft*, 1988b, 43, p. 3–7.
52. Dannenberg, F.; Kessler, H.G. Thermodynamic approach to kinetics of β -lactoglobulin denaturation in heated skim milk and sweet whey. *Milchwissenschaft*, 1988c, 43, p. 139–142.
53. Debeaufort, F.; Queada-Gallo, J.A.; Voilley, A. Edible films and coatings: tomorrow's packaging: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1998, 38, p. 299–313.
54. Delves-Broughton, J. Nisin as a food preservative. *Food Australia*, 2005, 57, p. 525–527.
55. Devlieghere et al. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 2004, 21, p. 703–714.
56. Di Piero, P., et al. Chitosan-whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules*, 2006, 7, p. 744–749.
57. Di Piero, P., et al. Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT-Food Science and Technology*, 2011, 44, p. 2324–2327.
58. Di Piero, P., et al. Effect of transglutaminase on the mechanical and barrier properties of whey protein/pectin films prepared at complexation pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 4593–4598.
59. Diaz, O.; Candia, D.; Cobos, A. Effects of ultraviolet radiation on properties of films from whey protein concentrate treated before or after film formation. *Food Hydrocolloids*, 2016, 55, p. 189–199.
60. Duan, J., et al. Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 59, p. 71–79.
61. Durango, A.M.; Soares, N.F.F.; Andrade, N.J. Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, 2006, 17, p. 336–341.
62. Edwards, P.B.; Creamer, L.K.; Jameson, G.B. Structure and stability of whey proteins. In Thompson, A.; Boland, M.; Singh, H. *Milk Proteins: From Expression to Food*. Academic Press/Elsevier, USA, 2009, p. 163–203. ISBN 0-12-374039-8.
63. Eissa, A.S.; Khan, S.A. Acid-gelation of enzymatically modified, preheated whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, p. 5010–5017.
64. Elsabee, M.Z.; Abdou, E.S. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering*, 2013, C 33, p. 1819–1841.
65. Emamifar, A. Applications of antimicrobial polymer nanocomposites in food packaging. In Hashim, A. *Advances in nanocomposite technology*. InTech, Croatia, 2011, p. 299–318. ISBN 978-953-307-347-7.
66. Emiroglu, Z.K., et al. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 2010, 86, p. 283–288.
67. Erdohan, Z.O.; Turhan, K.N. Barrier and mechanical properties of methylcellulose-whey protein films. *Packaging Technology and Science*, 2005, 18, p. 295–302.

68. Fabra, M., et al. Influence of the homogenization conditions and lipid self-association on properties of sodium caseinate based films containing oleic and stearic acids. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25, p. 1112–1121.
69. Faergemand, M., et al. Transglutaminase: effect on instrumental and sensory texture of set-style yoghurt. *Milchwissenschaft*, 1999, 54, p. 563–566.
70. Faergemand, M.; Otte, J.; Qvist, K.B. Enzymatic cross-linking of whey proteins by a Ca^{2+} independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. *Food Hydrocolloids*, 1997, 11, p. 19–25.
71. Faergemand, M.; Otte, J.; Qvist, K.B. Cross-linking of whey proteins by enzymatic oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, p. 1326–1333.
72. Falguera, V., et al. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*, 2011, 22, p. 292–303.
73. Fattouch, S., et al. Antimicrobial activity of tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, p. 963–969.
74. Fattouch, S., et al. Comparative analysis of polyphenols profiles and antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian pome fruit pulp and peel aqueous acetone extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, p. 1084–1090.
75. Fernandez-Pan, I.; Carrion-Granda, X.; Mate, J.I. Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food Control*, 2014, 36, p. 69–75.
76. Farrell, H.M.J., et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk – sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87, p. 1641–1674.
77. Ferreira, C.O., et al. Characterization of chitosan – whey protein films at acid pH. *Food Research International*, 2009, 42, p. 807–813.
78. Fitzsimons S.M.; Mulvihill, D.M.; Morris, E.R. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, 2007, 21, p. 638–644.
79. Garcia, M.A.; Martino, M.N.; Zaritzky, N.E. Plasticized starch-based coatings to improve strawberry (*Fragaria ananassa*) quality and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, p. 3758–3767.
80. Gauche, C.; Barreto, P.L.M.; Bordignon-Luiz, M.T. Effect of thermal treatment on whey protein polymerization by transglutaminase: implications for functionality in processed dairy foods. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, 43, p. 214–219.
81. Gennadios, A., et al. Mechanical and barrier properties of egg albumen films. *Cereal Chemistry*, 1996, 70, p. 426–429.
82. Gennadios, A.; Hanna, M.A.; Kurth, L.B. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 1997, 30, p. 337–350.
83. Geraldine, R.M., et al. Characterization and effect of edible coatings on minimally processed garlic quality. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72, p. 403–409.
84. Ghanbarzadeh, B., et al. Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films. *Food Science and Technology*, 2007, 40, p. 1191–1197.

85. Ghasemlou, M., et al. Characterization of edible emulsified films with low affinity to water based on kefir and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 49, p. 378–384.
86. Giancone, T., et al. Role of constituents on the network formation of hydrocolloid edible films. *Journal of Food Engineering*, 2008, 89, p. 195–203.
87. Goetz, J.; Koehler, P. Study of the thermal denaturation of selected proteins of whey and egg by low resolution NMR. *LWT-Food Science and Technology*, 2005, 38, p. 501–512.
88. Gómez-Estaca, J., et al. Biodegradable gelatine-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 2010, 27, p. 889–896.
89. Gonzalez-Aguilar, G.A., et al. Preserving quality of fresh-cut products using safe technologies. *Journal of Consumer Protection and Food safety*, 2010, 5, p. 65–72.
90. Gounga, M.E.; Xu, S.Y.; Wang, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *Journal of Food Engineering*, 2007, 83, p. 521–530.
91. Greener Donhowe, I.; Fennema, O. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. In Krochta, J. M.; Baldwin, E.; Nisperos-Carriedo, M. O. *Edible coatings and films to improve food quality*. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA, 1994, p. 1–24. ISBN 1-56676-113-1.
92. Guilbert, S. Technology and application of edible protective films. In Mathlouthi, M. *Food packaging and preservation: Theory and practice*. Elsevier Applied Science, New York, 1986, p. 371–394.
93. Guo, M., et al. Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. *Food Control*, 2014, 40, p. 64–70.
94. Guyot, C.; Kulozik, U. Effect of transglutaminase-treated milk powders on the properties of skim milk yoghurt. *International Dairy Journal*, 2011, 21, p. 628–635.
95. Guzey, D.; McClements, D.J. Characterization of β -lactoglobulin–chitosan interactions in aqueous solutions: a calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20, p. 124–131.
96. Haard, N.F. Characteristics of edible plant tissues. In: Fennema, O.R. (Ed.), *Principles of Food Science*, Part I: Food Chemistry. Marcel Dekker, New York, 1976, p. 677–764.
97. Hagyard, C.; Cummings, T.; Martin, A. Effect of ammonia exposure on subsequent rancid flavor development in lamb. *Journal of Muscle Food*, 1993, 4, p. 245–251.
98. Han, C., et al. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology*, 2004, 33, p. 67–78.
99. Han, J.; Bourgeois, S.; Lacroix, M. Protein-based coatings on peanut to minimize oil migration. *Food Chemistry*, 2009, 115, p. 462–468.
100. Han, J.H.; Gennadios, A. Edible films and coatings: a review. In Han, J.H. *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, Holland, 2005, p. 239–259. ISBN 0-12-311632-5.

101. Harb, C.B., et al. Thermal modifications of structure and co-denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases. *Nahrung/Food*, 2002, 46, p. 283–289.
102. Hattori, M., et al. Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48, p. 2050–2056.
103. He, D., et al. Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. *Botanical Bulletin-Academia Sinica Taipei*, 2003, 44, p. 211–216.
104. Hernandez-Munoz, P., et al. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 2008, 110, p. 428–435.
105. Hillier, R.M.; Lyster, R.L.J. Whey protein denaturation in heated milk and cheese whey. *Journal of Dairy Research*, 1979, 46, p. 95–102.
106. Huffman, L.M.; de Barros Ferreira, L. Whey-based ingredients. In Chandan, R.C.; Kilara, A. *Dairy Ingredients for Food Processing*. Blackwell Publishing Ltd., Ames, IA, 2011, p. 179–198. ISBN 978-0-8138-1746-0.
107. Huppertz, T.; Kelly, A.L.; Fox, P.F. Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal*, 2002, 12, p. 561–572.
108. Imeson, A.F.; Ledward, D.A.; Mitchell, J.R. On the nature of the interaction between some anionic polysaccharide acid proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1977, 28, p. 669–672.
109. Jasutienė, I.; Viškeliienė, R. Mėlynių, juodųjų serbentų ir spanguolių sulčių bei ekstraktų sudėtis ir antioksidacinis aktyvumas. *Maisto Chemija ir Technologija*, 2006, 40, p. 19–26.
110. Jiang, Z.; Neetoo, H.; Chen, H. Efficacy of freezing, frozen storage and edible antimicrobial coatings used in combination for control of *Listeria monocytogenes* on roasted turkey stored at chiller temperatures. *Food Microbiology*, 2011, 28, p. 1394–1401.
111. Jiang, J., et al. Structure-modifying alkaline and acidic pH-shifting processes promote film formation of soy proteins. *Food Chemistry*, 2012, 132, p. 1944–1950.
112. de Jong, G.A.H.; Boumans J.W.L.; Wijngaards, G. *Food grade transglutaminase inhibitor and uses thereof*. Applicant: Nederlandse Organisatie voor toegepast-natuurwetenschappelijk Onderzoek, TNO, 2628 VK Delft (NL). Int Cl.⁷: A23J 1/20, A23J 3/08, A23L 1/305, A23C 9/14. European patent EP 1201136A1, 02.05.2002 Bulletin 2002/18.
113. de Jong, G.A.H.; Koppelman, S.J. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. *Journal of Food Science*, 2002, 67, p. 279–2806.
114. Kadam, D.M., et al. Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 2013, 117, p. 133–140.
115. Kafkas, E., et al. Quality characteristics of strawberry genotypes at different maturation stages. *Food Chemistry*, 2007, 100, p. 1229–1236.
116. Kalt, W., et al. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47, p. 4638–4644.

117. Karbowski, T., et al. Effect of plasticizers (water and glycerol) on the diffusion of a small molecule in κ -carragennan biopolymer films for edible coating application. *Biomacromolecules*, 2006, 7, p. 2011–2019.
118. Kilinceker, O.; Dogan, I.S.; Kucukoner, E. Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. *LWT-Food Science and Technology*, 2009, 42, p. 868–873.
119. Kessler, H.G.; Beyer, H.J. Thermal denaturation of whey proteins and its effect in dairy technology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1991, 13, p. 165–173.
120. Kester, J.J.; Fennema, O.R. Edible films and coatings: a review. *Food technology*, 1986, 40, p. 47–59.
121. Kon, S.; Schwimmer, S. Depolymerization of polysaccharides by active oxygen species derived from a xanthine oxidase system. *Journal of Food Biochemistry*, 1977, 1, p. 141–152.
122. Korkina, L.G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cellular and Molecular Biology*, 2007, 53, p. 15–25.
123. Kosar, M., et al. Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, p. 1586–1589.
124. Kristo, E.; Koutsoumanis, K.P.; Biliaderis, C.G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22, p. 373–386.
125. Kristo, W.; Hazizaj, A.; Corredig, M. Structural changes imposed on whey proteins by UV irradiations in a continuous UV light reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60, 6204–6209.
126. Krochta, J.M.; de Mulder-Johnston, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, 1997, 51, p. 61–74.
127. Krochta, J.M. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In Gennadios, A. *Protein-based films and coatings*. CRC Press LLC, New York, 2002, p. 1–41. ISBN 1-58716-107-9.
128. Kumar, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 2000, 46, p. 1–27.
129. Kurek, M.; Galus, S.; Debeaufort, F. Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. *Food Packaging and Shelf Life*, 2014, 1, p. 56–67.
130. Kuwajima, K.; Sugai, S. Equilibrium and kinetics of the thermal unfolding of α -lactalbumin. The relation to its folding mechanism. *Biophysical Chemistry*, 1978, 8, p. 247–254.
131. Lacombe, A., et al. Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 139, p. 102–107.
132. Lacroix, M.; Cooksey, K. Edible films and coatings from animal-origin proteins. In Han, J. *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, Holland, 2005, p. 301–317. ISBN 0-12-311632-5.

133. Lacroix, M.; Le Tien, C. Edible films and coatingst from nonstarch polysaccharides. In Han, J. *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, Holland, 2005, p. 338–361. ISBN 0-12-311632-5.
134. Laplante S.; Turgeon S.L.; Paquin P. Effect of pH, ionic strength, and composition on emulsion stabilizing properties of chitosan in a model system containing whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 2004, 18, p. 1–9.
135. Landrigan, M., et al. Postharvest water relationship and tissue browning of rambutan fruit. *Scientia Horticulturae*, 1996, 66, p. 201–208.
136. Latou, E., et al. Combined effect of chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken breast fillets. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 55, p. 263–268.
137. Lazard, Laurent; Doreau, Albert; Nadison, Jeffrey. *Edible films*. Applicant: National Starch and Chemical Investment Holding Corporation. Int. Cl. C08L 3/00, A23G 3/00, A23P 1/08. 1993-06-23.
138. Leceta, I.; Guerrero, P.; de la Caba, K.. Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 93, p. 339–346.
139. Letendre, M., et al. Physicochemical properties and bacterial resistance of biodegradable milk protein films containing agar and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002 b, 50, p. 6017–6022.
140. Li, Y. et al. Fabrication and characterization of TiO₂/whey protein isolate nanocomposite film. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25, p. 1098–1104.
141. Li et al. Effects of chitosan on control of postharvest blue mold decay of apple fruit and the possible mechanisms involved. *Scientia Horticulturae*, 2015, 186, p. 77–83.
142. Liao, M.; Seib, P. Chemistry of L-ascorbic acid related to foods. *Food Chemistry*, 1988, 30, p. 289–312.
143. Lim, L.T.; Mine, Y.; Tung, M.A. Transglutaminase cross-linked egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability. *Journal of Food Science*, 1998, 46, p. 4022–4029.
144. Lim, L.T.; Mine, Y.; Tung, M.A. Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature and glycerol content. *Journal of Food Science*, 1999, 64, p. 616–622.
145. Loewus, F.A.; Loewus, M.W. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1987, 5, p. 101–119.
146. Lorenzen, P.C. Renneting properties of transglutaminase-treated milk. *Milchwissenschaft*, 2000, 55, p. 433–437.
147. Lowings, P.H.; Cutts, D.F. The preservation of fresh fruits and vegetables. In: *Proceedings of the Institute of the Food Science and Technology, Annual Symposium, 1981*. Nottingham, UK, 1982.
148. Morales, H. et al. Inoculum size and intraspecific interactions affects *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *Food Microbiology*, 2008, 25, p. 378–385.
149. Maftoonazad, N.; Badii, F. Use of edible films and coatings to extend the shelf life of food products. *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*, 2009, 1, p. 162–170.

150. Mahmoud, R.; Savello, P.A. Solubility and hydrolyzability of films produced by transglutaminase catalytic cross-linking of whey protein. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76, p. 29–35.
151. Marcelo, P.A.; Rizvi, S.S.H. Physicochemical properties of liquid virgin whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 2008, 18, p. 236–246.
152. Marciulionis, P.; Zebrauskas, S. Numerical analysis of electric wind in corona field. *Electronics and Electrical Engineering*, 2011, 10, p. 15–18.
153. Marfil, P.H.M.; Santos, E.M.; Telis, V.R.N. Ascorbic acid degradation kinetics in tomatoes at different drying conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, 41, p. 1642–1647.
154. Mariniello, L., et al. Preparation and mechanical properties of edible pectin-soy flour films obtained in absence or presence of transglutaminase. *Journal of Biotechnology*, 2003, 102, p. 191–198.
155. Matheis, G.; Whitaker, J.R. A review: enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. *Journal of Food Biochemistry*, 1987, 11, p. 309–327.
156. McGuire, R. Reporting of objective color measurement. *Horticulture Science*, 1992, 27, p. 1254–1255.
157. McHugh, T.H.; Krochta, J.M. Permeability properties of edible films. In Krochta, J.M.; Baldwin, E.; Nisperos-Carriedo, M.O. *Edible coatings and films to improve food quality*. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA, 1994, p. 139–187. ISBN 1-56676-113-1.
158. McHugh, T.H.; Krochta, J.M. Sorbitol-plasticized vs. glycerol-plasticized whey-protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994 a, 42, p. 841–845.
159. McHugh, T.H.; Krochta, J.M. Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of American Oil Chemists Society*, 1994 b, 71, p. 307–312.
160. McHugh, T.H.; Senesi, E. Apple wraps: a novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh -cut apples. *Journal of Food Science*, 2000, 65, p. 480–485.
161. Millette, M., et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, 2007, 18, p. 878–884.
162. Miller, K.S.; Chiang, M.T.; Krochta, J.M. Heat curing of whey protein films. *Journal of Food Science*, 1997, 62, p. 1189–1193.
163. Miller, N.J.; Rice Evans, C.A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 1997, 60, p. 331–337.
164. Miralles, B., et al. The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between β -lactoglobulin and chitosan. *Food Chemistry*, 2007, 100, p. 1071–1075.
165. Mleko, S.; Foegeding, E.A. Formation of whey protein polymers: effects of properties a two-step heating process on rheological. *Journal of Texture Studies*, 1999, 30, p. 137–149.
166. Mohamed, A.Y.I.; Aboul-Anean, H.E.; Hassan, A.M. Utilization of edible coating in extending the shelf life of minimally processed prickly pear. *Journal of Applied Sciences Research*, 2013, 9, p. 1202–1208.

167. Monahan, F.J.; German, J.B.; Kinsella, J.E. Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulfide interchange reactions during heatinduced gelation of whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43, p. 46–52.
168. Montero, T.M., et al. Quality attributes of strawberry during ripening. *Scientia Horticulturae*, 1996, 65, p. 239–250.
169. del R. Moreira, M., et al. Edible coatings on fresh squash slices: effect of film drying temperature on the nutritional and microbiological quality. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2009, 33, p. 226–236.
170. Motoki, M.; Serugo, K. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 1998, 9, p. 204–210.
171. Mounsey, J. S., et al. The effect of heating on β -lactoglobulin-chitosan mixtures as influenced by pH and ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22, p. 65–73.
172. Mudgal, P.; Daubert, C.R.; Foegeding, E.A. Cold-set thickening mechanism of β -lactoglobulin at low pH: concentration effects. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23, p. 1762–1770.
173. Mulvihill, D.M.; Donovan, M. Whey proteins and their thermal denaturation—A review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 1987, 11, p. 43–75.
174. Mulvihill, D.M.; Ennis, M.P. Functional milk proteins: Production and utilisation. In Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. *Advanced dairy chemistry. Vol. 1. Proteins*. Kluwer Academic, New York, 2003, p. 1175–1228. ISBN 0-306-47271-6.
175. Napravnikova, E.; Vorlova, L.; Malota, L. Changes in hygienic quality of vacuum-packed pork during storage. *Journal Acta Veterinaria Brno*, 2002, 71, p. 255–262.
176. Natrajan, N.; Sheldon, B.W. Evaluation of bacteriocin-based packaging and edible film delivery systems to reduce *Salmonella* in fresh poultry. *Poultry Science*, 1995, 74, p. 31.
177. Ninomiya, Hirofumi; Suzuki, Shoji; Ishii, Kazuhiro. *Edible film and method of making same*. Original Assignee: Mitsubishi Rayon Co., Ltd. Int. Cl. B65D 30/08. 1997-04-15.
178. Nonaka, M., et al. Polymerisation of several proteins by Ca^{2+} – independent transglutaminase derived from micro-organism. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1989, 53, p. 2619–2623.
179. Nunes, M.C.N., et al. Controlling temperature and water loss to maintain ascorbic acid levels in strawberries during postharvest handling. *Journal of Food Science*, 1998, 63, p. 1033–1036.
180. Nunes, M.C.N., et al. Fruit maturity and storage temperature influence response of strawberries to controlled atmospheres. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2002, 127, pp. 836-842.
181. Nunes, M.C.N., et al. Physicochemical changes during strawberry development in the field compared to those that occur in harvested fruit during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86, p. 180–190.
182. Oh, J.H., et al. Characteristics of edible films made from dairy proteins and hydrolysate cross-linked with transglutaminase. *International Journal of Food Science and Technology*, 2004, 39, p. 287–294.
183. Ohtsuka, T., et al. Comparison of deamidation activity of transglutaminases. *Journal of Food Science*, 2001, 66, p. 25–29.

184. Olsson, M.E., et al. Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria ananassa*): effects of cultivar, ripening, and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, p. 2490–2498.
185. Oms-Oliu, G.; Soliva-Fortuny, R.; Martin-Belloso, O. Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pear. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 50, p. 87–94.
186. Oses, J., et al. Stability of the mechanical properties of edible films based on whey protein isolate during storage at different relative humidity. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23, p. 125–131.
187. Ou, S., et al. An improved method to determine -SH and -S-S- group content in soymilk protein. *Food Chemistry*, 2004, 88, p. 317–320.
188. Ouattara, B., et al. Microbiological and biochemical characteristics of ground beef as affected by gamma irradiation, food additives and edible coating film. *Radiation Physics and Chemistry*, 2002, 63, p. 299–304.
189. Ouattara, B., et al. Use of γ -irradiation cross-linking to improve the water vapor permeability and the chemical stability of milk protein films. *Radiation Physics and Chemistry*, 2002, 63, p. 821–825.
190. Oussalah, M., et al. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, p. 5598–5605.
191. Park, H.J. Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 1999, 10, p. 254–260.
192. Park, S.Y.; Marsh, K.S.; Rhim, J.W. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *Journal of Food Science*, 2002, 67, p. 194–197.
193. Paschoalick, T.M., et al. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile Tilapia. *Food Hydrocolloids*, 2003, 17, p. 419–427.
194. Pereda, M.; Aranguren, M. I.; Marcovich, N. E. Characterization of chitosan/caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*, 2008, 107, p. 1080–1090.
195. Perez-Gago, M.B.; Krochta, J.M. Formation and properties of whey protein films and coatings. In Krochta, J.M.; Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M. *Edible coatings and films to improve food quality*. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA, 1994, p. 159–180. ISBN 1-56676-113-1.
196. Perez-Gago, M.B.; Serra, M.; del Rio, M.A. Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 2006, 39, p. 84–92.
197. Perkins-Veazie, P. Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Reviews*, 1995, p. 267–297.
198. Petrou, S., et al. Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 156, p. 264–271.
199. Phan, D., et al. Functional properties of edible agar-based and starch-based films for food quality preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, p. 973–981.

200. Pillai, C.K.S.; Paul, W.; Sharma, C.P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 2009, 34, p. 641–678.
201. Pitt, J.J.; Hocking, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional, London, 1997, p. 593. ISBN 978-0-387-92206-5.
202. Ponting, J.D.; Jackson, R.; Watters, G. Refrigerated apple slices: Effects of pH, sulphites and calcium on exture. *Journal of Food Science*, 1971, 36, p. 349–350.
203. Pranoto, Y.; Salokhe, V.; Rakshit, K.S. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*, 2005, 38, p. 267–272.
204. Purwanti, N., et al. Modulation of rheological properties by heat-induced aggregation of whey protein solution. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25, p. 1482–1489.
205. Puupponen-Pimiä, R., et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from Finnish berries. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90, p. 494–507.
206. Puupponen-Pimiä, R., et al. Bioactive berry compounds. Novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005 a, 67, p. 8–18.
207. Puupponen-Pimiä, R., et al. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 2005 b, 98, p. 991–1000.
208. Puyol, P.; Perez, M.D.; Horne, D.S. Heat induced gelation of whey protein isolate (WPI): effect of NaCl and protein concentration. *Food Hydrocolloids*, 2001, 15, p. 233–237.
209. Quintavalla, S., Vicini, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 2002, 62, p. 373–380.
210. Rajh, T., et al. Improving optical and charge separation properties of nanocrystalline TiO₂ by surface modification with vitamin C. *Journal of Physical Chemistry B*, 1999, 103, p. 3515–3519.
211. Ramos, O.L., et al. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International*, 2012 a, 45, p. 351–361.
212. Ramos, O.L., et al. Antimicrobial activity of edible coatings prepared from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents. *International Dairy Journal*, 2012 b, 25, p. 132–141.
213. Ramos, O.L., et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30, p. 110–122.
214. Rauha, J.P., et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 56, p. 3–12.
215. Raybaudi-Massilia, R.M.; Mosqueda-Melgar, J.; Martin-Belloso, O. Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 121, p. 313–327.
216. Reddy, M.V.B., et al. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 2000, 20, p. 39–51.
217. Reddy, N.; Jiang, Q; Yang, Y. Preparation and properties of peanut protein films crosslinked with citric acid. *Industrial Crops and Products*, 2012, 39, p. 26–30.

218. Regester, G.O.; Smithers, G.W. Seasonal changes in the β -lactoglobulin, α -lactalbumin, glycomacropeptide and casein content of whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74, p. 796–802.
219. Ressousany, M.; Vachon, C.; Lacroix, M. Irradiation dose and calcium effect on the mechanical properties of cross-linked caseinate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, p. 1618–1623.
220. Reyes, F.G.R., Wrolstad, R.E., Cornwell, C.J. Comparison of enzymic, gas-liquid chromatographic, and high performance liquid chromatographic methods for determining sugars and organic acids in strawberries at three stages of maturity. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1982, 65, p. 126–131.
221. Ribeiro, C., et al. Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, 44, p. 63–70.
222. Richards, R.M.E. Activity of p-aminobenzoic acid compared with other organic acids against selected bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 78, p. 209–215.
223. Riener, C.K.; Kada, G.; Gruber, H.J. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002, 373, p. 266–276.
224. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 2006, 31, p. 603–632.
225. Rodriguez-Nogales, J.M. Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cows' milk: a statistical approach. *International Dairy Journal*, 2006, 16, p. 26–32.
226. Rodriguez-Turienzo, L.; Cobos, A.; Diaz, O. Effects of microbial transglutaminase added edible coatings based on heated or ultrasound-treated whey proteins in physical and chemical parameters of frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Engineering*, 2013, 119, p. 433–438.
227. Rojas-Grau, M.A., et al. Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apples. *Food Hydrocolloids*, 2007, 21, p. 118–127.
228. Rojas-Grau, M.A.; Tapia, M.S.; Martin-Belloso, O. Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of freshcut Fuji apples. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, 41, p. 139–147.
229. Rose, N.L., et al. Inactivation of nisin by glutathione in fresh meat. *Journal of Food Science*, 1999, 64, p. 759–762.
230. Ryan, K.N., et al. Stability and mechanism of whey protein soluble aggregates thermally treated with salts. *Food Hydrocolloids*, 2012, 27, p. 411–420.
231. Sabato, S.F., et al. Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49, p. 1397–1403.
232. Samelis, J. Managing microbial spoilage in the meat industry. In Blackburn, W. (1 ed.), *Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing, Cambridge, 2006, p. 213–286. ISBN 978-1-85573-966-6.
233. Sanchez-Gonzalez, L., et al. Use of essential oils in bioactive edible coatings. *Food Engineering Reviews*, 2011, 3, p. 1–16.

234. Schirmer, B.C., et al. A novel packaging method with a dissolving CO₂ headspace combined with organic acids prolongs the shelf life of fresh salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 133, p. 154–160.
235. Schmitt, C., et al. Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl: physicochemical, interfacial and foaming properties. *Langmuir*, 2007, 23, p. 4155–4166.
236. Seib, P.A., Tolbert, B.M. Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses. *Advances in Chemistry Series 200*, American Chemical Society, Washington, DC, 1982, p. 110–119. ISBN 0608035041.
237. Shahidi, F.; Arachchi, J.K.V.; Jeon, Y.J. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, 1999, 10, p. 37–51.
238. Shaw, N.B., et al. Physical properties of WPI films plasticized with glycerol, xylitol or sorbitol. *Journal of Food Science*, 2002, 67, p. 164–167.
239. Shen, X.L., et al. Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids*, 2010, 24, p. 285–290.
240. Shih, F.F. Interaction of soy isolate with polysaccharide and its effect on film properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1994, 71, p. 1281–1285.
241. Shin, Y., et al. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, 45, p. 349–357.
242. Siew, D.C.W., et al. Solution and film properties of sodium caseinate/glycerol and sodium caseinate/polyethylene glycol edible coating systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47, p. 3432–3440.
243. Singh, H.; Hevea, P. Thermal denaturation, aggregation and gelation of whey proteins. In Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. *Advanced dairy chemistry. Vol. 1. Proteins*. Kluwer Academic, New York, 2003, p. 1261–1287. ISBN 0-306-47271-6.
244. Slinkard, K.; Singleton, V.L. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1977, 28, p. 49–55.
245. Schmid, M., et al. Permeation of water vapour, nitrogen, oxygen and carbon dioxide through whey protein isolate based films and coatings – Permselectivity and activation energy. *Food Packaging and Shelf Life*, 2015, 6, p. 21–29.
246. Smulders, P.E.A. Formation and stability of emulsions made with proteins and peptides. PhD Thesis. Wageningen University, Netherlands, 2000.
247. Son, S.M.; Moon, K.D.; Lee, C.Y. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chemistry*, 2001, 73, p. 23–30.
248. Sothornvit, R.; Krochta, J.M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 2001, 50, p. 149–155.
249. Stuchell, Y.M.; Krochta, J.M. Enzymatic treatment and thermal effects on edible soy protein films. *Journal of Food Science*, 1994, 59, p. 1332–1337.
250. Suyatma, N.E., et al. Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends. *Journal of Polymers and the Environment*, 2004, 12, p. 1–6.
251. Swaisgood, H.E. Characteristics of milk. In Fennema, G.R. (3 ed.) *Food Chemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996, p. 841–878. ISBN 0-8247-9346-3.

252. Talens, P., et al. Application of edible coatings to partially dehydrated pineapple for use in fruit–cereal products. *Journal of Food Engineering*, 2012, 112, p. 86–93.
253. Tannous, J., et al. Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 189, p. 51–60.
254. Tapia, M.S., et al. Use of alginate- and gellan-based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of freshcut papaya. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22, p. 1493–1503.
255. Thakur, B.R.; Singh, R.K.; Handa, A.K. Chemistry and uses of pectin – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1997, 37, p. 47–73.
256. Traore, F.; Meunier, J.C. Cross-linking activity of placental FXIIIa on whey proteins and casein. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1992, 40, p. 399–402.
257. Tzoumaki, M.V.; Biliaderis, C.G.; Vasilakakis, M. Impact of edible coatings and packaging on quality of white asparagus (*Asparagus officinalis*, L.) during cold storage. *Food Chemistry*, 2009, 117, p. 55–63.
258. Urbain, W.M. Biological effects of ionizing radiation. In Urbain, W.M. *Food Irradiation*. Academic Press Inc., Orlando, FL, 1986, p. 83–117. ISBN 0-12-709370-2.
259. Valenzuela, C.; Abugoch, L.; Tapia, C. Quinoa protein-chitosan-sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. *LWT-Food Science and Technology*, 2013, 50, p. 531–537.
260. Vargas, M., et al. Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 2006, 41, p. 164–171.
261. Vartiainen, J., et al. Chitosan-coated paper: effects of nisin and different acids on the antimicrobial activity. *Journal of Applied Polymer Science*, 2004, 94, p. 986–993.
262. Vedenskaya, I.O.; Vorsa, N. Flavonoid composition over fruit development and maturation in American cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait. *Plant Science*, 2004, 167, p. 1043–1054.
263. Vieira, M.G.A., et al. Natural-based plasticizers and biopolymer films: a review. *European Polymer Journal*, 2011, 47, p. 254–263.
264. Viškelis, P. Vaisių ir daržovių bei jų produktų kokybės bei saugos tyrimų apžvalga. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 2013, 32, p. 139–155.
265. Vårum, K.M.; Smidsrød, O. Chitosans. In Stephen, A.M.; Phillips, G.O.; Williams, P.A. *Food Polysaccharides and Their Applications*. (2 ed.), Taylor and Francis Group, New York, 2006, p. 497–520. ISBN: 0-8247-5922-2.
266. Wang, S.Y.; Camp, M. J. Temperatures after bloom affect plant growth and fruit quality of strawberry. *Scientia Horticulturae*, 2000, 85, p. 183–199.
267. Wang, W.; Zhong, Q.; Hu, Z. Nanoscale understanding of thermal aggregation of whey protein pretreated by transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 435–446.
268. Wang, Y., et al. Oxidation promotes cross-linking but impairs film-forming properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 2013, 115, p. 11–19.
269. Wihodo, M.; Moraru, C.I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: a review. *Journal of Food Engineering*, 2013, 114, p. 292–302.

270. Winterowd, J.G.; Sandford, P.A. Chitin and chitosan. In Stephen, A.M. *Food Polysaccharides*. Marcel Dekker Inc., New York, 1995, p. 441–462. ISBN 0-8247-9353-6.
271. Wong, D.W.S.; Camirand, W.M.; Pavlath, A.E. Development of edible coatings for minimally processed fruits and vegetables. In Krochta, J.M.; Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M.O. *Edible coatings and films to improve food quality*. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA, 1994, p. 65–88. ISBN 1-56676-113-1.
272. Wu, V.C.H., et al. Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, 41, p. 1834–1841.
273. Yingyuad, B.S., et al. Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork. *Packaging Technology and Science*, 2006, 19, p. 149–157.
274. Yoshida, C.M.P.; Antunes, A.J. Characterization of whey protein emulsion films. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2004, 21, p. 247–252.
275. Zhou, J.J.; Wang, S.Y.; Gunasekaran, S. Preparation and characterization of whey protein film incorporated with TiO₂ nanoparticles. *Journal of Food Science*, 2009, 74, p. 50–56.
276. Zhou, G.H., Xu, X.L., Liu, Y. Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science*, 2010, 86, p. 119–128.
277. Zinoviadou, K.G.; Koutsoumanis, K.P.; Biliaderis, C.G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 2009, 82, p. 338–345.
278. Zinoviadou, K.G.; Koutsoumanis, K.P.; Biliaderis, C.G. Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. *Food Hydrocolloids*, 2010, 24, p. 49–59.

6. MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS STRAIPSNIAI

Mokslinės informacijos instituto (Thomson Reuters Web of Science) pagrindinio sąrašo leidiniuose

1. Mažuknaitė, I.; Guyot, C.; Leskauskaitė, D.; Kulozik, U. Influence of transglutaminase on the physical and chemical properties of acid milk gel and cottage type cheese. *Journal of food, agriculture and environment*, 2013, 11 (3–4), p. 119–124.
2. Leskauskaitė, D.; Simanaitienė, D.; Brink, I.; Sipailienė, A. The effect of chitosan and whey proteins-chitosan films on the growth of *Penicillium expansum* in apples. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 2015, 95 (7), p. 1475–1481.

Lietuvos mokslo tarybos patvirtinto sąrašo tarptautinėse duomenų bazėse referuojamuose leidiniuose

1. Mažuknaitė, I.; Leskauskaitė, D. Transglutaminazės įtaka pieno rūgštaus gelio savybėms. *Maisto chemija ir technologija*, 2010, 44 (2), p. 60–68. [Index Copernicus; CAB Abstracts].
2. Leskauskaitė, D.; Mažuknaitė, I.; Vinauskienė, R.; Pukinskytė, S.; Vinauskaitė, R. Valgomųjų išrūgų baltymų plėvelių savybės ir jų įtaka šviežios mėsos kokybei. *Maisto chemija ir technologija*, 2010, 44 (2), p. 35–42. [Index Copernicus; CAB Abstracts].

KONFERENCIJŲ PRANEŠIMAI

1. Mažuknaitė, I.; Leskauskaitė, D.; Guyot, C.; Kulozik, U. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on the properties of acid gels // AERC 2010, 6th Annual European Rheology Conference, Göteborg, Sweden, April 7–9, 2010; book of abstracts / Chalmers University of Technology, p. 238.
2. Mažuknaitė, I.; Leskauskaitė, D.; Vinauskienė, R.; Pukinskytė, S.; Vinauskaitė, R. Properties of whey protein edible films and their impact on the shelf life of turkey meat // Foodbalt-2011, „Innovations for food science and production“, 6th Baltic Conference on Food Science and Technology, Jelgava, Latvija, May 5–6, 2011; abstract book / Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology; Riga, Latvia : Drukātava, 2011, p. 22.
3. Mažuknaitė, I.; Leskauskaitė, D. Effect of heat treatment and enzymatic cross-linking of whey proteins on the mechanical and structural properties of whey proteins films // ISFRS 2012, 6th International Symposium on Food Rheology and Structure, Zürich, Switzerland, April 10–13, 2012; abstract book / ETH Zurich, Institute of Food, Nutrition and Health, Laboratory of Food Process Engineering; Lappersdorf, Germany : Kerschensteiner Verlag GmbH, 2012, p. 264.

4. Mažuknaitė, I.; Petkevičiūtė, I.; Simanaitienė, D.; Leskauskaitė, D.; Bobinaitė, R.; Viškelis, P. Impact of whey protein based edible films on the shelf life of fresh strawberries and sliced apples // Foodbalt 2012, „Innovate and healthy food for consumers“, 7th Baltic Conference on Food Science and Technology, Kaunas, Lithuania, May 17–18, 2012; conference program and abstracts / Kaunas University of Technology, Department of Food Technology; Kaunas, Lithuania : Technologija, 2012, p. 67.

5. Leskauskaitė, D.; Sipailiene, A., Brink, I. Antimicrobial activity and mechanical properties of whey proteins/chitosan based edible films // International Dairy Federation World Dairy Summit 2013, Yokohama, Japan, October 28 – November 1, 2013; P-ST055.

DALYVAVIMAS MOKSLINIULOSE PROJEKTUOSE, KURIE SUSIJĘ SU DISERTACINIO DARBO TEMA

1. Nacionalinės mokslo programos „Sveikas ir saugus maistas“ projektas „Tradicinio maisto kokybės ir biologinės vertės didinimas projektuojant jo struktūrą ir funkcionalumą (TRAMAKOBIO)“.

2. Nacionalinės mokslo programos „Sveikas ir saugus maistas“ projektas „Auginimo ir laikymo būdų bei technologijų įtaka sodininkystės ir daržininkystės produktų kokybei (LAIKYMAS)“.

PRIEDAS 1

Prototipinė šviežiai pjaustytų obuolių dengimo valgomąja danga technologija

Aprašyta prototipinė pjaustytų obuolių dengimo valgomąja danga technologija, leidžianti išlaikyti šviežiai pjaustytus obuolius 12 val. 20 °C temperatūroje ir 24 val. 4 °C temperatūroje be išvaizdos ir skonio pakitimų. Pjaustytų obuolių kokybę bei tinkamumo vartoti trukmę lemia keletas veiksnių – vandens pasišalinimas, fermentinis parudavimas, suminkštėjimas, gedimo mikroorganizmų augimas. Tyrimais įrodyta, kad dviejų sluoksnių valgomoji danga, pagaminta iš natūralių biopolimerų – išrūgų baltymų ir chitozano, suteikia šviežiai pjaustytiems obuoliams barjerinę apsaugą, apsaugo juos nuo fermentinio parudavimo ir taip prailgina jų tinkamumo vartoti trukmę. Nustatyta, kad pirmo dangos sluoksnio džiovinimui naudojant elektros lauką (8 kV), šviežiai pjaustytų obuolių parudavimą pavyko sulėtinti labiau, nei džiovinant ne elektros lauke.

Šviežiai pjaustytų obuolių padengimo dvigubo sluoksnio valgomąja danga gamybos technologijos aprašymas

Pagrindiniai technologiniai etapai:

- Valgomųjų dangų kompozicijų sudarymas;
- Obuolių pjaustymas;
- Šviežiai pjaustytų obuolių padengimas pirmuoju valgomosios dangos sluoksniu;
 - Pirmojo valgomosios dangos sluoksnio nudžiovinimas;
 - Šviežiai pjaustytų obuolių padengimas antruoju valgomosios dangos sluoksniu;
- Antrojo valgomosios dangos sluoksnio nudžiovinimas.

Valgomųjų dangų kompozicijų sudarymas

Pirmojo valgomosios dangos sluoksnio kompozicijos sudarymas. IB izoliatas, kuriame yra ne mažiau kaip 89 % baltymų, ištirpinamas kambario temperatūros vandenyje, nuolat maišant. Gauta baltymų tirpalo koncentracija turi būti 7 %, pH 6,0–7,0. Tirpalas pašildomas iki 90 °C temperatūros ir joje išlaikomas 15 min nuolat maišant. Atvėsintas iki kambario temperatūros baltymų tirpalas sumaišomas su sorbitoliu santykiu 1:1.

Antrojo valgomosios dangos sluoksnio kompozicijos sudarymas. Chitozanas, kurio deacetilinio laipsnis ne mažesnis kaip 75 %, ištirpinamas 1 % ledinės acto rūgšties tirpale kambario temperatūroje nuolat maišant. Gauta chitozano tirpalo koncentracija turi būti 1 %, pH 2,0–3,0.

Obuolių pjaustymas

Obuoliai nulupami ir supjaustomi norimo dydžio gabalėliais.

Šviežiai pjaustytų obuolių padengimas pirmuoju valgomosios dangos sluoksniu ir džiovinimas

Šviežiai pjaustyti obuoliai panardinami į pirmąjį tirpalą, skirtą valgomosios dangoms gaminti, išlaikomi jame 10 s, išgriebiami ir džiovinami 10 min pučiant kambario temperatūros oro srovę arba veikiant elektros lauku (8 kV).

Šviežiai pjaustytų obuolių padengimas antruoju valgomosios dangos sluoksniu ir džiovinimas

Susiformavus pirmosios valgomosios dangos sluoksniui, obuolių gabalėliai nardinami į antrąjį tirpalą, skirtą valgomosios dangoms gaminti, išlaikomi jame 10 s, išgriebiami ir džiovinami 20 min pučiant kambario temperatūros oro srovę arba veikiant elektros lauku (8 kV).

Išdžiūvus antrosios valgomosios dangos sluoksniui, technologinis procesas yra užbaigtas. Valgomąja danga padengti šviežiai pjaustyti obuoliai gali būti laikomi ne ilgiau kaip 12 val. 20 °C temperatūroje ir ne ilgiau kaip 24 val. 4 °C temperatūroje.

Prototipinė šviežių braškių dengimo valgomąja danga technologija

Aprašyta prototipinė braškių dengimo valgomąja danga technologija, leidžianti išlaikyti braškes 2 paras 20 °C temperatūroje ir 6 paras 4 °C temperatūroje, esant 80 % RH, be išvaizdos pakeitimų. Braškių kokybę laikymo metu bei tinkamumo vartoti trukmę lemia intensyvūs biocheminiai procesai, kurių metu keičiasi uogų cheminė sudėtis ir fizikinės savybės. Tyrimais įrodyta, kad valgomoji danga, pagaminta iš natūralių biopolimerų – išrūgų baltymų ir chitozano, pridodant spanguolių sulčių, daro įtaką šviežių braškių kvėpavimo procesui, apsaugodama uogas nuo žalingo deguonies poveikio, lėtinama jų nokimą ir gedimą ir taip prailgina jų tinkamumo vartoti trukmę. Nustatyta, kad dangų sudėtyje esančios spanguolių sultys dėl jose esančių organinių rūgščių pasižymi mikroskopinio grybo *Penicillium expansum* augimą stabdančiomis bei antibakterinėmis savybėmis ir taip prailgina šviežių braškių tinkamumo vartoti trukmę.

Šviežių braškių padengimo valgomąja danga gamybos technologijos aprašymas

Pagrindiniai technologiniai etapai:

- Valgomosios dangos kompozicijos sudarymas;
- Šviežių braškių paruošimas;
- Šviežių braškių padengimas valgomosios dangos sluoksniu;
- Valgomosios dangos nudžiovinimas.

Valgomųjų dangų kompozicijų sudarymas

Išrūgų baltymų izoliatas, kuriame yra ne mažiau kaip 89 % baltymų, ištirpinamas kambario temperatūros vandenyje, nuolat maišant. Gauta baltymų

tirpalo koncentracija turi būti 1 %, pH 6,0–7,0. Tirpalas pašildomas iki 90 °C temperatūros ir joje išlaikomas 15 min nuolat maišant.

Chitozanas, kurio deacetilimo laipsnis ne mažesnis kaip 75 %, ištirpinamas spanguolių sultyse kambario temperatūroje nuolat maišant. Spanguolių sulčių SM kiekis turi būti ne mažiau kaip 5 g/100g sulčių. Gauta chitozано tirpalo koncentracija turi būti 1 %, pH 2,0–3,0.

Išrūgų baltymų ir chitozано tirpalai sumaišomi santykiu 1:1 kambario temperatūroje nuolat maišant ne trumpiau kaip 5 min.

Braškių paruošimas

Šviežios braškės nuplaunamos tekančia vandens srove ir nudžiovinamos 20–25 °C temperatūroje per 30 min.

Šviežių braškių padengimas valgomosios dangos sluoksniu ir džiovinimas

Šviežios braškės panardinamos į tirpalą, skirtą valgomosios dangoms gaminti, išlaikomos jame 10 s, išgriebiamos ir nudžiovinamos 20–25 °C temperatūroje per 30 min.

Išdžiūvus valgomosios dangos sluoksniui, technologinis procesas yra užbaigtas. Valgomąją dangą padengtos šviežios braškės gali būti laikomos ne ilgiau kaip 2 paras 20 °C temperatūroje ir ne ilgiau kaip 6 paras 4 °C temperatūroje, esant 80 % RH.

SL344. 2016-09-14, 16 leidyb. apsk. l. Tiražas 14 egz. Užsakymas 401.

Išleido Kauno technologijos universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44249 Kaunas
Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas