



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Justina Balčiūtė

**BETA–GALAKTOZIDAZĖS ĮKAPSULIAVIMAS
PANAUDOJANT DVIGUBĄSIAS V/A/V EMULSIJAS**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovė
prof. dr. Daiva Leskauskaitė

KAUNAS, 2017

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**BETA–GALAKTOZIDAZĖS ĮKAPSULIAVIMAS
PANAUDOJANT DVIKUBĄSIAS V/A/V EMULSIJAS**

Baigiamasis magistro projektas
Maisto mokslo ir saugos programa (kodas 621E40001)

Vadovė

(parašas) prof. dr. Daiva Leskauskaitė
(data)

Recenzentas

(parašas) doc. dr. Aušra Šipailienė
(data)

Projektą atliko

(parašas) Justina Balčiūtė
(data)

KAUNAS, 2017



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Justina Balčiūtė

(Studento vardas, pavardė)

Maisto mokslo ir saugos programa, 621E40001

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Beta–galaktozidazės įkapsuliavimas panaudojant dvigubąsias V/A/V emulsijas“

AKADEMINIO SAŽINGUMO DEKLARACIJA

20 ____ m. _____ d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Justinos Balčiūtės**, baigiamasis projektas tema „*Beta–galaktozidazės įkapsuliavimas panaudojant dvigubąsias V/A/V emulsijas*“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjusi.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

ĮVADAS.....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	9
1.1. Pieno ir jo produktų nauda sveikatai	9
1.2. Laktozės netoleravimas: kilmė, paplitimas, pasekmės.....	9
1.3. Dieta be laktozės – produktai, jų gamybos būdai, juslinės ir technologinės savybės	14
1.4. Naujausi laktozės netoleravimo sprendimo būdai	18
2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI.....	24
2.1. Medžiagos.....	24
2.2. Dvigubosios $V_1/A/V_2$ emulsijos fazių paruošimas.....	24
2.3. Biopolimerų elektrostatinės sąveikos tyrimas	25
2.4. ζ -potencialo matavimai	25
2.5. Dvigubosios $V_1/A/V_2$ emulsijos gamyba	25
2.6. Dvigubųjų vienasluoksnės ir dvisluoksnės $V_1/A/V_2$ emulsijų tyrimams naudoti metodai	27
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	35
3.1. Sąlygų, reikalingų elektrostatinei sąveikai tarp IBI ir pektino parinkimas bei įvertinimas	35
3.2. Dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų su dvigubu biopolimerų sluoksniu tarpfazyje V_2/A , pagamintų naudojant „sluoksnis ant sluoksnio“ techniką, stabilumas.....	38
3.3. Laktozės įkapsuliavimo į dvigubą $V_1/A/V_2$ emulsiją galimybės tyrimas	47
3.4. Dvigubosios $V_1/A/V_2$ emulsijos virškinamumo ir fermento aktyvumo įvertinimas <i>in vitro</i> virškinimo metu.....	51
IŠVADOS.....	56
BIBLIOGRAFINIŲ NUORODŲ SĄRAŠAS	57

Balčiūtė, Justina. Beta–galaktozidazės įkapsuliavimas panaudojant dvigubąsias V/A/V emulsijas. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovė prof. dr. Daiva Leskauskaitė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslų kryptis ir sritis: Technologijų mokslai, Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: dviguboji emulsija; įkapsuliavimas; laktozės netoleravimas; laktazė; išrūgų baltymai; pektinas; dvisluoksnė.

Kaunas, 2017. 61 p.

SANTRAUKA

Dvigubosios $V_1/A/V_2$ emulsijos turi didelį pritaikomumo maisto pramonėje potencialą kaip bioaktyvių junginių pernešėjos. Tokias emulsijas su įkapsuliuota β -galaktozidaze (laktaze) būtų galima panaudoti pieno produktuose, taip apsaugant laktozės netoleruojančius jų vartotojus nuo nemalonių pojūčių, todėl šio darbo tikslas: pagaminti statinėmis sąlygomis stabilias dvigubąsias $V_1/A/V_2$ emulsijas su laktaze V_1 fazėje ir dvigubu biopolimerų sluoksniu tarpfazyje A/V_2 bei įvertinti laktazės atpalaidavimą iš emulsijos dinaminėmis virškinimo *in vitro* sąlygomis.

Tyrimų metu buvo vertinama dviejų biopolimerų – išrūgų baltymų (IB) ir pektino – tarpusavio sąveika, kuri sumaišius skirtingo pH (nuo pH 2 iki pH 7) 1 % IB tirpalus (IBT) ir skirtingų koncentracijų (nuo 0,1 % iki 1 %) pektino tirpalus, vertinta vizualiai pagal mišinių skaidrumą ir nuosėdų kiekį bei matuojant atrinktų pradinių tirpalų ζ -potencialą. Nustatyta, kad vizualiai geriausia tarpusavio sąveika pasižymėjo mišiniai, kuriuose IB ir pektino kiekio santykiai buvo 10:4; 10:6 ir 10:8, o IBT pH buvo pH 2, pH 6 ir pH 7. Išmatavus šių tirpalų ζ -potencialą nustatyta, kad pektinas ir IB gali kompleksuoti mišiniuose, kuriuose buvo naudotas IBT pH 2.

Kitame tyrimų etape buvo gaminamos dvigubosios dvisluoksnės (su dvigubu IB ir pektino sluoksniu) $V_1/A/V_2$ emulsijos. Jos tarpusavyje skyrėsi IB ir pektino santykiu V_2 fazėje, kuris buvo 10:8; 10:6 ir 10:4, bei gamybai naudotų IBT pH, kurie buvo pH 2, pH 6 ir pH 7. Šios emulsijos vertintos šiais rodikliais: gravitaciniu stabilumu, klampa ir dalelių dydžiu. Emulsijose, gamintose su IBT pH 6 ir pH 7, pektinas atliko tirštiklio vaidmenį, tačiau nepadidino jų stabilumo. Geriausią gravitacinį stabilumą, mažiausią ir pastovią klampą bei mažiausias daleles turėjo emulsijos, gamintos su IBT pH 2, kuriuose tarp IB ir pektino susiformavo elektrostatinis kompleksas. Todėl į jas buvo įkapsuliuota laktazė. Jų virškinamumas ir laktazės atpalaidavimas iš jos buvo atitinkamai įvertintas pagal *in vitro* virškinimo metu susidariusių laisvų riebalų rūgščių kiekį ir laktozės kiekio sumažėjimą virškinamajame mišinyje. Nustatyta, kad šių emulsijų V_1 fazėje buvo įkapsuliuota apie 98 % laktazės. *In vitro* virškinimo metu buvo suvirškinta daugiau nei 35 % riebalų, tačiau laktazė iš šių emulsijų neatsipalaidavo, greičiausiai dėl kompleksavimo tarp šio fermento ir emulsijų gamybai naudoto hidrofobinio emulsiklio PGPR. Taigi, šios dvigubosios dvisluoksnės $V_1/A/V_2$ emulsijos nėra tinkamos fermentų įkapsuliavimui.

Balčiūtė, Justina. *Encapsulation of Beta-Galactosidase Using Double W/O/W Emulsions*. Master's Thesis / supervisor prof. dr. Daiva Leskauskaitė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Technological Sciences, Food Technology

Keywords: double emulsion; encapsulation; lactose intolerance; lactase; whey proteins; pectin; double layer.

Kaunas, 2017. 61 p.

SUMMARY

Double $W_1/O/W_2$ emulsions have a huge potential as carriers for bioactive materials. Such emulsions with encapsulated β -galactosidase (lactase) could be used in dairy products and protect lactose intolerant consumers from unpleasant sensations caused by lactase deficiency. Therefore the aim of this study was to prepare stable double $W_1/O/W_2$ emulsions with encapsulated lactase in the inner aqueous phase W_1 and a double layer of biopolymers in the outer aqueous phase W_2 and to evaluate the release of lactase from the double emulsion during *in vitro* digestion.

The first objective was to evaluate the interactions between whey proteins (WP) and pectin. This interaction was evaluated by mixing 1% WP solutions (WPS) of different pH (from pH 2 to pH 7) and pectin solutions of different concentrations (from 0.1 % to 1%) and comparing the clarity and turbidity of the mixtures and by measuring the ζ -potential of selected solutions. Visually the best interactions were in the mixtures prepared with pH 2, pH 6 and pH 7 WPS and where the ratio of WP and pectin was 10:4; 10:6 and 10:8 respectively. The ζ -potential of these solutions showed that electrostatic attractions can only happen in the mixtures with pH 2 WPS.

In the next phase double $W_1/O/W_2$ emulsions with a double layer, comprising of WP and pectin, were prepared. They differed in the ratio of WP and pectin in the W_2 phase (10:4; 10:6 and 10:8), and the pH of the used WPS (pH 2, pH 6 and pH 7). These emulsions were evaluated by the following parameters: gravitational stability, viscosity and particle size. In the emulsions, prepared with pH 6 and pH 7 WPS, the pectin acted as a gelling agent but did not improve their stability. Emulsions prepared with pH 2 WPS had the best gravitational stability, lowest and constant viscosity, smallest and most even particles because of the electrostatic complex between the WP and pectin. Therefore, lactase was encapsulated into them. Their digestibility and lactase release from them was determined during simulated *in vitro* digestion by determining the amount of free fatty acids and the decrease of lactose in the digested mixture. It was determined that over 98 % of lactase was encapsulated into the W_1 phase. During the *in vitro* digestion over 35 % of fats were hydrolyzed, however the lactase was not released, probably because of the complex formed between the lactase and the hydrophobic emulsifier PGPR used for the production of these emulsions. Therefore, these emulsions are not suitable to be used for the encapsulation of enzymes.

IVADAS

Maisto netoleravimas - tai neimuninė neigiama organizmo reakcija. Ją dažniausiai sukelia ne tam tikras produktas, o vienas iš jame esančių komponentų. Manoma, kad maždaug 75 % pasaulio gyventojų toks komponentas yra disacharidas laktozė, kurios įvairias kiekiams yra visų žinduolių piene. Už laktozės virškinimą yra atsakingas fermentas β -galaktozidazė (laktazė), kuris sintetinamas plonajame žarnyne. Daugumos kūdikių organizme šio fermento kiekis yra pakankamas, todėl jie gali vartoti motinų pieną be neigiamų pasekmių. Tačiau augant ir keičiantis maisto racionui daugumos žmonių organizme šio fermento sintezė sulėtėja arba išnyksta visai. Todėl tokie individai, suvartoję pieno produktą gali patirti labai nemalonių pojūčių, tokių kaip pilvo pūtimas, vėmimas, viduriavimas, galvos skausmas ir t. t.

Laktozės netoleravimas yra gana plačiai paplitusi problema, kuri ne tik daugybei žmonių neleidžia mėgautis pieno produktais, bet ir stabdo pieno perdirbimo įmonių rinkos plėtrą. Nors nemaža dalis produktų gali būti pagaminti prieš tai iš pieno įvairiais metodais pašalinus laktozę, tačiau šis žingsnis negrįžtamai pakeičia produkto juslines, maistines, o dažnai ir technologines savybes. Todėl atsirado poreikis surasti būdą, kaip laktazę patalpinti į pieno produktus ir išlaikyti ją gyvybingą, tačiau neaktyvią, t. y., neskaidančią laktozės, iki tol, kol vartotojas produktą suvalgo ir prasideda virškinimo procesas. Tokiu būdu pieno produktai galėtų išlaikyti savo įprastas savybes, o dauguma laktozės netoleruojančių žmonių galėtų jais mėgautis be baimės, taip pat, labai išsiplėtus potenciali pieno produktų vartotojų rinka, kas labai aktualu visiems pieno perdirbėjams.

Pastaruosiu metu mokslinėje literatūroje daug dėmesio skiriama dvigubosioms emulsijoms, kaip vandenyje tirpių bioaktyvių medžiagų pernešėjoms, gebančioms jas apsaugoti nuo nepalankių aplinkos sąlygų ir atpalaiduoti jas tik tada, kai to reikia. Tai sudėtingos dispersinės sistemos, sudarytos iš mažų vandens lašelių su bioaktyviu junginiu (V_1), tolygiai paskirstytų didesniuose aliejaus lašeliuose (A), kurie yra pasiskirstę išorinėje vandeninėje fazėje (V_2). Iš esmės, tai emulsija emulsijoje, kur viena fazė nuo kitos yra atskirta emulsiklių sluoksnių. Aprašyti sėkmingi eksperimentai, kurių metu į tokias emulsijas įkapsuliuoti junginiai išliko aktyvūs, o ląstelės – gyvybingos net virškinimo metu.

Siekiant tinkamai apsaugoti jose patalpintus bioaktyvius junginius, svarbiausia yra padidinti dvigubųjų emulsijų stabilumą. Pastebėta, kad įvairių polisacharidų panaudojimas išorinėje V_2 fazėje ir komplekso tarp jų ir kito emulsiklio (dažniausiai baltymų) susiformavimas A/V_2 tarpfazyje leidžia pagaminti gerokai stabilesnes emulsijas bei padidinti bioaktyvių junginių įkapsuliuojimo efektyvumą. Dvigubo emulsiklių sluoksnio panaudojimas išorinėje fazėje, panaudojant „sluoksnis ant sluoksnio“ techniką, leido dvigubąsias vanduo–aliejuje–vandenyje ($V_1/A/V_2$) emulsijas padaryti dar stabilesnes.

Gauti teigiami rezultatai leidžia manyti, kad jos gali būti panaudotos ir laktazės įkapsuliavimui, nes dvigubosios emulsijos galėtų išlaikyti ją atskirtą nuo laktozės, esančios produkte, o virškinimo žarnyne metu, fermentui atsipalaidavus, jis galėtų suskaldyti su maistu į žarnyną patekusią laktozę. Tai įvertinus iškeliamas toks šio darbo tikslas: pagaminti statinėmis sąlygomis stabilias dvigubąsias $V_1/A/V_2$ emulsijas su laktaze V_1 fazėje ir dvigubu biopolimerų sluoksniu tarpfazyje A/V_2 bei įvertinti laktazės atpalaidavimą iš emulsijos dinaminėmis virškinimo *in vitro* sąlygomis. Tikslui pasiekti iškeliami šie uždaviniai:

1. Nustatyti sąlygas, kuriomis vyksta elektrostatinė sąveika tarp dviejų biopolimerų: hidrofilinio emulsiklio – išrūgų baltymų ir polisacharido – pektino;
2. Įvertinti dvigubųjų dvisluoksnių $V_1/A/V_2$ emulsijų stabilumą statinėmis sąlygomis ir nustatyti sąlygas, reikalingas stabilios dvigubosios dvisluoksnės (su dvigubu biopolimerų sluoksniu tarpfazyje A/V_2) $V_1/A/V_2$ emulsijos, naudojant „sluoksnis ant sluoksnio“ techniką, gamybai;
3. Įkapsuliuoti laktazę į dvigubąją dvisluoksnę $V_1/A/V_2$ emulsiją ir įvertinti įkapsuliavimo efektyvumą;
4. Įvertinti dvigubosios dvisluoksnės emulsijos virškinamumą ir įkapsuliuotos β -galaktozidazės aktyvumą virškinimo metu *in vitro* sąlygomis.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Pieno ir jo produktų nauda sveikatai

Įvairių žinduolių, tokių kaip karvės, avys, ožkos ir kt., pienas ir krekenos, dėl savo paplitimo ir gaminamų produktų įvairovės, laikomas vienu iš svarbiausių įvairių bioaktyvių junginių šaltinių žmonių mityboje. Jiems priskiriami specifiniai baltymai, peptidai, lipidai ir angliavandeniai, kurie yra išgaunami iš pieno ir naudojami kaip komponentai įvairių maisto produktų, įskaitant pieno, praturtinimui. Piene ir jo produktuose esantys baltymai ir peptidai sudaro didelę suvartojamų baltymų dalį kasdieninėje mityboje. Vidutiniškai piene būna apie 3,5 % baltymų, kurie turi aukštą maistinę vertę – dėl didelio kiekio naudingų amino rūgščių, kalcio, fosfatų. Taip pat jie yra geras bioaktyvių peptidų šaltinis. Pavyzdžiui, imunoglobulinai padeda susiformuoti imunitetui naujagimių organizmuose, o laktoferinas yra antioksidantas, priešuždegiminis, priešvėžinis, antimikrobinis ir imunitetą reguliuojantis junginys [1]. Taip pat manoma, kad pieno baltymai, ypač išrūgų, sukelia sotumo jausmą ir mažina apetitą [2].

Kitas naudingas pieno komponentas – tai riebalai. Karvių piene nustatyta ~400 rūšių skirtingų riebalų rūgščių, iš kurių svarbiausia yra konjuguota linolo rūgštis, padedanti kovoti su vėžiu, skleroze, diabetu, nutukimu, taip pat ji skatina medžiagų apykaitą, stiprina imuninę sistemą [3].

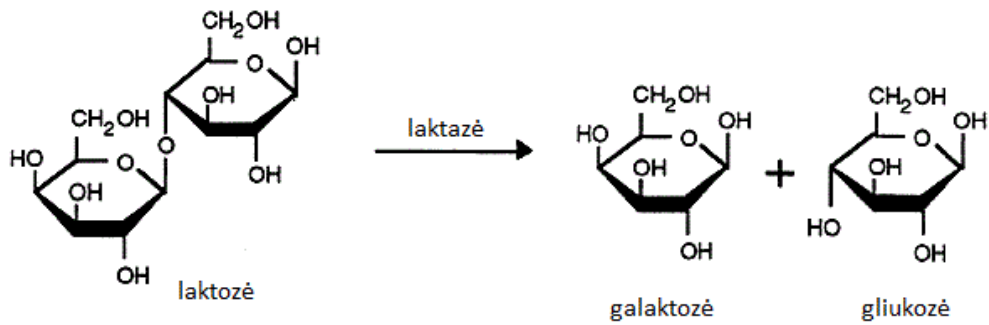
Pagrindinis pieno angliavandenis – disacharidas laktozė, kurio kiekis įvairių gyvūnų piene gali siekti iki 10 % [4], sudarytas iš galaktozės ir gliukozės molekulių, sujungtų β 1→4 glikozidiniu ryšiu [5]. Laktozė yra pagrindinis energijos šaltinis kūdikiams. Paminėtina tai, kad pieno kaitinimo metu iš jos susidaro laktuliozė, kuri skatina bifido bakterijų augimą žarnyne [6]. Laktozė yra pagrindinis galaktozės šaltinis, kurios dariniai randami kai kurių fiziologiškai svarbių lipidų ir baltymų sudėtyje, pvz., galaktozilkeramido, kuris yra labai svarbus kūdikių smegenų vystymuisi [7].

1.2. Laktozės netoleravimas: kilmė, paplitimas, pasekmės

Taigi, nors pienas ir pasižymi daugybe sveikatą gerinančių savybių, tačiau būtent laktozė yra tas komponentas, dėl ko įvairių šaltinių duomenimis net iki 75 % pasaulio gyventojų negali vartoti pieno ir daugelio jo produktų – tai vadinama laktozės netoleravimu [8, 9].

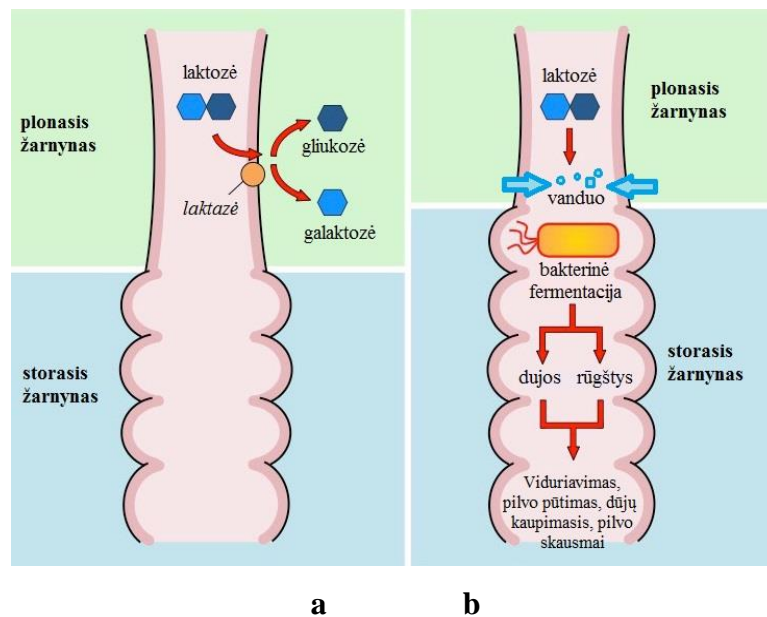
1.2.1. Laktozės virškinimas

Laktozė yra skaidoma fermento laktazės (β -galaktozidazės), kuri randama visame plonojo žarnyno epitelyje, tačiau aktyviausia – tuščiojoje (lot. *jejunum*) ir dvylikapirštėje (lot. *duodenum*) žarnoje. Esant pakankamam laktazės aktyvumui, laktozė suskaldoma iki gliukozės ir galaktozės, dėl ko nustatomas gliukozės kiekio padidėjimas kraujyje (žr. 1 pav., 2 pav. A) [9] [10].



1 paveikslas. Laktozės hidrolizė [3]

Žmonės laktazę pradeda gaminti iškart po gimimo, o kitų žinduolių, pavyzdžiui, graužikų, organizme laktazės gamyba maksimumą pasiekia tik praėjus kelios dienoms, kai subręsta jų žarnynas. Visų žinduolių organizme laktazės ekspresija išlieka aukšta visą žindymo laikotarpį. Vėliau, pasikeitus maistui iš pieno į sudėtingesnę ir sudarytą iš skirtingų produktų, laktazės kiekis pradeda laipsniškai mažėti. Tačiau žinduolio amžius, kuriame tai įvyksta, yra labai skirtingas. Apie 35% žmonių nenustoja gaminti laktazės (išskyrus atvejus, kai patiriami įvairūs žarnyno pažeidimai arba ligos) net ir subrendę ir dėl to geba virškinti laktozę nepatirdami nemalonių pojūčių [10].



2 paveikslas. Laktozės toleravimo (a) ir netoleravimo (b) schemas [11].

Likusių, maždaug 65–75 % pasaulio gyventojų organizmai, laktazės išvis nebegamina arba gamina per mažai. Tokiu atveju, vartojant pieną ir jo produktus, laktozė nėra iki galo suhidrolizuojama ir nesuvirškintas disacharidas patenka į žarnyną ir padidina osmosinį slėgį, dėl ko į žarnyną iš audinių yra traukiamas vanduo ir elektrolitai. Čia ją pradeda virškinti žarnyno bakterijos, kurios laktozę iš pradžių suskaldo ir tada konvertuoja į gryną gliukozę, o tada ją fermentuoja iki trumpųjų riebiųjų rūgščių (pieno, acto ir pan.) ir įvairių dujų, tarp kurių daugiausia vandenilio (žr. 2 pav. B). Dėl bendro šių procesų poveikio, po maždaug 0,5 – 2 val. gali prasidėti

viduriavimas rūgščiomis ir skystomis išmatomis, kuris ypač pavojingas kūdikiams, nes sukelia odos sudirginimą ir trūkinėjimą. Taip pat jaučiami pilvo skausmai, diskomfortas, dujų kaupimasis, pilvo pūtimas, taip pat vėmimas. Esant labai rimtoms netoleravimo formoms ar suvartojus per didelį kiekį laktozės, dėl viduriavimo gali atsirasti dehidratacija, elektrolitų disbalansas ir kitos problemos, ypač pavojingos kūdikiams [8, 9, 10, 12].

1.2.2. Pagrindiniai laktozės netoleravimo tipai

Laktozės netoleravimas (kai laktozė visiškai nevirškinama) ir laktazės nepakankamumas (kai suvirškinama ne visa į žarnyną patekusi laktozė) pasauliniu lygmeniu nėra laikoma liga, nes šis terminas taikytinas didžiajai daliai pasaulio gyventojų ir kitų žinduolių, be to laktazės aktyvumo sumažėjimas po žindymo laikotarpio yra visiškai natūralus procesas, vadinamas pirminiu laktazės nepakankamumu [8]. Nustatyta, kad šiuo atveju laktazės aktyvumas sumažėja 90 % arba ji išnyksta visai [13].

Antriniu laktazės nepakankumu vadinamas laktazės kiekio arba aktyvumo sumažėjimas dėl įvairių žarnyno epitelio pažeidimų, kuriuos gali sukelti įvairūs vaistai, pvz., antibiotikai, operacijos, radiacija, ligos, prasta mityba [8]. Paprastai, pašalinus šią problemą sukėlusį veiksni ir atsistačius plonosios žarnos veiklai, laktazės gamyba vėl suaktyvėja [14], nes tai genetiškai nulemtas procesas (žr.: 1.2.3. skyrius).

Taip pat verta išskirti ir įgimtus laktazės nepakankamumo ir laktozės netoleravimo atvejus, kurie sukelia daug problemų kūdikiams. Jiems vartojant motinos pieną arba pieno mišinius su laktoze gali prasidėti stiprus viduriavimas, kuris sukelia dehidrataciją, elektrolitų netekimą, kūno masės sumažėjimą. Esant visiškam netoleravimui sutrinka kūdikio vystymasis, pažeidžiamos kepenys, inkstai, laktozė patenka į kraują ir gali pažeisti smegenis bei akis. Belaktozės dietos taikymas tokiems kūdikiams padeda išvengti šių simptomų ir juos apsaugo [15, 16, 17].

1.2.3. Pieno vartojimo kultūros pradžia ir laktozės toleravimas

Pieno ir jo produktų vartojimas prasidėjo maždaug prieš 10000 – 12000 metų (Neolitas), kai buvo prijaukinti pirmieji pieniniai gyvūnai – dabartinių ožkų, avių ir karvių protėviai. Archeologiniai duomenys rodo, kad šis procesas prasidėjo Artimuosiuose Rytuose ir Anatolijoje iš kur vėliau, vykstant žmonių migracijai, pasklido į Vidurinius Rytus, Kaukazą, Europą ir Afriką. Vis dėl to, labai abejotina, kad neolito laikų gyventojai sugebėjo toleruoti laktozę ir vartoti pieną dideliais kiekiais, nepatirdami sveikatos sutrikimų. Galima manyti, kad todėl atsirado įvairūs pieno perdirbimo būdai – gaminant sūrį, jogurtą, sviestą, rūgpienį ir kitus produktus. Taigi buvo pagaminami produktai, turintys ilgesnį tinkamumo vartoti terminą ir rauginimo metu sumažintą laktozės kiekį, kas šiuos produktus padarė daug lengviau virškinamus. Be to, tokie produktai leido žmonių organizmui po truputį pratintis prie laktozės [9].

Neseni genetiniai žmonių tyrimai atlikti Europoje, Šiaurės Vakarų Afrikoje ir Viduriniuosiuose Rytuose parodė, kad laktozės toleravimas yra genetiškai perduodama savybė per LCT geną, atsakingą už laktazės gamybą. Jis yra 49336 bazių porų ilgio ir randamas antroje chromosomoje. Šiuose regionuose buvo nustatyti keletas su laktozės toleravimu susijusių alelių, kurių paplitimas skirtingose geografinėse vietovėse varijuoja, pvz., Europoje dominuojantys aleliai nenustatyti Afrikoje. Pirmasis ir daugiausia Europoje randamas alelis, kurio buvimas stipriai susijęs su padidėjusiu laktazės aktyvumu, yra C > T (citozino ir tiamino), esančių per 13910 bazių nuo LCT geno kodono, bazių poros pakitimas. Manoma, kad šis pokytis gali skatinti laktazės gamybą žarnyne. Vienų pirmųjų Europos ūkininkų palaikų genetiniai tyrimai parodė, kad šis alelis yra gana naujas ir išplito natūralios selekcijos būdu [10]. Vėlesni tyrimai ir simuliacijos tai patvirtino – nustatyta, kad laktozės toleravimas pradėjo plisti prieš maždaug 7500 metų tarp gana mažo skaičiaus pienininkyste užsiimančių ūkininkų Centrinėje Europoje ir Šiaurės Balkanuose. Ir priešingai, tarp gyventojų neturinčių pastovaus šviežio pieno šaltinio ir besiverčiančių kitais darbais, pvz., žvejyba arba žemdirbyste, ši savybė neplito, nes buvo nereikalinga [9, 10]. Visgi, kol kas nėra iki galo išsiaiškinta ar šie genetiniai pakitimai nulemia laktazės aktyvumo padidėjimą, ar tiesiog yra to indikatoriai.

1.2.4. Laktozės toleravimo fenotipo ir genotipo paplitimas ir koreliacija

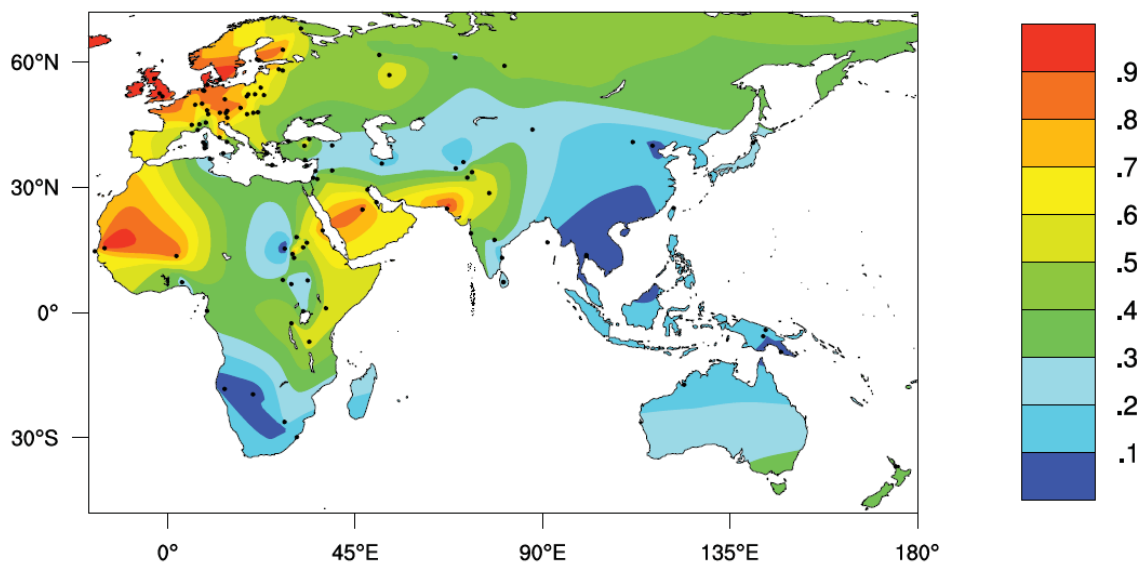
Šiais laikais laktozės toleravimas nustatomas dviem pagrindiniais neinvaziniais testais po nakties badavimo:

1. gliukozės kiekio pokyčiu kraujyje;
2. nustatant vandenilio kiekį iškvepiamame ore.

Pirmuoju atveju, jei laktozė virškinama, tai susidariusi gliukozė ir į ją konvertuota galaktozė patenka į kraują, todėl pastebimas gliukozės kiekio padidėjimas, jei ne – kiekis nepakinta. Antruoju atveju, jei laktozė nėra virškinama, tai ji skaldoma žarnyne esančios mikrobiotos, susidarant vandenilio dujoms, kurios pasišalina su iškvepiamu oru. Jų kiekis nustatomas nešiojamu vandenilio analizatoriumi [18].

Remiantis šių tyrimų duomenimis, nustatyta, kad laktozės netoleravimo fenotipas (žr. 3 pav.) yra labai nevienodai pasiskirstęs ir priklauso nuo rasės bei protėvių gyvenimo būdo. Pavyzdžiui, šalyse, kuriose nuo seno vartojami dideli kiekiai pieno ir jo produktų, laktozės netoleravimas yra labai retas reiškinys. Europos vakarų ir šiaurės šalyse, tokiose kaip Suomija, Didžioji Britanija, Danija jis pasireiškia 2–5 % gyventojų. Šiaurės Vakarų Vokietijoje jis taip pat svyruoja tarp 6–9 %, o tolstant į pietus padidėja net iki 22–23 %, tačiau manoma, kad tam įtakos turėjo ir didesni migracijos mąstai po Antrojo Pasaulinio karo. Laktozės netoleruojančių žmonių skaičiaus didėjimas Europoje pastebimas judant į pietus ir rytus, pavyzdžiui, Lietuvoje, Lenkijoje,

Vengrijoje jis siekia 30–37 %. Tačiau verta paminėti, kad tarp klajoklių gyvenimo būdu pasižyminčių Vengrijos čigonų, laktozės netoleravimas paplitęs net tarp 56 % žmonių – tai rodo gyvenimo būdo įtaką šios savybės paplitimui. Italijoje ir Ispanijoje jis pasireiškia maždaug 70 % gyventojų [19].



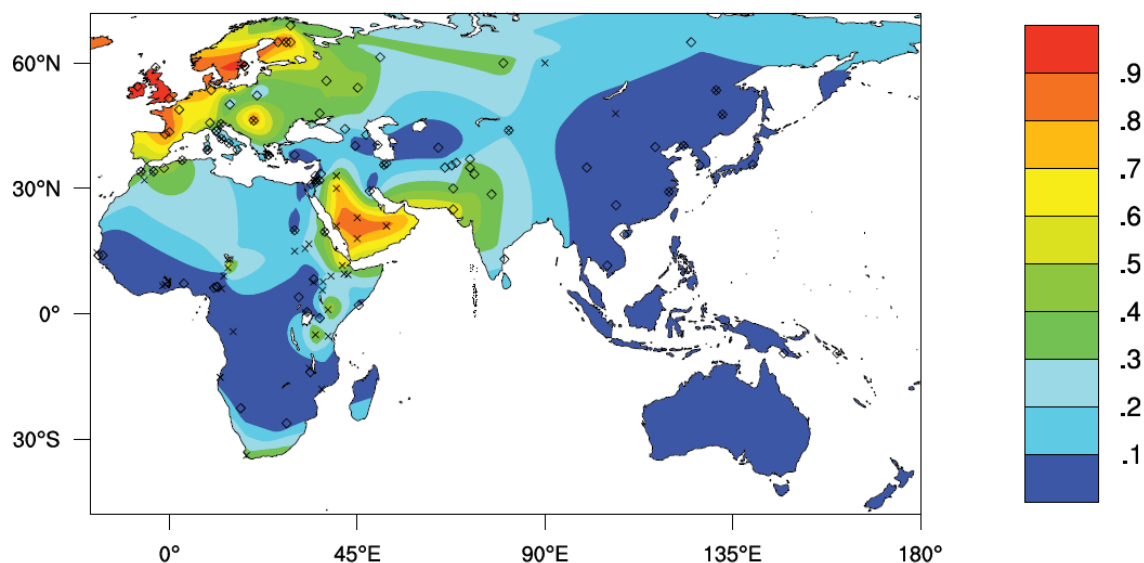
3 paveikslas. Interpoliuotas laktozės toleravimo fenotipo pasiskirstymo Senajame Pasaulyje žemėlapis (taškais pažymėtos vietos, kuriose atlikti tyrimai; spalvų skalė rodo laktozę toleruojančių žmonių dalį) [10]

Afrikoje laktozės toleravimas nėra tolygiai pasiskirstęs – milžiniški skirtumai nustatyti net tarp greta gyvenančių grupių. Pavyzdžiui, tik 8 % Tutzi genties atstovų, gyvenančių Ruandoje ir nuo seno užsiimančių karvių auginimu bei pieno vartojimu, netoleruoja laktozės. O iš netoli gyvenančios Bashi genties, užsiimančios kitokia veikla, laktozės netoleruoja net 98 % žmonių. Panaši situacija yra ir Viduriniuosiuose Rytuose – tiek Jordanijoje, tiek Saudo Arabijoje laktozės netoleravimas tam tikrose grupėse svyruoja maždaug nuo 20 % (beduinų gentims, vartojančioms kumelių pieną) iki 80 % [18]. Šiaurės Indijoje, kur labiau paplitusi gyvulininkystė, problemų kyla tik maždaug 27 %, o Pietų Indijoje net iki 70 % gyventojų.

Vis labiau tolstant į rytus, laktozės netoleravimas tampa vis dažnesnis: Irake ir Afganistane daugiau nei 80 %, Šanchajuje apie 86 %, o Tailande, Vietname ir Indonezijoje siekia beveik 100 %. Kadaise iš Azijos į Ameriką migravę indėnai taip pat visiškai netoleruoja laktozės [19].

Atlikti genetiniai –13910 C>T alelio tyrimai gana gerai koreliuoja su fenotipiniais tyrimais, ypač Europoje (žr. 4 pav.). Tačiau Afrikoje ir Viduriniuosiuose Rytuose padėtis kitokia. Pastaruosiuose laktozės toleravimą greičiausiai lemia kiti aleliai, išsidėstę ne daugiau nei 100 bazių atstumu nuo anksčiau minėto. O Afrikoje, ypač Vakariniėje ir Rytinėje dalyse, kur laktozės toleravimas tarp skirtingų grupių yra gana paplitęs, nebuvo aptikti šie, su laktozės aktyvumu

išlikimu susiję aleliai. Tai rodo, kad šiuo metu turimos genetinės žinios negali iki galo paaiškinti, kodėl kai kurios žmonių grupės geba virškinti laktozę visą gyvenimą, o kitos patiria daug problemų [10].



4 paveikslas. Interpoliuotas laktozės toleravimo genotipo pasiskirstymo Senajame Pasulyje žemėlapis (x pažymėtos vietos, kuriose atlikti visų žinomų alelių genotipų tyrimai, o \diamond pažymėtos vietos, kuriose tirtas tik -13910 C>T alelis) [10]

1.3. Dieta be laktozės – produktai, jų gamybos būdai, juslinės ir technologinės savybės

1.3.1. Laktozės kiekis įvairiuose maisto produktuose

Šiuo metu labiausiai taikomas būdas „kovoti“ su laktozės netoleravimu yra maisto, pagrinde pieno ir kai kurių jo produktų, be laktozės vartojimas. Deja, laktozės vengimas nėra tokia paprasta užduotis, kaip galėtų atrodyti. Laktozė šiais laikais randama ne tik piene ir jo produktuose, bet ir kituose produktuose. Pastaruosiuose ji vartojama dėl puikių reologinių savybių, gebėjimo absorbuoti dažiklius, nepageidautinus skonio ir kvapo junginius, dalyvauti Majaro reakcijoje, nes yra redukuojantis cukrus. Todėl gali būti randama kūdikių maistelyje, šokolade ir saldainiuose, įvairiuose miltiniuose produktuose (duonoje, sausainiuose), greito paruošimo mišiniuose blynams, biskvitams, ir netgi kai kuriuose mėsos produktuose, pvz., pjaustytame kumpyje, dešrelėse [20, 21]. Be to, nedideliais kiekiais laktozė randama ir daugelyje vaistų ir maisto papildų. Šioje srityje ji naudojama, nes pasižymi puikiomis savybėmis, reikalingomis tablečių formavimui, nėra per saldi, tirpsta vandenyje, yra saugi bei išgaunamas didelis jos grynumo laipsnis. Vis dėl to, čia ji randama sąlyginai mažais kiekiais, kurie dažniausiai nesukelia didelių problemų laktozės netoleruojantiems individams [20, 22].

Nemažai žmonių, netoleruojančių laktozės, be reikalo save apriboja visiškai atsisakydami visų pieno produktų. Visgi jų visiškai atsisakius, ne tik apriojamas maisto racionas, bet prarandama labai daug naudingų ir maistingų pieno medžiagų. Vienas iš sunkiausiai pakeičiamų – kalcis. Skaičiuojama, kad iš pieno ir jo produktų gaunama net 73% kalcio dienos normos. Tai gali lemti susilpnėjusius kaulus ir padidėjusią osteoporozės atsiradimo galimybę. Nustatyta, kad net 8 iš 30 moterų, sergančių šia liga, netoleruoja laktozės [22]. Labai maži jos kiekiai randami brandintuose sūriuose ir svieste (žr. 1 lentelė). Daugumos sūrių gamybos metu į pieną yra įpilama pienarūgščių bakterijų kultūrų, kurios skaldo laktozę, taip sumažindamos pieno pH ir paruošdamos jį fermentiniam traukinimui. Po jo didžioji dalis laktozės yra pašalinama su išrūgomis. Likusi laktozė yra skaldoma sūrio brandimo metu išgyvenusios mikrofloros, todėl jos koncentracija sumažėja dar labiau. Todėl sūriai yra gana saugus variantas tokiems žmonėms [23]. Sviesto mušimo metu didžioji dalis grietinėlėje esančios laktozės pasišalina kartu su pasukomis.

1 lentelė. Laktozės kiekis kai kuriuose pieno produktuose [24].

Produktas	Porcijos dydis	Laktozės kiekis (g/porcijoje)	Laktozės kiekis (g/100 g produkto)
Pienas (0,5 – 3,5 % riebalų)	1 puodelis (240 g)	9 – 13	3,7 – 5,5
Lieso pieno milteliai	25 g (1 puodeliui)	12 – 13	50 – 52
Pasukos	1 puodelis (240 g)	8,6 – 12	3,6 – 5
Grietinė kavai (10 – 15 % riebalų)	1 valg. š. (15 g)	0,6 – 0,65	4,0 – 4,3
Grietinė (30 % riebalų)	30 g	1 – 1,3	3,4 – 4,3
Saldintas kondensuotas pienas	1 valg. š. (15 g)	1,5 – 2,1	10 – 14
Jogurtas (natūralus, 0 – 9 % riebalų)	200 g	3,8 – 15,4	1,9 – 7,7
Brandintas sūris (pelėsiniai, Kamemberas, Čederis, Gouda, Parmezanas ir pan.)	25 g	0 – 0,6	0 – 2,5
Varškė (0,5 % riebalų)	180 g	4,9 – 6,1	2,7 – 3,4
Varškė (9 % riebalų)	180 g	1,8 – 6,3	1 – 3,5
Sviestas	10 g	≤0,1	0,8 – 1
Ledai (iš grietinėlės)	70 g	2,4 – 5,9	3,1 – 8,4

Taip pat nustatyta, kad žmonėms, kurių laktazės aktyvumas yra sumažėjęs, nedidelės laktozės dozės – iki 12 g, kas prilygsta puodeliui (240 ml) pieno – dažniausiai nesukelia nemalonių simptomų. Daugiau nei 85% tokių žmonių jie pasireiškia tik suvartojus >20–50 g laktozės [22]. Ne vienas klinikinis tyrimas taip pat parodė, kad kasdien vartojant nedidelius kiekius laktozės (0,6 – 1 g/kg kūno masės/dieną) nemalonūs laktozės netoleravimo simptomai sumažėjo maždaug 50 % tiriamųjų, tai pat sumažėjo iškvepiamo H₂ kiekis. Tai rodo, kad žarnyno bakterijos gali bent truputį prisitaikyti prie laktozės vartojimo ir padėti ją virškinti [8, 10].

1.3.2. Maisto produktai be laktozės ir jų gamyba

Tačiau žmonėms visiškai netoleruojantiems laktozės iškyta daugybė problemų siekiant jos išvengti, todėl tai skatina pieno produktų (ypač pieno, varškės, ledų, jogurtų) be laktozės paklausos augimą. Tai skatina pieno perdirbimo įmones ieškoti būdų, kaip patenkinti šį poreikį.

Šiuo metu tokių produktų gamyba galima dviem būdais:

1. dalinis laktozės pašalinimas;
2. laktozės hidrolizavimas.

Pirmuoju atveju laktozė gali būti pašalinama chromatografiniu metodu arba taikant membranines filtravimo technologijas. Šiuo atveju pieno saldumas išlieka beveik nepakitęs. Chromatografinis laktozės pašalinimas paremtas tuo, kad pienas eina per kolonėlę, pilną porėtos medžiagos, kuri parenkama taip, kad jos funkcinės grupės su laktoze sudarytų patvarų kompleksą. Taip pat, porų dydis parenkamas taip, kad didesnės molekulės, pvz., baltymai, jose neužstrigtų, o mažesnės, pvz., įvairūs mineralai, lengvai jas praeitų. Taip yra sulėtinamas laktozės judėjimas per kolonėlę ir ji praktiškai pašalinama iš pieno.

Kitas būdas – ultrafiltracijos (UF) ir nanofiltracijos (NF) taikymas. Naudojant UF iš pieno pašalinama laktozė, tačiau kartu netenkama ir už ją mažesnių junginių, pvz., mineralų. Siekiant pašalinti kuo daugiau laktozės, papildomai gali būti taikoma ir diafiltracija. Šio proceso metu gaunami du tirpalai: koncentruotas baltymų retentatas ir minėtų junginių permeatas. Pastarasis yra papildomai NF – taip retentate pasilieka laktozė, o į permeatą pereina smulkieji pieno junginiai. Šis permeatas atvirkštinio osmoso būdu yra sukcentruojamas ir grąžinamas į baltymų retentatą. Abiem separavimo metodais pašalinama didžioji dalis laktozės, o likusi yra hidrolizuojama, taip atstatant natūralų pieno saldumą [25]. Tačiau, taip prarandamas natūralus pieno saldumas, 5% sumažėja jo išėiga, be to, yra nustatyta, kad toks pienas nesugeba sulaikyti kalcio ir perduoti jį kaulams virškinimo metu [26].

Antruoju atveju pienas yra termiškai apdorojamas (dažniausia, pasterizuojamas (72 °C temperatūroje 15s, tačiau gali būti ir apdorotas UAT), taip pašalinant natūralią pieno mikroflorą, patogenus, inaktyvuojant fermentus ir taip sudarant palankias sąlygas tolimesniems veiksams. Tada į jį įmaišoma laktazės, kuri gali būti keliose formose – tirpale arba imobilizuota. Laktazės imobilizavimas aktyvintoje anglyje, poringuose stiklo, akriliniuose rutuliukuose, želatinoje ir pan. leidžia fermentą naudoti daug kartų [27]. Ji hidrolizuoja didžiąją dalį laktozės, susidarant galaktozei ir gliukozei, kurios suteikia pienui daugiau saldumo. Paprastai siekiama, kad būtų suskaldyta daugiau nei 75 % pieno cukraus. Šis procesas paprastai vyksta 4 °C temperatūroje ir trunka 36 valandas. Aukštesnėje temperatūroje jis pagreitėtų, tačiau tada gali suaktyvėti išgyvenusios bakterijos ir negrįžtamai pakeisti pieno savybes. Po hidrolizės pienas paprastai vėl

apdorojamas UAT, kad inaktyvuoti laktazę [25, 28]. Šis būdas dėl paprastesnės technologijos ir mažesnių investicijų yra labiau paplitęs.

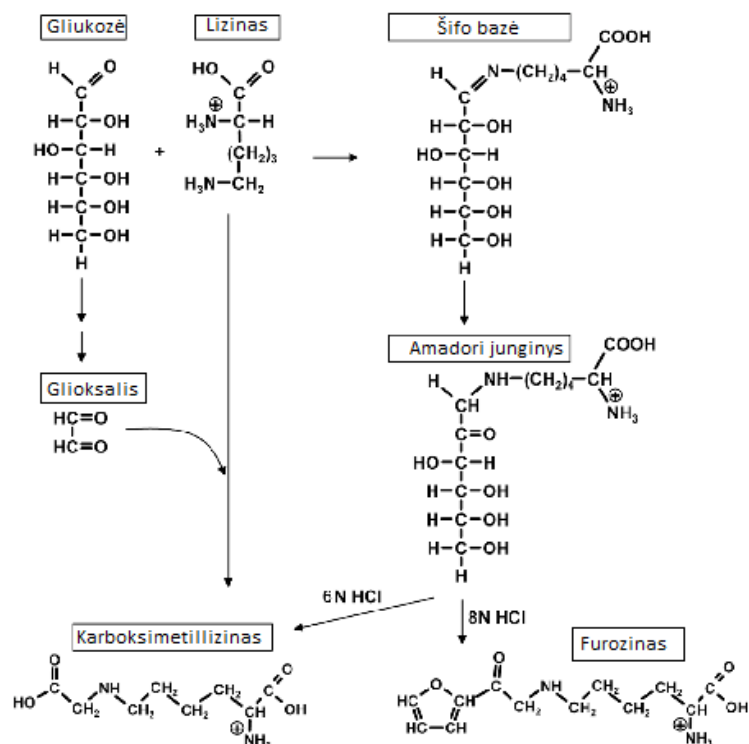
1.3.3. Maisto produktų be laktozės juslinės savybės ir maistingumas

Panaudojant anksčiau minėtas technologijas yra sukurtas ne vienas produktas (pvz., sūris, ledai, varškė, jogurtas, pienas ir t. t.) leidžiantis visiems mėgautis pieno ir jo produktų teikiama nauda. Visgi, šie produktai skiriasi nuo tradicinių, t. y., su natūraliu laktozės kiekiu, tiek savo juslinėmis savybėmis, tiek maistingumu. Šiuo metu daugiausia tyrimų yra atlikta su pienu, taip pat jogurtu.

Atliktas tyrimas lyginant kelių komercinių rūšių pieno be laktozės (PBL) ir standartinio pieno (SP) juslines savybes. Jame vertinimą atliko tiek profesionalūs vertintojai, tiek paprasti vartotojai. Didžiausias skirtumas pastebėtas saldume – PBL pavyzdžiai buvo ženkliai saldesni už SP, nes po hidrolizės susidariusios gliukozė ir galaktozė yra santykinai saldesnės nei laktozė [29]. Nustatyta, kad hidrolizavus 70 % laktozės, susidariusių cukrų saldumas prilygsta pienui, į kurį pridėta 2% cukraus. Tirti PBL taip pat pasižymėjo labiau išreikštomis šiomis neigiamomis savybėmis: kreidiškumu, šviežumo trūkumu, oksidaciniu ir „perdirbimo“ prieskoniu. Jų intensyvumą galėjo padidinti tiek apdorojimas UAT, tiek fermentu. Laktozės hidrolizės metu susidaro gliukozė ir galaktozė, kurios yra reaktyvesnės palyginti su laktoze, be to jų yra dvigubai daugiau. Dėl UAT suaktyvėja Majaro reakcija, kurios metu redukuojantys cukrūs reaguoja su pieno baltymais, ypač išrūgų, turinčiais daug lizino. Tai priverčia baltymus denatūruoti, dėl ko gali atsirasti kreidiškumo pojūtis bei nešviežio (perdirbto, oksidavusio) maisto skonis [29].

Daug problemų kelia ir maistinės PBL savybės. Dėl vykstančios Majaro reakcijos (žr. 5 pav.) ir baltymų denatūracijos, prarandamos svarbios maistinės medžiagos, ypač amino rūgštis (AR) lizinas. Tai nepakeičiama AR labai svarbi organizmui. Ji reikalinga įvairiems medžiagų apykaitos procesams, baltymų, fermentų, hormonų ir kitų junginių sintezei, įeina į kolageno sudėtį, yra būtina kaulų augimui ir t. t.

Atliktas tyrimas, lyginant PBL ir standartinio pieno, laikytų skirtingose temperatūrose ilgą laiką, furozino kiekį (jis proporcingas lizino kiekio sumažėjimui). Nustatyta, kad dėl intensyvesnės Majaro reakcijos PBL susidarė didesni kiekiai furozino, taigi, jo maistinė vertė prastesnė. Be to, laikant PBL kambario ar šiek tiek aukštesnėje temperatūroje, kas yra tikėtina, nes paprastai UAT pienas gali būti laikomas tokiomis sąlygomis, pastebėta, kad furozino kiekiai ženkliai padidėjo. Tai taip pat lėmė pieno spalvos pakitimą – aukštesnėje temperatūroje jis pradėjo ruduoti [30]. Šios problema gali būti labai aktualios gaminant ilgai termiškai apdorojamus produktus, pvz., kondensuotą pieną.



5 paveikslas. Majaro reakcijos, vykstančios piene, pavyzdys [31].

Deja, informacija apie jogurto be laktozės (JBL) savybes yra labai prieštaringa. Vieno tyrimo metu [32] gaminto JBL koaguliacijos laikas, lyginant su standartiniu jogurtu (SJ) sutrumpėjo apie 30–40 min. Greičiausiai dėl to, kad startinėms jogurto kultūroms nereikėjo skaldyti laktozės ir iškart prasidėjo pieno rūgšties gamyba iš gliukozės. O naujausio tyrimo duomenimis [33], JBL reikiamą rūgštingumą ir konsistenciją pasiekia net 1 valanda vėliau nei KJ, ką galėjo lemti vėliau prasidėjusi pieno rūgšties gamyba. Tekstūros profiliai taip pat skiriasi. Pirmuoju atveju, greičiausiai dėl didesnės monosacharidų koncentracijos, gauti švelnesni, kremiškesni, skystesni JBL, o didėjant hidrolizės laipsniui, šios savybės stiprėjo. Taip pat, šie jogurtai pasižymėjo intensyvesne sinereze. Antruoju atveju, gauti JBL buvo tvirtesnės tekstūros, kietesni, pasižymėjo didesne adhezija nei KJ. Išrūgų atsiskyrimas šiame jogurte buvo ženkliai mažesnis nei KJ ($14.40 \pm 27\%$ ir $25.24 \pm 6.48\%$ atitinkamai). Vertinant juslines savybes nustatyta, kad JBL, panašiai kaip ir PBL, pasižymėjo didesniu saldumu, kuris gali būti nepriimtinas standartinių jogurtų mėgėjams. Visgi, gaminant saldintus jogurtus su įvairiais priedais, ši savybė gali būti išnaudota sumažinant pridedamų saldiklių kiekį. JBL ir KJ kvapas ir spalva įvertinti vienodai [33]. Taigi, tokie skirtingi rezultatai reikalauja tolimesnių ir išsamesnių tyrimų.

1.4. Naujausi laktozės netoleravimo sprendimo būdai

Kadangi vengti maisto nėra taip lengva, kuriame yra laktozės, dėl didelio jos paplitimo nėra labai paprasta, o pieno produktai, iš kurių laktozė yra pašalinta, pasižymi ne tik kitokiomis

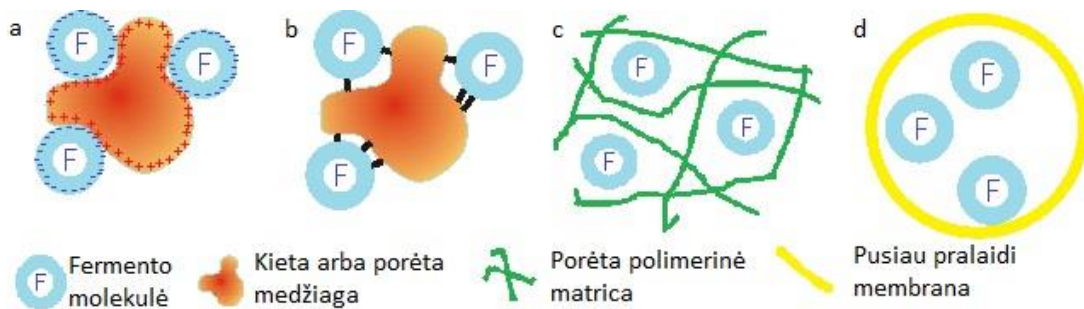
juslinėmis savybėmis, bet dažnai yra ir ženkliai brangesni, ieškoma kitų būdų, kaip spręsti šią problemą.

1.4.1. Maisto papildai su fermentais

Vienas iš jų – tabletės (maisto papildas), kuriose yra laktazės. Paprastai jos vartojamos prieš valgį arba valgio metu ir jose esantis fermentas padeda suvirškinti produkte esantį pieno cukrų. Lietuvoje jų pasiūla nėra labai didelė, tačiau vaistinėse galima rasti keletą tokių maisto papildų variantų. Šios tabletės būna kramtomos arba užgeriamos vandeniu, o laktazės kiekis labai įvairus. Nespecializuotuose fermentų mišiniuose jis gali būti iki 4500 FCC [34] (FCC – fermentų aktyvumo vienetas, remiantis tarptautiniu maisto standartų rinkiniu „Food Chemical Codex“). Apskaičiuota, kad 1 g laktozės suskaldyti žmogaus organizme reikia maždaug 1000 FCC. Esant didesniai poreikiui, galima rinktis maisto papildus, kuriuose yra tik laktazė. Čia jos kiekis svyruoja nuo 17500 FCC iki 52500 FCC, priklausomai nuo dozės [35]. Pagrindinis šio būdo pliusas – tabletės nepakeičia maisto produktų skonio ir suteikia galimybę vartoti praktiškai visus produktus. Tačiau, nors jos ir gali pagelbėti, tačiau sukelia ir keletą problemų. Šie maisto papildai paprastai būna gana brangūs, o tai ypač svarbu dažnai valgant tokius produktus. Taip pat, vartojamą dozę geriausia parinkti pagal maiste esančios laktozės kiekį, o tai gali būti sudėtinga valgant ne namuose ruoštą maistą. Tabletes reikia suvartoti tam tikru valgio metu, nes pavartojus per anksti ar per vėlai, fermentai gali inaktyvuotis arba nespėti tapti pakankamai aktyvūs. Vaikams gali būti sudėtinga jas nuryti, ypač jei reikalingas didesnis kiekis [36, 37].

1.4.2. Laktazės įkapsuliavimas geliuose

Įvertinus visų anksčiau minėtų būdų problemas, atsirado dar viena idėja – sukurti tokį maisto priedą ar komponentą, kuriame būtų uždaryta laktazė. Ji produkto gamybos, laikymo ir pirminio virškinimo burnoje ir skrandyje metu, turėtų būti tarsi „užrakinta“ ir neprieiti prie laktozės, o atsipalaiduoti tik plonajame žarnyne ir ten pradėti savo darbą, taip apsaugant vartotoją nuo nemalonių laktozės netoleravimo pojūčių. Šiuo metu jau yra žinoma keletas laktozės imobilizavimo būdų (žr. 6 pav.), pavyzdžiui, apgaubti ją pusiau laidžia membrana, pro kurią į kapsulės vidų galėtų patekti laktozė, arba ją patalpinti polimerinėje matricoje arba cheminių ryšių pagalba ją pritvirtinti prie įvairių netirpių medžiagų. Tačiau tokiais būdais imobilizuota laktazė išlieka aktyvi ir vos patekusi į substratą, pavyzdžiui, pieną, pradėtų virškinti laktozę. Todėl jie gali būti panaudojami tik tam tikriems technologiniams procesams, pavyzdžiui, anksčiau minėto pieno be laktozės gamybai. Taip imobilizuota laktazė gali būti nesudėtingai pašalinama iš pieno, pvz., filtruojant, ir panaudojama dar kartą, taip sutaupant nemažai pinigų [36, 37].



6 paveikslas. Fermentų imobilizavimo būdai: a) fermentas nekovalentiniais ryšiais adsorbuojasi prie netirpios dalelės; b) fermentas kovalentiniais ryšiais prisijungia prie netirpios dalelės; c) fermentas patalpinamas į polimerinę matricą; d) fermentas apribojamas pusiau pralaidžia membrana [38].

Taigi svarbiausia tinkamai parinkti medžiagas laktazės įkapsuliavimui. Jos turi būti tinkamos maistui, nekeisti jo jausinių ir technologinių savybių. Taip pat, tokio maisto priedo dalelės turi būti kuo mažesnio dydžio, kad žmogus jas jaustų kuo mažiau [36]. Nustatyta, kad mažiausios dalelės, kurias jis gali pajauti burnos organais yra 25 μm [39]. Ši medžiaga taip pat turi apsaugoti laktazę nuo rūgštinių sąlygų maiste ir skrandyje, nes rūgštiniame pH laktazė greitai inaktyvuojasi. Tokiomis medžiagomis gali būti įvairūs polimerai, riebiosios rūgštys, glicerinas vašakai, gumos ir t.t. [36].

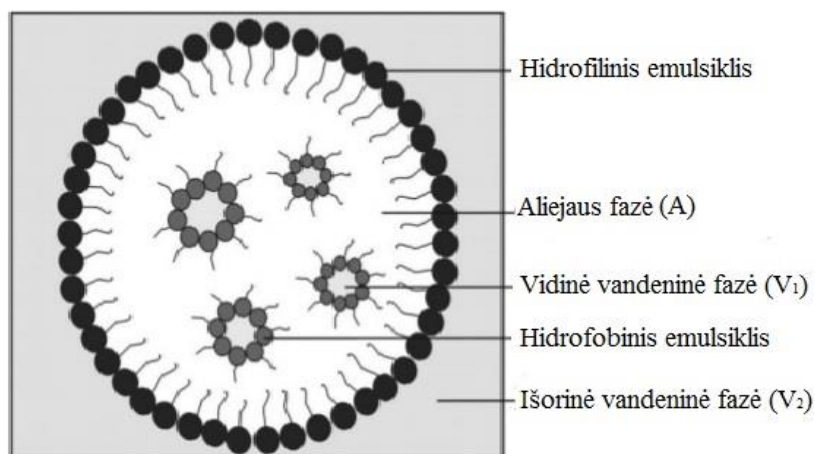
Nemažai tyrimų yra atlikta su hidrogelių panaudojimu šiam tikslui. Tai geliai sudaryti iš netirpių polimerų grandinių tinklų, kurių tarpai užpildyti vandeniu ir jame tirpiomis medžiagomis. Jie gali būti gaminami tiek iš natūralių, tiek iš sintetinių polimerų, panaudojant paprastus metodus. Dažniausiai yra suformuojami kuo smulkesni rutulėliai, kurie galėtų būti lengvai įmaišomi į maistą. Svarbiausia, kad susidariusios poros būtų mažesnės nei fermento molekulė ir jis liktų hidrogelio rutulėliuose. Visgi jų platesnį pritaikymą riboja tai, kad net ir labai sumažinus poras, pro jas vis tiek gali patekti H^+ jonai, esantys daugumoje maisto produktų bei skrandžio sultyse, kurie stipriai sumažina pH rutulėlių viduje ir taip inaktyvuoja fermentą. Neseniai atlikto tyrimo metu, į hidrogelį, pagamintą iš κ -karageniano, be laktazės buvo įmaišyta ir magnio hidroksido. $\text{Mg}(\text{OH})_2$ yra maisto pramonėje dažnai naudojamas bazinis buferis, kuris tirpsta tik rūgštiniame terpėje, taip palaikydamas jos pH. Eksperimento metu nustatyta, kad net dvi valandas, t. y., tol, kol buvo neištirpusio $\text{Mg}(\text{OH})_2$, laikant tokį hidrogelį rūgštiniame aplinkoje (pH 2,5), jo vidinis pH sumažėjo tik iki 6,6, o fermentas išliko aktyvus. Visgi, atsižvelgiant į tai, kad šis komponentas turėtų savo savybes išlaikyti produkto gamybos, laikymo ir vartojimo metu, praktinis pritaikymas kol kas yra neįmanomas, nes laktazė žūtų net nesibaigus gamybos procesui [37].

Kitas literatūroje aprašytas būdas imobilizuoti laktazę – panaudojant agarozę, krakmolą ir šokoladą. Iš pirmųjų dviejų komponentų yra pagaminamas gelis ir suformuojami rutuliukai. Tada jie yra liofilizuojami ir į juos suleidžiamas laktazės tirpalas. Rutulėliams išdžiūvus, jie pamerkami

į tirpintą šokoladą ir tada atvėsunami. Šokoladas naudojamas tam, kad užpildydamos liofilizuotų rutulėlių tarpus, apsaugotų laktazę nuo proteolitinių fermentų esančių skrandyje. *In vitro* virškinimo tyrimo metu, nustatyta, kad po 6 val. dirbtinių plonojo žarnyno sulčių tirpale (DPŽST), atsipalaidavo apie 22 % laktazės (vertinant fermento aktyvumą). Visgi, verta paminėti, kad suformuoti rutulėliai yra gana stambūs ir sunkūs – vieno agarozės rutulėlio diametras, prieš panardinimą į šokoladą, siekė beveik 4 mm, masė svyravo nuo 4,5 iki 6,3 mg. Po panardinimo į šokoladą jų masė padidėjo iki 32 mg [40]. Taigi, tokios stambios dalelės būtų jaučiamos pieno produktuose, be to, produktui suteiktų papildomą, šokolado, skonį ir pakeistų spalvą, kas apriboja jų panaudojimą tradicinių pieno gaminių gamyboje. Tačiau, juos galima naudoti produktuose, kuriuose šokolado skonis yra pageidautinas.

1.4.3. Dvigubųjų emulsijų panaudojimas bioaktyvių junginių įkapsuliavimui

Šiuo metu vis daugiau dėmesio yra atkreipiama į dvigubąsias vanduo–aliejuje–vandenyje ($V_1/A/V_2$) emulsijas, kaip vandenyje tirpių bioaktyvių medžiagų pernešėjas. Šios emulsijos yra sudarytos iš mažų vandens lašelių (V_1), tolygiai paskirstytų didesniuose aliejaus lašeliuose (A), kurie yra pasiskirstę išorinėje vandeninėje fazėje (V_2) (žr. 7 pav.). Kaip hidrofilinis emulsiklis naudojamos aukšto HLB indekso medžiagos, pavyzdžiui, išrūgų baltymų koncentratai (IBK) ir izoliatai (IBI), natrio kazeinatas, chitozanas, galvijų serumo albuminas (GSA) ir t.t. Hidrofobiniai emulsikliai turi pasižymėti mažu HLB indeksu, pavyzdžiui, poliglicerolio poliricinoleatas (PGPR) ir sorbitano monoleatas (Span 80). Literatūroje galima aptikti ir įvairių aliejinės fazės (A) sudėties variantų – rapsų, alyvuogių aliejus, gryni pieno riebalai, limonenas ir t.t. [41, 42].



7 paveikslas. Dvigubos emulsijos $V_1/A/V_2$ sudėtis [43].

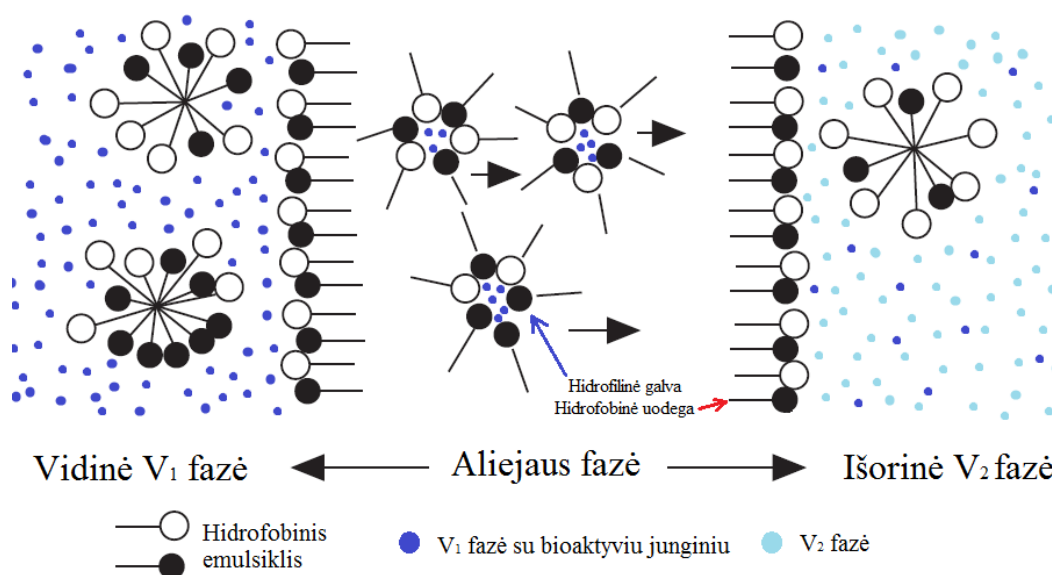
Dvigubosios emulsijos yra gaminamos dviejų pakopų homogenizacijos būdu. Iš pradžių V_1 fazė yra homogenizuojama su A faze, kurioje yra ištirpintas hidrofobinis emulsiklis. Tada ši

pirminė emulsija yra supilama į V_2 fazę, kurioje yra ištirpintas hidrofilinis emulsiklis, ir kartojamas homogenizavimo procesas [44].

Šios emulsijos turi nemažai potencialių panaudojimų sričių maisto pramonėje – jas galima panaudoti gaminant produktus su sumažintu riebalų kiekiu, įvairių toksinių medžiagų pašalinimui iš produktų, jų vidinėje V_1 fazėje galima įkapsuliuoti produktui būtinus, tačiau nemalonaus skonio ar kvapo vandenyje tirpius junginius, o svarbiausia – jautrius oksidacijai, lakius, greitai suyrančius bioaktyvius junginius (vitaminus, mineralus, skonio ir kvapo medžiagas), kurie gali būti atpalaiduojama tik tada, kada to reikia [45, 46].

Panaudojus tokią emulsiją alyvmedžių lapų ekstrakto, kaip antioksidanto, įkapsuliavimui gauti labai teigiami rezultatai. Eksperimento metu sojų pupelių aliejus, su trijų rūšių priedais: be pridėtinių antioksidantų (a), su neįkapsuliuotu (b) ir į $V_1/A/V_2$ įkapsuliuotu alyvmedžių lapų ekstraktu (hidrofilinis emulsiklis – IBK) (c), 20 dienų laikytas $55\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje. Po šio laiko, jų peroksidų skaičius, reikšmingai skyrėsi – (a) atveju jis buvo 46 meq/kg , (b) – $35,6\text{ meq/kg}$ (200 mg antioksidanto kg aliejaus), (c) – 19 meq/kg (200 mg įkapsuliuoto antioksidanto kg aliejaus) [46].

Junginiai iš emulsijų gali būti atpalaiduojami keliais būdais: vykstant migracijai arba virškinimo metu. Pirmuoju atveju, įkapsuliuoti junginiai gali migruoti iš V_1 fazės dėl osmosinio slėgio skirtumo tarp V_1 ir V_2 fazių arba dėl susiformavusių atvirkštinių micelių (žr. 8 pav.). Jos susiformuoja esant hidrofobinio emulsiklio pertekliui, kurio molekulės gali įkapsuliuoti V_1 lašelius ir per aliejinę fazę perneša juos į V_2 fazę, taip atpalaiduojant įkapsuliuotus junginius [47].



8 paveikslas. Atvirkštinių micelių susiformavimo ir bioaktyvių junginių pernešimo schema [48].

Visgi dažniausiai toks pernešimas yra nepageidautinas procesas, nes atsipalaidavę junginiai greitai netenka savo aktyvumo, todėl ieškoma būdų, kaip jį sustabdyti arba bent jau sulėtinti. Yra pastebėta, kad įvairių polisacharidų panaudojimas išorinėje fazėje kartu su esamais emulsikliais, leidžia pagaminti gerokai stabilesnes emulsijas bei padidinti įkapsuliavimo efektyvumą. Pavyzdžiui, emulsijos su įkapsuliuotu alyvmedžių lapų ekstraktu, kurioms stabilizuoti kaip hidrofilinis emulsiklis buvo panaudotas IBK, po 20 dienų laikymo atpalaidavo apie 22 % fenolinių junginių, o stabilizavimui panaudojus IBK kartu pektinu, per tą patį laiką atsipalaidavo tik apie 8,1 % ekstrakto [44].

Šie kompleksai susiformuoja išorinėje V_2 fazėje, kai tarp minėtų molekulių susidaro hidrofobiniai arba elektrostatiniai ryšiai, kai hidrofilinis emulsiklis ir polisacharidas turi skirtingus krūvius („sluoksnis ant sluoksnio“ technika). Tokie junginiai suformuoja stabilų ir storą barjerą aplink riebalų rutulėlius, taip stipriai lėtindami atvirkštinių micelių judėjimą ir bioaktyvių junginių atsipalaidavimą iš V_1 fazės [49]. Anksčiau minėto Mohammadi et al. [46] tyrimo metu, sojų pupelių aliejaus su $V_1/A/V_2$, kurios stabilizavimui išorinėje fazėje panaudotas IBK ir pektino kompleksas, peroksidų skaičius buvo 14,6 meq/kg (200 mg įkapsuliuoto antioksidanto kg aliejaus), t. y., pats mažiausias. Tai rodo, kad antioksidanto įkapsuliavimas padėjo išlaikyti didesnę jo aktyvumą.

Visgi pagrindinis šių emulsijų tikslas yra išsaugoti įkapsuliuotus junginius produktų gamybos technologinio proceso, produktų laikymo ir pirminio virškinimo burnoje ir skrandyje metu, tai reiškia, kad emulsijos turi būti stabilios ir atsparios skrandyje esančių fermentų ir žemo pH poveikiui. Tokiai emulsijai patekus į žarnyną, ją pradeda veikti lipazės, kurios ardo riebalų rutulėlius, o plonėjant riebalų sluoksniui, atsipalaiduoja vidinė V_1 fazė, taigi ir įkapsuliuoti junginiai. Patekę į žarnyną jie jau gali būti absorbuojami ir panaudojami.

Bandymai į tokias emulsijas įkapsuliuoti probiotikus taip pat sėkmingi. Joje uždarytos *L. rhamnosus* bakterijų ląstelės, ne tik išgyveno virškinimą skrandyje ir rūgštines jo sąlygas, bet netgi sugebėjo daugintis $V_1/A/V_2$ viduje. Manoma, kad šio bandymo metu kaip hidrofilinį emulsiklį panaudotą IBK bakterijos panaudojo kaip maistinę medžiagą. Tai suteikia galimybę panaudoti tokią emulsiją pieno produktų praturtinimui gyvybingais probiotikais [50]. Vieno iš naujausių tyrimų metu šios emulsijos panaudotos insulino įkapsuliavimui. Nustatyta, kad dvigubosios emulsijos, stabilizuotos panaudojant chitozaną, insuliną atpalaiduoja palaipsniui – per pirmąsias 30 min. atsipalaiduoja 15 %, po 60 min. – 40 %, o po 90 min. – 70 % insulino [51]. Taigi toks platus dvigubųjų emulsijų pritaikomumas leidžia manyti, kad galbūt jos gali būti pritaikytos ir laktazės bei kitų fermentų įkapsuliavimui, pakeičiant jomis dalį ar visa grietinėlę pieno ir jo produktų gamyboje.

2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

Emulsijų gamybai naudotos žaliavos:

- distiliuotas vanduo,
- pirmo spaudimo rapsų aliejus („Golden Oil“, Rusija),
- chemiškai grynas natrio chloridas (NaCl) (Reachem Slovakia s.r.o, Slovakija),
- β-galaktozidazė („Ha-lactase 5200“, Chr. Hansen Holding A/S, Danija),
- poliglicerolio poliricinoleatas (PGPR) („Radiamuls Poly 2253K“, OLEON, Belgija),
- išrūgų baltymų izoliatas (IBI), kuriame yra $89,7 \pm 0,3$ % baltymų, $6,0 \pm 0,1$ % drėgmės, $4,0 \pm 0,1$ % pelenų, 0,2 % riebalų ir 0,1 % laktozės (Lacprodan DI-9213 Arla Foods Ingredients Group, Denmark),
- pektinas, kurio metilinimo laipsnis – 68–76 % („Pectin Classic CM 201“, Herbstreith & Fox KG, Vokietija);
- druskos rūgštis (HCl) (UAB „Eurochemicals“, Lietuva);
- natrio hidroksidas (NaOH) (UAB „Eurochemicals“, Lietuva).

2.2. Dvigubosios $V_1/A/V_2$ emulsijos fazių paruošimas

2.2.1. Vidinės vandeninės emulsijos fazės (V_1) paruošimas

Kambario temperatūros (20 °C) distiliuotame vandenyje ištirpinama valgomoji druska (emulsijoms be laktazės) arba valgomoji druska ir laktazės tirpalas (emulsijoms su laktaze). Gautuose tirpaluose yra 0,5 % valgomosios druskos arba 0,5 % valgomosios druskos ir 18,7 % laktazės atitinkamai. Laktazės kiekis parinktas taip, kad dvigubojoje emulsijoje $V_1/A/V_2$ ji sudarytų 1,5 % masės.

2.2.2. Aliejinės fazės (A) paruošimas

50 °C temperatūros rapsų aliejuje 15 min. tirpinamas emulsiklis PGPR. Gaunamas 6 % PGPR tirpalas, kuris po tirpinimo atvėsina iki kambario temperatūros (20 °C) [52].

2.2.3. Išorinės vandeninės emulsijos fazės (V_2) paruošimas

1. Paruošiamas 1 % išrūgų baltymų tirpalas (IBT) distiliuotame kambario temperatūros (20 °C) vandenyje. IBI tirpinamas vandenyje 2 valandas maišant magnetine maišykle. Po maišymo tirpalas paliekamas 24 valandoms šaldytuve, kad IBI gerai išbrinktų. Paruošto tirpalo pH, kuris yra pH 7, koreguojamas 2N HCl iki pH 6; 5; 4; 3; 2.
2. Paruošiami keli skirtingų koncentracijų pektino tirpalai: (PT) 0,1 %, 0,2 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,8 %, 1 %. Pektinas tirpinamas 50 °C temperatūros distiliuotame vandenyje 30 min. nuolat

maišant magnetine maišykle. Tirpalai atvėsunami iki kambario temperatūros ir paliekami 24 valandoms joje, kad pektinas išbrinktų.

2.3. Biopolimerų elektrostatinės sąveikos tyrimas

Išrūgų baltymų (IB) ir pektino tarpusavio sąveika vertinta vizualiai pagal juos sumaišius gauto tirpalo drumstumą. IBT ir PT paruošti pagal 2.2.3 skyriuje aprašytą metodiką. Visų koncentracijų PT maišyti su visų pH IBT santykiu 1:1, t. y., galutiniame tirpale IB ir pektino tarpusavio santykis buvo 10:1, 10:2, 10:4, 10:6, 10:8, 10:10. Vizualiai įvertinus tirpalų drumstumą (skaidrus, drumstas tirpalas, tirpalas su nuosėdomis) atrinkti geriausi mišiniai (skaidriausi, be nuosėdų). Tyrimas atliktas su kambario temperatūros (~20–25 °C) tirpalais. Vertinimas atliktas vizualiai, praėjus 10 min. po sumaišymo.

2.4. ζ -potencialo matavimai

Biopolimerų tirpalų, pirminės, antrinės ir dvigubųjų emulsijų ζ -potencialas matuotas naudojant dalelių elektroforezės prietaisą Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Didžioji Britanija). Emulsijų ir biopolimerų tirpalų mėginiai buvo atskiesti buferiniais tirpalais santykiu 1:100. Naudoti buferiniai tirpalai, kurių pH atitiko tiriamojo mėginio pH. ζ -potencialas matuotas pagal dalelių judėjimo kryptį ir pagreitį sukurtame elektros lauke. Prieš tyrimą PT ir IBT buvo praskiesti du kartus distiliuotu vandeniu, įvertinant jų praskiedimą V_2 fazėje. Tam kad elektroforezės mobilumo matavimus perskaičiuoti į ζ -potencialo vertes, buvo naudotas M. Smoluchowski matematinis modelis. ζ -potencialo vertės pateiktos kaip trijų matavimų vidurkių vertės su standartiniu nuokrypiu.

2.5. Dvigubosios $V_1/A/V_2$ emulsijos gamyba

2.5.1. Pirminės emulsijos V_1/A gamyba

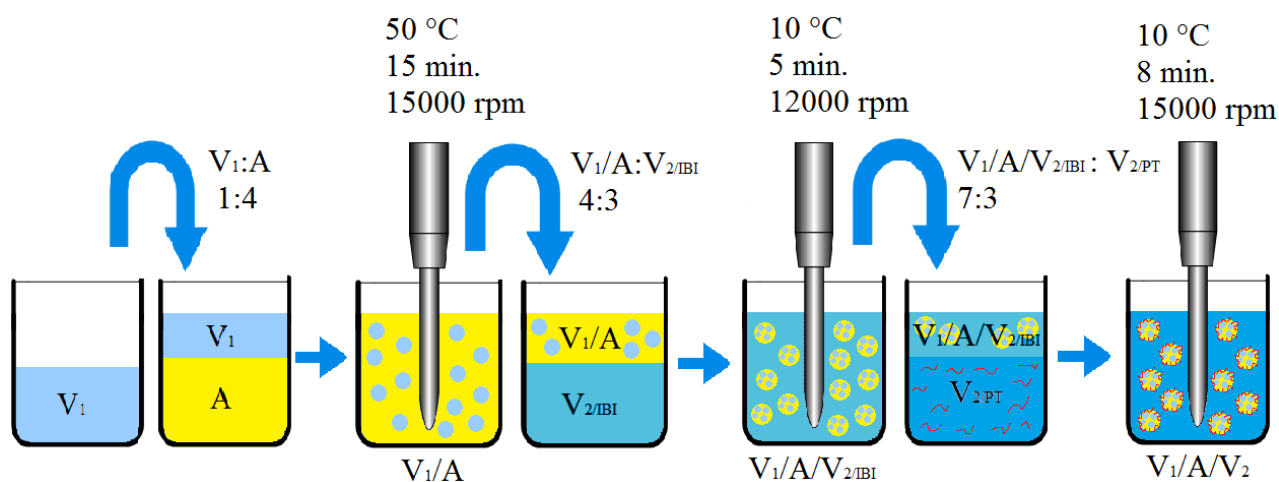
Į A fazę pipete sulašinama V_1 fazė, kur A ir V_1 fazių svorių santykis atitinkamai yra 4:1, ir homogenizuojama maišykle (Ultra Turrax T18, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Vokietija) 50 °C temperatūroje 15 min. 15000 rpm greičiu. Prieš tolimesnius veiksmus gauta pirminė emulsija atvėsinama iki kambario temperatūros (20 °C) [52].

2.5.2. Dvigubosios vienasluoksnės $V_1/A/V_2$ emulsijos gamyba

IBT praskiedžiamas su distiliuotu vandeniu iki 0,5% koncentracijos. Dalis pirminės emulsijos V_1/A lėtai pilama į paruoštą kambario temperatūros (20 °C) IBT (pH 7) atitinkamai svorių santykiu 4:6 ir homogenizuojama 11000 rpm greičiu 5 min. kambario temperatūroje [52]. Gaunama emulsija E₇₋₀, kurios išorinėje vandeninėje fazėje yra tik IB ir kuri bus naudojama kaip kontrolinė emulsija.

2.5.3. Dvigubosios dvisluoksnės $V_1/A/V_2$ emulsijos gamyba

Likusi pirminė emulsija V_1/A lėtai pilama į paruoštą kambario temperatūros (20 °C) IBT, atitinkamai svorių santykiu 4:3 ir homogenizuojama 12000 rpm greičiu 5 min. 10 °C temperatūroje (žr. 9 pav.). Naudojami pasirinkto pH IBT, pagaminti pagal 2.2.3 skyriuje aprašytą metodiką. Gaunama antrinė emulsija, kurios išorinėje V_2 fazėje yra 1 % IB ($V_1/A/V_2/IBI$).



9 paveikslas. Emulsijų gamybos schema

Gauta emulsija lėtai supilama į paruoštą kambario temperatūros (20 °C) pasirinktos koncentracijos PT (atitinkamai svorių santykių 7:3) ir homogenizuojama 15000 rpm 8 min. 10 °C temperatūroje. Gaunamos emulsijos su dviem emulsiklių sluoksniais, kurios tarpusavyje skiriasi pektino kiekiu išorinėje vandeninėje fazėje, naudoto IBT pH ir emulsijos pH (2 lentelė).

2 lentelė. Dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų, naudotų tyrimams, sudėtis

	E7-0	E2-2	E2-3	E2-4	E6-2	E6-3	E6-4	E7-2	E7-3	E7-4
Emulsijos pH	7,02	2,38	2,42	2,45	4,83	4,42	4,13	5,27	4,64	4,32
Naudoto IBT pH	7	2			6			7		
Distiliuotas vanduo, %	67,66	67,54	67,48	67,42	67,54	67,48	67,42	67,54	67,48	67,42
Rapsų aliejus, %	30,08									
PGPR, %	1,92									
Druska, %	0,04									
IB, %	0,30									
Naudoto PT koncentracija, %	0	0,4	0,6	0,8	0,4	0,6	0,8	0,4	0,6	0,8
Pektino kiekis V_2 fazėje, %	0	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4
Pektino kiekis emulsijoje, %	0	0,12	0,18	0,24	0,12	0,18	0,24	0,12	0,18	0,24

Pirmasis indekso skaitmuo prie emulsijos trumpinio nurodo naudoto IBT pH, o antrasis – pektino kiekį V_2 fazėje, pvz., E2-3, reiškia, kad emulsija pagaminta su IBT pH 2, o V_2 fazėje yra 0,3 % pektino.

2.6. Dvigubųjų vienasluoksnės ir dvisluoksnių $V_1/A/V_2$ emulsijų tyrimams naudoti metodai

2.6.1. Dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų gravitacinis stabilumo nustatymas

Emulsijų gravitacinis stabilumas vertintas pagal jų sudarančių fazių atsiskyrimą laikant jas statinėmis sąlygomis. Emulsijos iškart po gamybos supiltos į 30 ml talpos graduotus mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai laikyti kambario temperatūroje (~20 °C) 20 dienų, fiksuojant vandeninės ir aliejinės fazės atsiskyrimą praėjus 1–ai ir 20–iai dienų po gamybos.

2.6.2. Dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų klampos tyrimai

Emulsijų klampa nustatyta reometru (Physica MCR 301, Anton Paar Graz, Austrija) naudojant cilindrinį tyrimo kūną, smailėjančiu galu (CC24). Prieš tyrimą bandiniai 1 valandą laikyti kambario temperatūroje, kad aklimatizuotųsi. Prieš bandymą bandiniai 10 s energingai maišyti stikline lazdele. Greičių gradientas (deformacijos greitis ($\dot{\gamma}$)) per 2,5 minutės didintas nuo 1 iki 1000 s⁻¹, 1 minutę jis laikytas pastovus ($\dot{\gamma} = \text{const.} = 1000 \text{ s}^{-1}$), o per kitas 2,5 minutes greičių gradientas vėl mažintas iki 1 s⁻¹. Dinaminės klampos kitimas, kai $\dot{\gamma} = 1000 \text{ s}^{-1}$ įvertintas ją matuojant po gamybos ir praėjus vienai savaitei po gamybos. Kiekvienas matavimas kartotas 3 kartus, įvertinant standartinį nuokrypį.

Tekėjimo kreivės buvo įvertintos pagal Oswald de Waele jėgos dėsnio modelio lygtį (1):

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

čia: τ – šlyties įtempis, Pa; $\dot{\gamma}$ – deformacijos greitis, s⁻¹; K – konsistencijos koeficientas, kuris yra klampos rodiklis; n – tekėjimo indeksas, kuris yra nuokrypio nuo niutoniniams skysčiams būdingų savybių rodiklis.

2.6.3. Dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų dalelių dydžio pasiskirstymo ir vidutinio dalelių dydžio nustatymas

Emulsijų dalelių, t. y., disperguotos pirminės emulsijos V_1/A , dydžio pasiskirstymas ir vidutinis dalelių dydis (pagal tūrį) nustatytas difrakciniu lazerio spektrometru (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Didžioji Britanija).

Prieš tyrimą bandiniai 1 valandą laikyti kambario temperatūroje, kad aklimatizuotųsi. Prieš bandymą bandiniai 10 s energingai maišyti stikline lazdele. Dalelių dydis matuotas praėjus 1 parai po emulsijos gamybos, kad jos struktūra spėtų nusistovėti po homogenizacijos. Emulsija yra įlašinama į aparato priedo Hydro 2000 talpoje esančią dispersinę fazę (distiliuotą vandenį), kol pasiekiami reikiama jos koncentracija. Ji yra įvertinama pagal lazerio spindulio intensyvumo sumažėjimą (angl.: *laser obscuration*), kurį sukelia į dispersinę terpę patekęs mėginys. Tyrimui

tinkamas intensyvumo sumažėjimas yra 10 – 20 %. Kiekvienas matavimas kartotas 3 kartus, įvertinant standartinį nuokrypį.

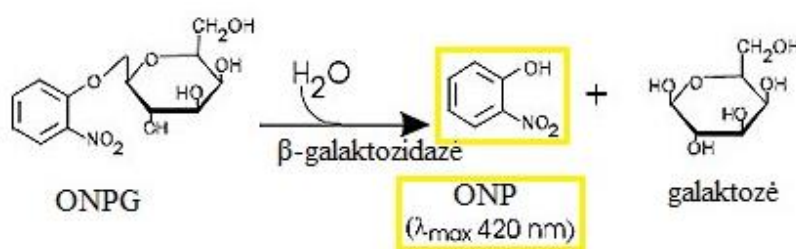
Dalelių dydis nustatomas matuojant išsklaidytos lazerio šviesos spindulių kampą ir intensyvumą, kai lazerio spindulys eina per dispersinę terpę su mėginiu. Pagal gautus duomenis, remiantis Mie šviesos sklaidymo teorija, yra apskaičiuojamas dalelių dydis ir jų pasiskirstymas [53].

2.6.4. Į pirminę V_1/A emulsiją įkapsuliuotos laktazės terminio stabilumo įvertinimas

Laktazės terminis stabilumas įvertintas imituojant pirminės emulsijos gamybą, t. y., V_1 fazė yra homogenizuojama su grynu aliejumi (be hidrofobinio emulsiklio). Homogenizavimas atliktas 10 °C, 25 °C ir 50 °C temperatūroje. Emulsijos 1 val. laikytos kambario temperatūroje, kad aklimatizuotųsi, tada jos 5 min. centrifuguotos 6000 rpm greičiu (Velocity 18R, Dynamica, Austrija). Atsiskyrusi V_1 fazė prafiltruota su 0,45 μm švirkštiniu filtru (Chromafil® RC–45/25, Macherey–Nagel GmbH & Co. KG, Vokietija). 4 ml filtrato sumaišyti su 21 ml 5 % laktozės tirpalo ir vieną valandą inkubuoti 37 °C temperatūroje. Laktazės terminis stabilumas vertintas pagal suskaldytos laktozės kiekį – jei jis sumažėja, tai reiškia, kad laktazė nedematūravo dėl temperatūros poveikio. Laktozės/galaktozės kiekis mišinyje nustatytas pagal 2.6.7.1 skyriuje aprašytą metodiką. Kiekvienas matavimas kartotas 3 kartus, įvertinant standartinį nuokrypį.

2.6.5. Laktazės įkapsuliovimo į dvigubą emulsiją $V_1/A/V_2$ efektyvumo nustatymas

Laktazės įkapsuliovimo efektyvumas įvertintas pagal Ahn et al. [26] aprašytą procedūrą naudojant 5 mM ONPG tirpalą. Laktazė gali skaidyti ONPG iki ONP ir galaktozės (žr. 10 pav.). Susidaręs ONP yra geltonas junginys, taigi pagal tirpalo spalvos pokytį, matuojant jo absorbciją, esant 420 nm bangos ilgiui, galima nustatyti laktazės koncentraciją mėginyje.



10 paveikslas. ONPG skaldymas β -galaktozidaze

Emulsija 5 min. centrifuguota 3000·g greičiu (Velocity 18R, Dynamica, Austrija). Atsiskyrusi vandeninė frakcija su neįkapsuliuota laktaze prafiltruota su 0,45 μm švirkštiniu filtru (Chromafil® RC–45/25, Macherey–Nagel GmbH & Co. KG, Vokietija). 0,5 ml filtrato buvo įpilti į 2 ml 5mM koncentracijos orto–nitrofenil– β -galaktopiranozido (ONPG) (Sigma–Aldrich Chemie

GmbH, Vokietija) tirpalą, kuris prieš tai 15 min. buvo laikomas 37 °C temperatūros vandens vonelėje, ir 15 min. inkubuoti 37 °C temperatūros vandens vonelėje. Reakcija sustabdyta į mišinį įpilant 0,5 ml 500 mM natrio karbonato (Na₂CO₃) tirpalo. Galutinio tirpalo absorbcija matuota spektrofotometru (Evolution 300 LC, Thermo Fisher Scientific, JAV) esant 420 nm bangos ilgiui. Analogiški matavimai atliekami vietoj filtrato naudojant žinomos koncentracijos laktazės tirpalus. Iš gautų rezultatų sudaroma kalibracinė kreivė, pagal kurią apskaičiuojamas laktazės kiekis filtrate. Kiekvienas matavimas kartotas 3 kartus, įvertinant standartinį nuokrypį.

2.6.6. Dvigubųjų V₁/A/V₂ emulsijų virškinimo tyrimas

2.6.6.1. Dirbtinių virškinamojo trakto sulčių sudėtis ir gamyba

Dirbtinių skrandžio sulčių tirpalas (DSST) ir dirbtinių plonųjų žarnų sulčių tirpalas (DPŽST) gaminti naudojant komercinius fermentus, patalpinant juos į fiziologiniams skysčiams artimas terpes. Visos sudėtinės jų dalys ir kiekiai yra nurodyti 3 lentelėje.

DSST pagamintas pagal US Pharmacopeial Convention (2000) su tam tikrais pakeitimais: 2 g natrio chlorido (Reachem Slovakia s.r.o, Slovakija) ir 7 ml koncentruotos druskos rūgšties ištirpinta 1 litre distiliuoto vandens ir pridėta 6,9 g pepsino (77160, 669 U/mg, Sigma–Aldrich Co., JAV). Tirpalo pH koreguotas iki 2, naudojant 2,0 M HCl. Pagamintas DSST laikytas 4 °C temperatūroje.

DPŽST pagamintas pagal Aura *et al.* (1999) pasiūlytą sudėtį su tam tikrais pakeitimais: sumaišyta 174 ml 0,9 % NaCl, 83 ml 0,15 M HCl, 17 ml 2,0 M HCl, 400 ml 0,15 M Na₂CO₃ (Sigma–Aldrich Co., JAV), 280 ml H₂O ir pridėta 1,36 g lipazės (L3126, Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Vokietija) bei 10,8 g tulžies rūgščių druskų (B8631, Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Vokietija). pH koreguotas iki pH 7, naudojant 4,0 M NaOH, ir iki 1 L praskiesta distiliuotu vandeniu.

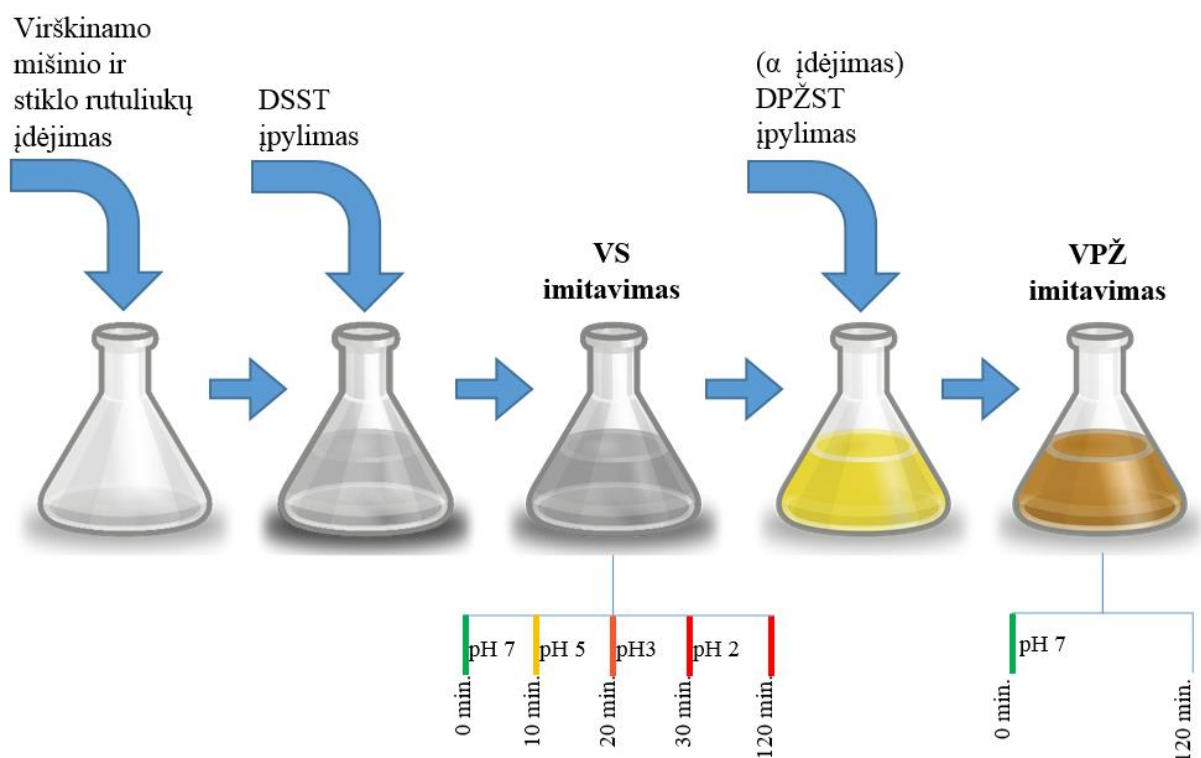
3 lentelė. DSST ir DPŽST sudėtis.

	DSST	DPŽST
Fermentai ir pagrindiniai komponentai	6,9 g pepsino	1,36 g lipazės 10,8 g tulžies druskų
Fiziologinio skysčio komponentai	2 g NaCl 7 ml konc. HCl dist. H ₂ O	174 ml 0,9 % NaCl 83 ml 0,15 M HCl 17 ml 2,0 M HCl 400 ml 0,075 M Na ₂ CO ₃ 280 ml dist. H ₂ O
Kiekis	1000 ml	1000 ml
pH	2	7
pH koregavimo tirpalas	2,0 M HCl	4,0 M NaOH

Švieži DSST ir DPŽST tirpalai buvo ruošti kiekvieną kartą prieš pradėdant emulsijų virškinimo procesą.

2.6.6.2. Emulsijų virškinimo imitavimas

Virškinimo imitavimo procedūra (virškinimas) (žr. 11 pav.) atlikta pagal Leskauskaitė et al. [54] pasiūlytą metodiką. Ji parinkta taip, kad visos sąlygos būtų kaip įmanoma artimesnės natūraliam virškinimo procesui. Svarbiausi jo kriterijai: pastovios temperatūros ir fermentams optimalaus pH palaikymas bei natūralius virškinamojo trakto judesius imituojantys apsisukimai. Virškinimo procesas suskirstytas į dvi dalis: virškinimas skrandyje ir virškinimas plonojoje žarnoje.



11 paveikslas. Virškinimo proceso imitavimo schema

Emulsijos virškinamumas vertintas virškinant pirminę V_1/A ir dvigubą $V_1/A/V_2$ emulsijas, su įkapsuliuota laktaze (3,74 % ir 1,5 % atitinkamai). Laktazės atpalaidavimas *in vitro* virškinimo metu vertintas keliais būdais: pagal suskaldytos laktozės kiekį, kai emulsijos buvo sumaišytos su pienu arba β -laktozės tirpalu, ir pagal ONPG tirpalo spalvos pasikeitimą, kai emulsijos buvo sumaišytos su 5 mM ONPG tirpalu, kuris atitinka maždaug 1,7 % laktozės tirpalą. *In vitro* virškinimui buvo ruošiami $V_1/A/V_2$ ir V_1/A mišiniai su:

- atstatytu pienu (10 % lieso pieno miltelių (UAB MGL Baltija, Lietuva) tirpalas);
- 5 % β -laktozės (L3750, Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Vokietija) tirpalu;
- 5 mM ONPG tirpalu (atitinka maždaug 1,7 % laktozės tirpalą).

Virškinimui naudojamų tirpalų kiekiai yra nurodyti 4 lentelėje. Virškinamas substratas sumaišytas su DSST bei stiklo rutuliukais ($\varnothing = 5$ mm), kurie pagerina maišymo kokybę. Gautas emulsijos ir skrandžio sulčių mišinys laikytas termostate, palaikant pastovią 37 °C temperatūrą, maišant 150 aps./min greičiu. Virškinimo skrandyje metu per pirmąsias 30 min. pH palaipsniui mažintas iki pH 2 su 2,0 M HCl (žr. 11 pav.). Pasiekus pH 2, virškinimas skrandyje tęstas dar 90 min (bendra trukmė – 120 min). Mėginių tyrimai kartoti 2 kartus.

4 lentelė. Virškinamų tirpalų pagrindinių komponentų sudėtis.

Virškinamo substrato sudėtis				Stiklo rutuliukų kiekis, g	DSST kiekis, g	DPŽST kiekis, g
Emulsijos kiekis ir rūšis	Tirpalo kiekis ir rūšis	Riebumas, %	Laktozės kiekis, %			
2 g V ₁ /A/V ₂	18 g *	3,2	4,6	5	20	20
2 g V ₁ /A/V ₂	18 g **	3,2	4,5	5	20	20
2 g V ₁ /A/V ₂	18 g ***	3,2	–	5	20	20
1 g V ₁ /A	19 g **	4	4,75	5	–	25
2 g V ₁ /A/V ₂	–	32	–	5	20	20
1 g V ₁ /A	–	80	–	5	–	25

* atstatytas pienas; ** 5 % β -laktozės tirpalas; *** 5 mM ONPG tirpalas

Po šio etapo išimta po vieną mėginį ir juos įpilta po 2 ml 0,5 M Na₂CO₃, kad sustabdyti fermentų veiklą. Likę mėginiai sumaišyti su DPŽST, o jų pH pakoreguotas iki pH 7 su 4,0 M NaOH, virškinimas plonojoje žarnoje imituotas 120 min. Virškinant tik pirminę emulsiją V₁/A, virškinimo skrandyje etapas praleistas ir vykdytas tik virškinimo plonajame žarnyne imitavimas. Šio eksperimento metu pH nekoreguotas.

Imituojamo virškinimo metu mėginiai analizei imti pasibaigus virškinimo skrandyje ir pasibaigus virškinimo plonajame žarnyne imitavimui. Mėginiuose nustatytas laktozės kiekio pokytis prieš ir po virškinimo (žr. 2.8 skyrių). Kiekvienas matavimas kartotas 3 kartus, įvertinant standartinį nuokrypį.

2.6.7. Dvigubųjų V₁/A/V₂ emulsijų virškinamumo įvertinimas

Dvigubosios emulsijos virškinamumas įvertinamas pagal jos riebalų hidrolizės laipsnį. Kuo jis didesnis, tuo emulsija geriau virškinama ir tuo daugiau V₁ fazės, su įkapsuliuota laktaze, gali atsipalaiduoti.

Laktazės atsipalaidavimas iš emulsijos laikymo ar virškinimo metu gali būti įvertintas pagal mėginyje esančios laktozės kiekį. Jei laktozės kiekis išlieka nepakitęs, tai reiškia, kad fermentas yra neaktyvus arba neatsipalaiduoja iš emulsijos. Tačiau, jei laktozės kiekis sumažėja, o galaktozės

kiekis padidėja, tai rodo, kad laktozė buvo suskaidyta į monosacharidus veikiant atsipalaidavusiam fermentui.

2.6.7.1. Dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų riebalų hidrolizės įvertinimas

Riebalų hidrolizės laipsnis nustatomas pagal virškinimo metu susidariusių laisvų riebalų rūgščių (LRR) kiekį. Jam nustatyti naudojamas „pH–stat“ metodas, kurio metu LRR kiekis įvertinamas pagal 0,1 M NaOH tirpalo kiekį, sunaudotą virškinimo metu susidariusių LRR neutralizavimui. Mėginiai titruojami praėjus 120 min. nuo virškinimo imitavimo plonajame žarnyne pradžios. LRR kiekis apskaičiuojamas pagal (2) formulę:

$$\% LRR = \left(\frac{V_{NaOH} \times m_{NaOH} \times M_{rieb.}}{w_{rieb.} \times 2} \right) \times 100 \quad (2)$$

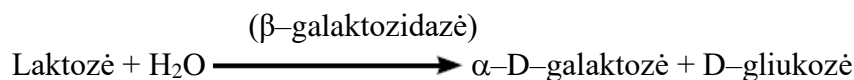
kur: V_{NaOH} – NaOH kiekis (ml), sunaudotas virškinimo metu susidariusioms LRR neutralizuoti; m_{NaOH} – NaOH koncentracija (0,1 M); $M_{rieb.}$ – naudojamų riebalų (rapsų aliejus) molekulinė masė (~876,6 g/mol); $w_{rieb.}$ – pradinis riebalų kiekis virškinimo sistemoje (mg).

2.6.7.2. Laktazės atpalaidavimo iš dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų nustatymas pagal laktozės kiekio pokytį

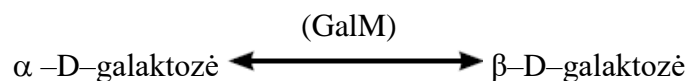
Vienas iš populiariausių ir labiausiai ištobulintų laktozės kiekio nustatymų būdų yra fermentinis metodas, kurio metu laktozė yra hidrolizuojama iki D–galaktozės ir D–gliukozės, o tada nustatomas vieno ar kito monosacharido kiekis. Dažniausiai nustatinėjamas D–galaktozės kiekis, nes paprastai tiriamame gaminyje jos būna mažiau, nei D–gliukozės.

Šiam tyrimui naudotas laktozės/galaktozės kiekio nustatymo rinkinys (Lactose/Galactose Assay Kit (Rapid), Megazyme Inc., JAV), kurio veikimas paremtas 3 pagrindiniais etapais:

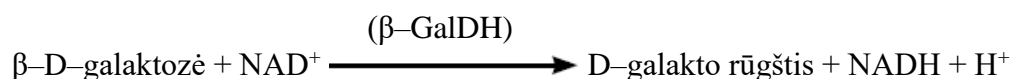
1) gaminyje esanti/likusi laktozė yra hidrolizuojama iki D–galaktozės ir D–gliukozės su iš *Aspergillus niger* išgauta β–galaktozidaze (pH 5):



2) tada galaktozės mutarotazė (GalM) katalizuoja α–D–galaktozės konversiją į β– anomerinę formą:



3) terpėje, kurios pH8,6 bei esant β–galaktozės dehidrogenazei (β–GalDH), β–D–galaktozė yra oksiduojama NAD^+ iki D–galakto rūgšties, susiformuojant NADH:



Susidariusio NADH kiekis yra proporcingas laktozės kiekiui produkte. NADH kiekis nustatomas matuojant tirpalo absorbciją esant 340 nm bangos ilgiui ir naudojant 1 cm pločio kiuvetes.

Mėginiai tyrimui paruošiami pasveriant apie 1 g tiriamo produkto į 100 mL matavimo kolbą ir įpilant apie 60 mL distiliuoto vandens ir išmaišant. Kolba patalpinama į 50 °C vandens vonią ir laikomas 15 min. retkarčiais pamaišant. Tada įpilami 2 mL Carrez I tirpalo (3,6 % kalio heksacianoferato ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) tirpalas), 2 mL Carrez II tirpalo (7,2 % cinko sulfato ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) tirpalas) ir 4 mL 100 mM NaOH tirpalo, po kiekvieno gerai išmaišant. Praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 100 mL ir filtruojama per filtrinį popierių, išmetant kelis pirmus filtrato mililitrus. Laktozės kiekiui nustatyti naudotų tirpalų kiekiai nurodyti 5 lentelėje.

5 lentelė. Laktozės kiekiui nustatyti naudotų tirpalų kiekiai.

	Laktozė		Galaktozė	
	Tuščias mėginys	Mėginys	Tuščias mėginys	Mėginys
Mėginio (filtrato) kiekis	–	0,20 mL	–	0,20 mL
Tirpalas Nr. 4 (β -galaktozidazė)	0,20 mL	0,20 mL	–	0,20 mL
<i>Visi tirpalai švelniai išmaišomi ir 10 min. inkubuojami ~25 °C temperatūroje.</i>				
Distiliuotas vanduo	2,20 mL	2,00 mL	2,40 mL	2,20 mL
Tirpalas Nr. 2 (buferis)	0,20 mL	0,20 mL	0,20 mL	0,20 mL
Tirpalas Nr. 3 (NAD ⁺)	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL	0,10 mL
<i>Viskas išmaišoma ir po maždaug 3 min. matuojama absorbcija (A_1)</i>				
Suspensija Nr. 5 (β -GalDH/GalM)	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL
<i>Išmaišoma ir po maždaug 5 min. matuojama absorbcija A_2</i>				

Galaktozės mėginių absorbcijos pokytis, apskaičiuojamas pagal formulę (3):

$$\Delta A_{D-galakt} = (A_2 - A_1)_{galaktozės\ mėginio} - (A_2 - A_1)_{galaktozės\ tuščio\ mėginio}; \quad (3)$$

o laktozės mėginių absorbcijos pokytis, apskaičiuojamas pagal formulę (4):

$$\Delta A_{laktozės} = ((A_2 - A_1)_{laktozės\ mėginio} - (A_2 - A_1)_{laktozės\ tuščio\ mėginio}) - \Delta A_{D-galakt}. \quad (4)$$

Tiek D-galaktozės, tiek laktozės kiekis mėginyje apskaičiuojamas pagal formulę (5)

$$C = \frac{V \times M_{sacharido}}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A, \quad (5)$$

kur: V – bendras tirpalų tūris (2,72 mL), mL; $M_{sacharido}$ – tiriamo sacharido (galaktozės arba laktozės) molekulinė masė, g/mol; ε – NADH ekstinkcijos koeficientas esant 340 nm bangos ilgiui ($6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); d – šviesos kelias per kiuvetę (1 cm), cm; v – mėginio tūris, ml.

Laktozės ir galaktozės kiekis mėginyje prieš atitinkamai apskaičiuojamas:

$$C_{laktazės} = \frac{2,72 \times 342,3}{6300 \times 1 \times 0,2} \times \Delta A_{laktazės} = 0,7389 \times \Delta A_{laktazės}$$

$$C_{galaktazės} = \frac{2,72 \times 180,16}{6300 \times 1 \times 0,2} \times \Delta A_{laktazės} = 0,3889 \times \Delta A_{laktazės}$$

Kiekvienas matavimas kartotas 3 kartus, įvertinant standartinį nuokrypį.

2.6.7.3. *Laktazės atpalaidavimo nustatymas pagal tirpalo spalvos pokytį*

Laktazės atpalaidavimą iš emulsijos virškinimo metu įvertinti galima paruošiant mėginį, kuriame emulsija yra sumaišoma su bespalviu 5 mM ONPG tirpalu (žr. 4 lentelė). Jei virškinimo metu laktazė atsipalaiduoja, ji skaido ONPG iki ONP ir galaktazės (žr. 10 pav.). Susidaręs ONP yra geltonas junginys, taigi pakinta tirpalo spalva.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Sąlygų, reikalingų elektrostatinei sąveikai tarp IBI ir pektino parinkimas bei įvertinimas

Įvairūs polisacharidai ir baltymai yra natūralūs polimerai, dažnai randami ir naudojami kaip funkciniai ingredientai įvairiuose maisto produktuose, taip pat ir emulsijose. Šie polimerai geba keisti maisto tekstūrą, jo skonį, priimtinumą, stabilumą ir netgi galiojimo laiką [55]. Stabilumas yra viena iš svarbiausių emulsijų savybių, todėl jam skiriamas didelis dėmesys. Baltymai jau seniai naudojami kaip emulsikliai A/V emulsijų stabilizavime, o įvairių polisacharidų panaudojimas leidžia jas padaryti dar stabilesnes vykstant elektrostatinei ar hidrofobinei sąveikai tarp jų.

Šiuo metu, tam kad abu polimerus panaudoti emulsijų stabilizavimui, dažniausiai naudojama „sluoksnis ant sluoksnio“ technika. Visgi, pagrindinė šios technikos problema yra emulsijos lašelių flokuliacija, kuri gali vykti dviem skirtingais būdais: a) jungiančioji flokuliacija (*angl. bridging flocculation*) ir b) išstūmio flokuliacija (*angl. depletion flocculation*). Jungiančioji flokuliacija vyksta esant per mažai polisacharido koncentracijai, kai jis nepadengia viso emulsijos lašelių paviršiaus ir jie homogenizuojant susiduria tarpusavyje ir prisijungia prie tos pačios polisacharido molekulės. Šis kompleksas tampa labai stambus ir nusėda. Išstūmio flokuliacija įvyksta esant per didelei polisacharido koncentracijai, kai neadsorbuotas polisacharidas pasiekia kritinę vertę, taip versdamas emulsijos daleles sulipti ir nusėsti [55, 56].

Taigi, biopolimerų tarpusavio sąveikos tipas ir stiprumas labai priklauso nuo keleto faktorių, tokių kaip polimerų tipas, molekulinis svoris, krūvis ir jo tankumas bei pasiskirstymas, tirpumas, terpės pH, temperatūra, joninė jėga [55]. Todėl šių tyrimo tikslas yra nustatyti sąlygas (IBT pH ir polimerų tarpusavio santykį), kuriose biopolimerai gali sąveikauti, remiantis vizualiniu biopolimerų mišinių įvertinimu bei jų ζ -potencialo matavimu.




























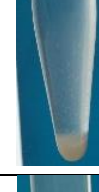



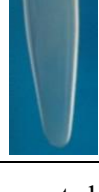
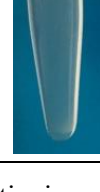

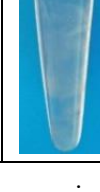

3.1.1. Vizualinis pektino ir išrūgų baltymų kompleksavimo įvertinimas

Šio tyrimo metu PT (0,1 %, 0,2 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,8 % ir 1 %) maišyti su skirtingų pH (žr. 12 pav.) 1 % IBT santykiu 1:1, t. y., galutiniame tirpale IB ir pektino tarpusavio santykis buvo 10:1, 10:2, 10:4, 10:6, 10:8, 10:10. IB ir pektino tarpusavio sąveika vertinta vizualiai pagal juos sumaišius gauto tirpalo drumstumą bei nuosėdų susidarymą.

Pektinas yra polisacharidas, turintis neigiamą krūvį dėl jonizuotų karboksi- grupių. IBT, kurių $pH > 4,5 = pI$, kas yra šių baltymų izoelektrinis taškas (pI) [57], taip pat yra neigiamai įkrauti. Todėl elektrostatinė sąveika tarp šių polimerų gali vykti tik naudojant IBT, kurių $pH < pI$, taigi šiuo atveju pH 4, pH 3 ir pH 2.

Nustatyta, kad kai IBT pH yra 4 ir 5, jo mišiniais su pektino tirpalais yra labiausiai drumsti (žr. 12 pav.), nes artėjant prie pI, baltymai praranda savo krūvį ir pradeda denatūruoti, todėl tirpalai

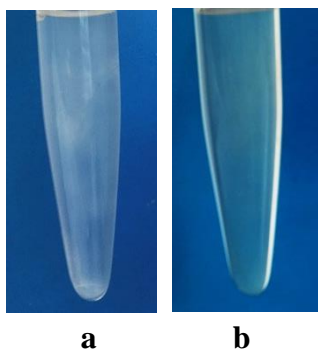
susidrumsčia. Visgi, esant pH 5, dalis baltymų dar turi neigiamą krūvį todėl kompleksavimas su pektinu dar nevyksta, tačiau ties pH 4 IB jau pradeda įgauti teigiamą krūvį. Šiuo metu neigiamos pektino molekulės neutralizuoja teigiamas IB molekules, susidarant netirpiems kompleksams, kurie iškrinta nuosėdomis. Panaši situacija yra su pH 3 IBT, tik šiuo atveju mišiniai yra skaidresni, nes beveik visi baltymai jau yra įgavę teigiamą krūvį, tačiau dėl didesnio jų kiekio susiformuoja ir daugiau nuosėdų. Mažėjant pektino ir sąlyginai didėjant IB koncentracijai, susidaro mažiau netirpių, todėl ir nuosėdų kiekis mažėja [55].

IB: pektino santykis IBI tirpalo pH	10:10	10:8	10:6	10:4	10:2	10:1
pH 7						
pH 6						
pH 5						
pH 4						
pH 3						
pH 2						

12 paveikslas. IBT ir PT mišinių išvaizda, esant skirtingiems polimerų tarpusavio santykiams ir IBT pH

Geriausi rezultatai gauti naudojant IBT, kurio pH 2, nes visi tirpalų mišiniai išliko skaidrūs ir be nuosėdų. Šiuo atveju, IB ir pektino molekulės iš pradžių sąveikauja neutralizuodamos viena

kitą, susiformuojant netirpiems kompleksams, todėl pirmosiomis sumaišymo akimirkomis tirpalai buvo šiek tiek drumsti (žr. 13 pav.). Tačiau toliau vykstant šių kompleksų ir anijoninio pektino sąveikai, jie patys tapo anijoniniai, taigi tirpūs, ir tirpalai praskaidrėjo. Visgi, esant nedidelei pektino koncentracijai, palyginus su IB, ne visiems agregatams užtenka pektino, todėl tokie mišiniai yra truputį drumsti (žr. 12 pav., pH 2, santykis 10:2 ir 10:1).



13 paveikslas. IBT ir PT mišinio (IBT pH 2, IB ir pektino santykis 10:8) drumstumas: (a) iškart po sumaišymo ir (b) praėjus 10 min. po sumaišymo.

Kai IBT pH > 5, kompleksavimas nevyksta, nes abu polimerai turi vienodą, t. y., neigiamą, krūvį. Visgi, didėjant pektino koncentracijai, pastebėtas mišinių drumstumo didėjimas, kurį greičiausiai lėmė denatūruojantys baltymai. Denatūravimą galėjo sukelti rūgštinis pektino tirpalas (pvz., 0,6 % koncentracijos tirpalo pH = 3,3), kuris bendro mišinio pH priartino prie baltymų pI. Didėjant pektino koncentracijai, mažėjo jo tirpalo pH, todėl tokiuose mišiniuose su IB drumstumas yra didesnis.

Tolimesniems tyrimams dėl didžiausio skaidrumo ir mažiausio nuosėdų kiekio atrinktos šios kombinacijos: IB ir pektino tarpusavio santykis 10:8, 10:6, 10:4, t. y., V₂ fazėje bus 0,5% IB ir 0,4 %; 0,3 % ir 0,2 % pektino, ir pH 7; pH 6 ir pH 2 IB tirpalai.

3.1.2. Dvigubųjų V1/A/V2 emulsijų gamybai naudojamų tirpalų ζ-potencialas

ζ-potencialas parodo dalelių paviršiaus krūvį koloidiniuose tirpaluose. Kai jis didelis (tiek teigiamas, tiek neigiamas), tai rodo koloido stabilumą ir atsparumą flokuliacijai ir koaguliacijai. Jam mažėjant, mažėja ir koloido stabilumas [58]. Baltymai gali turėti tiek teigiamą, tiek neigiamą ζ-potencialą, priklausomai nuo terpės pH. Krūvį baltymams suteikia amino rūgštys ir jų jonizacija skirtingame pH. Karboksilinti polisacharidai anijoniniais tampa tokiose pH vertėse, kurios yra aukštesnės už jo rūgšties disociacijos konstantą (pKa). Šis elektrinis krūvis ir lemia ar polimerai trauks ar stums vienas kitą tirpale [55].

Visų koncentracijų pektino tirpalai (PT) pasižymi dideliu neigiamu ζ-potencialu, kuris didėja, didėjant jo koncentracijai (žr. 6 lentelė). IBT, kurio pH 2, t. y., mažiau už pI, ζ-potencialas

teigiamas, o kurių pH 6 ir pH 7, yra stipriai neigiamas. Šie duomenys patvirtina vizualinio pektino ir išrūgų baltymų kompleksavimo įvertinimo rezultatus (žr. 3.1.1 skyrių), kad PT gali sudaryti kompleksą tik su IBT, kurio pH 2, nes abu tirpalai turi priešingą ζ -potencialą. Jie taip pat, leidžia manyti, kad kompleksavimas vyks ir dvigubųjų dvisluoksnių emulsijų gamybos metu taikant „sluoksnis ant sluoksnio“ techniką, t. y., kai IBT ir PT į emulsijas bus įmaišomi ne vienu metu, o vienas po kito. Komplekso stiprumą emulsijose turėtų sustiprinti ir teigiamas V_1 fazės potencialas, kurį jai suteikė laktazė.

PT mišiniuose su IBT, kurių pH 6 ir pH 7, elektrostatinė sąveika taip gali vykti, nors šiuo atveju visi tirpalai turi neigiamą ζ -potencialą. Kompleksas gali susidaryti tarp aktyvių, teigiamai įkrautų IB amino rūgščių, pvz., arginino (pI = 10,76), histidino (pI = 7,59) ir lizino (pI = 9,74), kurios tokiais sąlygomis yra katijoninės [59], ir jonizuotų pektino karboksi- grupių [42].

6 lentelė. Dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų gamybai naudotų tirpalų ζ -potencialas, priklausomai nuo IBT pH ir PT koncentracijos.

Tirpalo pavadinimas	ζ -potencialas, mV
V_1 (su laktaze)	$12,93 \pm 0,21$
IBT 0,5 % (pH 2)	$10,70 \pm 0,36$
IBT 0,5 % (pH 6)	$-23,63 \pm 0,32$
IBT 0,5 % (pH 7)	$-25,83 \pm 0,12$
A	0,00
PT (0,2 %)	$-31,50 \pm 0,44$
PT (0,3 %)	$-34,50 \pm 0,50$
PT (0,4 %)	$-45,13 \pm 0,29$

3.2. Dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų su dvigubu biopolimerų sluoksniu tarpfazyje V_2/A , pagamintų naudojant „sluoksnis ant sluoksnio“ techniką, stabilumas

Kaip minėta anksčiau, viena iš pagrindinių ir svarbiausių emulsijos savybių yra jos stabilumas, kuris yra apibūdinamas gravitaciniu stabilumu, o taip pat dalelių dydžiu bei jos klampa. Mažas dalelių dydis leidžia emulsiją lengviau ir tolygiau paskirstyti produkte, be to, tokia emulsija mažiau jaučiama galutiniame produkte. Dėl panašių priežasčių labiau vertinamos ir skystesnės emulsijos – jas galima daug lengviau paskirstyti produkte, jo nesutirštinant. Šioms emulsijų savybėms labai didelę įtaką gali daryti jų gamybos metu vykstantys procesai, iš kurių labiausiai – elektrostatinės ar kitokios sąveikos tarp jos sudėtinių dalių. Todėl labai svarbu yra jas nustatyti ir įvertinti.

Šių tyrimų metu vertintos 3.1.2 skyriuje minėtos emulsijos. Kaip kontrolė naudota dviguboji vienasluoksnė emulsija (E₇₋₀), pagaminta pagal 2.5.2 skyriuje aprašytą metodiką. Šių emulsijų sudėtis nurodyta 2 lentelėje.

3.2.1. Gamybos sąlygų įtaka dvigubųjų V₁/A/V₂ dvisluoksnių emulsijų ζ–potencialui

Siekiant įvertinti, ar dvigubųjų dvisluoksnių emulsijų gamybos metu, taikant „sluoksnis ant sluoksnio“ techniką, tarp IB ir pektino vyksta elektrostatinė sąveika, buvo išmatuotas jų, pirminės ir antrinės (gamintos su IBT pH 2) emulsijų ζ–potencialas. Nustatyta, kad pirminė emulsija V₁/A kaip ir V₁ fazė, turi teigiamą ζ–potencialą (žr. 6 ir 7 lentelės). Antrinė emulsija, pagaminta su pH 2 IBT – taip pat turi, nors ir nedidelį, tačiau teigiamą ζ–potencialą, dėl kurio galimas elektrostatinis kompleksavimas su stipriai neigiamais PT. Nors PT ζ–potencialas ir yra stipresnis, galutiniame produkte jis sudaro tik 30 %, lyginant su 70 % antrinės emulsijos, todėl tokios dvigubosios emulsijos vis tiek išlaiko silpną teigiamą krūvį.

O emulsijos paruoštos su pH 6 ir pH 7 IBT turi didelį neigiamą krūvį. Nors šiuo atveju kompleksavimas ir nevyksta arba vyksta labai silpnai, emulsijos gali išlikti stabilios dėl, kaip minėta anksčiau, didelės ζ–potencialo vertės [58]. Mohammadi et al. [44] savo tyrimų metu taip pat naudojo IBT pH 6 dvigubųjų emulsijų su pektinu gamybai, tačiau IBT ir PT buvo sumaišomi dar prieš homogenizavimą, taigi jis netaikė „sluoksnis ant sluoksnio“ technikos. Taip pat verta paminėti, kad didėjant pektino koncentracijai V₂ fazėje, didėja ir ζ–potencialo vertė, taigi ir, bent teoriškai, emulsijos stabilumas.

7 lentelė. Pirminės, antrinės ir dvigubųjų V₁/A/V₂ emulsijų ζ–potencialas, priklausomai nuo gamybos sąlygų (IBT pH ir PT koncentracijos)

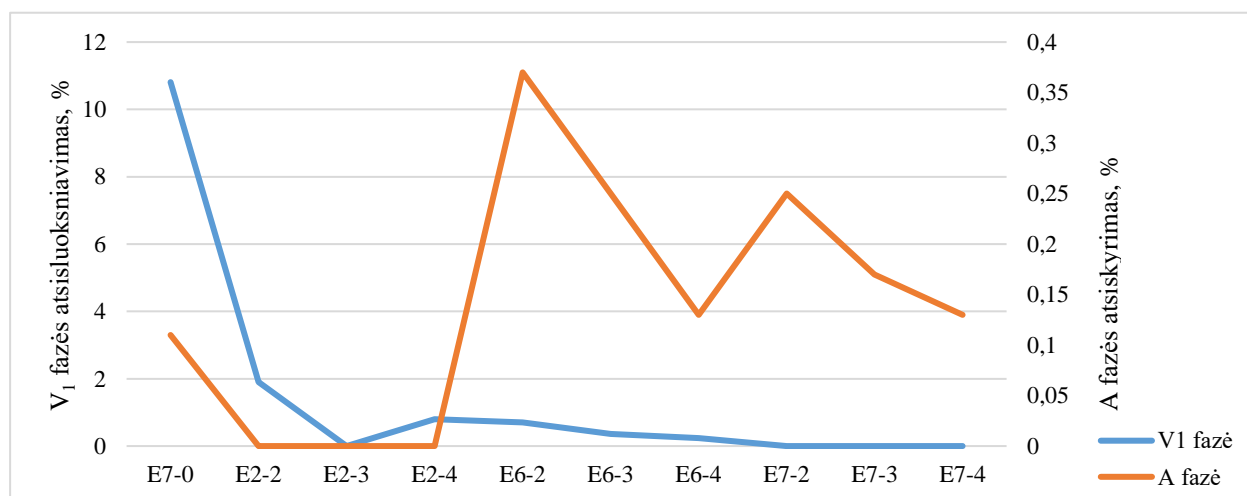
Emulsijos pavadinimas	ζ–potencialas, mV
V ₁ /A	7,93 ± 0,12
V ₁ /A/V ₂ /IBT pH2	12,23 ± 0,23
V ₁ /A/V ₂ /IBT pH2 + 0,2 %	3,03 ± 0,25
V ₁ /A/V ₂ /IBT pH2 + 0,3 %	3,53 ± 0,06
V ₁ /A/V ₂ /IBT pH2 + 0,4 %	4,33 ± 0,12
V ₁ /A/V ₂ /IBT pH6 + 0,2 %	-35,03 ± 0,06
V ₁ /A/V ₂ /IBT pH6 + 0,3 %	-35,87 ± 0,12
V ₁ /A/V ₂ /IBT pH6 + 0,4 %	-36,47 ± 0,06
V ₁ /A/V ₂ /IBT pH7 + 0,2 %	-34,13 ± 0,12
V ₁ /A/V ₂ /IBT pH7 + 0,3 %	-34,63 ± 0,06
V ₁ /A/V ₂ /IBT pH7 + 0,4 %	-35,30 ± 0,17

3.2.2. Dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų gravitacinis stabilumas statinėmis sąlygomis

Emulsijos iškart po gamybos buvo supiltos į sugraduotus mėgintuvėlius, o jų stabilumas (atsparumas fazių atsiskyrimui) vertintas vizualiai (žr. 15 pav.), laikant jas kambario temperatūroje 20 dienų. Kaip ir ankstesniuose tyrimuose, kaip kontrolė buvo naudojama vienasluoksnė emulsija E₇₋₀. Praėjus vienai dienai iš kontrolinės E₇₋₀ emulsijos atsiskyrė 4,53 %, o per 20 dienų net 10,81 % V₂ fazės ir 0,11 % A fazės (žr. 14 pav.).

Dvisluoksnės emulsijos buvo ženkliai stabilesnės tiek praėjus vienai, tiek 20–iai dienų po gamybos. Emulsijos, gamintos su pH 7 IBT, pasižymėjo mažiausiu V₂ fazės atsiskyrimu – nors pradžioje ir buvo pastebėtas labai nežymus jos atsiskyrimas, tačiau vėliau jis pradingo. Kadangi tokiomis sąlygomis biopolimerų kompleksavimas nevyksta, tai gali būti paaiškinta tuo, kad pektinas šiuo atveju veikia kaip tirštiklis, o bėgant laikui jis adsorbavo visą atsiskyrusį vandenį.

Tai patvirtina ir padidėjusi šių emulsijų klampa (žr. 4.2.4 poskyrį) bei didelis dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų, gamintų su IBT pH 6 ir pH 7, ζ -potencialas. Visgi tai nepadėjo apsaugoti aliejinės fazės – dalis jos atsiskyrė (žr. 15 pav.). Kadangi pektino kiekiui V₂ fazėje didėjant nuo 0,2 iki 0,4 %, atsiskyrusios A fazės kiekis mažėjo (atitinkamai 0,25 %, 0,17 % ir 0,13 %), galima manyti, kad padidinus pektino kiekį, pavyktų sulaukyti didesnę jos kiekį.



14 paveikslas. Dvigubųjų vienasluoksnės ir dvisluoksnių $V_1/A/V_2$ emulsijų, paruoštų skirtingomis gamybos sąlygomis, fazių atsiskyrimas per 20 dienų, remiantis vizualinio vertinimo duomenimis

Iš emulsijų, pagamintų su pH 6 IBT, atsiskyrė nedidelis kiekis V₂, kuris mažėjo didėjant pektino kiekiui sistemoje. Per 20 dienų šis kiekis nepadidėjo, tačiau ir nesumažėjo, kaip anksčiau minėtose emulsijose. Visais atvejais atsiskyrusios V₂ fazės kiekis neviršijo 0,5 %. Tačiau šiose emulsijose pastebėtas stipriausias A fazės atsiskyrimas, kuris emulsijose E₆₋₂, E₆₋₃ ir E₆₋₄ atitinkamai buvo 0,37 %, 0,25 % ir 0,13 %. Aliejinės fazės atsiskyrimą abiem atvejais greičiausiai lėmė mažas emulsijų pH (žr. 2 lentelė), artimas IB pI, todėl jis negalėjo pakankamai gerai adsorbuotis ir apsaugoti riebalų rutulėlių.

1 diena po gamybos										
20 dienų po gamybos										
20 dienų po gamybos										
	E7-0	E2-2	E2-3	E2-4	E6-2	E6-3	E6-4	E7-2	E7-3	E7-4

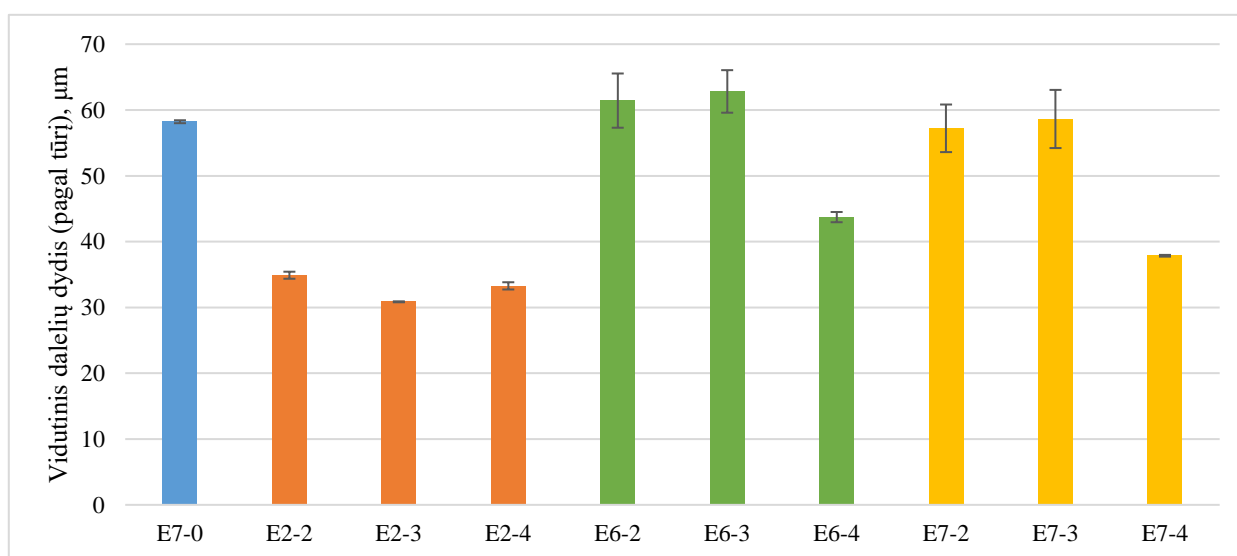
15 paveikslas. Dvigubųjų vienasluoksnės ir dvisluoksnių $V_1/A/V_2$ emulsijų, paruoštų skirtingomis gamybos sąlygomis, stabilumas statinėmis sąlygomis praėjus 1–ai it 20–iai dienų po gamybos (pirmasis indekso skaitmuo prie emulsijos trumpinio nurodo naudoto IBT pH, o antrasis – pektino kiekį V_2 fazėje).

Emulsijų, pagamintų su pH 2 IBT, stabilumas buvo skirtingas tiek lyginant su kitomis dvisluoksnėmis emulsijomis, tiek tarpusavyje. Iš E₂₋₂ atsiskyrė didžiausias kiekis V₂ – po pirmos dienos šis kiekis buvo apie 0,5 %, o po 20–ies padidėjo iki 1,9 %. E₂₋₄ buvo gerokai stabilesnė – nežymus V₂ fazės atsiskyrimas (~0,8 %) pastebėtas tik po 20–ies dienų. Visgi pati stabiliausia iš visų buvo E₂₋₃ – per 20 dienų nepastebėtas joks fazių atsiskyrimas. Nė vienoje iš šių emulsijų per šį laikotarpį nepastebėtas A fazės atsiskyrimas.

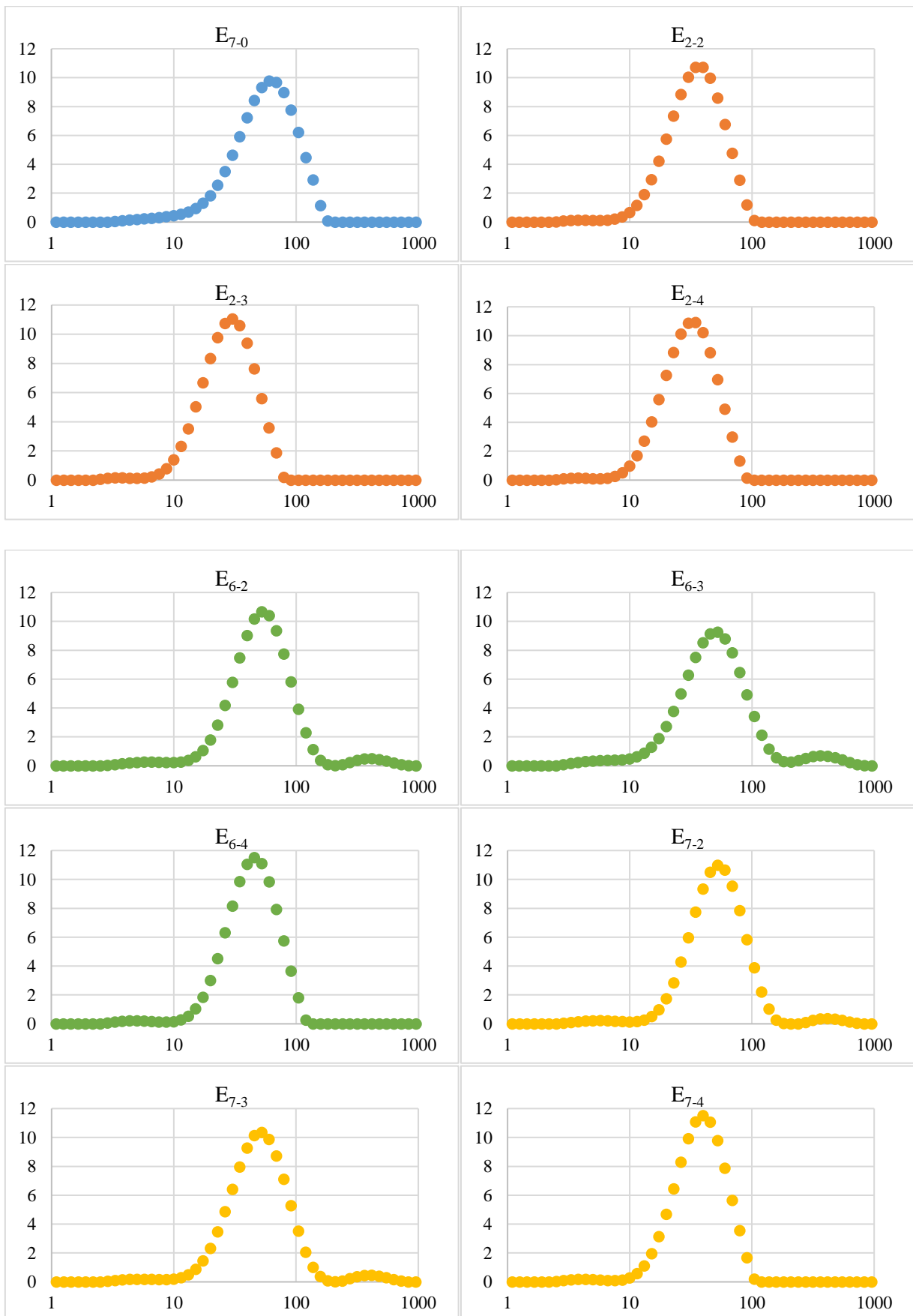
Dviejų polimerų panaudojimo pagrindinis tikslas yra apsaugoti pirminę emulsiją V₁/A ir V₁ fazėje esančias bioaktyvias medžiagas nuo neigiamo išorės poveikio. A fazės atsiskyrimas iš dvigubųjų V₁/A/V₂ emulsijų, gamintų su IBT pH 6 ir pH 7, rodo, kad jos nesugebėtų tinkamai apsaugoti įkapsuliuotų junginių, priešingai nei emulsijos, kuriose pektinas sudarė kompleksą su IB.

3.2.3. Dvigubųjų V₁/A/V₂ emulsijų dalelių dydis

Emulsijų dalelių dydžio pasiskirstymo kreivės pateiktos 17 paveiksle, o vidutinis jų dalelių dydis – 16 paveiksle. Emulsijos E₇₋₀ vidutinis dalelių dydis buvo $58,22 \pm 0,22 \mu\text{m}$. Panašaus dydžio dalelės buvo ir emulsijose, kurių išorinėje fazėje buvo 0,2 % ir 0,3 % pektino, o IB tirpalo pH 6 ir 7. Tačiau priešingai nei pirmosios, šių emulsijų dalelės buvo labai skirtingo ir nepastovaus dydžio – sistema polidispersinė, matomi neryškūs pikai maždaug 300-700 μm zonoje (žr. 17 pav.). Tačiau padidinus pektino kiekį iki 0,4 %, abiejų emulsijų dalelės ženkliai sumažėjo iki $43,74 \pm 0,77 \mu\text{m}$ ir $37,85 \pm 0,13 \mu\text{m}$ atitinkamai, o didelių dalelių nebuvo nustatyta. Akivaizdu, kad pakankamas pektino kiekis leidžia suformuoti vienalytę, smulkiadispersinę emulsiją, o per mažas kiekis neapsaugo emulsijos dalelių nuo koalescencijos.



16 paveikslas. Vidutinis dvigubųjų vienasluoksnės ir dvisluoksnės V₁/A/V₂ emulsijų, paruoštų skirtingomis gamybos sąlygomis, dalelių dydis



17 paveikslas. Dvigubųjų vienasluoksnės ir dvisluoksnių $V_1/A/V_2$ emulsijų, paruoštų skirtingomis gamybos sąlygomis, dalelių dydžio pasiskirstymo kreivės.

Geriausi rezultatai, t. y., mažiausios dalelės, gauti tiriant emulsijas, paruoštas su pH 2 IBT. Visų emulsijų dalelių dydis svyravo nuo maždaug 30 iki 35 μm , visgi mažiausios ($30,85 \pm 0,07 \mu\text{m}$) dalelės buvo emulsijose, kurių pektino kiekis išorinėje fazėje buvo 0,3 % (E_{2-3}). Šiomis sąlygomis abu polimerai kompleksuoja tarpusavyje ir padengia rutulėlių paviršius, taip apsaugodami juos nuo koalescencijos.

Lutz et al. [42] savo tyrimuose naudojo panašios sudėties emulsijas (E_L) (žr. 8 lentelė), kuriose taip pat buvo tiriama IB ir pektino sąveikų įtaka emulsijų savybėms, priklausomai nuo V_2 pH (pH 2, pH 4, pH 6 ir pH 8). Pagrindinis skirtumas tarp Lutz ir šių tyrimų metu naudotų emulsijų – V_2 fazės inkorporavimas į emulsiją. Šių tyrimų metu emulsijos gamintos taikant „sluoksnis ant sluoksnio“ techniką, o Lutz polimerų tirpalus sumaišė prieš homogenizaciją, todėl visos sąveikos tarp polimerų įvyko dar prieš ją.

Emulsijų, gamintų su IBT, kurio pH 2, vidutinis dalelių dydis, praėjus 1 dienai po paruošimo, buvo $35 \pm 2 \mu\text{m}$, taigi labai panašus į mūsų tyrimo metu gautas emulsijas, taikant „sluoksnis ant sluoksnio“ techniką. Tačiau emulsijose, kurių V_2 fazės pH 6, susidarė net kelis kartus mažesnės dalelės, kurių dydis buvo apie $13 \pm 2 \mu\text{m}$. Lutz tai paaiškino tuo, kad šiuo atveju, nors abiejų polimerų ζ -potencialas yra neigiamas (žr. 6 lentelė), kompleksas vis tiek susidarė tarp aktyvių, teigiamai įkrautų IB sričių ir jonizuotų pektino karboksi- grupių. Dėl nedidelio ryšių kiekio, palyginus su kompleksu, susidariusiu prie pH 2, susiformavo maži agregatai, kurie galėjo tampriai padengti riebalų rutulėlius. O antruoju atveju, polimerai buvo stipriai ir priešingai įkrauti, todėl susidarė didelis, nelankstus kompleksas, kuris daug sunkiau adsorbavosi tarpfazėje.

8 lentelė. Šiame tyrime ir Lutz et al. [42] tyrime naudotų dvigubųjų emulsijų sudėties palyginimas

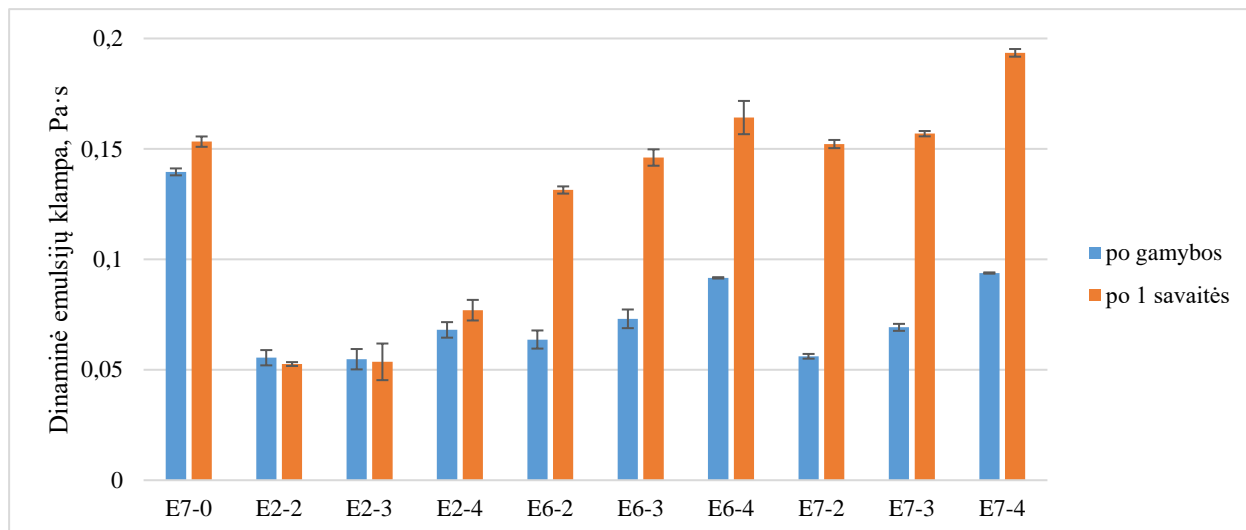
	V_2 fazė, %	Pektino kiekis emulsijoje, %	WPI kiekis emulsijoje, %	A fazė, %	V_1 fazė, %	PGPR kiekis emulsijoje, %
E_L	70,00	0,35	2,80	18,00	9,00	3,00
E_{2-3}	60,00	0,18	0,30	32,00	8,00	1,92

3.2.4. Dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų klampa

Vienasluoksnės emulsijos (E_{7-0}) dinaminė klampa iškart po gamybos, buvo ženkliai didesnė, nei dvisluoksninių emulsijų (žr. 18 pav.), tačiau praėjus savaitei padidėjo tik labai nežymiai. Lyginant emulsijas, gamintas su vienodo pH IBT, matoma, kad didėjant pektino kiekiui, dinaminė klampa taip pat didėja. Lyginant emulsijas su vienodu pektino kiekiu, matoma, kad dinaminė klampa didėja priklausomai nuo gamybai naudoto IBT pH: $\text{pH } 2 < \text{pH } 6 < \text{pH } 7$.

Praėjus savaitei po gamybos emulsijų, pagamintų su pH 2 IBT, klampa beveik nepakito arba padidėjo labai neženkliai (E_{2-4}). Kadangi šiomis sąlygomis pektinas ir IB turi priešingus krūvius (žr. 4.1.2 skyrius) ir gali kompleksuoti tarpusavyje, galima teigti, kad šiose emulsijose visas

pektinas buvo sunaudotas komplekso su IB sudarymui, todėl šių emulsijų klampa beveik nepakito. Kitų dvisluoksnių emulsijų klampa padidėjo vidutiniškai 2 kartus. Kadangi šiomis sąlygomis kompleksavimas tarp polimerų nevyksta arba yra silpnas, pektinas čia greičiausiai veikia kaip išorinės vandens fazės V_2 tirštiklis.

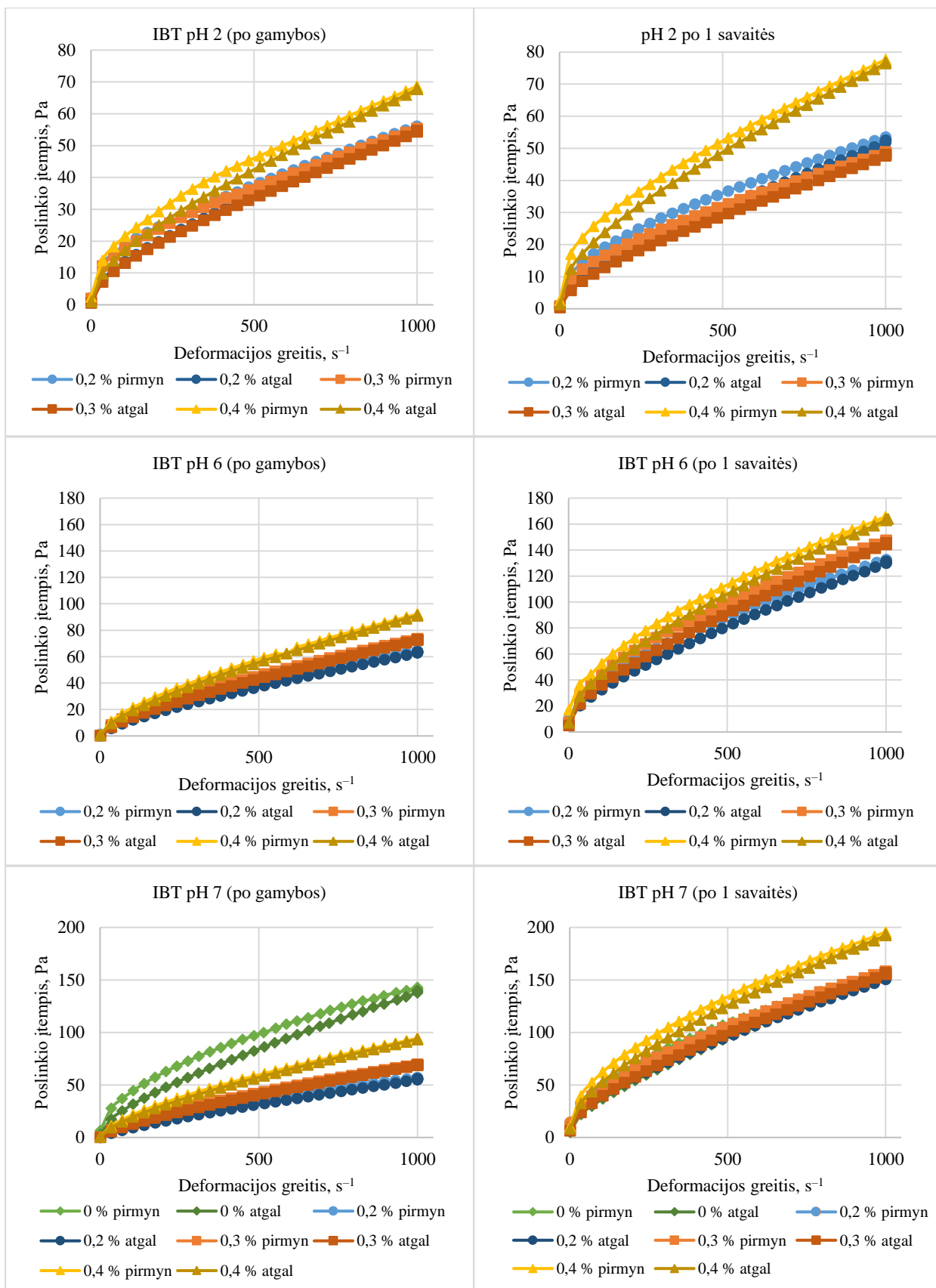


18 paveikslas. Dvigubųjų vienasluoksnės ir dvisluoksnių $V_1/A/V_2$ emulsijų, paruoštų skirtingomis gamybos sąlygomis, vidutinės dinaminės klamos priklausomybė nuo jų gamybai naudoto IBT pH ir PT koncentracijos, kai greičio gradientas $\gamma = 1000 \text{ s}^{-1}$

Siekiant įvertinti ir palyginti reologines vienasluoksnės ir dvisluoksnių dvigubųjų emulsijų savybes buvo sudarytos tekėjimo kreivės taikant jėgos dėsnį. Tai neniutoninius skysčius aprašyti skirta matematinė priklausomybė. Pagrindiniai šio dėsnio koeficientai – klamos konstanta K ir tekėjimo indeksas n – nurodyti 9 lentelėje, o tekėjimo kreivės – 19 paveiksle.

9 lentelė. Dvigubųjų vienasluoksnės ir dvisluoksnių $V_1/A/V_2$ emulsijų reologinių charakteristikų priklausomybė nuo jų gamybai naudoto IBT pH ir pektino kiekio V_2 fazėje

	Klamos konstanta (K), $\text{Pa} \cdot \text{s}^n$		Tekėjimo indeksas (n)	
	po gamybos	1 sav.	po gamybos	1 sav.
E₇₋₀	$3,45 \pm 0,12$	$5,23 \pm 0,26$	$0,52 \pm 0,002$	$0,48 \pm 0,001$
E₂₋₂	$1,33 \pm 0,28$	$0,79 \pm 0,08$	$0,54 \pm 0,018$	$0,61 \pm 0,012$
E₂₋₃	$1,14 \pm 0,39$	$0,67 \pm 0,18$	$0,56 \pm 0,034$	$0,62 \pm 0,024$
E₂₋₄	$1,53 \pm 0,26$	$1,94 \pm 0,54$	$0,55 \pm 0,014$	$0,53 \pm 0,030$
E₆₋₂	$0,59 \pm 0,26$	$5,46 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,056$	$0,45 \pm 0,001$
E₆₋₃	$0,49 \pm 0,13$	$4,73 \pm 0,50$	$0,73 \pm 0,028$	$0,49 \pm 0,011$
E₆₋₄	$0,76 \pm 0,02$	$7,33 \pm 0,29$	$0,70 \pm 0,003$	$0,34 \pm 0,006$
E₇₋₂	$0,24 \pm 0,01$	$7,42 \pm 0,42$	$0,79 \pm 0,005$	$0,42 \pm 0,006$
E₇₋₃	$0,35 \pm 0,03$	$5,40 \pm 0,11$	$0,77 \pm 0,008$	$0,47 \pm 0,012$
E₇₋₄	$0,69 \pm 0,01$	$7,37 \pm 0,10$	$0,71 \pm 0,002$	$0,46 \pm 0,0001$



19 paveikslas. Dvigubųjų dvisluoksnių $V_1/A/V_2$ emulsijų tekėjimo kreivių priklausomybė nuo jų gamybai naudoto IBT pH ir pektino kiekio V_2 fazėje (nurodytas legendoje).

Didžiausia klampos konstanta iškart po gamybos pasižymėjo kontrolinė emulsija E₇₋₀, kuri per savaitę padidėjo maždaug pusantro karto. Didžiausias klampos konstantos pokytis nustatytas dvisluoksnėse emulsijose, gamintose su IBT pH 6 ir pH 7. Per savaitę jų K padidėjo nuo 9 (E₆₋₂) iki 30 kartų (E₇₋₂). Šie rezultatai, kaip ir per savaitę padidėję poslinkio įtempiai (žr. 19 pav.) patvirtino ankstesnį teiginį, kad pektinas šiose emulsijose veikia kaip tirštiklis. Emulsijose E₂₋₂ ir E₂₋₃ K sumažėjo maždaug pusantro karto, o emulsijoje E₂₋₄ – truputį padidėjo nepakitusi.

Remiantis tekėjimo indeksais, kurie yra mažesni už 1, galima teigti, kad visos tirtos emulsijos yra neniutoniniai, pseudoplastiniai skysčiai. Per 1 savaitę vienasluoksnės kontrolinės emulsijos E₇₋₀ pseudoplastiškumas sumažėjo neženkliai, o dvisluoksnių emulsijų, gamintų su IBT pH 6 ir pH 7 – labai stipriai. Dvisluoksnių emulsijų, gamintų su IBT pH 2 ir turinčias 0,2 % ir 0,3 % pektino V₂ fazėje, pseudoplastiškumas neženkliai sumažėjo, emulsijos, kurios V₂ fazėje yra 0,4 % pektino, beveik nepakito. Tai dar kartą patvirtina, kad pastarosios emulsijos, kuriose IB ir pektinas sudaro kompleksą, pasižymi visiškai kitokiomis savybėmis, nei tos, kuriose pektinas veikia kaip tirštiklis.

Nagrinėjant emulsijų, gamintų su IBT pH 2, tekėjimo kreives iškart po gamybos, gautas didinant ir mažinant deformacijos greitį, galima pastebėti, kad joms būdinga nežymi histerezė, kuri per savaitę nepakito. Tai rodo, kad šių emulsijų struktūra bėgant laikui nekinta. Tačiau dvisluoksnių emulsijų, gamintų su IBT pH 6 ir pH 7, tekėjimo kreivėse iškart po gamybos histerezė nenustatyta.

O praėjus savaitei jau matomos nedidelės histerezės kilpos, kurios rodo, kad pektinas, kaip tirštiklis, suformavo tam tikrą emulsijų struktūrą, kuri šio tyrimo metu buvo suardyta. Kontrolinė vienasluoksnė emulsija E₇₋₀ per savaitę beveik nepakito (tekėjimo kreivės labai panašios), tačiau jos histerezės kilpa tiek iškart po gamybos, tiek praėjus 1 savaitei buvo pati ryškiausia, o tai rodo tam tikros struktūros susidarymą emulsijoje.

3.3. Laktazės įkapsuliavimo į dvigubą V₁/A/V₂ emulsiją galimybės tyrimas

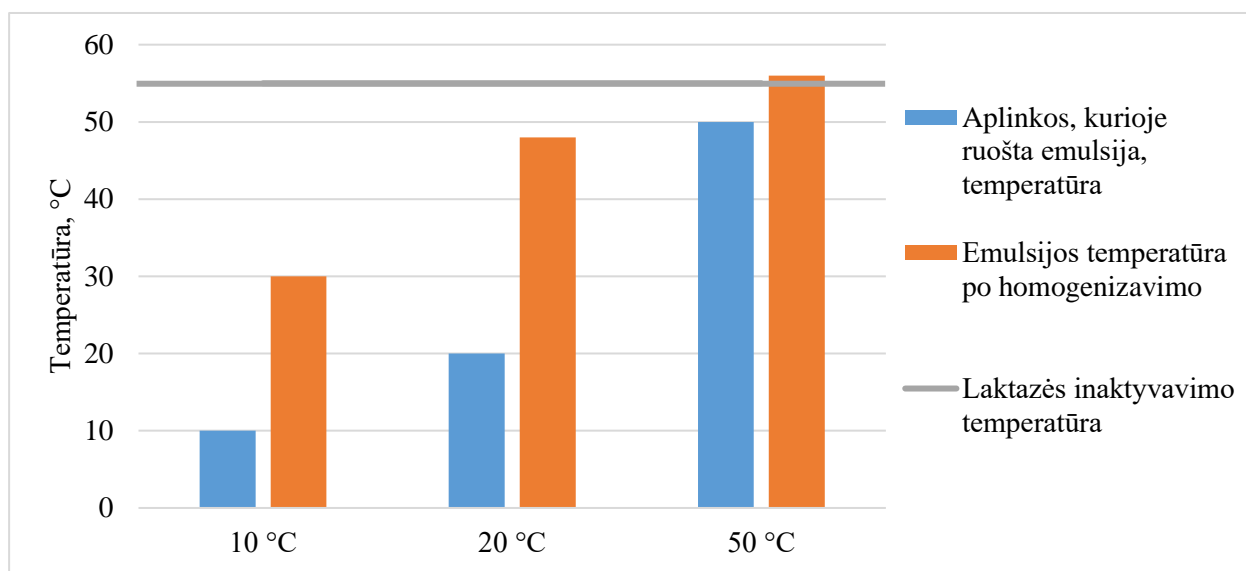
Emulsijų vidinėje V₁ fazėje buvo ištirpinta 18,7 % laktazės, tam kad dvigubojame emulsijoje ji sudarytų 1,5 % masės. Šių tyrimų metu naudota laktazė yra išgaunama iš atrinktų *Kluyveromyces lactis* mielių padermių. Tai – termolabilus fermentas, kuris savo aktyvumą praranda aukštesnėje nei 55 °C temperatūroje [60]. Todėl labai svarbu įvertinti, ar pirminės emulsijos gamybos metu, kai homogenizavimas vyksta 50 °C temperatūroje, fermentas nežūva. Parinkus tinkamas sąlygas, įvertintas laktazės įkapsuliavimo efektyvumą, kuris nustatytas dviem metodais – statiniu (pagal 2.6.7.1 skyriuje aprašytą metodiką) ir dinaminio (pagal 2.6.4 skyriuje aprašytą metodiką).

3.3.1. Laktazės terminis stabilumas

Šiame tyrime pirminė emulsija buvo gaminama remiantis Eisinaitė et al. [52] aprašyta metodika. Tačiau, reikia įvertinti, ar šio proceso metu naudojama aukšta temperatūra (50 °C) bei intensyvus ir ilgalaikis homogenizacijos procesas (15000 rpm, 15 min.), kuris taip pat gali padidinti emulsijos temperatūrą, nesunaikina fermento, kuris yra termolabilus. Homogenizavimo imitavimas atliktas trijose skirtingose temperatūrose:

- 10 °C vandens vonelėje, t. y., šaldant;
- Kambario temperatūroje (~20 °C);
- 50 °C vandens vonelėje, t. y., šildant.

Emulsijos temperatūra matuota iškart po homogenizavimo. Nustatyta, kad homogenizavimas pirmųjų emulsijų temperatūrą padidino daugiau nei 2 kartus, o trečiosios emulsijos temperatūra pakilo 6 laipsniais (žr. 20 pav.) ir pasiekė fermento inaktyvavimo temperatūrą.

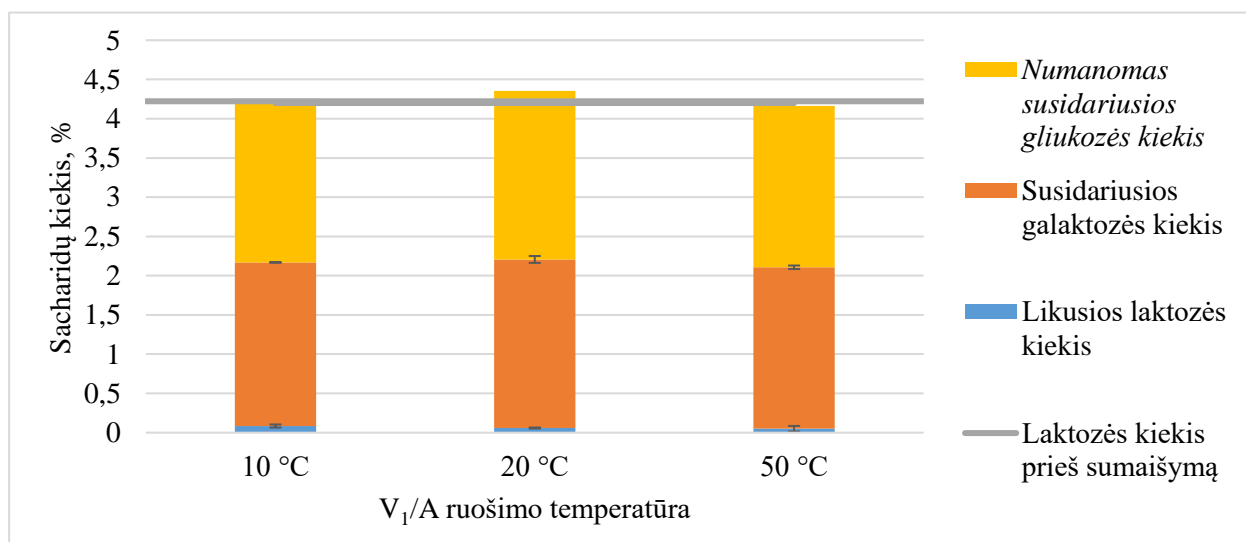


20 paveikslas. Skirtingose temperatūrose homogenizuotų pirminių emulsijų temperatūra po homogenizavimo.

Po homogenizavimo emulsijos buvo paliktos kambario temperatūroje 1 valandą, kad atvėstų ir tada jos buvo centrifuguojamos. Atsiskyrusi vandeninė fazė buvo sumaišyta su 5 % laktozės tirpalu ir 1 valandą inkubuota 37 °C temperatūroje. Tada fermentiniu būdu buvo nustatytas mišinyje likęs laktozės ir susidariusios galaktozės kiekis, kurie nurodyti 21 paveiksle.

Emulsijoje, ruoštoje 10 °C temperatūroje susidarė $2,08 \pm 0,0004$ %, ruoštoje 20 °C temperatūroje – $2,15 \pm 0,04$ %, o ruoštoje 50 °C temperatūroje – $2,06 \pm 0,02$ galaktozės. Laktozės kiekis visais atvejais nesiekė net 0,1 %, todėl į jį galima neatsižvelgti. Kadangi laktozė virškinimo

metu skyla į du monosacharidus – gliukozę ir galaktozę – kurie susidaro vienodais kiekiais, tai reiškia, kad visuose mišiniuose susidarė vienodas gliukozės ir galaktozės kiekis, kurių suma yra labai artima mišiniuose buvusios laktozės kiekiui (4,2 %). Šie rezultatai rodo, kad buvo suskaldyta beveik visa mišiniuose buvusi laktozė. Taigi, nustatyta, kad laktazė visais atvejais išliko aktyvi ir nedematūravo V_1/A gamybos metu net esant pakankamai aukštai temperatūrai bei intensyviai mechaniniam poveikiui.



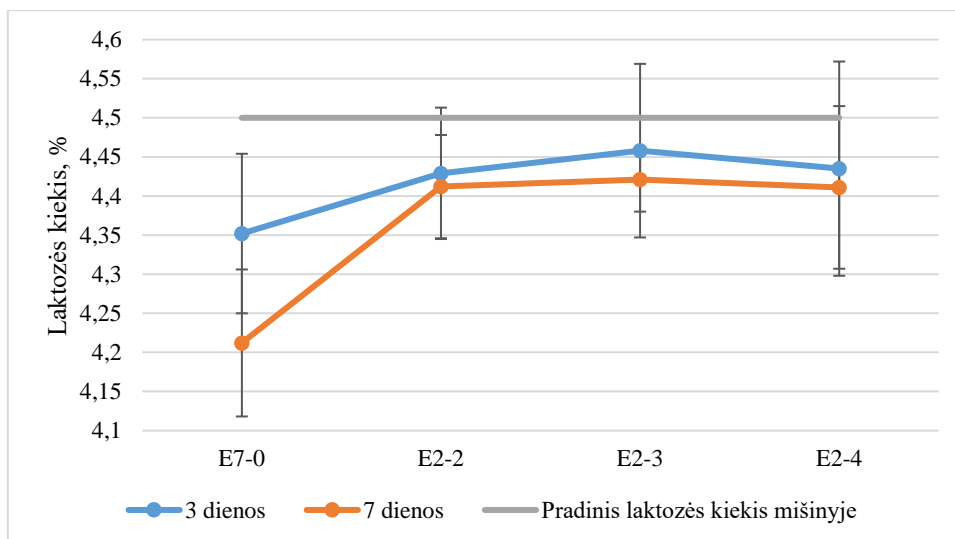
21 paveikslas. Laktozės ir galaktozės kiekiai pirminių V_1/A emulsijų V_1 fazės ir laktozės tirpalo mišiniuose, priklausomai nuo jų ruošimo temperatūros.

Kadangi ruošiant pirminę emulsiją 50 °C temperatūroje laktazė išlieka aktyvi, dvigubųjų emulsijų gamybai su laktaze bus naudojamos šios sąlygos.

3.3.2. *Laktazės įkapsuliavimo į dvigubąją $V_1/A/V_2$ emulsiją efektyvumas statinėmis sąlygomis*

Emulsijos buvo sumaišytos su 5 % laktozės tirpalu, santykiu – 1:10 (santykiai ir koncentracijos parinkti taip, kad būtų kuo artimesni pienui). Šie mišiniai laikyti šaldytuve 1 savaitę. Siekta įvertinti, kaip kinta laktozės kiekis tokiame mišinyje – jei jis mažėtų, tai reikštų, kad laktazė atsipalaiduoja iš emulsijos, priešingu atveju – kad laktazė yra tinkamai įkapsuliuota emulsijoje. Laktozės kiekis mišiniuose nustatytas fermentiniu laktozės kiekio nustatymo metodu praėjus 3 ir 7 dienoms nuo sumaišymo.

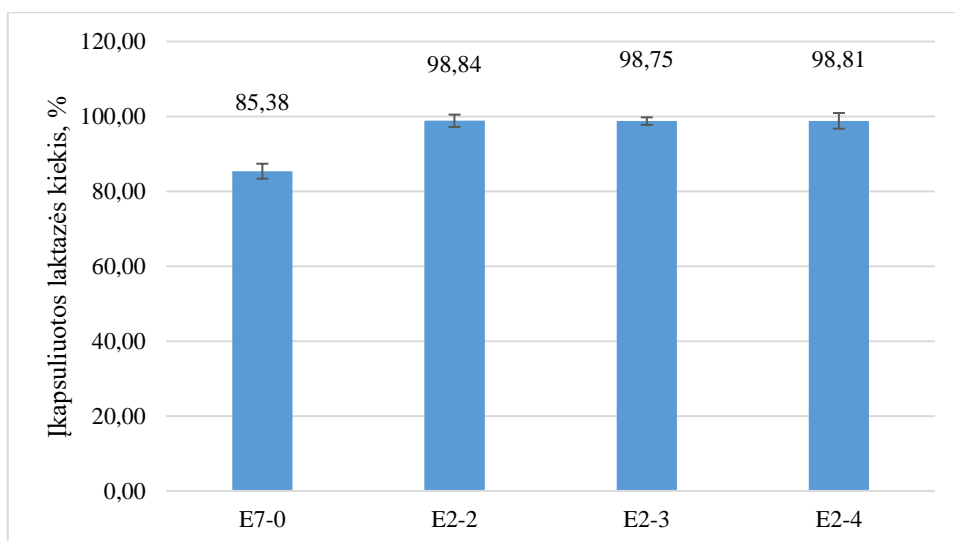
Nustatyta, kad mišiniuose su dvisluoksnėmis emulsijomis E_{2-2} , E_{2-3} ir E_{2-4} , kurios tarpusavyje skyrėsi pektino kiekiu išorinėje fazėje, laktozės kiekis svyravo labai nestipriai (žr. 22 pav.). Jis nežymiai sumažėjo, tačiau visais atvejais šis pokytis buvo mažesnis nei 0,1 %. Laktozės tirpalo ir kontrolinės vienasluoksnės E_{7-0} emulsijos mišinyje nustatytas didesnis laktozės kiekio pokytis – po 3 dienų jis sumažėjo iki $4,35 \pm 0,10$ %, o praėjus 7 dienoms – iki $4,21 \pm 0,09$ %.



22 paveikslas. Laktazės kiekio kitimas laktazės tirpalo ir dvigubųjų vienasluoksnių ir dvisluoksnių $V_1/A/V_2$ emulsijų mišiniuose, laikant juos šaldytuve 1 savaitę.

3.3.3. Laktazės įkapsuliavimo į dvigubąją $V_1/A/V_2$ emulsiją efektyvumas dinaminėmis sąlygomis

Laktazės įkapsuliavimo efektyvumas dinaminėmis sąlygomis nustatytas centrifuguojant emulsiją ir nustatant laktazės kiekį atsiskyrusioje prafiltruotoje vandeninėje fazėje. Neįkapsuliuotos laktazės kiekis filtrate nustatytas pagal kalibracinę kreivę, sudarytą pagal absorbciją, gautą vietoj filtrato naudojant žinomos koncentracijos laktazės tirpalus. Pagal tai, apskaičiuotas laktazės įkapsuliavimo efektyvumas dvisluoksnėse emulsijose E_{2-2} , E_{2-3} ir E_{2-4} buvo apie 98,8 %, o kontrolinėje vienasluoksnėje emulsijoje E_{7-0} – 85,38 % (žr. 23 pav.).



23 paveikslas. Įkapsuliuotos laktazės kiekis dvigubųjų vienasluoksnės ir dvisluoksnių $V_1/A/V_2$ emulsijų V_1 fazėje

Abiejų tyrimų metu, gauti analogiški rezultatai rodo, kad dvisluoksnės emulsijos, kurių išorinėje V_2 fazėje yra pektino, daug geriau apsaugo laktazę tiek statinėmis, tiek dinaminėmis sąlygomis, dėl aplink riebalų rutulėlius, kuriuose yra paskirstyta V_1 fazė su laktaze, suformuoto IB ir pektino komplekso. Vienasluoksnė emulsija E_{7-0} nesugeba taip efektyviai išlaikyti laktazės dvigubosios emulsijos vidinėje vandens fazėje. IB suformuoja silpnesnį apsauginį sluoksnį aplink riebalų rutulėlius, dėl to įkapsuliuojama apie 13 % mažiau laktazės, o statinėmis sąlygomis fermentas gali migruoti į išorinę V_2 fazę. Silpnesnį šio emulsiklio efektyvumą patvirtina ir 3.2.2 skyriuje aprašytas prastesnis šios emulsijos gravitacinis stabilumas, palyginus su dvisluoksnėmis emulsijomis.

3.4. Dvigubosios $V_1/A/V_2$ emulsijos virškinamumo ir fermento aktyvumo įvertinimas *in vitro* virškinimo metu

Atsižvelgiant į visų ankstesnių tyrimų rezultatus, tolimesniems tyrimams buvo išrinkta dvisluoksnė E_{2-3} emulsija, kuri pasižymėjo geriausiu gravitaciniu stabilumu (atsparumu išsisluoksniavimui), mažiausiomis ir stabilaus dydžio dalelėmis, mažiausia ir pastovia klampa bei labai geru laktazės įkapsuliavimu.

Norint panaudoti šią emulsiją realiuose maisto produktuose reikia nustatyti:

- 1) ar virškinimo metu ji pilnai suyra;
- 2) ar virškinimo plonosiose žarnose metu atsipalaiduoja laktazė;
- 3) ar laktazė išlaiko savo aktyvumą ir skaldo laktozę.

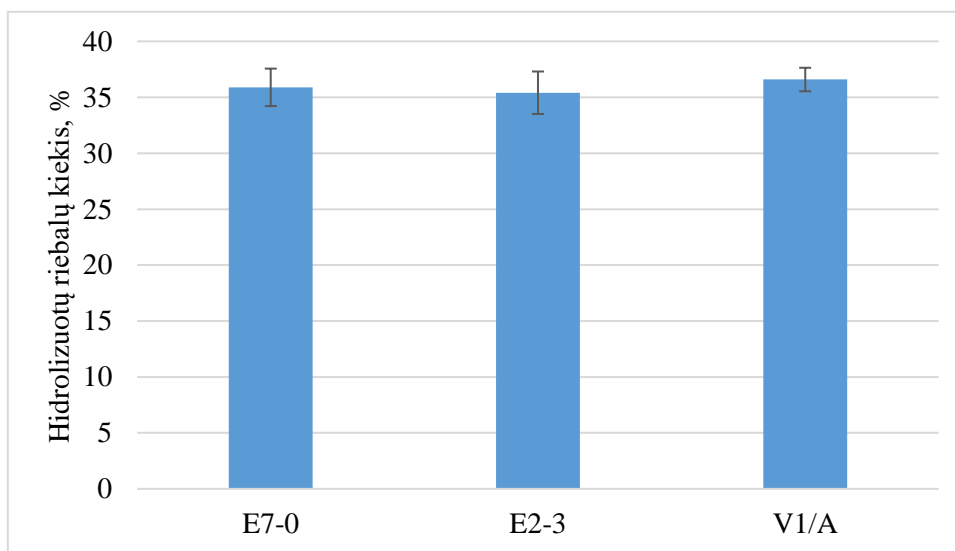
Norint atsakyti į pirmąjį klausimą buvo imituojamas dvigubosios emulsijos E_{2-3} virškinimas skrandyje ir žarnyne ir pirminės emulsijos V_1/A virškinimas žarnyne *in vitro* sąlygomis bei nustatomas atsipalaidavusių laisvų riebalų rūgščių (LRR) kiekis. Laktazės atpalaidavimui ir aktyvumui nustatyti emulsija E_{2-3} buvo sumaišyta su įvairiais tirpalais (atstatytu pienu, 5 % laktozės tirpalu ir 5 mM ONPG tirpalu) ir tada buvo imituojamas jų virškinimas analogiškomis sąlygomis. Po virškinimo buvo nustatomas likusios laktozės kiekis mišiniuose. Kaip kontrolė naudota vienasluoksnė emulsija E_{7-0} .

3.4.1. Dvigubųjų $V_1/A/V_2$ emulsijų virškinamumas

Emulsijos virškinamumą galima įvertinti pagal jos riebalų hidrolizės laipsnį, kuris apskaičiuojamas pagal NaOH kiekį, sunaudotą neutralizuoti hidrolizės metu susidariusioms laisvoms riebalų rūgštims.

Virškinant pirminę emulsiją nustatyta, kad per dvi valandas yra suvirškinama $36,59 \pm 1,05$ g riebalų (žr. 24 pav.). Dvigubosios emulsijos yra virškinamos tam, kad nustatyti, kokią įtaką jų virškinamumui daro papildomas V_2 sluoksnis ir IB ar pektino kompleksas su IB. Nustatyta, kad,

imituojant emulsijos E₇₋₀ virškinimą skrandyje ir žarnyne, buvo suhidrolizuota $35,89 \pm 1,67$ g riebalų. Virškinant emulsiją E₂₋₃, kurios išorinėje fazėje aplink riebalų rutulėlius yra susidaręs pektino ir IB kompleksas, taip pat gauti labai panašūs rezultatai – identiškomis sąlygomis buvo suvirškinta $35,41 \pm 1,89$ g riebalų. Šie rezultatai yra labai panašūs į gautus, virškinant tik pirminę emulsiją, todėl galima teigti, kad virškinimo skrandyje metu pepsinas suvirškina tiek IB tiek IB ir pektino komplekso apsauginį sluoksnį, atsipalaiduojant riebalų rutulėliams, prie kurių lengvai gali prieiti lipazė virškinimo žarnyne metu.



24 paveikslas. Dvigubųjų vienasluoksnės ir dvisluoksnės bei pirminės emulsijų riebalų hidrolizė *in vitro* virškinimo metu.

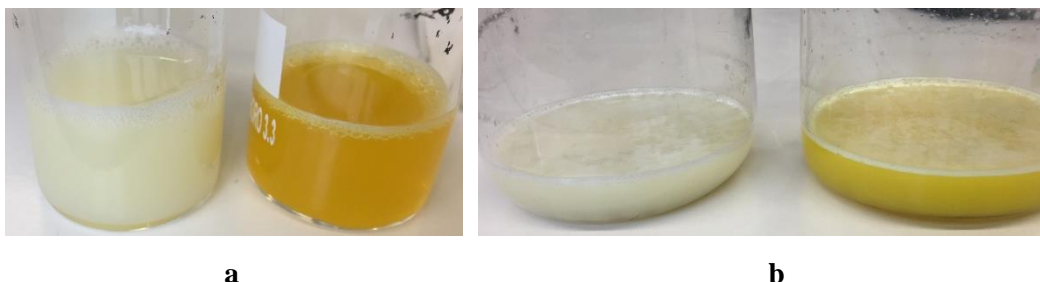
Taigi, pektino panaudojimas dvigubosios emulsijos gamyboje ženkliai padidina jos stabilumą statinėmis sąlygomis, tačiau netrukdo jos virškinimui, o tai labai svarbu tinkamam laktazės atpalaidavimui.

3.4.2. Laktazės atpalaidavimas iš dvigubųjų V_{1/A}/V₂ emulsijų *in vitro* virškinimo metu

Laktazės atpalaidavimas iš emulsijos virškinimo metu nustatomas sumaišant dvigubą emulsiją su:

- 5 mM ONPG tirpalu (γ) – pagal tirpalo spalvos ir absorbcijos pokytį nustatoma, ar virškinimo metu atsipalaiduoja laktazė;
- 5 % laktozės tirpalu (β) – nustatomas atsipalaidavusios laktazės aktyvumas pagal suvirškintos laktozės kiekį;
- atstatytu pienu (10 % lieso pieno miltelių tirpalas) (α) – nustatant, ar pieno komponentai netrukdo emulsijos virškinimui.

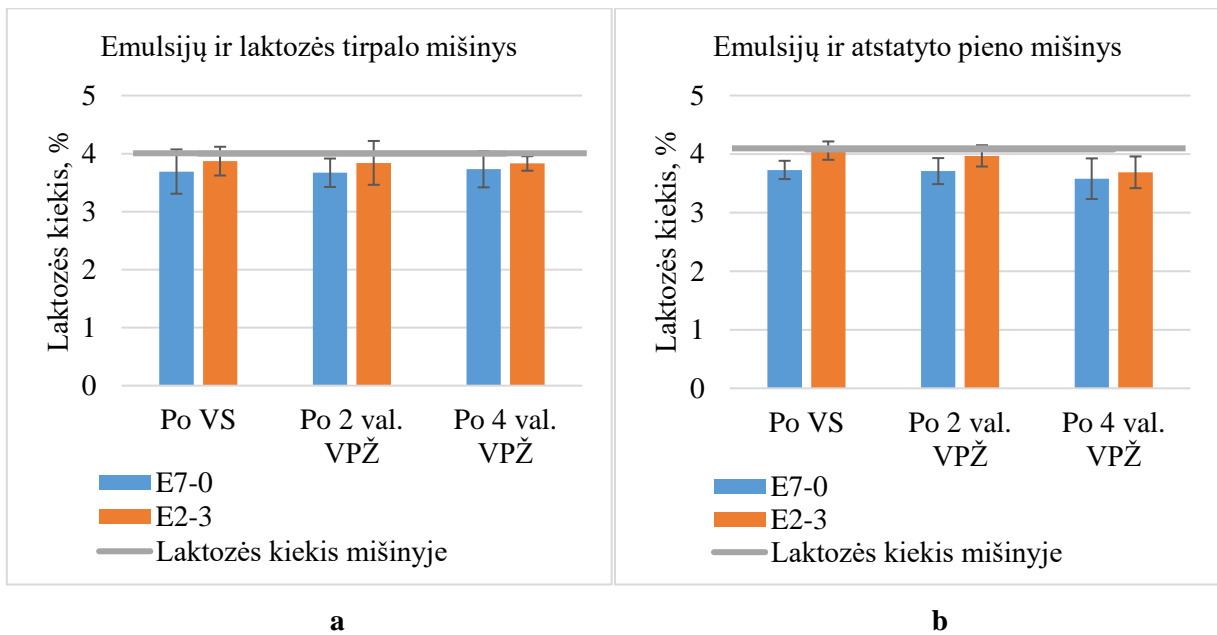
Pirmojo tyrimo metu buvo nustatyta, kad, praėjus 2 valandoms nuo virškinimo plonajame žarnyne pradžios, laktazė atsipalaidavo tik iš emulsijos E₇₋₀, nes virškinimas mišinys vos prasidėjęs virškinimui plonajame žarnyne nusidažė ryškiai geltona spalva, būdinga atsipalaidavusiam orto-nitrofenoliui (ONP). Mišinys su emulsija E₂₋₃ išliko žymiai šviesesnis, tai rodo, kad laktazė nebuvo atpalaiduota ir neskaldė ONPG (žr. 25 pav.). Todėl buvo nuspręsta pratęsti virškinimą plonajame žarnyne iki 4 valandų, tačiau ir po jų nebuvo pastebėta pakitimų, t. y., mišinys su emulsija E₂₋₃ nepakeitė savo spalvos.



25 paveikslas. Dvigubųjų emulsijų E₇₋₀ ir E₂₋₃ ONPG tirpale virškinimas *in vitro* sąlygomis. Virškinimo plonajame žarnyne trukmė: a) 2 val., b) 4 val. Abiem atvejais kairėje pusėje – E₂₋₃, dešinėje – E₇₋₀.

Analogiški tyrimai atlikti vietoj ONPG tirpalo naudojant laktozės tirpalą ir atstatytą pieną. Laktozės kiekis mišiniuose nustatytas 3 kartus: po VS ir praėjus 2 ir 4 valandoms nuo virškinimo plonajame žarnyne pradžios. Tyrimo rezultatai pateikti 26 paveiksle. Nustatyta, kad laktozės kiekis mišiniuose su emulsija E₂₋₃ viso virškinimo proceso metu pakito labai nežymiai, taip pat, nebuvo nustatytas tolygus laktozės kiekio mažėjimas vykstant virškinimui plonajame žarnyne, ko būtų galima tikėtis, jei iš emulsijos atsipalaiduotų laktazė. Tokia pati tendencija gauta laktozės tirpalo ir atstatyto pieno mišiniuose su kontroline vienasluoksne emulsija E₇₋₀ – viso virškinimo proceso metu nenustatytas žymus laktozės kiekio sumažėjimas.

Tačiau abiem atvejais, laktozės kiekis mišiniuose su vienasluoksne emulsija E₇₋₀ buvo mažesnis, nei mišiniuose su dvisluoksne emulsija E₂₋₃. Tai galima paaiškinti ankstesnių tyrimų rezultatais. Emulsija E₇₋₀ pasižymėjo prastesniu laktazės įkapsuliavimu, o tai reiškia, kad dalis laktazės galėjo pereiti į išorinę V₂ emulsijos fazę. Būtent ši laktazė galėjo sureaguoti su ONPG, susidarant galaktozei ir geltonam ONP. Kadangi laktazė jau buvo išorinėje fazėje, reakcija greičiausiai įvyko dar prieš virškinimo pradžią, tačiau rūgštinėje skrandžio aplinkoje ONP yra bespalvis. Šios emulsijos mišiniuose su laktozės tirpalu ir pienu, išorinėje fazėje esanti laktazė taip pat galėjo suvirškinti nedidelį kiekį laktozės sumaišymo metu, nes, kaip minėta anksčiau, virškinimo metu nenustatytas žymus laktozės kiekio kitimas.



26 paveikslas. Laktozės kiekio kitimas dvigubųjų emulsijų E₇₋₀ ir E₂₋₃ mišiniuose su a) 5% laktozės tirpale b) atstatytame piene, *in vitro* virškinimo metu.

Siekiant nustatyti, ar laktazės neatsipalaidavimui iš dvigubosios emulsijos įtakos turėjo V₂ fazė ir joje esantys biopolimerai, buvo pakartotas pirminės emulsijos V₁/A virškinimo imitavimas plonosiose žarnose ir nustatytas laktozės/galaktozės kiekis gautame mišinyje. Tačiau ir jame nebuvo nustatytas galaktozės kiekio padidėjimas, kas leistų spręsti apie laktazės atsipalaidavimą. Laktozės kiekis taip pat išliko nepakitęs. Todėl neigiamos biopolimerų įtakos fermento atsipalaidavimui ir aktyvumui galimybė buvo atmesta.

Literatūroje yra aprašytas panašus eksperimentas, kuriame dviguboji emulsija su įkapsuliuota laktaze buvo sumaišyta su 5 % laktozės tirpalu ir imituotas šio mišinio virškinimas [26]. Šio tyrimo metu buvo naudojama dviguboji emulsija E_A, kurios sudėtis nurodyta 10 lentelėje. Šio tyrimo metu, laktazė iš emulsijos atsipalaidavo ir suvirškino 1,17 g laktozės iš 4,45 g buvusių mišinyje. Atsižvelgiant į tai, kad emulsijoje E₂₋₃ laktazės buvo beveik 2 kartus daugiau nei emulsijoje E_A, laktozės kiekis turėjo sumažėti ir mišiniuose su E₂₋₃, tačiau taip neįvyko.

10 lentelė. Šiame tyrime ir Ahn et al. [26] tyrime naudotų dvigubųjų emulsijų sudėtis palyginimas

	V ₂ fazė, %	A fazė, %	V ₁ fazė, %	PGPR kiekis emulsijoje, %	Laktazės kiekis, %
E _A	83	16,15	0,85	0,75	0,85
E ₂₋₃	60	32	8	1,92	1,5

Tai, kad laktazė nebuvo atpalaiduota iš emulsijos E₂₋₃ galima paaiškinti nebent laktazės, kaip baltymo, kompleksavimu su PGPR. Dickinson [61] teigia, kad net ir nedidelės baltymų koncentracijos V₁ fazėje padeda padidinti emulsijų stabilumą. Tai greičiausiai lemia kompleksas,

susidaręs tarp baltymo ir lipofilinio emulsiklio, kuris suformuoja klampiai elastingą tarpsluoksnį, apsaugantį lašelius nuo koalescencijos. Nustatyta, kad vidinėje fazėje ištirpinus 0,5 % natrio kazeinato, galima sumažinti PGPR kiekį nuo 8 % iki 2 %, gaunant tokio pačio stabilumo ir išeigos emulsiją.

Laktazė taip pat yra baltymas, turintis aktyvių centrų, galinčių kompleksuoti su PGPR. Emulsijoje E₂₋₃ PGPR kiekis yra maždaug 2,5 karto didesnis nei emulsijoje E_A, o laktazės ir PGPR santykis šiose emulsijose atitinkamai yra 1:1,03 ir 1:0,88. Taigi, yra tikimybė, kad emulsijoje E₂₋₃ visa laktazė sukomplesavo su PGPR, o emulsijoje E_A galėjo sukomplesuoti tik dalis laktazės, nes jos ten buvo santykinai daugiau nei PGPR, taigi laisva laktazė virškinimo metu atsipalaidavo.

IŠVADOS

1. Vizualiai įvertinus skirtingų koncentracijų išrūgų baltymų ir pektino tirpalų mišinių fazių būseną ir pamatavus jų ζ -potencialą, keičiant išrūgų baltymo tirpalo pH ribose 2 – 7, nustatyta, kad geriausiai elektrostatinė sąveika tarp šių biopolimerų įvyksta, kai išrūgų baltymų tirpalo pH 2.
2. Nustatyta, kad didžiausiu stabilumu statinėmis sąlygomis pasižymėjo dvisluoksnės dvigubosios $V_1/A/V_2$ emulsijos, pagamintos naudojant „sluoksnis ant sluoksnio“ metodą, kurio esmė – neigiamai įkrautų hidrofilinių išrūgų baltymų elektrostatinė sąveika su teigiamai įkrautu pektinu tarpfazyje A/V_2 , kai išrūgų baltymų tirpalo pH 2. Šios emulsijos pasižymėjo didžiausiu gravitaciniu stabilumu, mažiausiu dalelių dydžiu ir mažiausia klampa, lyginant su vienasluoksnėmis $V_1/A/V_2$ emulsijomis, kurių V_2 fazė buvo sutirštinta pektinu, nesąveikaujančiu su tarpfazyje A/V_2 esančiais išrūgų baltymais, naudojant pH 6 ir pH 7 išrūgų baltymų tirpalus.
3. Nustatyta, kad taikant dvisluoksnių dvigubųjų emulsijų gamybos „sluoksnis ant sluoksnio“ metodą, β -galaktozidazės įkapsuliuojimo į šių emulsijų vidinę vandens fazę V_1 efektyvumas - 99 %. Nustatyta, kad mechaniniai ir terminiai procesai, naudojami gaminant emulsijas, neturi įtakos β -galaktozidazės aktyvumui.
4. Palyginus dvisluoksnių ir vienasluoksnių $V_1/A/V_2$ emulsijų virškinamumą plonosiose žarnose *in vitro* sąlygomis, nustatyta, kad tarpfazyje A/V_2 suformuotas išrūgų baltymų ir pektino sluoksnis nesulėtino virškinimo metu susidariusių laisvųjų riebalų rūgščių atpalaidavimo iš emulsijų.
5. Atlikus dvisluoksnių ir vienasluoksnių $V_1/A/V_2$ emulsijų virškinimą plonosiose žarnose *in vitro* sąlygomis, nenustatytas į šių emulsijų vidinę vandens fazę V_1 įkapsuliuotos β -galaktozidazės atpalaidavimas iš emulsijų. Tai greičiausiai lėmė tarp hidrofobinio emulsiklio PGPR ir β -galaktozidazės susiformavęs kompleksas pirminės emulsijos V_1/A tarpfazyje.
6. Šio tyrimo metu pagamintos vienasluoksnės ir dvisluoksnės dvigubosios $V_1/A/V_2$ emulsijos gali būti sėkmingai naudojamos β -galaktozidazės įkapsuliuojimui, tačiau šios sistemos negali būti taikomos laktozės netoleruojantiems žmonėms skirtų pieno produktų gamyboje.

BIBLIOGRAFINIŲ NUORODŲ SĄRAŠAS

1. KORHONEN, H. J. Bioactive Components in Bovine Milk. In *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Wiley–Blackwell, 2009, pp. 43–81. ISBN 978–0–8138–1982–2
2. VISIOLI, F. and A. STRATA. Milk, Dairy Products, and Their Functional Effects in Humans: A Narrative Review of Recent Evidence. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 2014, 5, 131–143.
3. <http://chemistry.gravitywaves.com/CHEMXL153/RegulationofGeneExpression.htm>
4. GUDMAND–HØYER, E. and H. SKOVBJERG. Disaccharide digestion and maldigestion. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1996, 216, 111–121.
5. FOX, P. F. Lactose: Chemistry and Properties. In *Advanced Dairy Chemistry (Volume 3): Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*. Springer, 2009, pp. 1–15. ISBN: 978–0–387–84864–8.
6. PARK, Y.W. Bioactive Components in Goat Milk. In *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Wiley–Blackwell, 2009, pp. 15–42. ISBN 978–0–8138–1982–2.
7. NEWBURG, D. S. and S. H. NEUBAUER. Carbohydrates in Milks: Analysis, Quantities, and Significance. *Handbook of Milk Composition*. Academic Press, 1995, pp. 273–349. ISBN 0–12–384430–4.
8. BROWN–ESTERS, O., P. McNAMARA and D. SAVAIANO. Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. *International Dairy Journal*. 2012, 22, 98–103.
9. LEONARDI, M. et al. The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence. *International Dairy Journal*. 2012, 22, 88–97.
10. ITAN, Y. et al. A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. *BMC Evolutionary Biology*. 2010, 10(36), 1–11.
11. <https://www.quora.com/India-How-prevalent-is-the-lactose-tolerance-gene-in-India>
(žiūrėta: 2017–03–20)
12. WILSON, J. Milk Intolerance: Lactose Intolerance and Cow’s Milk Protein Allergy. *Newborn and Infant Nursing Reviews*. 2005, 5, 203–207.
13. FLATZ, G. Genetics of lactose digestion in humans. *Advances in human genetics*. Plenum Press. 1987, 16, 1–77.
14. VESA, T. H., P. MARTEAU and R. KORPELA. Lactose Intolerance. *The Journal of the American College of Nutrition*. 2000, 19, 165–175.
15. JÄRVELÄ, I. et al. Assignment of the locus for congenital lactase deficiency to 2q21, in the vicinity of but separate from the lactase–phlorizin hydrolase gene. *The American Journal of Human Genetics*. 1998, 63, 1078–1085.

16. KUOKKANEN, M. et al. Mutations in the translated region of the lactase gene (LCT) underlie congenital lactase deficiency. *The American Journal of Human Genetics*. 2006, 78, 339–344.
17. HOSKOVA, A. et al. Severe lactose intolerance with lactosuria and vomiting. *Archives of Disease in Childhood*. 1980, 55, 304–316.
18. INGRAM, C. J. E. et al. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human Genetics*. 2009, **124**(6), 579–591.
19. KALIBATIENĖ, D. *Intestinės enzimopatijos*, Vilniaus Universiteto Leidykla, 2014. ISBN 978–609–459–321–5.
20. PATERSON, A. H. J. Production and Uses of Lactose. In *Advanced Dairy Chemistry (Volume 3): Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*. Springer, 2009, pp. 105–120. ISBN: 978–0–387–84864–8.
21. KIES, A. K. Authorised EU health claims related to the management of lactose intolerance: reduced lactose content, dietary lactase supplements and live yoghurt cultures. In *Foods, Nutrients and Food Ingredients with Authorised EU Health Claims*. Woodhead Publishing Limited, 2014, pp. 177–211.
22. HERTZLER, S. et al. Nutrient Considerations in Lactose Intolerance. In *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease, Third Edition*. Elsevier Inc., 2013, pp. 757–772. ISBN–13: 978–0123918840.
23. MCSWEENEY, P. L. H. and P. F. FOX, Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate. In *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1. General Aspects*, 2004, 2, 361–371. ISBN: 0–1226–3652–X.
24. Chapter 3: Lactose content of milk and milk products (Review Article). *American Journal of Clinical Nutrition*. 1988, **48**(4), 1099 – 1104.
25. HARJU, M., H. KALLIOINEN and O. TOSSAVAINEN. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*. 2012, 22, 104–109.
26. AHN, S. I., Y. K. LEE and H. S. KWAK. Optimization of water–in–oil–in–water microencapsulated β –galactosidase by response surface methodology. *Journal of Microencapsulation*. 2013, **30**(5), 460–469.
27. PANESAR, P., S. KUMARI and R. PANESAR. Potential Applications of Immobilized β –Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme Research*, 2010, straipsnio ID 473137, p. 1–16.

28. MESSIA, M.C., T. CANDIGLIOTA and E. MARCONI. Assessment of quality and technological characterization of lactose-hydrolyzed milk. *Food Chemistry*. 2007, **104**(3), p. 910-917.
29. ADHIKARI, K., L. M. DOOLEY, E. CHAMBERS, N. BHUMIRATANA. Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in the United States. *LWT – Food Science and Technology*. 2010, 43, 113–118.
30. TOSSAVAINEN, O., and H. KALLIOINEN. Effect of lactose hydrolysis on furosine and available lysine in UHT skim milk. *Milchwissenschaft*. 2008, **63**(1), 22–26.
31. HELMUT, F. E. and V. SOMOZA, Forty years of furosine – Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. In *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007, 51, 423–430.
32. NAGARAJ, M. et al. Standardization of different levels of lactose hydrolysis in the preparation of lactose hydrolyzed yoghurt. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*. 2009; **10**(2), 132–136.
33. KÁRNYÁ CZKI, Zs. And J. CSANÁDI. Texture profile properties, sensory evaluation, and susceptibility to syneresis of yoghurt prepared from lactose-free milk. *Acta Alimentaria: An International Journal of Food Science*. 2016, **46**(1), p. 1–8.
34. <http://www.verdin.lt/verdin/enzymixx/> (žiūrėta: 2017–03–05)
35. https://www.vaistine.lt/Lactosolv_kapsules_N30/CatalogStoreDetail.aspx?ID=353060 (žiūrėta: 2017–03–05)
36. SOLOMON, N. A. A lactase formulation. Patent WO 2008/127777 A1. Filled on 14 February, 2008, and issued on 23 October, 2008.
37. ZHANG, Z., R. ZHANG and D. J. McCLEMENTS. Lactase (b-galactosidase) encapsulation in hydrogel beads with controlled internal pH microenvironments: Impact of bead characteristics on enzyme activity. *Food Hydrocolloids*. 2017, 67, 85–93.
38. <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/immethd.html> (žiūrėta: 2017–03–11)
39. ENGELEN, L. et al. Relating particles and texture perception. *Physiology & Behavior*. 2005, **86**(1–2), 111–117.
40. NUSSINOVITCH, A. et al. Delivery of lactase using chocolate-coated agarose carriers. *Food Research International*. 2012, 46, 41–45.
41. PAYS, K. et al. Double emulsions: how does release occur? *Journal of Controlled Release*. 2002, 79, 193–205.
42. LUTZ, R. et al. Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009, 72, 121–127.
43. <https://www.slideshare.net/mariahanif31/emulsion-42971230> (žiūrėta: 2017–03–15)

44. MOHAMMADI, A. et al. Nano-encapsulation of olive leaf phenolic compounds through WPC-pectin complexes and evaluating their release rate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, 82, 816–822.
45. GIROUX, H. J. et al. Cheese fortification using water-in-oil-in-water double emulsions as carrier for water soluble nutrients. *International Dairy Journal*. 2013, 29, 107–114.
46. MOHAMMADI, A. et al. Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chemistry*. 2016, 190, 513–519.
47. BENICHO, A., A. ASERIN and N. GARTI. Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2004, 108–109, 29–41.
48. GARTI, N. Progress in Stabilization and Transport Phenomena of Double Emulsions in Food Applications. *LWT – Food Science and Technology*. 1997, **30**(3), 222–235.
49. BENICHO, A., A. ASERIN and N. GARTI. W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007, 294, 20–32.
50. PIMENTEL-GONZÁLEZ, D.J et al. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*. 2009, 42, 292–297.
51. MUTALIYEVA, B. et al., Microencapsulation of insulin and its release using W/O/W double emulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2016 (Article in press).
52. EISINAITE, V., D. JURAITE, K. SCHROËN and D. LESKAUSKAITE. Preparation of stable food-grade double emulsions with a hybrid premix membrane emulsification system. *Food Chemistry*. 2016, 206, 59-66.
53. https://www2.warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/booking/particlesize/mastersizer_2000_main_manual.pdf (žiūrėta: 2017-04-28).
54. LESKAUSKAITĖ, D. et al. The Effect of Carboxymethyl Cellulose on the Stability of Emulsions Stabilized by Whey Proteins under Digestion in vitro and in vivo. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 2013, **7**(7), 538-543.
55. GHOSH, A.K. and P. BANDYOPADHYAY. Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids. In *The Complex World of Polysaccharides*. InTech, 2012, pp. 395–408. ISBN 978–953–51–0819–1.
56. MALINAUSKYTĖ, Ernesta. *Išrūgų baltymais ir karboksimetilceliulioze stabilizuotos emulsijos: sudėtis, savybės, panaudojimas pieno produktų gamyboje*: daktaro disertacija:

- technologiniai mokslai, chemijos inžinerija, Kauno Technologijos Universitetas. Kaunas, 2014.
57. GUIMARÃES, D. H. P. and C. A. GASPARETTO. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT– Food Science and Technology*. 2005, **38**(1), 77–80.
 58. GREENWOOD, R and K. KENDALL. Electroacoustic studies of moderately concentrated colloidal suspensions. *Journal of the European Ceramic Society*. 1999, **19**(4), 479–488.
 59. <http://www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey5e/Ch27/ch27-1-4-2.html> (žiūrėta: 2017-05-02)
 60. BOSSO, A., L. R. I. MORIOKA, L. F. dos SANTOS, H. H. SUGUIMOTO. Lactose hydrolysis potential and thermal stability of commercial β -galactosidase in UHT and skimmed milk. *Food Science and Technology*. 2016, 36(1). Prieigai per doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.0085> .
 61. DICKINSON E. Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers. *Food Biophysics*. 2011, 6, 1-11.