



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Marija Kubiliūtė

**LIETUVOS SENOJO GENOTIPO JUODMARGIŲ GALVIJŲ
PIENO BALTVMŲ SUDĖTIS, TECHNOLOGINĖS SAVYBĖS IR
VIRŠKINAMUMAS**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Prof. dr. Daiva Leskauskaitė

KAUNAS, 2017

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**LIETUVOS SENOJO GENOTIPO JUODMARGIŲ GALVIJŲ
PIENO BALTŲMŲ SUDĖTIS, TECHNOLOGINĖS SAVYBĖS IR
VIRŠKINAMUMAS**

Baigiamasis magistro projektas
Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

Vadovas

(parašas) Prof. dr. Daiva Leskauskaitė

(data)

Recenzentas

(parašas) Lektorė dr. Renata Žvirdauskienė

(data)

Projektą atliko

(parašas) Marija Kubiliūtė

(data)

KAUNAS, 2017



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos

(Fakultetas)

Marija Kubiliūtė

(Studento vardas, pavardė)

Maisto mokslas ir sauga, 621E40001

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Lietuvos senojo genotipo juodmargių galvijų pieno baltymų sudėtis,
technologinės savybės ir virškinamumas“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 17 m. birželio 1 d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Marijos Kubiliūtės**, baigiamasis projektas tema „Lietuvos senojo genotipo juodmargių galvijų pieno baltymų sudėtis, technologinės savybės ir virškinamumas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

TURINYS

IŽANGA.....	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1. Lietuvos senojo genotipo juodmargiai galvijai	10
1.1.1. Pieninių galvijų istorija ir dabartinė pieno ūkio situacija pasaulyje.....	10
1.1.2. Lietuvos galvijų genofondo išsaugojimo sistema	11
1.1.3. Lietuvos juodmargių galvijų gerinimas.....	12
1.2. Pieno sudėtis ir technologinės savybės	13
1.2.1. Karvių pieno sudėtis.....	13
1.2.2. Kazeinas	16
1.2.3. Pieno technologinės savybės	21
1.3. Pieno baltymų biologinė kokybė.....	27
1.3.1. Virškinamumas.....	27
1.3.2. Bioaktyvūs peptidai.....	29
2. TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	31
3. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	32
3.1. Tyrimų medžiagos	32
3.2. Pieno mėginių paruošimas sudėties ir technologinių savybių analizei ir tyrimo organizavimas.....	32
3.3. Pieno sudėties nustatymo metodai	33
3.4. Pieno technologinių savybių nustatymo metodai.....	34
3.5. Statistinė analizė.....	36
3.6. Mėginių paruošimas pieno baltymų virškinamumo analizei ir tyrimo organizavimas	36
3.7. Pieno baltymų virškinamumo tyrimas <i>in vitro</i> metodu	38
3.8. Pieno baltymų virškinamumo įvertinimui naudoti analizės metodai	41
4. REZULTATAI.....	43
4.1. Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno sudėties įtaka jo technologinėms savybėms	43
4.1.1. Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno sudėtis priklausomai nuo sezono	43
4.1.2. Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno technologinės savybės priklausomai nuo sezono	49
4.1.3. Koreliacijos tarp pieno sudėties ir technologinių rodiklių	54
4.2. Pieno baltymų virškinamumo tyrimai	55
4.2.1. Pieno baltymų hidrolizės laipsnio įvertinimas virškinimo <i>in vitro</i> etapuose	56
4.2.2. Pieno baltymų proteolizės produktų kokybinis įvertinimas įvairiuose virškinimo <i>in vitro</i> etapuose	58
4.2.3. Baltymų virškinimo <i>in vitro</i> metu susidariusių peptidų bendras profilis.....	59
IŠVADOS.....	71
BIBLIOGRAFINIŲ NUORODŲ SĄRAŠAS	72
PRIEDAI.....	80
1 PRIEDAS	81
2 PRIEDAS	90

Kubiliutė, Marija. Lietuvos senojo genotipo juodmargių galvijų pieno baltymų sudėtis, technologinės savybės ir virškinamumas. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas prof. dr. Daiva Leskauskaitė; Kauno technologijos universitetas, cheminės technologijos fakultetas.

Mokslų kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: *vietinė galvijų veislė, pieno sudėtis, kazeinas, koaguliacija, virškinamumas, bioaktyvūs peptidai*

Kaunas, 2017. 79 p.

SANTRAUKA

Magistro baigiamojo darbo tikslas buvo įvertinti Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno baltymų kiekybinę ir kokybinę sudėtį bei technologines savybes ir nustatyti iš jų pieno pagamintų baltyminių produktų biologinę vertę.

Ištirtas 20-ies Lietuvos senojo genotipo juodmargių veislės karvių (vietinė galvijų veislė) pienas, mėginius imant kas mėnesį metus laiko. Nustatyta pieno sudėtis ir technologinės savybės priklausomai nuo sezono. Pirmą kartą išanalizuota šios veislės karvių pieno baltymų kokybinė ir kiekybinė sudėtis. Apskaičiuotos koreliacijos tarp pieno sudėties ir technologinių savybių. Pieno baltymų virškinamumas skrandyje bei plonosiose žarnose *in vitro*, siekiant nustatyti jų biologinę vertę, buvo vertintas tokiais rodikliais: baltymų hidrolizės laipsniu, baltymų hidrolizės produktų kokybine sudėtimi bei baltymų hidrolizės metu susidariusių peptidų kokybinė ir kiekybinė sudėtimi.

Nustatyta, jog nuo sezono priklausė šie Lietuvos juodmargių karvių pieno rodikliai: kalcio kiekis, bendras baltymų kiekis, kazeino frakcijų sudėtis, fermentinės koaguliacijos trukmė. Kitų rodiklių reikšmės sezono metu keitėsi nežymiai, todėl jų variacijos nesiejamos su sezoniškumu. Nustatytos stiprios koreliacijos tarp šių sudėties ir technologinių savybių rodiklių: rūgštinės koaguliacijos stiprumo ir κ - ir β -kazeinų kiekio. Tyrimų rezultatai parodė, kad Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pienas pasižymi geromis koaguliacijos savybėmis – iš tirtų 219 bandinių tik 2 % nesudarė sutraukos per 60 min. nuo traukinančio agento įdėjimo pradžios. Manoma, kad analizuotų karvių pienas labiausiai tinka sūrio – fermentuotų pieno produktų gamybai.

Vertinant baltyminių produktų biologinę vertę, nustatyta, kad iš senojo genotipo Lietuvos juodmargių veislės karvių pieno ir iš Holšteino veislės karvių pieno pagamintų fermentinės bei rūgštinės sutraukos yra puikus bioaktyvių peptidų (daugiausia angiotenziną konvertuojančių fermentų inhibitorių) šaltinis. Peptidai atpalaiduojami ne tik virškinimo metu, bet ir sutraukos susidarymo metu. Nustatyta, kad rūgštinė sutrauka virškinama greičiau nei fermentinė, o veislė akivaizdžios įtakos šių sutraukų baltymų hidrolizės greičiui neturi.

Kubiliute, Marija. COMPOSITION, TECHNOLOGICAL PROPERTIES AND DIGESTIBILITY OF MILK PROTEINS FROM NATIVE BREED - LITHUANIAN BLACK AND WHITE, COWS: *Master's thesis in Food Science and Safety / supervisor assoc. prof. Daiva Leskauskaitė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.*

Research area and field: Technological Sciences, Food Technology

Key words: native cattle breed, milk composition, casein, coagulation, digestibility, bioactive peptides

Kaunas, 2017. 79 p.

SUMMARY

The aim of the master project was to study the composition of proteins and technological properties of raw milk from an individual old genotype Lithuanian Black and White cows and evaluate the biological value of the products manufactured from the analyzed milk.

Monthly milk samples were obtained from 20 old genotype Lithuanian Black and White cows (native cattle breed). It is the first study of the fractions of milk proteins of Lithuanian cattle breed. The interrelationships in physico-chemical properties are determined in this project. The digestibility and biologic value of milk proteins was evaluated by degree of hydrolysis, determined by fluorescamin assay, and profile of peptides derived from caseins during gastrointestinal digestion *in vitro*.

Protein, calcium levels, casein concentration and rennet coagulation time demonstrated seasonal trends, while other properties displayed considerable variations, which apparently unrelated to season. Some significant interrelations in physico-chemical properties were found: acid gel strength is influenced by κ - and β -caseins. Old genotype Lithuanian Black and White cows milk can be characterized as having good coagulation properties. We found that among the 219 milk samples from 20 individual cows only 2 % were noncoagulating (did not formed rennet/acid induced gel through 60 min.). Lithuanian native cattle breed milk is suitable for cheese and fermented milk products manufacture.

Peptides profile analysis has showed that acid and rennet gels produced from old genotype Lithuanian Black and White cows milk and from Holstein cows milk are great source of bioactive peptides (mostly ACE inhibitors). No evident difference between milk gels made from different breeds cows milk was observed, while the type of curd has impact: acid gel degrade faster than rennet gel. Peptides formation starts with technological process (different profiles of peptides derived from different casein fractions depends on used coagulation agent) and changes during digestion in simulated gastroduodenal digestion process *in vitro*.

SANTRUMPOS

A.r. – aminorūgštys

ESCh – efektyvioji skysčių chromatografija

FKT – fermentinės koaguliacijos trukmė

GDL – gliukono–delta–laktonas

Leu – leucinas

NK – nekoaguliuojantis pienas

RKT – rūgštinės koaguliacijos trukmė

SCh–ESI–MS/MS – skysčių chromatografijos – elektrotrauto jonizacijos – tandeminės masių spektrometrijos metodas

SDS-PAGE – elektroforezės metodas

VTE – vandenyje tirpus ekstraktas

IŽANGA

Pienas ir pieno produktai vartojami plačiai visame pasaulyje. ES pagaminta produkcija užima pagrindinę pasaulio pieno rinkos dalį. Lietuvoje 2016 m. pieno pramonės gaminių gamyba sudarė daugiau nei ketvirtadalį visos maisto ir gėrimų pramonės gamybos, o pieno gaminių eksportas – apie trečdalį viso maisto ir gėrimų pramonės eksporto. Pagrindinis gaminamas produktas yra sūriai, kurių eksportas 2016 m. sudarė apie 43 % visos pieno gaminių eksporto vertės [1].

Sūrių gamybai reikalingas pienas, pasižymintis geromis koaguliacijos savybėmis ir gera fermentinės sutraukos sinereze. Todėl pasauliniuose pienininkystės mokslo centruose atlikta nemažai tyrimų, kurie parodė, kad informacija apie pieno koaguliacijos savybes svarbi tiek sūrių gamybos išėigai, tiek kokybei. Pieno koaguliacijos savybių tyrimai atliekami ir laboratoriniu [2] ir pramoniniu lygmeniu [3, 4].

Kita populiarių pieno produktų grupė – rauginto pieno produktai, kurių per metus pasaulyje pagaminama daugiau kaip 25 mln. tonų [5]. Lietuvos pieno perdirbėjai gamina įvairių raugintų pieno produktų asortimentą – jogurtus, rūgpienį, kefyra, raugintas pasukas bei varškę ir varškės produktus. Gaminant raugintus pieno produktus, svarbiausias technologinis etapas – pieno fermentacija pienarūgštėmis bakterijomis, kurios metu mažėja pH, todėl kazeino micelėse esantis netirpus kalcio fosfatas ima tirpti, o neigiamai įkrautos kazeino dalelės praranda krūvį. Kazeino dalelių agregacija prasideda, kai pH pasiekia kazeino izoelektrinį tašką (pH 4,6) [6]. Siekiant gauti geresnėmis tekstūros savybėmis pasižyminčius rauginto pieno produktus, prieš rauginimą pienas apdorojamas aukštoje temperatūroje, tam kad įvyktų β -laktoglobulino denatūracija ir jis galėtų sudaryti kompleksus su kazeinu arba agreguotis tarpusavyje. Šis procesas pagerina rūgštinės sutraukos klampą [7]. Yra žinoma keletas veiksnių, kurie turi įtakos rūgštinės sutraukos susidarymui: pieno sudėtis, perdirbimo sąlygos [6] ir pieno genetiniai veiksniai [8]. Kol kas nėra nustatytų aiškių priklausomybių tarp karvių pieno genetinių ir jo technologinių savybių, svarbių rūgštinės sutraukos susidarymui.

62 % visų laikomų pieninių galvijų Lietuvoje sudaro Lietuvos juodmargiai galvijai, kurie savarankiška veisle buvo pripažinti 1951m. ir nuo to laiko intensyviai kryžminti su kitų veislių galvijais [9]. Lietuva, pasirašydama 1992 m. birželio 11 d. Rio de Žaneire „Biologinės įvairovės konvenciją“, įsipareigojo išsaugoti mūsų šalies gyvulių veislių genetinį fondą. Nacionaliniai genetiniai ištekliai turi selekcinę, ekonominę, mokslinę, ekologinę, kultūrinę, istorinę reikšmę ir yra svarbi pasaulinės žemės ūkio įvairovės dalis [10]. Senojo genotipo Lietuvos juodmargių galvijų populiacijos dydis pastaraisiais metais didėja, 2016 metais ją sudarė 1975 galvijai.

Manoma, jog vietinės galvijų veislės yra geriausiai prisitaikiusios prie to regiono sąlygų ir jų gaminamas pienas galimai naudingesnis vartotojų sveikatai nei galvijų, nebūdingų tam regionui. Nors yra atlikta tyrimų, kuriuose analizuojama pašaro, holšteinizacijos, laktacijos, sezono, genotipo įtaka Lietuvos juodmargių karvių produktyvumui ir kokybės rodikliams, nėra atlikta tyrimų, kuriuose būtų gilinamasi į senojo genotipo Lietuvos juodmargių pieno baltymų sudėtį ir pieno technologines savybes bei jų tarpusavio ryšius, kurie svarbūs pieno pramonei bei galimai vartotojų sveikatai, dėl pieno produktų virškinimo metu išskiriamų bioaktyvių junginių išskirtinumo ir potencialo.

Magistro baigiamojo **darbo tikslas** – įvertinti Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno baltymų kiekybinę ir kokybinę sudėtį bei technologines savybes ir nustatyti iš jų pieno pagamintų baltyminių produktų biologinę vertę tiriant produktų virškinamumą *in vitro* bei nustatant biologiškai aktyvių peptidų atpalaidavimą virškinamajame trakte.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Lietuvos senojo genotipo juodmargiai galvijai

1.1.1. Pieninių galvijų istorija ir dabartinė pieno ūkio situacija pasaulyje

Pagal sistematinę gyvūnų klasifikaciją galvijai ir jų laukiniai protėviai priskiriami žinduolių (lot. *Mammalia*) klasei, porakanopių (lot. *Artiodactyla*) būriui, atrajotojų (lot. *Ruminantia*) pobūriui, dykaragių (lot. *Cavicornia*) šeimai, stambiųjų raguočių (lot. *Bos*) genčiai ir galvijų (lot. *Taurina*) rūšiai. Svarbiausias galvijų protėvis – tauras [11].

Veislės apibrėžimas susijęs su daugeliu fenotipinių požymių, tokių kaip gyvūno spalva, raguotumas, ūgis, reprodukcinės savybės, produktyvumas bei pieno cheminės ir technologinės savybės. Visa tai apibrėžia genetinį potencialą [12]. Siekiant pagerinti vietinių gyvūnų savybes galvijų migracija tarp pasaulio šalių pradėta 19 a. pirmoje pusėje. Vietinius galvijus kryžminant su įvežtiniais buvo sukurtos, ir vis dar kuriamos, kultūrinės veislės. 20 a. pirmoje pusėje pradėtos organizuoti gyvulių parodos, atsirado kilmės knygos, kūrėsi asociacijos, kurios skatino selektyvų veisimą tam tikroms savybėms stiprinti. Yra žinoma, kad vietinės, tipiškos tam tikram geografiniam regionui arba šaliai galvijų veislės, yra geriau prisitaikiusios prie esamų gamtinių bei aplinkos sąlygų, veisimo būdų bei auginimo tipo, šėrimo būdo bei pašaro sudėties, pasižymi aukštu atsparumu tai vietai būdingų ligų atžvilgiu [13, 14].

Industrializacija pradėta 20 a. pradžioje kelia grėsmę vietinėms galvijų veislėms Europoje. Dėl intensyvios ekonominės plėtros žemės ūkyje, 1989–1995 metais Lenkijoje auginamų galvijų skaičius sumažėjo 30 %, Lietuvoje, Latvijoje bei Estijoje – apie 50 %, o šiose šalyse laikomų vietinių galvijų veislės atsidūrė ties išnykimo riba [13]. Jos saugomos ir auginamos dėl regiono ekonomikos, prisitaikymo prie aplinkos sąlygų, galimybės išsaugoti ateities kartoms, mokslinių tyrimų potencialo (viso pasaulio molekulinės genetikos mokslininkai ieško tikrų genų, darančių įtaką produktyvumui, pagamintų produktų savybėms, gyvūnų sveikatingumui bei reprodukcinėms savybėms), kultūrinių ir istorinių priešasčių, ekologinės vertės [12, 15].

2015 metais pasaulyje buvo pagaminta 818 milijonų tonų pieno. 29 % priklauso Azijos valstybėms, antras pagal produktyvumą žemynas – Europa, čia pagaminta 24 % viso pasaulio pieno skirta pramonei. Didėjant žmonių populiacijai didėja ir pieno poreikis (2015 metų duomenimis vienas žmogus per metus suvartoja 113,3 kg pieno). Per ateinantį dešimtmetį pagaminamo pieno kiekis turėtų padidėti 12,5 %. Dėl vis augančios pieno paklausos karvės selekcijos būdu gerinamos didinant jų produktyvumą [5].

FAO duomenimis 2016 metais pasaulyje (182 pasaulio šalių duomenys) buvo registruota 1024 skirtingos galvijų rūšys, iš jų 375 priklauso Europos ir Kaukazo sričiai. Kiekviena valstybė atsako už savo naminių gyvulių genetinius išteklius ir turi pasiūlyti sistemą nacionalinei, regioninei ir pasaulinei veiklai šioje srityje užtikrinti [16].

Viena svarbiausių priemonių gyvulininkystės ūkiui plėtoti, tvarkyti ir racionalizuoti – ūkinių gyvūnų produktyvumo kontrolė. Lietuvoje kontroliuojama apie 138 tūkst. karvių. Tai sudaro apie 43 % visų melžiamų karvių. Daugelyje ES šalių gyvulių produktyvumo kontrolei skiriama ypač daug dėmesio ir kontroliuojamų karvių yra gerokai daugiau nei Lietuvoje (Čekijoje kontroliuojama 95 %, Estijoje – 93 %, Danijoje – 90 %, Olandijoje – 89 %, Švedijoje ir Vokietijoje – 84 %, Slovakijoje ir Slovėnijoje – 80 %, Suomijoje – 83 %, Vengrijoje – 68 %, Austrijoje – 76 %, Latvijoje – 73 % karvių [17].

1.1.2. Lietuvos galvijų genofondo išsaugojimo sistema

Lietuvoje kontroliuojamų karvių mažėja, dėl to silpsta veislininkystės sistema – selekcijos programos įgyvendinamos ne taip efektyviai, kyla pavojus, kad nebus išsaugotas Lietuviškų veislių genofondas, mažėja gyvulių populiacija tikrinamiesiems buliams įvertinti pagal palikuonių savybes [17]. Valstybės įmonės Žemės ūkio informacijos ir kaimo verslo centro (ŽŪIKVC) duomenimis šiuo metu Lietuvoje kontroliuojamos 36 karvių veislės, iš jų 5 yra vietinių galvijų. Daugiausia šalyje auginama juodmargių veislės galvijų. Šie sudaro apie 62 % visų laikomų pieninių galvijų, 32 % – Lietuvos žalieji [18].

Lietuva, pasirašydama 1992 m. Birželio 11 d. Rio de Žaneire „Biologinės įvairovės konvenciją“ [10], įsipareigojo išsaugoti mūsų šalies gyvulių veislių genetinį fondą. Nacionaliniai genetiniai ištekliai, kurių išskirtiniai paveldimi požymiai susiformavę Lietuvoje, turi selekcinę, ekonominę, mokslinę, ekologinę, kultūrinę, istorinę reikšmę ir yra svarbi pasaulinės žemės ūkio įvairovės dalis.

Žemės ūkio ministro 1996 m. lapkričio 28d. Įsakymu Nr. 481 patvirtinta „Lietuvos senųjų vietinių žemės ūkio gyvūnų genetinių išteklių išsaugojimo programa“. Programoje numatyta, jog turi būti atliekami visapusiški gyvūnų tyrimai, parengiamos vertinimo principų sistemos. 2008 m. patvirtinta „Lietuvos žemės ūkio gyvūnų genetinių išteklių išsaugojimo programa“. Saugomos Lietuvos galvijų veislės: Lietuvos šemieji, Lietuvos baltnugariai, senojo genotipo Lietuvos žalieji, senojo genotipo Lietuvos juodmargiai galvijai [19, 20]. 1993 metais įkurta Lietuvos juodmargių galvijų gerintojų asociacija, kuri siekdama efektyvaus esamų Lietuvos juodmargių galvijų genetinio potencialo panaudojimo, jų veislinių ir ūkiškai naudingų savybių

išsaugojimo ir gerinimo, rengia ir vykdo Lietuvos juodmargių galvijų veislininkystės selekcijos programas [21].

1.1.3. Lietuvos juodmargių galvijų gerinimas

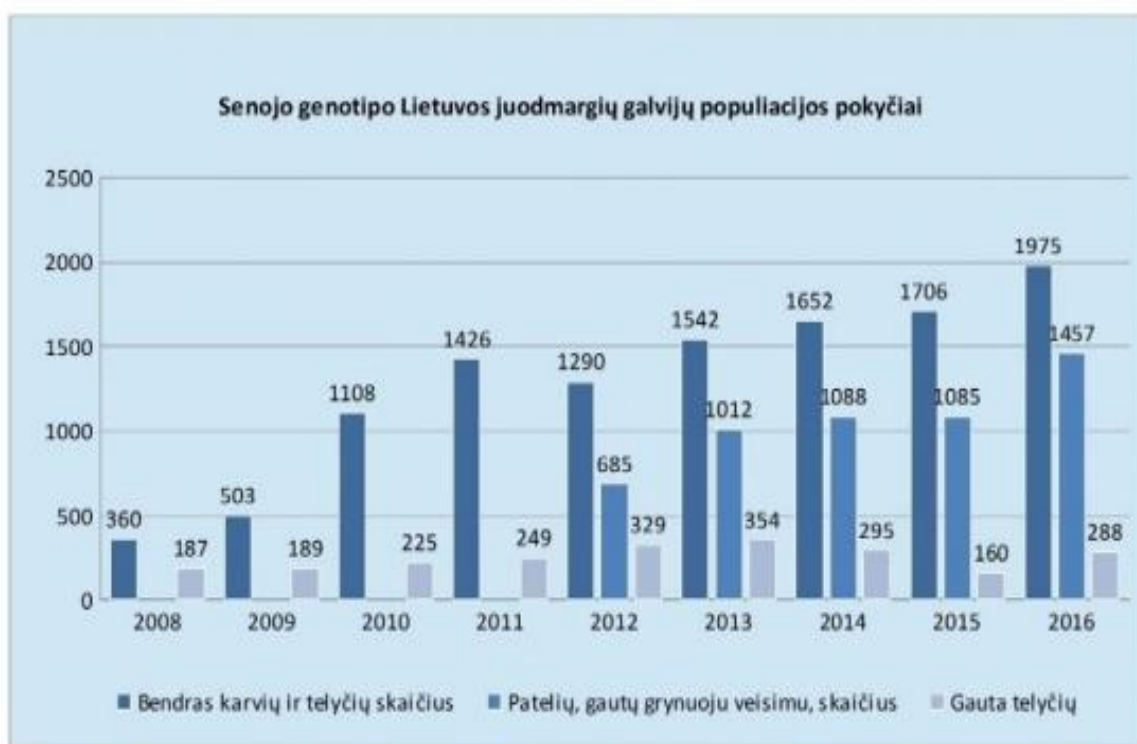
Lietuvos juodmargių galvijų veislė buvo išvesta kryžminat vietinius galvijus, egzistavusius jau prieš 400 metų, iš pradžių su įvairių veislių, o vėliau su Olandijos juodmargiais, ostfryzais ir Švedijos juodmargiais galvijais. Vėliau mišrūnai buvo veisiami tarpusavyje. Lietuvos juodmargių galvijų veislei didelę reikšmę formuoti turėjo gyvulių produktyvumo kontrolė (pradėta 1909 metais), atranka pagal pieningumą ir pieno riebalus, eksterjerą, įrašymas į kilmės knygas. Savarankiška veisle Lietuvos juodmargiai pripažinti 1951 metais. Šie juodmargiai galvijai buvo nepakankamai produktyvūs, liesapieniai, turėjo daug eksterjero trūkumų. Trūkumams pašalinti šeštojo dešimtmečio antroje pusėje į Lietuvą vėl įvežti Olandijos juodmargiai. Taip intensyvios selekcijos pagrindu, panaudojant Olandijos juodmargius, buvo suformuotas naujas juodmargių galvijų genotipas [22].

Globalinė Lietuvoje veisiamų juodmargių galvijų holšteinizacija prasidėjo 1982 metais, kai į respubliką buvo pradėti importuoti holšteinizuoti Vokietijos juodmargiai buliai. Naudojant Holšteino veislės bulius padidėjo dukterų pieningumas, gebėjimas efektyviau naudoti pašarus. Holšteinai pakankamai stabiliai perduoda palikuonims ūkiškai naudingus požymius. Olandiškas genotipas buvo nustelbtas ir veislė, nors ir išlaikė Lietuvos juodmargių pavadinimą, suartėjo su Holšteinų veisle. Vokietijoje auginamų galvijų genofondas turėjo, turi ir ateityje turės įtakos Lietuvoje laikomų juodmargių galvijų veislių formavimui ir įsiliejimui į Holšteinų veislės masyvą [23].

Lietuvoje daugelis atliktų tyrimų buvo sukonzentruoti karvių produktyvumo stebėjimui bei reprodukciniams savybėms analizuoti, nes nuo jų priklauso pieninių galvijų bandos naudingumas. Primelžiamo pieno kiekis ir kokybė yra svarbūs ekonominiai pieno ūkio faktoriai. Nustatyta jog Holšteinai labai pagerina juodmargių, ypač turinčių 1/2 ir daugiau Holšteinų kraujo dalį, pieningumą [24]. 1980–1995 m. Lietuvos juodmargiams galvijams gerinti naudoti Holšteino veislės buliai padidino dukterų pieningumą vidutiniškai 76,9 kg, o pieno riebalų produkciją 2,17 kg [25].

Holšteinų ir didelę jų kraujo dalį turinčių bulių gerinamasis efektas bei jų palikuonių produktyvumas labai priklauso nuo šėrimo pilnavertiškumo. Moksliniai tyrimai ir ilgametė ūkininkų patirtis rodo, kad grynaveisliai ir galvijai, turintys daugiau Holšteinų veislės kraujo, yra jautresni šėrimo pilnavertiškumui. Ūkiuose, kuriuose gyvulių produktyvumas yra mažas dėl prasto šėrimo, Holšteinų gerinamasis poveikis būna nedidelis arba nepasireiškia [26].

Senojo genotipo Lietuvos juodmargių galvijų populiacijos dydis 2016 metais buvo 1975 galvijai, 1279 iš jų - veislinės patelės. Suaugusio gyvūno duomenys: patino aukštis ties ketera 135–145 cm, gyvasis svoris 800–950 kg, patelės atitinkamai 125–135 cm, 450–550 kg. Vidutiniškai primelžiama 5612 kg 4,31 % riebumo ir 3,35 % baltymingumo pieno. Senojo genotipo Lietuvos juodmargiai galvijai yra stiprios konstitucijos, proporcingo, kompaktiško kūno sudėjimo. Dėl trumpų kojų, gilios ir plačios krūtinės, plačios keteros, nugaros, juosmens, ilgo ir plataus užpakalio bei gerai išsivysčiusių raumenų jie dažnai panašesni į pieninius–mėsinius galvijus. Prieauglis pasižymi didele augimo energija ir sparčiu brendimu. Veislės saugojamos *ex situ* (užšaldytos gyvūnų genetinės medžiagos išsaugojimas) ir *krio* konservavimo būdais. Gyvūnai laikomi 132 Lietuvos ūkiuose [27]. Senojo genotipo Lietuvos juodmargių galvijų populiacija didėja. (1 pav.).



1 pav. Lietuvos senojo genotipo juodmargių galvijų populiacijos pokyčiai [28]

1.2. Pieno sudėtis ir technologinės savybės

1.2.1. Karvių pieno sudėtis

Pienas yra sudėtinga biocheminė sistema. Tai vandeninis tirpalas, kuriame yra mineralinių medžiagų, vitaminų, laktozės, tirpių proteinų, pieno riebalų, kurie pasiskirstę lašeliais (aliejus

vandenyje tipo emulsija), bei koloidinių dalelių – kazeino micelių. Vidutinė pieno sudėtis pateikta žemiau esančioje lentelėje.

1 lentelė. Pieno kiekybinė sudėtis [29]

Komponentas	Kiekis, %
Vanduo	87,3
Mineralai	0,8
Laktozė	4,7
Riebalai	3,9
Baltymai	3,3

Mineralai

Mineralinių elementų kiekis piene nėra pastovus – priklauso nuo daugelio faktorių tokių kaip karvės mityba, laktacija, aplinka, sezonas ir pan. Žemiau esančioje lentelėje pateikti vidutiniai pagrindinių pieno mineralinių komponentų kiekiai.

2 lentelė. Piene esančios mineralinės medžiagos [30]

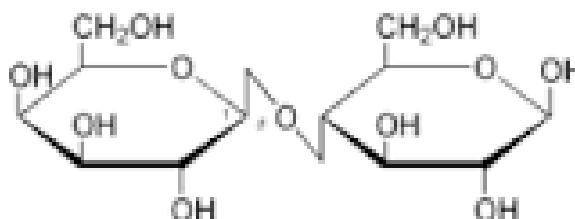
Mineralas	Kiekis, mg/l
Natris	530
Kalis	1360
Chloras	970
Kalcis	1120
Fosforas	890
Magnis	110

Piene svarbiausią vaidmenį atlieka kalcis ir fosforas. Kalcis piene egzistuoja dviem formomis – tirpia ir netirpia. Kalcis ištirpęs pieno plazmoje sudaro kompleksus su kitais jonais ir išrūgų baltymais (0,15 % kalcio yra susijungę su α -laktoalbuminu) arba randamas joninėje formoje, o netirpus kalcis, vadinamas koloidiniu, randamas kazeino micelėse, sudaręs kompleksus su fosforo anijonais (CCP – koloidinis kalcio fosfatas). 99 % kalcio randama lieso pieno frakcijoje [31]. 20 % bendro fosforo kiekio piene yra organinio fosfato formos ir susijungęs esteriniu ryšiu su kazeinu. 44 % neorganinio fosfato randama kazeino micelėse kalcio fosfato formos ($\text{Ca}_9(\text{PO})_4$), 56 % yra tirpios formos, egzistuojančios kaip fosfato jonai. 35 % magnio jonų prisijungę prie kazeino micelių (maždaug pusė sudaro asociatus su koloidiniu kalcio fosfatu, kita dalis tiesiogiai prisijungusi prie kazeino frakcijų fosfoserino liekanų). Likęs magnis yra tirpios formos (40 % magnio citrato, 7 % – magnio fosfato, 16 % laisvų magnio jonų pavidalo) [30]. Ca, Mg, P kiekiai turi įtakos pieno koaguliacijos savybėms. Nustatyta jog nekoaguliuojančiame piene jų koncentracija mažesnė nei koaguliuojančiame [32, 33].

Laktozė

Laktozė vadinama pieno cukrumi, sintetinama pieno sekrecijos liaukų alveolių paviršiuje iš gliukozės. Apie 70 % karvės kraujyje cirkuliuojančios gliukozės yra paverčiama laktoze. Laktozės kiekis yra susijęs su pieno išėiga. Laktozė yra disacharidas, kuris sudarytas iš D-gliukozės ir D-galaktozės. Galaktozės aldehidinė grupė C1 susijungusi su gliukozės C4 β-1,4-glikozidiniu ryšiu. Laktozė blogai tirpsta vandenyje (10 °C temp. 13 g/100g, 30 °C temp. 20 g/100 g, 50 °C temp. 30g/100g, kai palyginimui sacharozės tirpūs kiekiai 100 g vandens yra atitinkamai 66, 69, 73 g). Pieno cukraus saldumas maždaug tris kartus mažesnis už sacharozės. Laktozė yra pakankamai stabili ir jos fizikocheminei hidrolizei reikalinga aukšta temperatūra bei mažas pH. Laktozę iki monomerų hidrolizuoja fermentas laktazė (β-galaktozidazės), kurią išskiria rūgštinių pieno produktų gamybai naudojamos pienarūgštės bakterijos [34].

Fermentinio sūrio gamybos metu praktiškai visa laktozė pereina į išrūgas. Naudojant pienarūgštės bakterijas pagamintuose produktuose laktozės kiekis yra maždaug trigubai mažesnis nei žaliame piene, nes mikroorganizmai dalį laktozės paverčia į pieno rūgštį [35].



2 pav. Laktozė

Lipidai

Pieno riebalai pasiskirstę sferinėmis globulėmis piene sudaro riebalai vandenyje tipo emulsiją. Globulių diametras svyruoja nuo 0,1 iki 20 μm (vidutinė reikšmė 3–4 μm). Jų dydis priklauso nuo gyvulio rūšies, veislės, sveikatos būklės, laktacijos, sezono ir kt. 1 ml pieno randama apie 15x10⁹ globulių, kurių bendras paviršiaus plotas siekia 1,2–2,5 m². Pieno lipidų (daugiau nei 95 % yra trigliceridai) globulių paviršius apsuptas membranos, kurioje yra emulsuojančiomis savybėmis pasižyminčių proteinų (jie sudaro 20–65 % membranos masės), taip padidinimas jų atsparumas agregacijai, sumažinamas paviršiaus įtempis. Pagrindiniai membranų baltymai – mucinas, ksantino dehidrogenazė–oksidazė, bei glikoproteinai. Pieno riebalų lašeliai yra mažesnio tankio nei pieno serumas, todėl pradeda kilti į paviršių praėjus vos 20 min. nuo melžimo pabaigos [36].

Baltymai

Baltymai piene sudaro vidutiniškai 3,3–3,5 %. Pagal funkcijas jie skirstomi į penkias pagrindines grupes – kazeinas, išrūgų baltymai, lipidų globulių membranų baltymai, fermentai ir kiti minoriniai baltymai. Daugiau nei 95 % pieno baltymų yra užkoduoti 6 struktūriniais genais. Žinomi keturi kazeino genai CN1S1, CSN2, CSN1S2, CSN3, lokalizuoti 6 chromosomoje, literatūroje vadinami atitinkamai α_{s1} -kazeinu, β -kazeinu, α_{s2} -kazeinu, κ -kazeinu. Du pagrindiniai išrūgų baltymai koduojami LAA ir LGB genais, kurie lokalizuoti atitinkamai 5 ir 11 chromosomose (atitinkamai α -laktoalbuminas ir β -laktoglobulinas) [37]. Šie baltymai piene pasiskirstę santykiu 1:3. Taip pat prie išrūgų baltymų priskiriami mažais kiekiais aptinkami: serumo albuminas, penkios imunoglobulinų klasės (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD). Fermentų grupei priskiriama daugiau nei 60 skirtingų fermentų, kurių bendras kiekis nesiekia 1 % bendro pieno baltymų kiekio (pvz. katalazė, laktoperoksidazė, ribonukleazė, gliukozaminazė ir kt.). Penktai baltymų grupei, kurių randami maži kiekiai, tačiau junginiai atlieka tam tikrą biologinę funkciją, priskiriami: transferinas, laktoferinas, laktolinas, kininogenas ir kt. [38]. Piene taip pat gali būti randama nebaltyminių azotinių medžiagų – laisvųjų aminorūgščių, peptidų. Šių baltymų skilimo produktų koncentracija priklauso nuo somatinių ląstelių kiekio piene (teigiama koreliacija) [39].

1.2.2. Kazeinas

Kazeinas yra svarbiausias pieno baltymas kiekybiniu, technologiniu ir mitybiniu aspektais. Jo aminorūgščių sekoje randamos visos devynios nepakeičiamosios aminorūgštys – fenilalaninas, valinas, treoninas, triptofanas, metioninas, leucinas, izoleucinas, lizinas, histidinas. Kazeinas sudaro apie 80 % visų pieno baltymų, α_{s1} -, α_{s2} -, β -, ir κ -frakcijos pasiskirsčiusios atitinkamai santykiais 4:1:4:1 [40].

Kazeinas vadinamas „lėtuju“ baltymu, kadangi patekęs į virškinimo sistemą rūgštinėje terpėje jis koaguliuoja, tuo tarpu išrūgų baltymai lieka skystos formos ir su skysčių srautu nunešami į žarnyną daug greičiau [41].

Kazeino frakcija apibūdinama kaip frakcija, kuri koaguliuoja ir iškrinta nuosėdomis žalią liesą pieną parūgštinus iki pH 4,6 20 °C temperatūroje. Frakcijos tarpusavyje (kokybinė analizė) atskiriamos pagal skirtingą judrumą elektros lauke elektroforezės (SDS–PAGE) metodu ant poliakrilamido gelio arba krakmolo gelio su urėja [42,43].

1.2.2.1. Kazeino frakcijos

α_{s1} -kazeinas

α_{s1} -kazeino frakcija sudaro apie 40 % visų kazeino frakcijų. α_{s1} -kazeino etaloninis tipas B-8P sudarytas iš 199 a.r., molekulinė masė – 23 615 Da. Žinomi 8 skirtingi α_{s1} - kazeino genetiniai variantai, kurie tarpusavyje skiriasi tam tikrais a.r. pakeitimais 53, 59, 66, 192 pozicijose, ar neturi būdingos grandinės ties 14–26 bei 51–59 padėtimis. Tyrimais nustatyta, jog tam tikras genetinis variantas koreliuoja su pieno sudėties ir technologinėmis savybėmis. Frakcija neatspari Ca^{2+} jonams – visiškai nusodinama, susidarant kalcio druskoms, 6 mM Ca^{2+} tirpalu kai pH 7,0 [42].

α_{s2} -kazeinas

α_{s2} -kazeino frakcija sudaro apie 10 % bendro kazeino kiekio. Dominuojanti frakcijos forma pasižymi disulfidiniais ryšiais, kurių kiekis kinta priklausomai nuo fosforilavimo laipsnio. Tai labiausiai fosforilinta kazeino frakcija. Žinomi 4 skirtingi genotipai, dažniausiai pasitaikančio A-11P genotipo baltymo grandinė sudaryta iš 207 a.r., molekulinė masė – 25 226 Da. Tarp cisteino molekulių esančių 36 ir 40 padėtyse susidaro disulfidiniai ryšiai. Jie formuojasi tiek toje pačioje molekulėje, tiek lygiagrečiai su šalia esančia, sudarydami antrinę struktūrą. α_{s2} -kazeino frakcija yra pati hidrofiliškiausia iš visų kazeino frakcijų bei mažiausiai atspari Ca^{2+} jonams. Frakcija visiškai nusodinama, susidarant kalcio druskoms, 2 mM Ca^{2+} tirpalu, kai pH 7,0 [42].

β -kazeinas

β -kazeino frakcija dėl natūralaus piene esančio fermento plazmino veiklos yra kompleksinė. Plazminas suskaido β -kazeiną į γ_1 , γ_2 , γ_3 – kazeinus (29–209, 106–209, 108–209 β -kazeino grandinės fragmentai atitinkamai). Pagrindinė β -kazeino frakcijos forma A²-5P sudaryta iš 209 a.r., molekulinė masė 23 983 Da. Žinoma 12 β -kazeino genetinių variantų. Tai hidrofobiškiausia kazeino frakcija. Esant žemesnei nei 4 °C temperatūrai ryšiai palaikantys frakciją micelės viduje susilpnėja ir β -kazeinas išsiskiria iš micelės [44, 42].

κ -kazeinas

Tai vienintelė kazeino frakcija, kurio triptofano liekanos būna glikolizuotos. Molekulėje yra cisteino liekanų, kurių sieros turinčios grupės sudaro disulfidinius ryšius formuojančius antrinę baltymo struktūrą. Kaip etaloninė forma aprašymuose naudojama neglikolizuota A-1P forma, kurią sudaro 169 a.r., molekulinė masė – 19 037 Da. Žinoma 11 genetinių variantų, iš

kurių 2 pagrindiniai A ir B. Ši kazeino frakcija atspari Ca^{2+} jonams, dengdama kitų kazeino frakcijų aglomeratą jas apsaugo nuo kalcio tokiu būdu palaikydama kazeino micelės stabilumą piene. κ -kazeinas neatsparus proteolitinio fermento renino poveikiui – jautriausia jungtis esanti ties fenilalaninu (Phe) ir metioninu (Met) (105–106) suskaldoma, atskylant hidrofobiniam para- κ -kazeinui (1–105) ir hidrofiliniam peptidui glikomakropeptidui (106–169) [42].

3 lentelėje pateikta kiekybinė ir kokybinė a.r. sudėtis kazeino molekulėse. Kazeino frakcijų a.r. sekos pateiktos 4 lentelėje.

3 lentelė. Pagrindinių kazeino frakcijų aminorūgščių sudėtis[45]

Amino rūgštis	3 raidžių trumpinys	1 raidės trumpinys	α_{s1} -kazeinas B-8P	α_{s2} -kazeinas A-11P	β -kazeinas A ² -5P	κ -kazeinas A-1P
Asparto r.	Asp	D	7	4	4	3
Asparaginas	Asp	N	8	14	5	8
Treoninas	Thr	T	5	15	9	14
Serinas	Ser	S	8	6	11	12
Fosfoserinas	Ser(P)		8	11	5	1
Glutamo r.	Glu	E	25	24	19	12
Glutaminas	Gln	Q	14	16	20	14
Prolinas	Pro	P	17	10	35	20
Glicinas	Gly	G	9	2	5	2
Alaninas	Ala	A	9	8	5	15
Cisteinas	Cys	C	0	2	0	2
Valinas	Val	V	11	14	19	11
Metioninas	Met	M	5	4	6	2
Izoleucinas	Ile	I	11	11	10	13
Leucinas	Leu	L	17	13	22	8
Tirozinas	Tyr	Y	10	12	4	9
Fenilalaninas	Phe	F	8	6	9	4
Triptofanas	Trp	W	2	2	1	1
Lizinas	Lys	K	14	24	11	9
Histidinas	His	H	5	3	5	3
Argininas	Arg	R	6	6	4	5
Oksiprolinas	Pro(O)		0	0	0	1
Aminorūgščių skaičius			199	207	209	169
Molekulinis svoris (skaičiuotas), Da			23 614	25 230	23 983	19 007
Vidutinis hidrofobiškumas (kJ/mol liekanai)			4,90	4,64	5,59	5,12
Koncentracija piene g/l			10,25	2,75	10,5	3,5

4 lentelė. Kazeino aminorūgščių sekos (naudojami 1 raidės trumpiniai) [42]

<p>β-kazeinas</p> <p>¹RELEELNVPG EIVES^{pLSpSpSpE} ESITRINK KI EKFAQS^{pEEQQQ} TEDELQDKIH</p> <p>⁵¹PFAQTSLVY PFPGPINSL PQNIPPLTQT PVVVPFLQP EVMGVSKVKE</p> <p>¹⁰¹AMAPK QK EMP FPKYPVEPFT ESQSLTLTDV ENLHLPLPLL QSWMHQPHQP</p> <p>¹⁵¹LPPTVMFPPQ SVLSLSQSKV LPVPQKAVPY PQRDMPIQAF LLYQEPVLGP</p> <p>²⁰¹VRGPFPIIV</p>
<p>α_{s2}-kazeinas</p> <p>¹KN^TMEHVS^{pSpSp} EESIIS^{pQETY} KQEKMAINP ^{Sp}KENLCSTFC KEVVRNANEE</p> <p>⁵¹EYSIGS^{pSpSpEE} SAEVATEEVK ITVDDKHYQK ALNEINQFYQ KFPYLQYLY</p> <p>¹⁰¹QGPIVLNPWD QVKRNAVPIT PTLNREQLS^{pT} ^{Sp}PEENSKKTVD MESTEVFTKK</p> <p>¹⁵¹TKL^TEEENR LNFLKKISQR YQKFALPQYL KTVYQHQA KPWIQPKTKV</p> <p>²⁰¹IPYVRYL</p>
<p>α_{s1}-kazeinas</p> <p>¹RPKHPIKHQGLPEVLNENL LRFFVAPFPE VFGKEKVNEL ^SKDIGS^{pESpTE}</p> <p>⁵¹DQAMEDIKQM EAES^{pISpSpSpEE} IVPNS^{pVEQKH} IQKEDVPSER YLGYLEQLLR</p> <p>¹⁰¹LKKYKVPQLE IVPNS^{pAEERL} HSMKEGIHAQ QKEPMIGVNQ ELAYFYPELF</p> <p>¹⁵¹RQFYQLDAYP SGAWYYVPLG TQYTDAPSFS DIPNPIGSEN SEKTTMPLW</p>
<p>κ-kazeinas</p> <p>¹QEQNEQPIR CEKDERFFSD KIAKYIPIQY VLSRYPSYGL NYYQQKPVAL</p> <p>⁵¹INNQFLPYPY YAKPAAVRSP AQILQWQVLS NTVPAKSCQA QPTTMARHPH</p> <p>¹⁰¹PHLSF MAIPP KKNQDKTEIP TINTIA^SGEP TSTPT^TIEAVE STVAT^TLEAS^{pP}</p> <p>¹⁵¹EVIESPPEIN TVQVTSTAV</p>

Sp – fosfoserinas; **S, T** – fosforilinta kituose genotipuose; **|** – jungtys jautriausios fermentinei hidrolizei

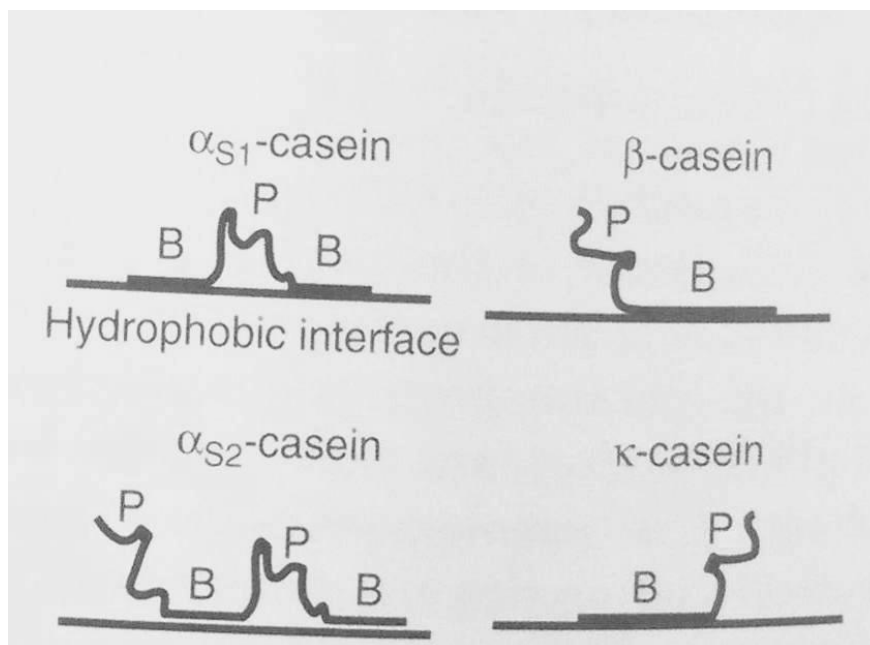
1.2.2.2. Kazeino frakcijų hidrofobiškumas

α_{s1} -kazeino frakcija turi tris hidrofobinius regionus – 1–44, 90–113, 132–199. Regionas 41–80 yra labai polinis dėl to, jog jame yra fosfato grupę turi 7 serino, 8 glutamo, 3 asparto a.r.

α_{s2} -kazeinas turi daugiausiai fosfoserino ir lizino molekulių, bei dvi cisteino molekules 36 ir 40 pozicijose. Tai antra pagal hidrofiliškumą frakcija, kurios poliniai regionai – 7–31, 55–66, 129–143, hidrofobiniai – 90–120, 160–207.

β -kazeinas – hidrofobiškiausia kazeino frakcija, kurioje nėra cisteino, ir randama daug hidrofobinio prolino (35 molekulės). N-terminalinis 21 a.r. ilgio segmentas turi aukštą neigiamą krūvį, likusi molekulės dalis yra hidrofilinė ir krūvio neturi.

κ -kazeinas – hidrofiliškiausia kazeino frakcija. N-terminalinis segmentas kurį sudaro 1–95 a.r. įkrautas teigiamai, yra labai hidrofobinis ir sudaro stiprų ryšį su kitomis kazeino molekulėmis. C-terminalinis segmentas (113–169 a.r.) įkrautas neigiamai, jame yra daugiau polinių a.r. nei nepolinių, jis lemia molekulės hidrofiliškumą [46, 42]

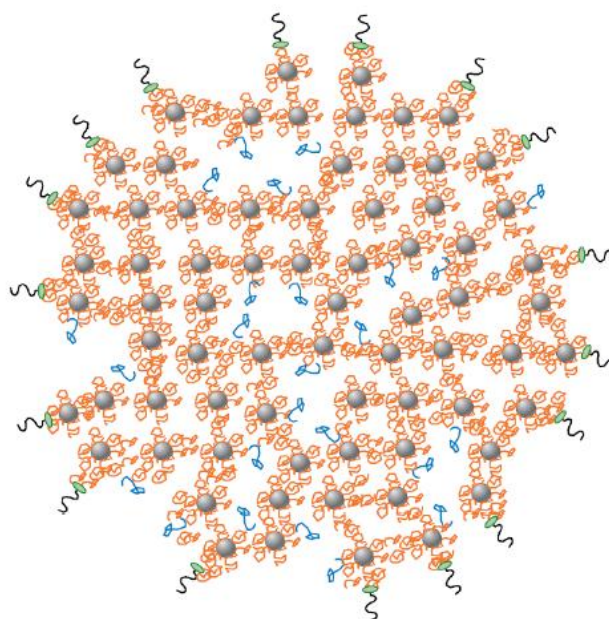


3 pav. Kazeino (angl. *casein*) frakcijų hidrofobiškumo iliustracija ant hidrofobinio paviršiaus (angl. *Hydrophobic interface*). B – hidrofobinis segmentas, P – hidrofilinis segmentas. κ -kazeinas hidrofiliškiausias, α_{s2} -kazeinas, α_{s1} -kazeinas, β -kazeinas hidrofobiškiausias [46]

1.2.2.3. Kazeino micelė

Kazeino frakcijos yra susijungusios į didelius molekulinis kompleksus vadinamus kazeino micelėmis [41]. Micelės viduje išsidėsčiusios aukšto fosforilavimo laipsnio frakcijos (α_{s1} , α_{s2} , β) per fosforilino liekanas kalcio–fosforo tilteliais susijungusios tarpusavyje ir su κ -kazeinu [47]. Nuo agregavimosi kazeiną micelių viduje saugo įvairios hidrofobinės ir elektrostatinės sąveikos, kuriose dalyvauja kalcio–fosforo kompleksai (vidutinis spindulys 2,3 nm), vandeniliniai ryšiai [48]. Kazeino micelės nuo flokuliacijos yra apsaugomos neigiamai įkrautų κ -kazeino grandinių [49]. Galutinė micelių struktūra nėra pilnai žinoma, nors atlikta daug tyrimų ir siūloma keletas modelių. Kol kas visi tyrėjai sutinka, jog kazeino micelės yra polidispersinės, koloidinės, sferinės dalelės, kurių diametras svyruoja nuo 50 iki 600 nm, vidutinis diametras yra 200 nm. Jų dydis priklauso nuo įvairių faktorių, tokių kaip pH (teigiama koreliacija) ar mineralinių elementų (Mg ir K kiekis koreliuoja neigiamai su kazeino micelės dydžiu). Dydžiui įtakos turi sezonas (vasaros metu micelės yra mažesnės lyginat su žiemos

sezonu), individualios karvės mityba, genotipas. Mažesnės kazeino micelės suformuoja stipresnę pieno sutrauką [50].



4 pav. Kazeino micelės schema. Oranžinė spalva vaizduoja α_s - ir β -kazeinus sąveikaujančius su kalcio-fosforo kompleksais $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ (pilki rutuliai) stabilizuodamos vidinį tinklą. Kai kurios β -kazeino molekulės (mėlyna spalva) hidrofobine sąveika jungiasi su kitomis kazeino molekulėmis. κ -kazeino hidrofobinė dalis (N-terminalinė) lokalizuota micelės paviršiuje (žalios dalelės), hidrofiliinė κ -kazeino dalis kazeinomakropeptidas (juoda spalva) nukreiptas nuo micelės į pieno terpę ir sudaro elektrostatinčius ryšius su gretimai esančiomis micelėmis [51]

1.2.3. Pieno technologinės savybės

Europos sąjungos šalys pirmauja pasaulyje pagal eksportuojamo sūrio kiekį. Fermentiniai sūriai užima labai didelę pieno pramonės dalį. Iš 100 kg pieno pagaminama apie 8–16 kg sūrio. Sūrio išėigos optimizavimas yra labai svarbus procesas pieno pramonei [52]. Pieno koaguliavimo savybės yra svarbus faktorius sūrių gamybos kokybiniu ir kiekybiniu požiūriais. Joms įtakos turi kazeino frakcijų kiekybinė sudėtis, riebalų kiekis, riebalų ir baltymų santykis, joninio kalcio kiekis. Kazeino koaguliacija gali būti pasiekama dviem būdais – rūgštiniu ir fermentiniu. Rūgštinės koaguliacijos procesas naudojamas rūgščių pieno gaminių gamybai – jogurtui, kefyrui bei varškės sūriams ir kt. Kiekvienais metais pagaminama daugiau nei 25 milijonai tonų fermentuotų pieno produktų [50]. Pieno tinkamumui perdirbti į produktus svarbios ir fizikocheminės savybės, tokios kaip termostabilumas, buferinė talpa.

1.2.3.1. Pieno koaguliacijos savybės

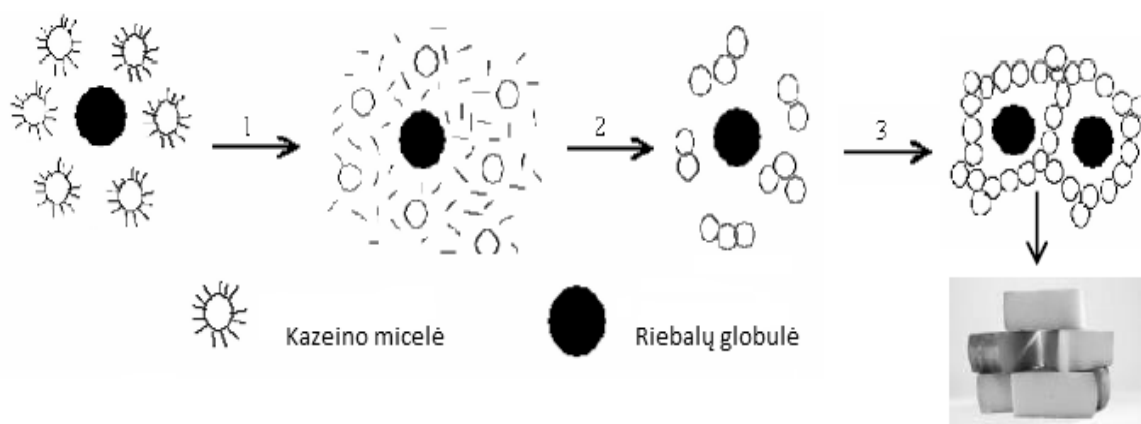
Pieno koaguliacijos savybės gali būti nustatomos naudojant kompiuterizuotus mechaninius ir optinius prietaisus kurie fiksuoja kaip keičiasi sutraukos tvirtumas bėgant laikui. Pagrindiniai trys parametrai apibrėžiantys pieno fermentinės koaguliacijos savybes yra koaguliacijos trukmė, parodanti per kiek laiko nuo fermento įdėjimo pradžios susidaro gelis, sutraukos sutvirtėjimo laikas, parodantis per kiek laiko nuo traukinančio agento įdėjimo į pieną gelio tvirtumas pasiekia tam tikrą vertę (20 mm), sutraukos tvirtumas praėjus 30 min. nuo fermento įdėjimo į bandinį pradžios. Braižomos koaguliacijos diagramos. Metodas, skirtas matuoti pieno bandinių klampos didėjimą nuo agento įdėjimo į bandinį pradžios, palaikant pastovią temperatūrą, vadinamas laktodinamografija [53]. Kitas tiesioginis metodas skirtas pamatuoti chimozino indukuojamo gelio susidarymo savybes – matavimas reometru, veikiančiu dinaminio mažo periodo deformavimo režimu. Koaguliacijos pradžia (trukmė) nustatomas kaip G' (elastingumo) ir G'' (klampumo) modulių susikirtimo taškas, arba kai G' pasiekia 1 Pa vertę [54].

Nekoaguliuojančio (NK) pieno grupei priskiriamas pienas kuris nesudaro gelio per 60 min. nuo chimozino pridėjimo pradžios, gerai koaguliuojančiu pienu laikomas tas pienas, kuris sudaro sutrauką per mažiau nei 10 min. analizuojant reometru, veikiančiu dinaminio mažo periodo deformavimo režimu. Silpnai koaguliuojantis pienas apibrėžiamas kaip sudarantis silpną gelį, kurio G' reikšmė maža (<350 Pa). Į gerai koaguliuojantį pieną įpylus blogai koaguliuojančio pieno, susidariusio gelio kokybė yra blogesnė [55], o tai labai svarbų sūrių gamybos išeioms.

NK pieną mokslininkai tyrinėja nuo 1920–ųjų metų [56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66]. Tokio pieno priežastys nėra suprastos iki galo, dėl to, kad dar nėra išaiškinta kazeino micelės struktūra ir pieno koaguliacijos proceso kompleksiskumas, kuris priklauso nuo daugelio veiksnių. Buvo pripažinta, kad NK pienas, kuris dažniausiai būdingas vėlyvos laktacijos [67, 68] arba mastitu sergančioms karvėms [62, 68], yra paplitęs ir tarp sveikų, vidutinės laktacijos karvių [60, 69]. Taigi, šis reiškinys priklauso ne tik nuo aplinkos veiksnių. Nustatyta, jog veisliniai buliai, kurių dukterys gamina NK pieną, skiriasi genetiškai. Buvo identifikuoti du genai, galimai susiję su NK pieno gamyba [69]. Tačiau genetinis polinkis gaminti NK pieną nepaneigia didelės aplinkos bei sudėties veiksnių įtakos pieno koaguliacijai. Paskelbti duomenys, kad padidinus kalcio kiekį galima sugrąžinti koaguliacijos savybę NK pienui, tiesa, pasiekti gerai koaguliuojančio pieno savybių nepavyko [70].

Fermentinė koaguliacija

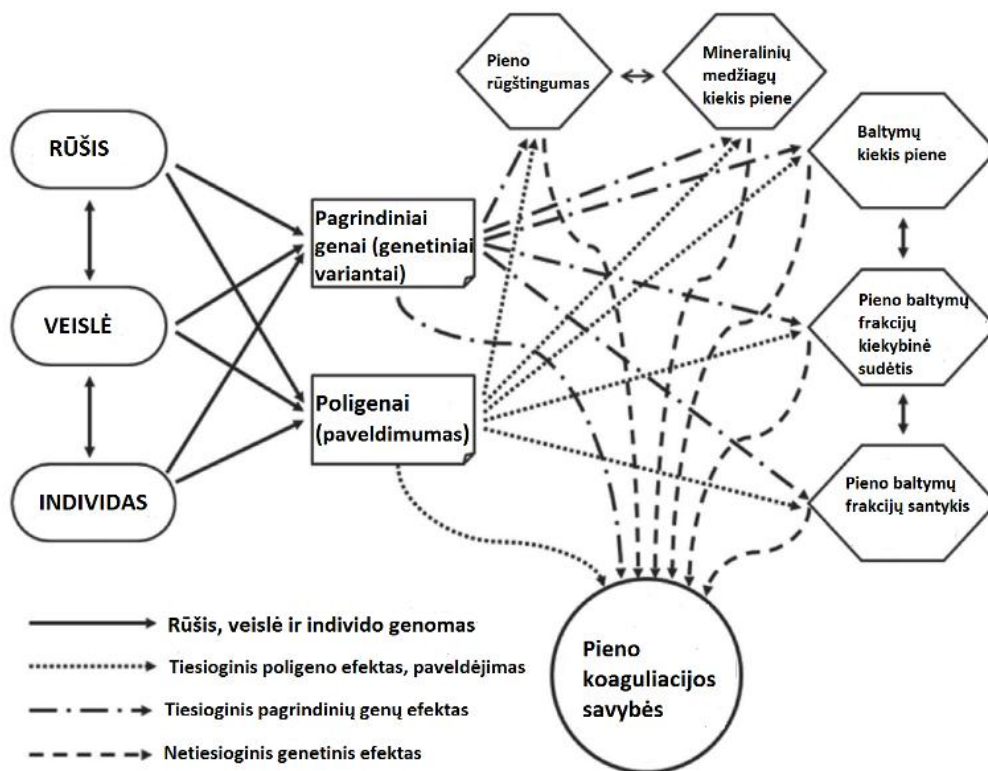
Fermentinė koaguliacija yra pagrindinis žingsnis sūrio gamybos procese. Fermentinis gelis susidaro trimis etapais (5 pav.). Pirmo etapo metu aktyvus proteolitinis fermentas destabilizuoja kazeino micelę suskaldydamas κ -kazeino peptidinę jungtį tarp fenilalanino ir metionino, esančią 105–106 padėtyje, į neigiamai įkrautą para- κ -kazeiną ir glikomakropeptidą. Frederiksen ir kt. [55] atliko kazeino makropeptido aptikimo testą. Junginys atpalaiduojamas prasidėjus gelio susidarymo procesui. Tiek koaguliuojančiame, tiek NK piene po fermento įdėjimo kazeino makropeptidas identifiкуotas, taigi įrodyta, jog nekoaguliavimo priežastimi nėra κ -kazeino skaldymo procesas. Suardžius 85–90 % micelių κ -kazeino apvalkalo tarp dalelių labai sumažėja elektrosstatinės atostūmio jėgos ir dispersinė sistema pasidaro nestabili. Prasideda antras etapas – kazeino micelių agregacija, kurios rezultatas – gelio susidarymas tarp kazeino fragmentų atsirandant elektrocheminiams ryšiams ir tinklo struktūroj inkorporuojant vandeninę pieno terpę su ištirpusiais elementais bei riebalų globulėmis. Fermentinė pieno sutrauka yra kondensacinės struktūros. Micelės agreguojasi, procesas trunka 0,5–2 val. Jei gelio susidarymo laikas yra ilgas, dėl chimozino ar kitų natyvinių pieno proteolitinių fermentų veikimo gali būti sukeltas sinerezės procesas, dėl kurio gaunama silpnesnė pieno fermentinė sutrauka [48,71].



5 pav. Fermentinio gelio susidarymo schema

Veiksniai, lemiantys pieno fermentinio koaguliavimo savybes

Laikas, per kurį susidaro gelis, ir gelio stiprumas priklauso nuo daugelio tiesioginių ir netiesioginių faktorių (6 pav.), tokių kaip baltymų (kazeino frakcijų sudėtis) sudėtis ir kiekis, temperatūra, pH, tačiau manoma, kad didžiausią įtaką turi κ -kazeino genetinis variantas [72].



6 pav. Tiesioginiai ir netiesioginiai veiksniai, darantys įtaką pieno koaguliacijos savybėms [53]

Fermentinės sutraukos susidarymo laikui ir stiprumui įtakos turi kazeino micelių dydis – mažesnės micelės sudaro stipresnį gelį per trumpesnę laiko tarpą. Nustatyta, jog geresnėmis fermentinio gelio susidarymo savybėmis pasižymi B genetinis κ -kazeino variantas, šio tipo piene kazeino micelės yra mažesnės [72]. Žinoma, jog pH koreliacija su kazeino micelių dydžiu teigiama, o mikroelementų Mg ir K neigiama [50]. Didesnis kalcio kiekis sutrumpina gelio susidarymo trukmę, sutrauka gaunasi tvirtesnė. Joninės formos kalcio koncentracijai didėjant nuo 2,5 mMol iki 5 mMol para-kazeino paviršius įsikrauna ir todėl didėja agregacijos tempas [73]

Nustatyta, jog kazeino frakcijų genotipas turi įtakos pieno technologinėms savybėms. Tiek Danijos holšteinų tiek Džersių veislės karvių NK piene α_{s1} -, β -, κ -kazeinų genotipai atitinkamai yra BB-A²A²-AA. Blogai koaguluojantis ir NK pienas turi mažiau fosforilintos α_{s1} -kazeino frakcijos formos α_{s1} -CN 8P, bei mažiau glikolizuoto κ -kazeino palyginus su bendru κ -kazeino kiekiu [32]. Poulsen ir kt. [74] taip pat įrodė, jog genetinis polimorfizmas turi didelę reikšmę sutraukos susidarymo greičiui ir tvirtumui – CSN1S1-C, CSN2-B, CSN3-B aleliai turi teigiamą poveikį, CSN2-A² – neigiamą. Tyrėja padarė išvadą, jog selekcijos būdų turėtų būti veisiamos karvės su tam tikrais kazeino genais, kad būtų galima gauti maksimalias sūrio išėigas. Hallen ir kt. [75] nustatė, kad κ -kazeino B alelis turi teigiamą poveikį gelio stiprumui, κ -kazeino AE genotipas neigiamą; β -kazeinas A²A² variantas siejamas su silpnesnio gelio susidarymu.

Prastomis koaguliavimo savybėmis pasižyminčiame piene yra sąlyginai mažas κ -kazeino kiekis, arba mažas κ -kazeino santykis su bendru kazeino kiekiu. Nustatyta, jog κ -kazeino kiekis didesnis B genotipo κ -kazeino frakcijoje nei A genotipo. Padaryta išvada, jog sūrio gaminimo ir išėigos savybės galėtų būti pagerintos atrenkant gamybai pieną, kuriame yra didelė α_{s1} -, β - ir κ -kazeinų koncentracija [66].

Rūgštinė koaguliacija

Rūgštinė sutrauka gaunama sumažėjus terpės pH iki kazeino izoelektrinio taško pH 4,6. pH mažėja dėl pienarūgščių mikroorganizmų išskiriamų organinių rūgščių, kurios gaunamos fermentuojant pieno cukrų laktozę. Kazeino izoelektrinis taškas pasiekiamas kai terpėje susidaro vienodas teigiamų ir neigiamų krūvių kiekis. Tokioje aplinkoje vyksta baltymų makromolekulių konformaciniai pokyčiai, micelių viduje esančių organinių kalcio ir fosforo junginių tirpumas sumažėja, organinio kalcio–kazeino kompleksas demineralizuojasi, micelinė struktūra suyra. Kazeino micelės disperguojasi ir sudaro vandenyje netirpius agregatus, kurie sudaro erdvinį tinklą. Procesas, priklausomai nuo naudojamų mikroorganizmų kultūrų, gali užtrukti iki 15 val. Pagal kazeino micelių tarpusavio jungčių pobūdį rūgštinė pieno sutrauka yra koaguliacinės struktūros [73].

Imituoti pienarūgščių bakterijų išskiriamų rūgščių efektą pieno baltymų sistemos koaguliavimui tyrimuose naudojamas gliukono-delta-laktonas (GDL). Vandeninėje terpėje laktonas skyla į rūgštį, lėtai išskirdamas H^+ joną į terpę, taip palaipsniui mažindamas pieno sistemos pH iki kazeino izoelektrinio taško (pH 4,6) [76].

Veiksniai, lemiantys rūgštinės koaguliacijos savybes

Rūgštinio gelio stiprumas ir klampumo bei elastingumo savybės geresnės, kai sutrauka gaminama iš termiškai apdoroto pieno. Pieną pakaitinus iki 90–95 °C temperatūros denatūruoja išrūgų baltymai ir nusėda ant kazeino micelių, sudarydami hidrofobines ir sulfidines sąveikas su micelės paviršiumi, taip pradėdami formuoti gelio struktūrą [7].

Pieno baltymų genetinio polimorfizmo įtaka rūgštinės koaguliacijos savybėms kol kas nėra nustatyta. Atlikti tyrimai rodo, jog nei β -kazeino nei κ -kazeino genetiniai variantai neturi reikšmės rūgštinės sutraukos susidarymo laikui ir gelio stiprumui, tačiau gaminant varškę ir kitus fermentuotus pieno produktus iš tokių karvių pieno, kurios turi κ -kazeino AB ir β -laktoglobulino BB genetinius tipus, produktų išeiga padidėja iki 7 %, pagerėja skonio savybės ir konsistencija. [77].

1.2.3.2. Termostabilumas

Termostabilumas yra pieno, grietinėlės, sterilizuotų sutirštintų produktų, koloidinių sistemų savybė išlaikyti baltymų stabilumą, esant aukštai temperatūrai, be matomų koaguliacijos požymių. Šiluminė pieno koaguliacija yra laikoma sudėtingu reiškiniu, kuriam įtakos turi keletas sąveikų ir sąlygų vienu metu. Termostabilumo nebuvimas yra laikomas technologine problema, kurią būtina spręsti ir kuri dažniausiai pasitaiko, gaminant konservuotus pieno produktus. Netermostabilus pienas, šiuo metu tampa, gana dideliu iššūkiu pieno perdirbimo įmonėms. Tokio pieno perdirbimas ne tik paveikia galutinio produkto kokybę, bet yra žalingas ir technologiniuose procesuose naudojamai įrangai.

Pieno termostabilumui nustatyti taikomas šiluminio atsparumo metodas, kai pienas kaitinamas 140 °C temperatūroje. Šiuo metodu pieno termostabilumas vertinamas pagal baltymų terminio koaguliacijos trukmę. Pieno terminė koaguliacija prasideda, kai kaitinimo metu denatūruoja išrūgų baltymai ir nusėda ant kazeino micelių sudarydami specifinius disulfidinius ryšius su jos paviršiuje esančiomis para-κ-kazeino cisteino molekulėmis. Manoma, jog kaitinimo metu keičiasi ir sąlyginai karščiui atsparios kazeino micelės paviršinio sluoksnio išsidėstymas arba struktūra, kadangi neaišku, koku kitu mechanizmu β-laktoglobulino molekulės galėtų „prasibrauti“ pro hidrofilinį makropeptidų sluoksnį iki para-κ-kazeino grandinės [78]. Pieno stabilumą kaitinimo metu mažinantys veiksniai – pH sumažėjimas, koloidinio kalcio fosfato persigrupavimas micelės viduje, išrūgų baltymų asociacija su kazeinu, kazeino defosforilinimas, kazeino hidrolizė, kovalentinių ryšių susiformavimas. Veiksniai, kurie pailgina pieno terminio stabilumo trukmę – joninio kalcio aktyvumo sumažinimas, kazeino jautrumo kalcio jonams sumažinimas, laktozės produktų skilimas [79].

1.2.3.3. Buferiškumas

pH sumažėjimas piene gali sukelti jo nepageidaujamus fizikocheminius pokyčius, tokius kaip kazeino micelės demineralizavimas, tirpumo sumažėjimas. Galimi pH pokyčiai kaitinimo metu gali būti įvertinti matuojant buferiškumą. Į pieną įpylus tam tikrą kiekį rūgšties ir palaikius 1 val. nustatomas pieno pH pasikeitimas similiarus pH pokyčiui kaitinant pieną nuo 20 °C iki 120 °C [80]. Buferiškumas priklauso nuo pieno sudėties – mažais kiekiais randamų komponentų (neorganinio fosfato, citrato, organinių rūgščių) ir pieno baltymų (kazeino ir išrūgų baltymų) koncentracijos bei veislės, laktacijos, gyvūno sveikatos būklės. Nustatyta, jog Džersių veislės karvių pienas, kuriame yra didesnis baltymų ir fosforo kiekis, pasižymi didesne buferine talpa nei Holšteinų veislės [81, 82].

1.3. Pieno baltymų biologinė kokybė

Maisto baltymai, peptidai ir aminorūgštys atlieka daug fiziologinių funkcijų, tokių kaip baltymų sintezė organizme, dalyvauja virškinimo sistemos veiklos palaikyme bei metabolizmo procesuose, ACE inhibitorinėmis savybėmis apsižymintis baltyminės kilmės junginiai reikalingi normaliam kraujospūdžiui palaikyti ir kt. [83]. Pagal mitybos specialistų rekomendacijas baltymai turi sudaryti apie 30 % dienos raciono. Baltymų biologinė vertė nustatoma analizuojant ne tik nepakeičiamų aminorūgščių kiekį atpalaiduojamą dėl proteolizės virškinimo metu, bet ir biologiškai aktyvių peptidų susidarymą. Pagal šias savybes galima prognozuoti baltymų pasisavinamumą. Bioaktyvių peptidų fiziologinis poveikis pasireiškia jiems patekus į kraują pro žarnų epitelio sieneles. Atliekama daug tyrimų, siekiant ištirti bioaktyvių peptidų susidarymo ir veikimo sistemas [84] nuo kurių priklauso maisto baltymų biologinė kokybė.

1.3.1. Virškinamumas

Žmogaus virškinamajame trakte maisto produktų skaidymas iki monomerų vyksta keliais etapais. Burnoje produktas pirmiausia apdorojamas mechaniškai, t.y. sukramtomas, padidinamas paviršiaus plotas. Seilių liaukų išskiriami fermentai maltazė ir amilazė pradeda krakmolo skaidymą, čia pH 7,5–8. Skrandyje pradedamas baltymų virškinimas, susidaro peptidai, aminorūgštys. Pagrindinis proteolitinis agentas – pepsinas. Šis fermentas aktyvus tik rūgščioje terpėje (skrandžio pH $2,0 \pm 0,2$ nulemia esančios druskos rūgšties koncentracija). Virškinimo skrandyje fazėje baltymai nesuskaidomi iki galo. Baltymai visiškai hidrolizuojami žarnyne, kuriame terpės pH 7, veikiant pankreatino peptidazėms, tripsinui, chimotripsinui. Kasos išskiriamose sultyse yra lipazės, kuri skaido tulžies druskų emulguotus riebalus iki glicerolio ir riebiųjų rūgščių, maltazės, suskaidančios krakmolo amilolitinio skilimo produktus iki gliukozės ir proteolitinio fermento tripsino. Mažamolekulius junginius organizmas pasisavina pro žarnų sieneles [85].

Maisto produktų virškinamumui tirti naudojami įvairūs modeliai. Dažniausiai taikomas virškinamumo tyrimas modifikuotoje *in vitro* sistemoje naudojant dirbtines arba natūralias žmogaus virškinamojo trakto sultis. Bandiniai imami tam tikrais laiko intervalais ir analizuojami. Metodas leidžia įvertinti skirtumus tarp substratų virškinamumo, virškinimo produktų pasisavinamumo ir naudingumo bei kt. Sistemos parametrai, fermentai, jų aktyvumai ir elektrolitai parenkami tokie, kad gauta visuma būtų kuo artimesnė fiziologiniam procesui, pavyzdžiui peristaltiniai virškinamojo trakto judesiai imituojami bandinį maišant, eksperimentų metu palaikoma temperatūra artima žmogaus vidinei temperatūrai – 37 °C [86].

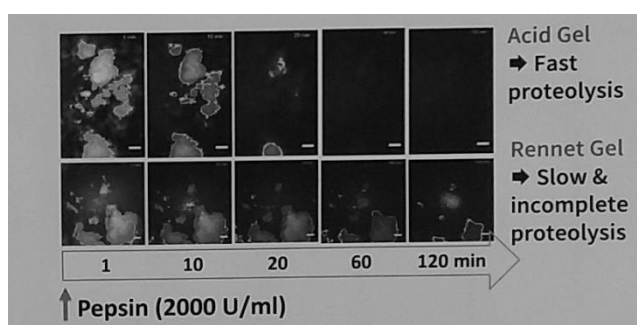
Maisto produktai, turintys tokią pačią cheminę sudėtį gali turėti skirtingą struktūrą bei maistinę vertę. Žinios apie maisto komponentų fizikinę elgesį virškinimo metu leidžia išstobulinti produktų apdorojimo metodus taip, jog individo organizmas pasisavintų maksimalų kiekį naudingų medžiagų per optimalų laiką.

1.3.1.1. Pieno baltymų virškinimas

Baltymai visiškai hidrolizuojami žarnyne, kuriame terpės pH 7, veikiant pankreatino peptidazėms, tripsinui, chimotripsinui. Pieno baltymų hidrolizės produktai – aminorūgštys ir peptidai naudingi ne tik mitybiniu atžvilgiu, bet ir dėl bioaktyvių peptidų, kurie žmogaus organizmu turi teigiamą biofunkcinę naudą (5 lentelė). 6-8 aminorūgščių ilgio peptidų grandinės dažnai atsparios tolimesnei hidrolizei ir gali būti pasisavintos per žarnų epitelio sienelės [87, 88].

Atlikta daug tyrimų, kuriuose analizuojama tam tikrų pieno produktų virškinamumas. Žinoma, jog skirtingi virškinimo rezultatai gaunami tiriant skirtingo riebumo pieną [89] virškinimui įtakos turi substratų mikrostruktūra [83], baltymų proteolizė skirtinga lyginant skystus ir pusiau skystus produktus [90], virškinimo dinamika priklauso nuo kazeino ir išrūgų baltymų santykio [91]. Barbe ir kt. [41] atliko tyrimą, kuriame tyrė iš to paties pieno pagamintų skirtingų sutraukų virškinamumo skirtumus (ta pati cheminė sudėtis ir panašios reologinės savybės) – baltymų proteolizę ir aminorūgščių absorbciją. Rezultatai parodė, jog virškinimo skirtumai yra labai akivaizdūs. Fermentinė sutrauka virškinama lėčiau, iš jos atpalaiduojama mažiau aminorūgščių, nei iš rūgštinės sutraukos [41].

Tai, kad rūgštinė sutrauka yra virškinama daug greičiau akivaizdžiai matomas žemiau pateiktoje iliustracijoje.

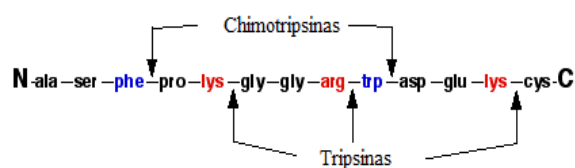


7 pav. Rūgštinio ir fermentinio gelio virškinimo mėginių nuotraukos darytos elektroniniu mikroskopu. Rūgštinis gelis (angl. *Acid gel*) veikiamas pepsino (angl. *Pepsin*) hidrolizuojamas greičiau nei per 60 min, tuo tarpu fermentinio gelio hidrolizė yra lėtesnė ir nesibaigia per 120 min. [41]

Pieno baltymų hidrolizės tyrimai virškinimo metu atliekami kaip substratą naudojant ne tik įvairius pieno produktus, bet ir išgrynintus baltymus arba jų frakcijas – β -laktoglobuliną, β -kazeiną, κ -kazeiną [44, 48].

1.3.2.2. Virškinimo fermentai

Proteolitiniai virškinimo fermentai skirstomi į dvi pagrindines grupes – egzopeptidazes ir endopeptidazes. Egzopeptidazės neturi specifinio veikimo, hidrolizuoja baltyminių substratų atskeldamos po vieną aminorūgštį nuo grandinės krašto. Virškinimo fermentai pepsinas, tripsinas, chimotripsinas yra endopeptidazės ir hidrolizuoja tik peptidines jungtis tarp tam tikrų aminorūgščių atskeldamos peptidų grandines. Tripsinas ardo jungtis tik tarp lizino ir arginino (nuo C-terminalinės pusės), chimotripsinas hidrolizuoja jungtis tarp hidrofobinių aminorūgščių – fenilalanino, tirozino, triptofano, taip pat tarp leucino ir metionino (8 pav.) [92]. Pepsinas gali hidrolizuoti sąlyginai visas peptidines jungtis, tačiau pirmiausia substratu tampa jungtis tarp hidrofobinių aminorūgščių ir su leucinu sujungtų aromatinių aminorūgščių [93].



8 pav. Virškinimo fermentų veikimas

1.3.2. Bioaktyvūs peptidai

Žmogaus mitybai baltymų hidrolizės produktai svarbūs ne tik kaip mitybinių elementų šaltinis, bet ir kaip bioaktyvūs junginiai arba prekursoriai. Peptidų aktyvumas priklauso nuo būdingų aminorūgščių sudėties ir sekos. Būdingas bioaktyvių peptidų aminorūgščių sekos ilgis yra nuo 3 iki 20. Maži peptidai (2–3 a.r. ilgio) greičiau absorbuojami, per žarnyno membranas juos perneša aktyvios pernašos sistemos. Didesni virškinimo metu susidarantys peptidai taip pat gali būti pernešti pro membranas esant tam tikroms aplinkybėms, pavyzdžiui uždegiminėms ligoms [93]. Po virškinimo atpalaiduoti tiek dipeptidai, tripeptidai, tiek kazeinomakropeptidas (64 a.r. grandinė, 8000 Da) randami žmogaus kraujo plazmoje, serume, piene [94].

Bioaktyvūs peptidai naudingi ligų, ypač neužkrečiamų, tokių kaip nutukimas, diabetas, vėžys prevencijai. Žinomos jų funkcijos pateiktos 5 lentelėje [95].

5 lentelė. Iš pieno baltymų gaunamų bioaktyvių peptidų funkcijos [95]

Funkcija	Peptidų grupė
Virškinimo sistemos gerinimas	Antimikrobiniai Imunomodulatoriai Opioidai
Širdies ir kraujotakos sistemos gerinimas	ACE inhibitoriai (ACE - angiotensiną konvertuojantys fermentai) Antitrombotiniai Anti cholesteroliniai Anti hipertenziniai
Imuninė apsauga	Imunomodulatoriai Citomodulatoriai
Nervų sistemos stiprinimas	Opioidai
Kaulų sveikata	Kalcį surišantys peptidai Laktoferinas
Svorio reguliavimas	Sotumą sukkeliantis glikomakropeptidas Opioidai

Bioaktyvūs peptidai iš pieno baltymų gali būti gauti tokiais būdais: pieno fermentacija proteolitinėmis startinėmis kultūromis, proteolitiniais mikrobiologinės ar augalinės kilmės fermentais arba fermentinė hidrolizė virškinimo fermentais [96].

Nustatyta, jog kazeino virškinimo imitavimo metu gaunamas panašus fosfopeptidų profilis kaip ir po kazeino hidrolizės tripsinu. Fosfopeptidai tampa sąlyginai atsparūs tolimesnei hidrolizei, manoma, jog jie apsaugo metalų jonus nuo nusėdimo šarminėje terpėje žarnyne, todėl yra naudingi mineralinių medžiagų pasisavinimui. Daugiausia fosfopeptidų gaunama iš α_{s1} -kazeino frakcijos 43–59, 45–55, 59–79, 66–74, 60–74, 106–119, β -kazeino frakcijos 1–25, 30–50, 1–28, α_{s2} -kazeino 2–21, 56–70, 55–75, 126–136, 138–149 a.r. sekų regionų [97, 98]

Pastaraisiais metais atlikta nemažai tyrimų kuriuose nustatyt ir rūgštinio gelio produktų virškinimo metu susidarantys peptidai (jogurto) [99, 100] bei iš fermentiniu būdu traukinto pieno pagamintų sūrių virškinimo metu susidariusių bioaktyvių junginių profiliai bei savybės: ACE inhibitoriai (β -kazeino 108–113, 114–121, 177–183, 193–202, 193–198 a.r. sekos fragmentai, α_{s1} -kazeino frakcijos 90–94, 143–149 a.r. sekos fragmentai, α_{s2} -kazeino 89–95 a.r. sekos fragmentas) [101, 102, 103] opioidai β -kazomorfinai (β -kazeino 60–66 a.r. sekos fragmentas) [104] bei jų antagonistai (α_{s1} -kazeino frakcijos 90–95, 90–96, 91–95 a.r. sekos fragmentai, κ -kazeino – 35–41, 58–61, 25–34, 158–164 a.r. sekos fragmentai) [102], antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys peptidai (β -kazeino 1–25 a.r. sekos fragmentas) [105, 106]. Antimikrobinėmis savybėmis pasižymi iš κ -kazeino atskeliami peptidai (106–116, 106–112, 113–116, 103–111 a.r. sekos fragmentai) [102].

2. TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Lietuvoje saugomos vietinės galvijų veislės – Lietuvos senojo genotipo juodmargių galvijų populiacija, didėja [27]. Yra atlikta tyrimų, kuriuose analizuojama selekcijos įtaka (Holšteino kraujo dalies didinimas) Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių produktyvumui, sudėties rodikliams bei eksterjerui, [13, 107], tačiau iki šiol netyrinėtos vietinės galvijų veislės pieno technologinės savybės. Pasaulyje atliekami tyrimai, kuriais siekiama išsiaiškinti, kokiems produktams gaminti yra tinkamiausias tam tikros galvijų veislės pienas. Žinoma, kad pieno technologinės savybės priklauso nuo jo sudėties rodiklių, daugiausiai įtakos joms turi kalcio koncentracija bei kazeino kokybinė sudėtis ir genotipas [55, 66, 74]. Priklausomai nuo baltymų sudėties ir apdorojimo būdo, skiriasi jų virškinamumas, o tuo pačiu ir potenciali nauda vartotojui, dėl bioaktyvių medžiagų atpalaidavimo baltymų hidrolizės metu [41].

Apžvelgus literatūrą matoma, jog Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno sudėties, technologinių savybių ir iš jo pagamintų baltyminių produktų virškinamumo tyrimai nėra atlikti, tačiau reikalingi, kad būtų galima parinkti visapusiškai geriausią vietinės galvijų veislės gaminamo pieno perdirbimo būdą.

Tyrimų tikslas – įvertinti Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno baltymų kiekybinę ir kokybinę sudėtį bei technologines savybes ir nustatyti iš jų pieno pagamintų baltyminių produktų biologinę vertę, tiriant produktų virškinamumą *in vitro* bei nustatant biologiškai aktyvių peptidų atpalaidavimą virškinamajame trakte.

Tikslui pasiekti iškelti **uždaviniai**:

1. Nustatyti Lietuvos senojo genotipo juodmargių galvijų pieno baltymų kiekybinę ir kokybinę sudėtį bei kitų pieno sudėties komponentų kiekį ir įvertinti sezono įtaką šiems rodikliams.
2. Nustatyti Lietuvos senojo genotipo juodmargių galvijų pieno technologines savybes ir įvertinti sezono įtaką šiems rodikliams.
3. Nustatyti koreliacinį ryšį tarp Lietuvos senojo genotipo juodmargių galvijų pieno sudėties ir technologinių rodiklių.
4. Įvertinti iš Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno ir iš Holšteino veislės karvių pieno pagamintų fermentinės bei rūgštinės sutraukų virškinamumą *in vitro* metodu.
5. Nustatyti iš Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno ir iš Holšteino veislės karvių pieno pagamintų fermentinės bei rūgštinės sutraukų virškinimo metu susidaranciu bioaktyvių peptidų profilį ir įvertinti jų potencialią įtaką vartotojų sveikatai.

3. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

3.1. Tyrimų medžiagos

Tyrimui naudoti individualių Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno mėginiai. Tyrimui buvo atrinkta 20 karvių, auginamų Alytaus rajone 5 ūkiuose. Kiekvienos karvės rytinio melžimo pieno mėginiai buvo surenkami kas mėnesį (nuo 2016 m. balandžio iki 2017 m. balandžio mėn.). Iš viso surinkta ir ištirta 219 pieno mėginių.

Pieno bandiniams konservuoti naudotas konservantas „Broad Spectrum Microtabs“ (Advanced Instruments, Inc; Masačusetas, JAV). Koaguliacijos savybių tyrimams naudoti: mezofilinis raugas (Yo-Flex®, "BalvitaLT".), fermentas chimozinai (Chr. Hansen, Danija) ir GDL (G4750, Sigma-Aldrich). Kazeino kokybinei analizei naudoti standartai (β -kazeinas iš galvijų pieno, 250 mg, α_{s1} -kazeinas iš galvijų pieno – >70 % α_{s2} -kazeino pagrindas, liofilizuoti milteliai, 250 mg, κ -kazeinas iš galvijų pieno – >70 % κ -kazeino pagrindas, liofilizuoti milteliai 100 mg) bei cheminiai reagentai bandiniams paruošti, pirkti iš UAB "Labochema LT". Virškinamumo imitavimui *in vitro* naudotos medžiagos: fermentai (Pepsin A, 601 U/mg, P7000, Pancreatin, 4xUSP, P1750, Bile, B8381) pirkti iš "Sigma-Aldrich" (Vokietija); NaCl (Chempur, Pekarai, Lenkija); Na₂HCO₃ (Lach-ner, Neratovicė, Čekijos Respublika). Fluoresaminės analizės reagentai: TCA; HCl; natrio tetraboratas; bevandenis acetonas; fluramas; L-Leucinas; bei *SCh-ESI-MS/MS* analizės reagentai TEAB, DTE, IA pirkti iš "Sigma-Aldrich" (Vokietija). Elektroforezei naudotos medžiagos ir reagentai pirkti iš "Fisher-scientific" (JAV).

3.2. Pieno mėginių paruošimas sudėties ir technologinių savybių analizei ir tyrimo organizavimas

Ryte pamelžto pieno mėginiai atšaldomi iki +4 °C temperatūros ir padalinami į dvi dalis. Į vieną dalį pieno įdedama konservanto ir ji vežama į VĮ „Pieno tyrimai“. Į kitą dalį pieno konservanto nededama, pienas vežamas į KTU Maisto mokslo ir technologijos katedrą.

VĮ „Pieno tyrimai“ buvo nustatomi šie pieno mėginių sudėties ir kokybės rodikliai: baltymų kiekis, riebalų kiekis, laktozės kiekis, urėjos kiekis, somatinių ląstelių kiekis.

KTU Maisto mokslo ir technologijos katedroje buvo nustatomi šie pieno bandinių sudėties, kokybės ir technologinių savybių rodikliai: pieno baltymų kokybinė ir kiekybinė sudėtis: β -laktoglobulinas, α_{s1} -kazeinas, α_{s2} -kazeinas, β -kazeinas, κ -kazeinas, kalcio kiekis, pH, fermentinės koaguliacijos savybės, rūgštinės koaguliacijos savybės, termostabilumas, buferiškumas.

3.3. Pieno sudėties nustatymo metodai

Baltymų, riebalų, laktozės ir urėjos kiekis

Šių pieno sudedamųjų dalių kiekiai nustatomi iš to paties pieno mėginio. Prieš tyrimą pieno mėginiai pašildomi vandens vonelėje iki 40 °C ir pavartomi, kad vienodai pasiskirstytų riebalai. Riebalų, baltymų ir laktozės kiekiai nustatomi rutininio metodu infraraudonųjų spindulių prietaisu Lactoscopu „LactoScope FTIR” (FT 1.0. 2001; Delta Instruments, Olandija). Tiriant matuojama kiekvieno komponento (riebalų, baltymų, laktozės) vidutinių infraraudonųjų spindulių specifinio bangų ilgio absorbcija. Pagal sugertos energijos kiekį ir yra skaičiuojamas šių pieno sudedamųjų dalių kiekis (LST ISO 9622:2000).

Kazeino frakcijų kokybinė ir kiekybinė sudėtis chromatografiniu metodu

Kazeino frakcijų ESCh analizė atlikta pagal modifikuotą Bonizzi ir kt. [40] metodiką aprašytą žemiau. Kiekvienos frakcijos atitinkamas kiekis ištirpintas 10 ml denatūruojančio urėjos tirpalo (tirpalą sudarančių komponentų koncentracijos: 8 M urėja, 165 mM Tris, 44mM natrio citratas, 0,3 % t/t β-merkaptoetanolis). Iš paruoštų frakcijų tirpalų gaminti skirtingų koncentracijų standartinių tirpalų mišiniai. Pagrindinis standartinis tirpalas paruoštas sumaišant po 1 ml kiekvienos frakcijos tirpalo ir pridedant 2 ml denatūruojančio tirpalo. Paskiedimo laipsnis kiekvienai frakcijai šiame etape yra lygus 5. Iš šio standarto tirpalo paruošti keturi skirtingų skiedimų standartų tirpalai. Skiedimo schema ir kazeino frakcijų koncentracijos praskiestuose tirpaluose nurodytos 6 lentelėje.

6 lentelė. Standartų koncentracijos frakcijų tirpalų mišiniuose, reikalinguose kalibracinėms kreivėms sudaryti

Skiedimo Nr.	Skiedimo schema		Galutinės koncentracijos, g/l				
	Pagrindinis standartinis tirpalas, ml	Urėjos tirpalas, ml	κ-CN	β-CN	α _s -CN	α _{s1} -CN ^a	α _{s2} -CN ^a
1	0,4	1,6	0,28	0,98	0,70	0,56	0,14
2	0,8	1,2	0,56	1,96	1,40	1,12	0,28
3	1,2	0,8	0,84	2,94	2,10	1,68	0,42
4	1,6	1,6	1,12	3,92	2,80	2,24	0,56

^a – α_{s1} ir α_{s2} kazeinų koncentracijos apskaičiuotos iš α_s-CN, žinant, kad jų santykis atitinkamai 4:1

Analizei naudoti atšildyti kambario temperatūroje lieso pieno mėginiai. 400 μl analizuojamo pieno maišoma su 1600 μl denatūruojančio urėjos tirpalo (sudėtis aprašyta aukščiau). Pieno bandinys filtruojamas per 0,45 μm porų celiuliozinę membraninę filtrą tiesiai į chromatografinės analizės mėgintuvėlį ir analizuojamas.

ESCh įranga: (Shimadzu, Japonija): du siurbliai (LC–30AD), automatinis bandinio paėmėjas (SIL–30AC), termostatas (CTO–20AC), diodų matricos detektorius (SPD–M20A). Naudota atvirkščių fazių kolonėlė C18 (Vydac 2018TP, 5 μm 250 mm x 4,6 mm) ir prieškolonėlė C18 (Vydac 2018TP, 5 μm 7,5 mm x 4,6 mm). Analizė atlikta prie 220 nm bangos ilgio. Naudota kompiuterinė programa – LabSolution. Eliuentas A – 0,1 % tūrio TFA vandenyje, B – 0,07 % TFA acetonitrile. Eliuentų tekėjimo programa: 0 min 4 % eliuento B, 15 min. 25 % eliuento B, 29 min. 45 % eliuento B, 32 min. 90 % eliuento B, 40 min. 4 % eliuento B.

Kalcio kiekio nustatymas

Kalcio kiekis piene buvo nustatytas atominės absorbcinės spektrinės analizės metodu. Analizė atlikta spektrometru (Perkin Elmer AAnalyst 400). Kalcio atomizacijai panaudota liepsna, gauta deginant acetileno ir oro mišinį (C_2H_2 – 2,7 l/min, oras – 10 l/min). Elektromagnetinės spinduliuotės šaltinis – tuščiavidurio katodo kalcio lempa, kurios spinduliuotės absorbcija nesužadintais kalcio atomais buvo matuojama esant 422,67 nm bangos ilgiui. Kalcio koncentracija bandiniuose buvo nustatoma gradavimo grafiko metodu, paruošiant 0,5-2 mg/l etaloninius kalcio tirpalus ir išmatuojant jų optinį tankį. Standartiniu tirpalu buvo naudotas *Jenway* 1000 ppm kalcio tirpalas. Pieno bandiniai buvo ruošiami 100 ml matavimo kolbose, įpilant po 100 μl kambario temperatūros pieno (bandiniai prieš analizę buvo užšaldyti - 20°C temp.) ir praskiedžiant iki matavimo ribos. Kiekvieną kartą ruošiant bandinius įpilta 100 μl pieno dozė buvo pasveriama, kad tiksliai sužinoti jos masę, reikalingą kalcio kiekiui perskaičiuoti į mg/100 g. Kad liepsnoje nesusidarytų kalcio ir fosforo junginiai ir nesumažėtų kalcio signalo intensyvumas, ruošiant pieno bandinius buvo pridedamas 10 ml 1 % koncentracijos lantano priedas. Analogiškas lantano priedas buvo naudotas ir ruošiant etaloninius bei lyginamąjį tirpalus.

3.4. Pieno technologinių savybių nustatymo metodai

Buferiškumas

Pieno buferiškumo nustatymui imama 25 ml pieno ir pH–metru išmatuojamas pieno aktyvusis rūgštingumas pH. Po to į pieną įpilama 4 ml 0,1 M HCl tirpalo. Pienas išmaišomas ir laikomas kambario temperatūroje. Po 1 h išmatuojamas pieno pH. Išmatuotas pH skirtumas prieš valandą ir po 1 valandos atitinka pieno pH kritimą kaitinant pieną nuo 20 °C iki 120 °C [80].

Termostabilumas

Termostabilumui nustatyti naudojamas šiluminio atsparumo metodas. Glicerinu užpildytas termostatas (WiseBath Oil bath 6l, max. temp. 250°C, Witeg, Vokietija) įjungiamas ir įkaitinamas iki (140 ± 1) °C temperatūros. Kai termostate pasiekama reikiama temperatūra pienu užpildyti (apie 10 ml) mėgintuvėliai, gerai užsuktai kamšteliais, atsargiai panardinami į įkaitusį gliceriną ir įjungiamas laikmatis. Kas 3 min mėgintuvėliai ištraukiami ir stebima baltymų koaguliacija. Po 10 min bandinių kaitinimo, mėgintuvėliuose esantis pienas analizuojamas kas 1 min. Mėgintuvėliai su pienu negali būti ištraukiami iš termostato ilgiau kaip 0,5 min. Pastebėjus baltymų koaguliaciją (baltymų dribsnius), fiksuojamas laikas, kuris ir yra pieno termostabilumo rodiklis.

Fermentinės koaguliacijos savybės

Pieno mėginiai atvėsunami iki 4 °C temperatūros ir po 50 ml supilami į centrifugavimo mėgintuvėlius. Centrifuguojama 5000 aps/min. greičiu, 20 min, 4 °C temperatūroje. Po centrifugavimo nuimamas išsiskyręs grietinėlės sluoksnis ir likęs liesas kaitinamas 60 °C temperatūroje 30 min. Po kaitinimo pienas atvėsinaamas iki 4–6 °C temperatūros. Atvėسę pieno mėginiai toliau analizuojami kitą dieną. Liesas pienas pašildomas iki 30 °C temperatūros ir laikomas 10 min. Į pašildytą mėginį įdedama šviežiai paruošto fermento chimozino. tirpalas paruoštas taip, kad į pieno mėginį jo būtų įdedama 0.04 IMCU/1 ml pieno. Išmaišytas mėginys supilamas į reometro analizavimo cilindrą. Matavimai buvo atlikti Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Vokietija) reometru naudojant cilindras–cilindras geometrinę sistemą (vidinio cilindro skersmuo – 25 mm). Reologinių rodiklių matavimo sąlygos: analizės trukmė – 60 min; temperatūra 30 °C; dažnis – 1 Hz; deformacija – 0,003. Reologiniai rodikliai – klampos bei elastingumo moduliai G' ir G'' , nustatomi kas 1 min. Fermentinės koaguliacijos trukmė (FKT) fiksuojama, kai $G' = G''$. Fermentinės sutraukos stiprumas nustatomas kaip G' vertė praėjus 40 min po fermento įdėjimo į pieną.

Rūgštinės koaguliacijos savybės

Pieno mėginiai atvėsunami iki 4 °C temperatūros ir po 50 ml supilami į centrifugavimo mėgintuvėlius. Centrifuguojama 5000 aps/min. greičiu, 20 min., 4 °C temperatūroje. Po centrifugavimo nuimamas išsiskyręs grietinėlės sluoksnis ir likęs liesas kaitinamas 95 °C temperatūroje 5 min. Po kaitinimo pienas atvėsinaamas iki 4–6 °C temperatūros. Atvėسę pieno mėginiai toliau analizuojami kitą dieną. Liesas pienas pašildomas iki 30 °C temperatūros ir laikomas 10 min. Į pašildytą mėginį įdedama 3 % atsverto GDL, išmaišoma. Išmaišytas mėginys supilamas į reometro analizavimo cilindrą. Matavimai buvo atlikti Physica MCR 301 (Anton

Paar, Messtechnik, Vokietija) reometru naudojant cilindras-cilindras geometrinę sistemą (vidinio cilindro skersmuo – 25 mm). Reologinių rodiklių matavimo sąlygos: analizės trukmė – 60 min; temperatūra 30 °C; dažnis – 1 Hz; deformacija – 0,003. Reologiniai rodikliai – klampos bei elastingumo moduliai G' ir G'' , nustatomi kas 1 min. Rūgštinės koaguliacijos trukmė (RKT) fiksuojama, kai $G' = G''$. Rūgštinės sutraukos stiprumas nustatomas kaip G' vertė praėjus 40 min po fermento įdėjimo į pieną.

3.5. Statistinė analizė

Sezoniškumo įtaka pieno sudėties ir technologiniams rodikliams bei koreliacijos tarp jų apskaičiuotos naudojant SAS 9.4 statistinį paketą. Sezoniškumo įtaka, apskaičiuota naudojant Mano-Vitnio-Vilkoksono sumų kriterijų palyginimo metodą, laikyta reikšminga kai $P < 0,05$.

3.6. Mėginių paruošimas pieno baltymų virškinamumo analizei ir tyrimo organizavimas

Eksperimentui atrinktas geromis koaguliacijos savybėmis ir dideliu κ -kazeino kiekiu pasižymintis Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pienas bei palyginimui paimtas Holšteino veislės juodmargės karvės pienas, pasižymintis analogiškomis savybėmis. Tolesniems tyrimams naudoto pieno sudėtis pateikta 7 lentelėje (pavasario ir vasaros sezonų duomenys).

7 lentelė. Rūgštinės ir fermentinės koaguliacijos sutraukų gamybai atrinkto pieno duomenys

Rodikliai		Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pienas		Holšteino veislės juodmargės karvės pienas	
		Vidurkis	SD	Vidurkis	SD
FKT, min.		16,40	3,13	16,80	4,32
G'_{F40}, Pa		65,25	12,26	70,16	10,84
RKT, min.		23,50	2,89	24,1	3,52
G'_{R40}, Pa		70,35	9,15	69,17	11,53
Kazeino frakcijos, g/l	κ	2,92	0,41	3,07	0,34
	α_{S2}	1,79	0,24	1,63	0,43
	α_{S1}	7,92	0,72	7,17	0,45
	β	18,36	1,90	17,73	1,36
	bendras kiekis	31,00	3,02	29,61	2,28
Ca, mg/100g pieno		124,16	3,32	105,76	6,74

Iš šio pieno imituojant pramonėje vykstančius procesus pagaminta po dvi rūgštinės ir fermentinės koaguliacijos sutraukas [108]. Jose nustatyti sausų medžiagų ir baltymų kiekiai, naudojant standartinius metodus. Likę sutraukų bandiniai užšaldyti -20 °C iki baltymų virškinamumo tyrimų. Tolesniems tyrimams naudotų pieno sutraukų sudėtis pateikta 8 lentelėje.

Fermentinės koaguliacijos sutraukos gamyba

Fermentinės koaguliacijos sutrauka gaminta į 1,0 l kiekvienos karvės pieno įdėjus pienarūgščių bakterijų, inkubuota 30 °C temperatūroje apie 2 val. (pH–6,5), tada įdėtas reikiamas kiekis fermento. Praėjus 30 min. nuo fermento įdėjimo pradžios pieno gelis buvo visiškai susidaręs. Siekiant atskirti išrūgas sutrauka buvo pjaustyta 35 °C temperatūroje 35 min., susiformavę varškės grūdeliai supilti į sūrmaišį ir palikti išrūgų nuvarvėjimui 1,5 val.

Rūgštinės koaguliacijos sutraukos gamyba

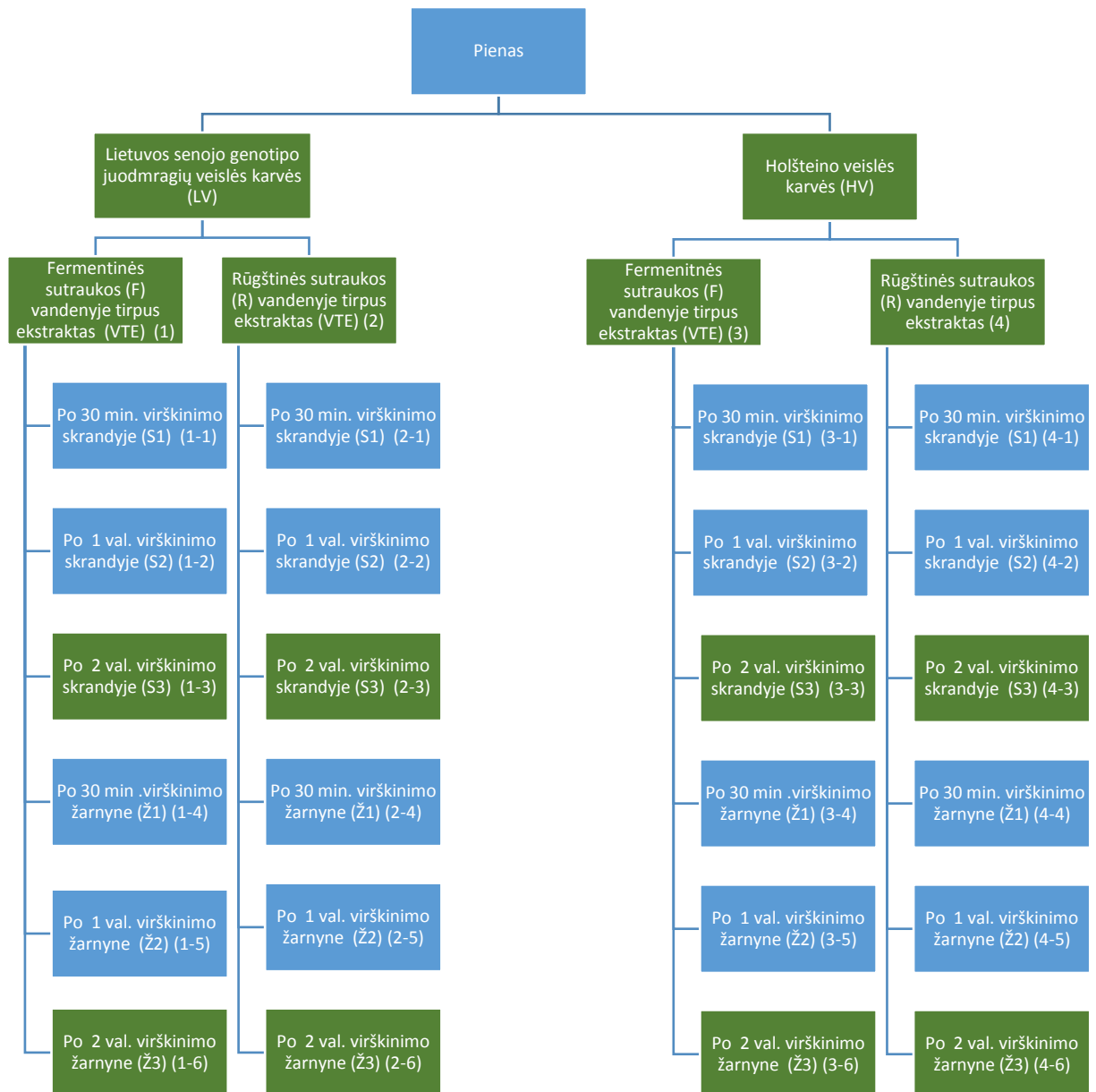
Rūgštinės koaguliacijos sutrauka gaminta į 1,0 l kiekvienos karvės pieno įdėjus reikiamą kiekį mezofilinio raugo. Inkubuota 28 °C temperatūroje. Praėjus 14 val. nuo pienarūgščių bakterijų įdėjimo pradžios pieno gelis buvo visiškai susidaręs (pH–4,5). Siekiant atskirti išrūgas sutrauka buvo pjaustyta keliant temperatūra nuo 28 °C iki 55 °C per 1,5 val., susiformavę varškės grūdeliai supilti į sūrmaišį ir palikti išrūgų nuvarvėjimui 1,5 val.

8 lentelė. Rūgštinės ir fermentinės sutraukos bandinių sudėties rodikliai

Rodiklis	Rūgštinė sutrauka iš:		Fermentinė sutrauka iš:	
	Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pieno	Holšteino veislės juodmargės karvės pieno	Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pieno	Holšteino veislės juodmargės karvės pieno
Drėgmė, %	66,93	67,00	59,36	59,47
Baltymai, %	13,98	14,54	13,75	14,40
Baltymai sausojoje medžiagoje, %	42,26	44,07	33,84	35,53

Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pieno ir iš Holšteino veislės karvės pieno pagamintų fermentinės bei rūgštinės sutraukų virškinamumo tyrimų *in vitro* metodu bandinių schema pateikta 9 paveiksle.

Virškinamumo imitavimo *in vitro* procesas, fluoresamininis aminorūgščių ir peptidų nustatymas bei baltymų proteolizės produktų kokybinė analizė SDS-PAGE metodu atlikti Lietuvoje. Peptidų identifikavimas SCh-ESI-MS/MS metodu atliktas ERASMUS+ praktikos metu Danijoje, Arhuso universitete, maisto mokslo departamente, cheminės analizės laboratorijoje (FOOD) (Aarhus University, Campus Foulum, Blichers Alle20, 8830 Tjele, Denmark).



9 pav. Iš Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pieno ir iš Holšteino veislės karvės pieno pagamintų fermentinės bei rūgštinės sutraukų virškinamumo *in vitro* metodu mėginių schema (žalia spalva pažymėti mėginiai, kurių tyrimai atlikti Arhuso universitete)

3.7. Pieno baltymų virškinamumo tyrimas *in vitro* metodu

Dirbtinių skrandžio ir žarnų sulčių paruošimas

Kiekvieno individo fermentų aktyvumas burnos, skrandžio ar žarnyno sekretuose skiriasi, todėl tyrėjai eksperimentuose taip pat naudoja įvairios sudėties dirbtines virškinimo sultis. Šiame darbe dirbtinėms sultimis pagaminti naudojami tokie fermentų kiekiai, kad jų proteolitinis ir lipolitinis aktyvumai atitiktų vidutines natūralių sulčių aktyvumų reikšmes, nustatytas ankstesnių

tyrimų metu, naudojant *in vitro* modelius su natūraliomis žmonių virškinimo sultimis [109]. Dirbtinių sulčių cheminė sudėtis pateikta 9 lentelėje.

9 lentelė. Virškinimo tirpalų sudėtis bei jų fermentų aktyvumas [109]

	DSST (Dirbtinės skrandžio sultys)	DPŽST (Dirbtinės plonosios žarnos sultys)
Fermentai ir pagrindiniai komponentai	6,9 g pepsino	1,36 g pankreatino 10,8 g tulžies druskų
Fiziologinio skysčio komponentai	2 g NaCl 7 ml HCl H ₂ O	174,2 ml 0,9 % NaCl 82,6 ml 0,15 M HCl 17,4 ml 2,0 M HCl 400,7 ml 0,15 M NaHCO ₃ 280 ml d. H ₂ O H ₂ O
Kiekis	1000 ml	1000 ml
pH	2	7
Proteolitinis aktyvumas	36±0,5 U/ml	17±0,2 U/ml
Lipazės aktyvumas	-	800±0,9 U/ml

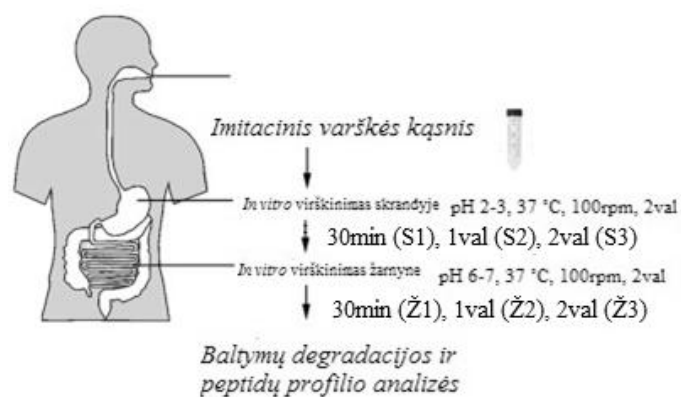
DSST gaminimas: 2 g natrio ir 7 ml druskos rūgšties ištirpinta 1 litre distiliuoto vandens ir pridėta 6,9 g pepsino. pH koreguotas iki 2, naudojant 2,0 M HCl. Pagamintas DSST laikytas 4 °C temperatūroje. Tokio tirpalo proteolitinis aktyvumas 36±0,5U/ml.

DPŽST gaminimas: sumaišyta 174,22 ml 0,9 % NaCl, 82,58 ml 0,15 M HCl, 17,42 ml 2,0 M HCl, 400,7 ml 0,15 M Na₂HCO₃, 278,75 ml H₂O ir pridėta 1,36 g pankreatino bei 10,8 g tulžies rūgščių druskų. pH koreguotas iki pH 7, naudojant 4,0 M NaOH, vandens pripilta iki 1 l. DPŽST proteolitinis aktyvumas 17±0,2 U/ml, lipazės aktyvumas 800±0,9 U/ml.

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

Vandenyje tirpūs fermentinės ir rūgštinės sutraukų vandenyje tirpūs ekstraktai (VTE) paruošti remiantis Adt ir kt. [98]. 6 g varškės homogenizuota su 12ml vandens 10 min. kambario temperatūroje. VTE gautas nucentrifugavus (4 °C temp., 5000g, 20 min.) homogenizatą.

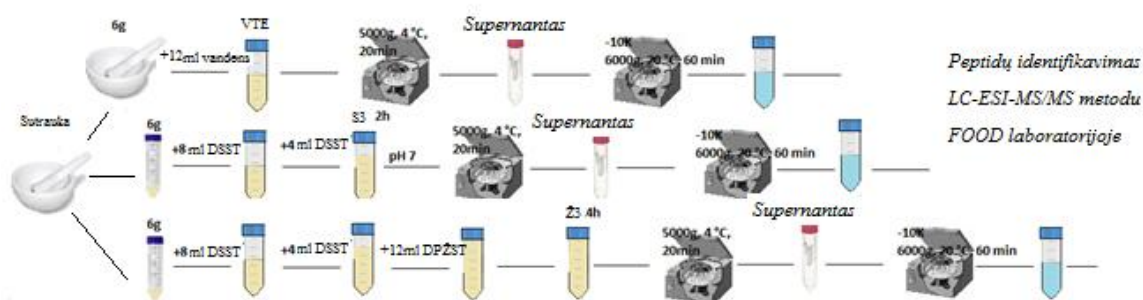
Fermentinės ir rūgštinės sutraukų virškinimas atliktas *in vitro* remiantis Fang ir kt. [110] aprašyta metodika. Virškinimo proceso trukmė – 4 val. 2 val. imituojamas virškinimas skrandyje, likusias 2 val. – žarnyne. Bandiniai imami praėjus 30 min., 60 min., 120 min. (S1,S2,S3 atitinkamai) po virškinimo skrandyje bei po 30 min., 60 min., 120 min. (Ž1,Ž2,Ž3 atitinkamai) po virškinimo žarnyne (9, 10 pav.).



10 pav. Virškinimo imitavimo *in vitro* metodu schema

In vitro virškinimo imitavimo procesas atliktas mėgintuvėlius su substratu ir dirbtinėmis virškinimo sultimis bei $1,00 \pm 0,05$ g stiklinių rutuliukų (maišymo elementai) patalpinus vandens vonioje su purtykle (GFL 1092, Vokietija), kurioje palaikoma $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra, purtoma 100 aps/min greičiu. Procesas imituojamas palaikant 1:2 substrato:fermento tirpalo santykį skrandžio fazėje bei 1:4 žarnyno fazėje. Imitacinio substrato kėsnio dydis – $6,00 \pm 0,02$ g, virškinimo sulčių (DSST) kiekis pradžioje 8 ml, po 1 val. įpilta dar 4 ml (imituojamas skrandžio sulčių dinaminis išsiskyrimas žmogaus virškinimo sistemoje). Virškinimo skrandyje metu bandinių pH 2–3. Virškinimas žarnyne imituotas į bandinius po 2 val. virškinimo skrandyje įpylus po 12 ml dirbtinių žarnų sulčių (DPŽST), pH 6–7.

Bandiniuose fermentų veikla nutraukta nedelsiant neutralizuojant NaOH/HCl iki pH 7 ir atšaldant iki $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros. Nesuvirškintos medžiagos pašalintos bandinius nucentrifugavus ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5000 g, 20 min.). Supernantai užšaldyti iki tolimesnių proteolizės greitį ir dydį leidžiančių įvertinti rodiklių nustatymo, t.y. laisvų aminorūgščių ir peptidų kiekio nustatymo fluoresciminiu metodu bei baltymų proteolizės produktų kokybinės analizės SDS–PAGE metodu. Bandiniai, kurie buvo vežami į FOOD laboratoriją prieš užšaldymą papildomai centrifuguoti 10K filtrais (Milipore, Cork, Ireland) (11 pav.). Tokiu būdu iš sistemos pašalinti fermentai ir užtikrintas biocheminių reakcijų sustabdymas.



11 pav. Bandinių paruošimas analizei FOOD laboratorijoje (Arhuso universitete)

3.8. Pieno baltymų virškinamumo įvertinimui naudoti analizės metodai

Fluoresamininis aminorūgščių ir peptidų nustatymas

Į virškinimo sultis išsiskyrusių baltymų hidrolizės produktų kiekybinė analizė atlikta pagal Zhao ir kt. [48] aprašytą metodiką atliekant fluoresamininį aminorūgščių ir peptidų nustatymą. Metodo esmė – fluoresaminas (fluramas) dedamas į bandinį kuriame jungiasi su laisvų aminorūgščių ir peptidų pirminėmis amino grupėmis sudarydamas fluorescuojantį junginį.

75 µl virškinamo bandinio centrifugato sumaišyta su 75 µl 24 % trichloracto rūgšties (24 g TCA/100 ml vandens) ir laikyta ledo vonelėje 30 min., kol nusėdo baltymai. Nusodintas mišinys centrifuguotas 4800 rpm 20 min. 4 °C temperatūroje. Supernantai buvo praskiesti 1mM HCl tirpalu (skrandžio fazės bandinių skiedimas 1:50, žarnyno – 1:100). 30 µl skiesto bandinio sumaišyta su 900 µl 0,1 M borato buferio (pH 8) ir 300 µl fluramo tirpalo (0,2 mg fluramo bevandeniam acetone). 250 µl bandinio pilta į baltos nepermatomos matavimo lėkštelės (Costar 3912) šulinėlius. Analizė buvo atlikta praėjus 40 min. nuo fluramo tirpalo įpylimo pradžios lėkštelę patalpinus į spektrofluorometrinių skaitytuvą (FLUOstar Omega reader BMG Labtech, Offenburg, Germany), (eksitacija 355 nm, emisija 460 nm). Kiekybinė analizė buvo atlikta naudojant Leu standartinę kreivę iš 0,1 M Leu tirpalo (32,75 mg Leu ištirpinta 25 ml 1 mM HCl) paruošiant 6 skirtingų koncentracijų (0,5 – 3 mM) tirpalus, kurie buvo analizuoti lygiai taip pat kaip virškinimo bandiniai. Laisvų aminorūgščių ir peptidų pirminių amino grupių kiekis išreiškiamas mMol Leu ekvivalentais.

Baltymų hidrolizės produktų kokybinė analizė elektroforezės metodu

Į virškinimo sultis išsiskyrusių baltymų hidrolizės produktų kokybinė analizė buvo atlikta elektroforezės metodu skirstant junginius natrio dodecilsulfato (SDS) poliakrilamido gelyje (PAGE). Bandiniai buvo praskiesti iki 0,7 mg/ml koncentracijos su ličio dodecilsulfato (LDS) buferiu. Paruošti bandiniai buvo centrifuguoti 15 s. 13400 rpm greičiu ir pakaitinti 70 °C temp. 10 min. Atvėsinti bandiniai buvo dar kartą centrifuguoti ir patalpinti į NuPAGE 4–12 % Bis-Tris elektroforezės mini gelio (Invitrogen, Kalifornija, JAV) šulinėlius (5 µg). Elektroforezė buvo vykdyta naudojant XCell II Mini-Cell (Novex, Kalifornija, JAV) sistemą, užpildytą MOPS SDS buferiniu tirpalu, esant 200 V įtampai, srovei pirmas 30 min esant 70mA, likusias 30 min. – 40 mA iki kol dažo linija pasiekia frakcionuojančio gelio apačią.

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

Peptidų identifikavimas Sch-ESI-MS/MS metodu

Peptidų profilio analizė atlikta pagal metodą aprašytą Le ir kt. [111]. Peptidų analizė atlikta bandiniams prieš virškinimą (VTE), po 2 val virškinimo skrandyje (S3) ir po 2 val virškinimo žarnyne (Ž3) imitavimo bei liofilizuotam pienui iš kurio buvo pagamintos pieno sutraukos. VTE, S3 ir Ž3 mėginiai paruošti tam tikrą kiekį (teorinė baltymų koncentracija prieš virškinimą – 20mg/ml) skiedžiant su 40mM TEAB tirpalu iki 100µl. Mėginiai redukuoti įpilant 20µl DTE tirpalo (20mg ištirpinta 1 ml 40 mM TEAB) ir inkubuojant 60 °C temperatūroje 10min. Kambario temperatūroje atvėsinti mėginiai alkilinti įpilant 20 µl IA (50 mg ištirpinta 1 ml 40mM TEAB), inkubuojant 37°C temperatūroje tamsoje. Kambario temperatūroje atvėsinti mėginiai parūgštinti iki pH 2–3 su 20 µl 10 % skruzdžių rūgšties. Pieno mėginiai paruošti rehidratuojant liofilizuotus pieno miltus (10 % pieno miltelių vandenyje). 40 µl rehidratuoto pieno atskiesta su 160 µl 40 mM TEAB, redukavimo bei alkilinimo procedūros atliktos identišškai kaip virškinimo bandiniams, vietoj 20 µl agentų įpylus po 10 µl. 3 µl 10 % skruzdžių rūgšties įpilta nusodinti kazeinui (pH ne mažiau kaip 4,6). Nuosėdos pašalintos centrifuguojant, 15 000 g 10 °C 10 min. Visi mėginiai centrifuguoti (14 000g, 4 °C, 10 min.) filtravimo mėgintuvėliuose (Milipore, Cork, Ireland), tokiu būdu pašalinti didesni nei 3 kDa baltymų fragmentai. Paruošti mėginiai užšaldyti ir laikyti iki analizės -20 °C temperatūroje.

Mėginiai analizuoti naudojant Aeris peptidų kolonėlę C18 (250 mm x 21 mm, dalelių dydis 3,6 µm), (Phenomenex, Torrance, CA, USA) Agilent 1200 serijos skysčių chromatografu, kuris tiesiogiai sujungtas su HCT jonų gaudykle (Bruker Daltonics, DE). Analizei naudoti eliuantai – tirpiklis A (0,1 % skruzdžių rūgštis) bei tirpiklis B (90 % acetonitrilo, 0,1 % skruzdžių rūgštis). Jų gradiento programa: 0–40 % B pirmas 80 min. ir išauga iki 80 % per sekančias 15 min., tėkmės greitis 200 µl/min. Mėginio analizės trukmė 110 min, injekcijos tūris – 5µl. Masių spektrometras skenavo junginius kurių m/z (molinė masė padalinta iš peptido krūvio) buvo nuo 250 iki 1800, MS/MS – nuo 100 iki 1200 m/z. MS/MS. Spektrų analizavimui naudotos DataAnalysis (4,0 versija) ir Biotools (3,1 versija) programos (Bruker Daltonic, Bremen, DE) bei Mascot (Matrix Science, MA, US) duomenų bazė. Peptidų paieškos ir identifikavimo kriterijai: Bos Taurus, jokių modifikacijų ir fermentų skaldymo specifikacijų, oksiduotų ir fosforilintų formų atpažinimas. Identifikuoti peptidai kiekvienai kazeino frakcijai atskirai, junginiai kurių atitikimo baltymo aminorūgščių sekai balas pakankamas (P<0,05) priimti kaip teigiamas rezultatas automatiškai, kitų peptidų spektrai analizuoti ir atrinkti rankiniu būdu.

4. REZULTATAI

4.1. Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno sudėties įtaka jo technologinėms savybėms

Pieno sudėties ir technologinių savybių tyrimų rezultatai suskirstyti pagal sezoniškumą. Žiemos sezonui priskirti sausio ir vasario mėnesiai, pavasario – kovo, balandžio ir gegužės mėnesiai, vasaros – birželio, liepos ir rugpjūčio mėnesiai, rudens – rugsėjo, spalio ir lapkričio. 10–18 lentelėse nurodytos didžiausios (max) ir mažiausios rodiklių reikšmės (min), gautos ištyrus tam tikro sezono bandinius, pateikti rodiklių reikšmių vidurkiai, standartiniai nuokrypiai (SD) ir analizuotų bandinių skaičius (n). Sezono įtaka sudėties ir technologinių savybių rodikliams nurodyta stulpeliuose skirtingomis raidėmis ($P < 0,05$) ties vidurkių reikšmėmis.

4.1.1. Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno sudėtis priklausomai nuo sezono

Kalcio, baltymų, riebalų, laktozės ir urėjos kiekis

10 lentelėje pateikta Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių žalio pieno cheminė sudėtis atskirose pieno mėginių grupėse, suskirstytose pagal sezoną.

10 lentelė. Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių žalio pieno cheminė sudėtis priklausomai nuo sezono

Sezonas	Rodiklis	Sudėties rodikliai				
		Ca, mg/100g pieno	Riebalai, %	Baltymai, %	Laktozė, %	Urėja, mg %
Pavasaris	min	101,20	2,88	2,69	4,14	0,00
	max	145,00	7,42	4,18	5,00	44,00
	vidurkis	113,15 ^a	4,88 ^a	3,36 ^a	4,45 ^a	18,18 ^a
	SD	10,61	1,09	0,35	0,17	8,65
	n	52	54	54	52	51
Vasara	min	100,27	2,08	2,91	3,87	4,00
	max	168,05	7,13	4,06	4,59	44,00
	vidurkis	115,69 ^a	4,68 ^a	3,51 ^{ac}	4,35 ^a	19,36 ^a
	SD	17,03	1,12	0,31	0,16	10,42
	n	49	38	38	33	33

10 lentelė. Tęsinys

Sezonas	Rodiklis	Sudėties rodikliai				
		Ca, mg/100g pieno	Riebalai, %	Baltymai, %	Laktozė, %	Ureėja, mg %
Ruduo	min	100,36	1,74	2,83	3,88	0,00
	max	149,90	7,96	5,23	4,66	45,00
	vidurkis	118,30 ^{ab}	4,58 ^a	3,73 ^b	4,34 ^{ba}	20,07 ^a
	SD	13,85	1,18	0,49	0,16	8,98
	n	50	56	56	55	55
Žiema	min	102,40	2,60	2,92	3,27	0,00
	max	137,70	6,38	4,71	4,81	40,00
	vidurkis	121,13 ^b	4,72 ^a	3,63 ^c	4,33 ^a	11,93 ^b
	SD	9,75	0,89	0,42	0,28	10,52
	n	30	29	29	29	29

Mūsų tyrime nustatytas vidutinis kalcio kiekis pavasario sezono metu buvo lygus $113,15 \pm 10,61$ mg/100 g, palaipsniui didėjo vasaros, rudens sezonais, o didžiausia koncentracija, kuri statistiškai patikimai ($P < 0,05$) didesnė už pavasario ir vasaros sezono koncentracijas, buvo nustatyta žiemos sezono pieno bandiniuose – $121,13 \pm 9,75$ mg/100 g pieno. Rezultatą galima palyginti su Frederiksen ir kt., [55] tirtų Danijos holšteinų veislės karvių pienu. Jis pasižymi geromis koaguliavimo savybėmis, o vidutinė bendro kalcio koncentracija siekia 134,9 mg/100g ($n=193$). Bandiniuose, kurių FKT buvo nuo 20 iki 60 min. (vidutinio greičio koaguliacija), bendras kalcio kiekis lygus 121,0 mg/100g ($n=119$) ir sutampa su didžiausia mūsų nustatyta koncentracija [55]. Kita mokslininkų grupė, Jensen ir kt., [29], nustatė, jog Džersių veislės karvių piene randama didesnė kalcio koncentracija, Danijos holšteinų veislės karvių piene silpnomis koaguliavimo savybėmis pasižyminčiame piene bendras kalcio kiekis siekia 145,8 mg/100g, o geromis koaguliavimo savybėmis pasižyminčiame piene – net 163,2 mg/100g [29].

Didžiausias riebalų kiekis, kurį nustatėme, rastas Lietuvos senojo genotipo juodmargių veislės karvių vasaros sezono pieno bandiniuose ($4,68 \pm 1,12$ %), tačiau sezonas šiam rodikliui statistiškai reikšmingos įtakos neturi ir sezono metu kinta nežymiai (10 lentelė).

Didžiausias baltymų kiekis, kurį nustatėme, priklauso žiemos ($3,63 \pm 0,42$ %) ir rudens ($3,73 \pm 0,49$ %) sezonų pieno bandiniams. Šios baltymų koncentracijos statistiškai patikimai ($P < 0,05$) didesnės už pavasario sezono pieno bandinių baltymų koncentraciją ($3,36 \pm 0,35$ %). Rudens sezono pieno baltymingumas statistiškai patikimai didesnis ($P < 0,05$) už vasaros sezono pieno baltymingumą ($3,51 \pm 0,31$ %). Mūsų gauti rezultatai sutampa su Jungtinių tautų statistika [80] ir prieštarauja Chen ir kt. [80] gautiems rezultatams – iš mokslininkų tirtų

pieno mėginių (įvairių veislių pieniniai galvijai) didžiausia baltymų koncentracija buvo nustatyta vasaros ir pavasario sezonų mėginiuose.

Savo gautus rezultatus galime palyginti su Lietuvos tyrėjų duomenimis. Juozaitienė ir kt. [112] nustatė Lietuvos pagrindinių veislių – juodmargių, žalmargių bei žalųjų, karvių pieno riebalų ir baltymų kiekį. Ji gavo, jog bendras visų tirtų karvių riebalų vidurkis yra $4,73 \pm 0,80$ %, o Lietuvos juodmargių karvių veislės pieno bendras riebumas mažesnis ($4,65 \pm 0,74$ %) už bendrą vidurkį. Panašų kiekį riebalų mes nustatėme vasaros sezono Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių piene ($4,6 \pm 1,12$ %). Tyrėjų [112] nustatytas vidutinis baltymų kiekis – $3,58 \pm 0,48$ %. Mes gavome, jog Lietuvos senojo genotipo juodmargių pienas turi panašų kiekį baltymų – vidutiniškai 3,57 %. Kita Lietuvos mokslininkų grupė, Pauliukas ir kt. [113], nustatė, jog Lietuvos juodmargių karvių pienas 2002–2003 metų laikotarpiu turėjo vidutiniškai 4,53 % riebalų ir 3,27 % baltymų. Šie rodikliai yra mažesni už mūsų gautus rezultatus. Rezultatai gali skirtis dėl įvairių priežasčių: pieno sudėties rodiklių koncentracijoms įtakos turi melžiamo gyvulio laktacijos periodas (visų veislių baltymingumas mažiausias būna pirmais trimis laktacijos mėnesiais [114]), gyvulių šėrimas (visus metus laikomų tvartuose karvių pienas pasižymi geresniais sudėties rodikliais nei ganomų karvių pienas [114]).

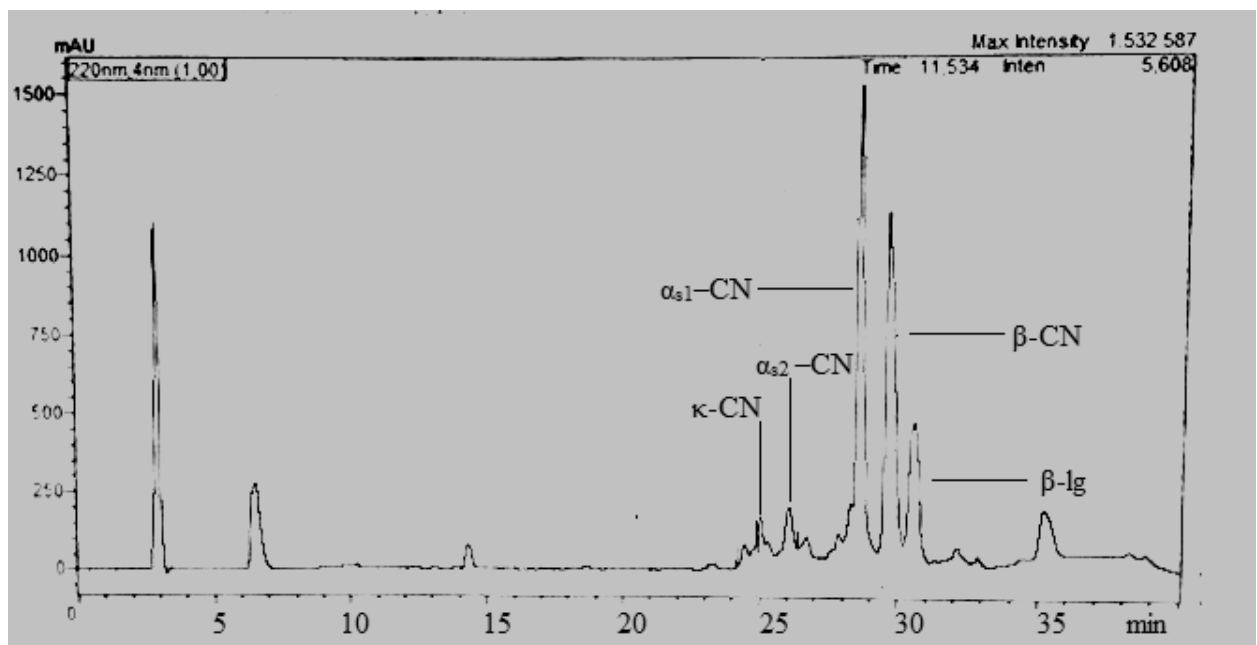
Nustatėme, jog laktozės kiekis pieno bandiniuose priklausomai nuo sezono skiriasi labai nežymiai – $4,37 \pm 0,05$ %. Urėjos kiekis svyruoja nuo 0 iki 45 mg % (rudens sezono bandiniuose nustatytas didžiausias vidutinis kiekis, kuris lygus $20,07 \pm 8,98$ mg %) (10 lentelė). Šio junginio, kitaip vadinamo karbamiu, koncentracija piene parodo ar gyvulio mitybos racione yra pakankamai baltyminių medžiagų. Kitų tyrėjų duomenimis karvių piene, priklausomai nuo laktacijos, urėjos kiekis svyruoja nuo 20 iki 40 mg% [115]. Lietuvos juodmargių karvių piene randama vidutiniškai $20,37 \pm 0,37$ mg% urėjos, o Lietuvos žalųjų ir juodmargių piene nustatytas kiekis 2004–2005 metų laikotarpiu – 26,14 mg% [112].

Pieno baltymų frakcijų sudėtis priklausomai nuo sezono

Toliau detaliau panagrinėsime pieno baltymų frakcijų sudėtį. Kazeino frakcijų ir β -laktoglobulino kiekis senojo genotipo Lietuvos juodmargių veislės karvių piene nustatytas pirmą kartą, naudojant ESCh metodą. Frakcijos skirstytos naudojant atvirkščių fazių C18 (Vydac 2018TP, 5 μ m 250 mm x 4,6 mm) kolonėlę. Hidrofiliskiausios kazeino frakcijos κ -kazeino sulaikymo trukmė kolonėlėje trumpiausia – junginys išstumiamas ir identifikuojamas diodų matricos detektoriumi ($\lambda=220$ nm) vidutiniškai po 25 min. Po 26 min. chromatogramose matomas α_{s2} -kazeino pikas, α_{s1} - ir β -kazeinai identifikuoti praėjus 28,5 ir 29,6 min. atitinkamai nuo bandinio injekcijos pradžios. Pagrindinis išrūgų baltymas β -laktoglobulinas yra hidrofobiškesnis už visas kazeino frakcijas, jo sulaikymo kolonėlėje trukmė – apie 31 min. (12

pav.). Šie mūsų gauti chromatografijos rezultatai sutampa su kitų tyrėjų duomenimis [38, 40, 41]. Junginių sulaikymo trukmė priklauso nuo frakcijų genetinio varianto [37, 55] ir eksperimentų sąlygų.

Iš duomenų apie bendrą kazeino frakcijos kiekį (11 lentelė) matome, kad mažiausiai kazeino nustatėme žiemos sezono bandiniuose ($31,64 \pm 3,07$ g/l), o daugiausiai vasaros sezono bandiniuose – $35,50 \pm 5,59$ g/l. Žiemos sezono metu gautas statistiškai reikšmingas ($P < 0,05$) mažesnis kazeino kiekis nei vasaros ar rudens sezonais. Vasaros sezono pieno bandinių kazeino koncentracija didesnė už pavasario sezono koncentraciją. Mes nustatėme, jog Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių piene vidutinis kazeino kiekis visų sezonų metu yra didesnis už 30 g/l. Ši kazeino koncentracija didesnė už Bonizzi ir kt. [40] darbe gautą bendrą kazeino koncentraciją, kuri buvo 25,74 g/l (tirti įvairių veislių pieniniai galvijai).



12 pav. Pieno baltymų chromatograma ($\lambda=220\text{nm}$)

Mūsų tyrime gauta didžiausia κ -kazeino frakcijos koncentracija vasaros ($3,45 \pm 0,97$ g/l) bei rudens sezonais ($3,32 \pm 0,85$ g/l). Vasaros sezono pieno κ -kazeino koncentracija statistiškai patikimai ($P < 0,05$) didesnė už pavasario ar žiemos sezonų pieno κ -kazeino koncentraciją. Svarbu, kad piene būtų pakankamai κ -kazeino – mažas κ -kazeino kiekis siejamas su prastomis pieno koaguliacijos savybėmis [66]. Analizuodami Lietuvos senojo genotipo juodmargių veislės karvių pieną radome keletą bandinių, kurių κ -kazeino koncentracija mažesnė už 2,00 g/l. Mūsų gautą rezultatą galima palyginti su Bonizzi ir kt. [40] nustatytais duomenimis. Mokslininkai ištyrė Italijos fryzų ($n=200$) veislės karvių pieną ir gavo, jog vidutinis κ -kazeino frakcijos kiekis

yra 3,26 g/l. Ši vertė yra panaši į mūšų nustatytas vertes, todėl galima teigti, jog Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pienas turi pakankamai didelę κ -kazeino koncentraciją.

Toliau paanalizuosime kitų kazeino frakcijų koncentracijas, nustatytas šiame darbe. Lietuvos senojo genotipo juodmargių pieno α -kazeinų kiekiai, kuriuose nustatėme, yra panašūs į Italijos fryzų veislės karvių piene esančius kiekius. Didžiausias skirtumas lyginant savo rezultatus su Italijos fryzų veislės karvių pieno rezultatais matomas β -kazeino frakcijos koncentracijos atžvilgiu. Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių piene mažiausia vidutinė β -kazeino koncentracija ($18,69 \pm 1,80$ g/l), kurią nustatėme žiemos sezono metu, ženkliai didesnė už Bonizzi ir kt. [40] nustatytą koncentraciją (tik 11,38 g/l). Ha ir kt. [116] atliko tyrimą, kuriame tyrė Džersių veislės karvių pieno baltymų frakcijų sudėtį. Mokslininkas gavo ženkliai didesnę kiekį α_{s1} -kazeino frakcijos ($21,24 \pm 0,34$ g/l) nei nustatėme mes Lietuvos senojo genotipo juodmargių veislės karvių piene. Didžiausia koncentracija ($9,05 \pm 1,35$ g/l), kurią gavome rudens sezono metu. Bonizzi ir kt. [40] nustatyti α_{s1} -, α_{s2} -kazeinų 9,55, 1,56 g/l.

Mes nustatėme, jog Lietuvos senojo genotipo juodmargių veislės karvių piene vidutinė pagrindinio išrūgų baltymo β -laktalbumino koncentracija priklausomai nuo sezono svyruoja nuo 7,04 iki 8,00 g/l. Gauta koncentracija yra šiek tiek mažesnė už Bonfatti ir kt. [38] nustatytą β -laktalbumino vidutinę koncentraciją – $8,58 \pm 0,09$ g/l [38].

Literatūroje nurodoma [38] jog vidutiniškai piene gaunamas α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ -kazeinų santykis lygus atitinkamai 4:1:4:1. Ištyrus senojo genotipo Lietuvos juodmargių karvių pieną gavome jog frakcijų santykis lygus apytiksliai 5:1:10:2. Literatūroje nurodomas [38] β -laktoglobulino santykis su bendru kazeino kiekiu – 1:3, tiriamojo darbo rezultatai parodė, jog Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno β -laktoglobulino santykis su bendru kazeino kiekiu yra apytiksliai 1:4.

11 lentelė. Baltymų frakcijų kiekybinė sudėtis priklausomai nuo sezono

Sezonas	Rodiklis	Baltymų frakcijos					
		κ -kazeinas g/l	α_{s2} -kazeinas g/l	α_{s1} -kazeinas g/l	β -kazeinas g/l	Bendras kazeino kiekis g/l	β -laktoglobulinas g/l
Pavasaris	Min	1,70	0,91	6,16	14,73	24,78	4,85
	Max	4,44	2,82	10,40	23,47	39,73	11,03
	Vidurkis	2,96 ^a	1,83 ^a	8,65 ^a	19,28 ^b	32,72 ^a	7,70 ^{ab}
	SD	0,60	0,41	1,06	1,95	3,35	1,44
	n	51	51	51	51	51	51

11 lentelė. Tęsinys

Sezonas	Rodiklis	Baltymų frakcijos					
		κ -kazeinas g/l	α_{s2} -kazeinas g/l	α_{s1} -kazeinas g/l	β -kazeinas g/l	Bendras kazeino kiekis g/l	β -laktoglobulinas g/l
Vasara	Min	1,90	1,40	5,03	9,81	23,62	4,76
	Max	7,10	4,64	12,37	28,65	48,66	10,59
	Vidurkis	3,45 ^b	2,22 ^{bc}	9,04 ^a	20,79 ^a	35,50 ^b	8,00 ^a
	SD	0,97	0,68	1,45	3,70	5,59	1,25
	n	49	49	49	49	49	47
Ruduo	Min	2,11	1,54	5,91	13,14	26,05	0,76
	Max	5,45	4,73	12,78	28,37	48,61	13,42
	Vidurkis	3,32 ^b	2,13 ^{bc}	9,05 ^a	20,30 ^a	34,73 ^b	7,86 ^a
	SD	0,85	0,59	1,35	3,12	5,20	1,84
	n	50	50	50	50	50	50
Žiema	Min	2,07	1,01	7,07	15,50	26,76	5,36
	Max	5,09	2,00	11,76	23,59	42,35	8,57
	Vidurkis	2,90 ^a	1,50 ^d	8,55 ^a	18,69 ^b	31,64 ^a	7,04 ^b
	SD	0,72	0,23	0,89	1,80	3,07	0,81
	n	30	30	30	30	30	30

Pieno kokybės rodikliai priklausomai nuo sezono

ES žaliame karvių piene reglamentuojamas somatinių ląstelių skaičius tūkst./ml, ne daugiau kaip 400 [117]. Lietuvos senojo genotipo juodmargių veislės karvių piene radome didelius kiekius somatinių ląstelių, kurie viršija normą net iki 20 kartų (santykis paskaičiuotas pagal rudens, žiemos sezonų maksimalias vertės). Nustatėme, jog visų sezonų pieno bandinių somatinių ląstelių vidurkiai buvo didesni už 400 tūkst./ml. (12 lentelė). Tirtų karvių grupė galimai genetiškai linkusi gaminti somatinį pieną, nes yra mažiau atspari infekcijoms. Somatinių ląstelių skaičiui sezonas įtakos neturi. Kitų tyrėjų publikacijose, pavyzdžiui Frederiksen ir kt. [55], somatinių ląstelių skaičius karvių piene 398,75 (x1000 vnt./ml).

Mūsų tirtu pieno pH vidutinės reikšmės yra panašios (6,8–6,9) ir sutampa su kitų tyrėjų duomenimis: Frederiksen ir kt. [55] tirtų Danijos holšteinų veislės karvių pieno vidutinis pH – 6,71, Gustavsson ir kt. [31] tirtų Švedijos raudonųjų veislės pieno vidutinis pH – 6,8.

Statistiškai apskaičiavę sezono įtaką pH rodikliui gavome, jog pavasario sezono pieno bandinių pH reikšmingai ($P < 0,05$) mažesnis už rudens ir vasaros sezonų pieno bandinių pH, rudens sezono pieno pH didesnis už žiemos sezono pieno pH. Šie rezultatai yra priešingi Chen ir kt. [80] gautiems rezultatams.

12 lentelė. Pieno kokybės rodikliai

Sezonas	Rodiklis	Kokybės rodikliai	
		pH	Somatinių ląstelių skaičius, tūkst./ml
Pavasaris	Min	6,56	6
	Max	7,10	7434
	vidurkis	6,77 ^a	680 ^a
	SD	0,08	1547
	n	51	51
Vasara	Min	6,59	13
	Max	6,96	3498
	vidurkis	6,81 ^b	437 ^a
	SD	0,08	642
	n	48	33
Ruduo	Min	6,58	25
	Max	7,09	7880
	vidurkis	6,87 ^c	504 ^a
	SD	0,11	1101
	n	50	55
Žiema	min	6,58	12
	max	7,05	9144
	vidurkis	6,77 ^{ab}	891 ^a
	SD	0,10	1776
	n	30	29

4.1.2. Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno technologinės savybės priklausomai nuo sezono

Koaguliacijos savybės

Technologinės savybės, ypač svarbios sūrių ir varškės gamintojams – pieno baltymų rūgštinės ir fermentinės koaguliacijos savybės. Jas vertinome dviem rodikliais – FKT, RKT ir susidariusios fermentinės/rūgštinės sutraukos stiprumu (G'_{40}).

Sutraukos stiprumas kai kuriose studijose fiksuojamas praėjus 60 min. nuo fermento įdėjimo [29, 118], tačiau remiantis Frederiksen ir kt. [55] bei Gustavson ir kt. [31] nusprendėme fiksuoti sutraukos stiprumą praėjus 40 min. nuo fermento įdėjimo pradžios. Pagal šiuos mokslininkus geromis koaguliacijos savybėmis pasižyminčio pieno grupei priskiriamas pienas, kurio sutraukos stiprumo vertė praėjus 40 min. nuo eksperimento pradžios didesnė už 350 Pa. Mūsų darbe koaguliacijos kriterijumi pasirinkta laikyti tik koaguliacijos trukmę. Pagal Jensen ir kt. [29] NK pienu laikomas tas, kuris nesudaro sutraukos per 60 min, o G'_{40} lygi 0 Pa. Gerai koaguliuojančiu pienu laikomas tas, kuris sudaro sutrauką per 20 min. ar mažiau.

Nustatėme, kad fermentinė sutrauka susidaro greičiausiai vasaros sezono pieno bandiniuose ($18,84 \pm 6,58$ min.). Pavasario pieno FKT ($23,90 \pm 9,77$ min.) trumpesnė už rudens

(29,88±10,07 min.) (P<0,05) ar žiemos (27,97±10,55 min.). Mūsų duomenimis RKT trumpesnė pavasario ir žiemos sezonais (atitinkamai 25,14±3,02 min ir 25,50±4,05 min.) nei vasaros (27,33±12,13 min.) ar rudens (29,64±7,19 min.). Statistinis duomenų apdorojimas parodė, kad sezonas šiam rodikliui statistiškai patikimos įtakos neturi.

Koaguliacijos savybės gali priklausyti ne tik nuo sezono, bet ir nuo veislės – Džersių veislės karvių tiek gerai koaguliuojantis tiek lėčiau koaguliuojantis pienas sudaro stipresnę sutrauką nei Holšteinių–fryzų veislės karvių pienas [29].

Lietuvos juodmargių karvių pieno sutraukos stiprumas (G'_{F40} ir G'_{R40}) mūsų duomenimis yra ženkliai mažesnis už vidutines kitų autorių publikuojamas šio rodiklio reikšmes. Frederiksen ir kt. [55] nustatė, jog silpnai koaguliuojančio pieno sutraukos stiprumas vidutiniškai lygus 234,38±424,38 Pa, Gustavson ir kt. [31] tyrime nustatytos sutraukos stiprumo reikšmės kinta nuo 0 (NK pienas) iki 312,7 Pa, vidurkis 90,9±70,5 Pa. Šiame darbe tirto pieno sutraukos stiprumas varijuoja nuo 0 iki 105 Pa. 13 lentelėje pateiktos G'_{40} vertės, net jei jos buvo lygios 0 (pienas nesudarė sutraukos per 40 min.). Apskaičiavome, kad šiam rodikliui sezonas statistiškai patikimos įtakos neturi.

13 lentelė. Lietuvos senojo genotipo karvių pieno koaguliacijos savybės priklausomai nuo sezono

Sezonas	Rodiklis	Koaguliavimo rodikliai			
		RKT, min	G'_{R40} , Pa	FKT, min	G'_{F40} , Pa
Pavasaris	min	22	17,20	7	0
	max	31	99,70	60	105,00
	vidurkis	25,14 ^a	60,94 ^a	23,90 ^a	18,77 ^a
	SD	3,02	25,83	9,77	27,09
	n	7	7	51	22
Vasara	min	14	0,02	8	14,9
	max	60	0,11	46	88,8
	vidurkis	27,33 ^a	0,07 ^a	18,84 ^b	40,57 ^a
	SD	12,13	0,04	6,58	41,80
	n	15	3	49	3
Ruduo	min	22	0,259	17	0
	max	43	33,46	60	113
	vidurkis	29,64 ^a	11,86 ^a	29,88 ^c	16,62 ^a
	SD	7,19	18,72	10,07	31,37
	n	11	3	50	24
Žiema	min	21	39,80	15	0
	max	36	97,70	60	94,40
	vidurkis	25,50 ^a	64,83 ^a	27,97 ^a	17,03 ^a
	SD	4,05	18,94	10,55	23,39
	n	14	6	30	29

Suskirstę skirtingų sutraukų susidarymo trukmę pagal sezoną gavome, jog tarp Lietuvos senojo genotipo juodmargių veislės karvių pieno NK pieno bandinių buvo tik 2 % (14 lentelė). Vasaros sezono metu visas tirtas pienas sudarė sutrauką greičiau nei per 60 min., 60 % bandinių koaguliuo greičiau nei per 20 min. Rudens ir žiemos sezonais nustatyta statistiškai reikšmingai daugiau pieno bandinių kurie nekoaguliuoja per 20 min. – atitinkamai 14 % ir 23 %. Kitų šalių autorių publikacijose taip pat randame duomenų apie nekoaguliuojantį pieną. Jensen ir kt. [29] tyrimo duomenimis Danijos holšteinų–fryzų veislės karvių 52 % pieno bandinių pasižymi geromis koaguliacijos savybėmis, ir net 12 % pieno yra NK.

Danijos mokslininkai pristatė studiją apie trijų karvių veislių: Džersių, Danijos žaliųjų ir Danijos holšteinų pieno koaguliacijos savybes. Tarp Džersių veislės karvių pieno nebuvo rasta NK pieno, o Danijos holšteinų grupėje toks pienas sudarė 3 %, kai tuo tarpu Danijos žaliųjų grupėje NK pieno buvo net 17 % [55]. Kita Danijos mokslininkų grupė tyrė trijų senojo genotipo veislių karvių pieno koaguliacijos savybes. Nustatyta, kad iš 28 Danijos žaliųjų veislės karvių pieno bandinių 4 bandiniai nekoaguliuo, o iš 23 Švedijos kalnų veislės karvių pieno bandinių nekoaguliuo 1 bandinys. Visi Jutlandijos veislės karvių pieno bandiniai koaguliuo; jų buvo tirta 12 [74].

14 lentelė. Lietuvos senojo genotipo karvių pieno bandinių FKT pasiskirstymas pagal sezoną

Sezonas			
Pavasaris	Vasara	Ruduo	Žiema
<20 min			
23vnt. (45 %)	29 vnt. (59 %)	7 vnt. (14 %)	7 vnt. (23 %)
20-60 min			
27 vnt. (53 %)	20 vnt. (41 %)	41 vnt. (82 %)	22 vnt. (73 %)
>60 min			
1 vnt. (2 %)	0 vnt.	2 vnt. (4 %)	1 vnt. (4 %)

Mūsų tyrimas parodė, kad rūgštinės sutraukos nesudarė tik vienas vasaros sezono Lietuvos senojo genotipo juodmargių veislės karvių pieno bandinys (atvirkščiai fermentinės sutraukos sudarymo tendencijoms pagal sezoną – vasaros metu nebuvo nė vieno nekoaguliuojančio pieno bandinio). Nustatėme, kad daugiausia bandinių nepriklausomai nuo sezono rūgštinę sutrauką sudaro per 20–60 min. Rudens sezono metu pienas rūgštinę sutrauką sudaro per ilgesnį laiką. Geromis koaguliacijos savybėmis pasižyminčio pieno buvo 21 % vasaros sezono metu, tik 5 % rudens sezono metu ir nė vieno pavasario ar vasaros sezonais (15 lentelė). Palyginimui Švedijos raudonųjų veislės (n=377) karvių rūgštinės koaguliacijos laikas kinta nuo 5,7 min. iki 66,9 min., vidutinė reikšmė – $28,2 \pm 10,5$ min., taigi yra pieno, kuris nesudaro rūgštinės sutraukos per 60 min. [66].

15 lentelė. Lietuvos senojo genotipo karvių pieno RKT pasiskirstymas pagal sezoną.

Sezonas			
Pavasaris	Vasara	Ruduo	Žiema
<20 min			
0 vnt.(0 %)	3 vnt. (20 %)	1 vnt. (5 %)	0 vnt. (0 %)
20-60 min			
7 vnt. (100 %)	11 vnt. (73 %)	19 vnt. (95 %)	14 vnt. (100 %)
>60 min			
0 vnt.(0 %)	1 vnt. (7 %)	0 vnt. (0 %)	0 vnt. (0 %)

Termostabilumas ir buferiškumas

Termostabilumas ir buferiškumas yra svarbios technologinės savybės, kurios turi įtakos terminiu būdu apdorojamų pieno produktų gamybai.

Mūsų tirto pieno buferiškumo talpa, išreikšta pH pokyčiu po valandos, į pieną įpylus druskos rūgšties, buvo apytiksliai lygus 0,70 vasaros, žiemos ir rudens sezonais (16 lentelė). Pavasario sezono bandiniuose nustatėme, jog buferiškumo talpa kitų sezonų atžvilgiu yra statistiškai patikimai mažesnis ($0,51 \pm 0,15$). Chen ir kt. [80] nustatė, jog Anglijos karvių (įvairių veislių) vidutinė visų metų pieno bandinių buferiškumo talpa lygi $0,84 \pm 0,02$. Manoma, jog buferiškumas priklauso nuo mineralų kiekio ir baltymų pasiskirstymo skystoje pieno fazėje [119].

Žinoma, kad termostabilumui įtakos turi β -laktoglobulino kiekis bei urėjos koncentracija. Į pieno, kurio pH 6,3–6,7 įdėjus 25 mg% urėjos arba β -laktoglobulino termostabilumas pagerinamas reikšmingai [120, 121]. Mūsų tyrime nustatyta, kad pavasario, vasaros ir rudens sezonais termostabilumas yra atitinkamai $14,20 \pm 5,02$ min, $14,35 \pm 4,03$ min., $14,34 \pm 5,71$ min., žiemos sezonu termostabilumo reikšmė šiek tiek didesnė – $15,10 \pm 4,89$ min. (16 lentelė), tačiau statistiškai nereikšmingai. Termostabilumas yra svarbus pieno, kuris bus naudojamas sterilizacijai, UAT pasterizavimui ar garinimui parametras. Tai aktuali problema pieno pramonėje, nors Singh [122] nustatė, jog tarp blogų (<15 min.) termostabilumo savybių ir komercinio sterilizavimo proceso koreliacija yra silpna. Donato ir Guyomarc'h [121] įrodė, jog pieno pakaitinimas nulemia tvirtesnės rūgštinės sutraukos susidarymo savybę, palyginus su nekaitintu pienu.

16 lentelė. Lietuvos senojo genotipo karvių pieno buferiškumas ir termostabilumas priklausomai nuo sezono

Sezonas	Rodiklis	Technologiniai rodikliai	
		Δ pH	TC
Pavasaris	min	0,32	4
	max	0,91	20,00
	vidurkis	0,51 ^a	14,20 ^a
	SD	0,15	5,02
	n	51	49
Vasara	min	0,5	5
	max	0,82	20
	vidurkis	0,70 ^b	14,35 ^a
	SD	0,08	4,03
	n	48	48
Ruduo	min	0,3	4
	max	0,85	20
	vidurkis	0,70 ^b	14,34 ^a
	SD	0,10	5,71
	n	50	50
Žiema	min	0,16	4
	max	1,27	20
	vidurkis	0,70 ^b	15,10 ^a
	SD	0,15	4,89
	n	30	30

Pagal pieno atsparumo kaitinimui trukmę bandinius suskirstėme į tris grupes – koaguliuojantys per mažiau 15 min., atsparūs kaitinimui 15–20 min., bei termostabilūs 20 ir ilgiau min. (ties 20 minute bandymai nutraukti) (17 lentelė). Gavome, jog po 20 % pavasario ir žiemos bandinių išlieka termostabilūs 20 ir daugiau min., vasaros ir rudens bandinių – po 15 %. Vasaros ir rudens sezonais buvo daugiausia jautresnių karščiui bandinių, sudarančių nuosėdas greičiau kaip per 15 min. veikimo 140 °C temperatūra (atitinkamai 52 ir 54 %). Nors žiemos sezono bandiniai pasižymi ilgesiu termostabilumo laiku, juose nei urėjos nei β -laktoglobulino kiekiai nėra didžiausi (10, 11 lentelės).

17 lentelė. Lietuvos senojo genotipo karvių pieno termostabilumo pasiskirstymas pagal sezoną

Sezonas			
Pavasaris	Vasara	Ruduo	Žiema
<15 min.			
23 vnt. (47 %)	25 vnt. (52 %)	21 vnt. (54 %)	11 vnt. (37 %)
15-20 min.			
16 vnt. (33 %)	16 vnt. (33 %)	12 vnt. (31 %)	13 vnt. (43 %)
≥20 min.			
10 vnt. (20 %)	7 vnt. (15 %)	6 vnt. (15 %)	6 vnt. (20 %)

4.1.3. Koreliacijos tarp pieno sudėties ir technologinių rodiklių.

Apskaičiuotos koreliacijos bei jų reikšmingumo lygmuo ($P < 0,05$ reikšmė žymima *, $P < 0,01$ reikšmė žymima **, $P < 0,001$ reikšmė žymima ***) tarp Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno sudėties ir technologinių rodiklių. Rezultatai pateikti 18 lentelėje. Stipria koreliacija laikoma ta, kurios reikšmė 0,7–1,0 (raudona spalva), vidutine – 0,5–0,7 (žalia spalva), silpna 0,2–0,5 (geltona spalva), jei reikšmė $< 0,2$ – koreliacijos nėra (nekoreliuojantys rezultatai į lentelę nedėti). Iš skaičiavimų imties pašalinti nekoaguliuojančio ir daugiau kaip 500 tūkst./ml somatinių ląstelių turinčio pieno mėginių rezultatai.

18 lentelė. Koreliacinis ryšys tarp Lietuvos juodmargių galvijų pieno sudėties ir technologinių rodiklių

Sudėties rodiklis	Technologinis rodiklis	Koreliacija	Sudėties rodiklis	Technologinis rodiklis	Koreliacija
κ -kazeinas g/l	RKT, min.	0,57***	κ -kazeinas g/l	FKT, min.	-0,26**
α_{s1} -kazeinas g/l		0,48**	β -kazeinas g/l		-0,24**
β -kazeinas g/l		0,40**	Kazeino suma g/l		-0,21*
β -laktoglobulinas g/l		0,35*	κ -kazeinas:suma		-0,25**
κ -kazeinas:suma		0,55***	pH		0,24**
Ca, mg/100g pieno		0,51**	κ -kazeinas g/l		0,33**
κ -kazeinas g/l	G'_{R40} , Pa	-0,78**	α_{s1} -kazeinas g/l	G'_{F40} , Pa	0,29*
α_{s2} -kazeinas g/l		-0,69**	β -kazeinas g/l		0,34**
α_{s1} -kazeinas g/l		-0,69**	Kazeino suma g/l		0,30*
β -kazeinas g/l		-0,70**	κ -kazeinas:suma		0,34*
Kazeino suma g/l		-0,78**	Ca, mg/100g pieno		0,20
β -laktoglobulinas g/l		-0,60*	α_{s2} -kazeinas g/l	pH	0,25**
κ -kazeinas:suma		-0,65**	U, mg/proc.		0,28**
Ca, mg/100g pieno		-0,67**	L, proc.		-0,25**
pH		-0,47*	pH		Δ pH

Remdamiesi kitų mokslininkų atliktų tyrimų duomenimis, kėlėme hipotezę, jog bus gautos stiprios koreliacijos tarp tokių rodiklių: FKT arba RKT ir κ -kazeino koncentracijos, α_{s2} -kazeino koncentracijos, κ -kazeino kiekio santykio su bendru kazeino kiekiu, kalcio kiekio (Ca, mg/100g), baltymų (B, %), riebalų (R, %) koncentracijų piene [29, 80, 118]; termostabilumo ir urėjos kiekio, pieno pH, kalcio kiekio, β -laktoglobulino koncentracijos [120, 122]; buferiškumo (Δ pH) ir somatinių ląstelių skaičiaus (SLS, tūkst./ml), kalcio kiekio, bendro baltymų kiekio (B, %) [29, 119].

Atlikę skaičiavimus radome stiprių, vidutinių ir silpnų koreliacijų. Stiprios koreliacijos nustatytos tarp κ -kazeino kiekio, β -kazeino kiekio, bendro kazeino kiekio ir rūgštinės sutraukos stiprumo. Vidutinio stiprumo koreliacijos nustatytos tarp κ -kazeino kiekio bei kalcio kiekio ir RKT; α_{s2} -, α_{s1} -kazeinų, β -laktoglobulino, kalcio kiekių bei pH ir rūgštinės sutraukos stiprumo. Silpnos koreliacijos taip pat nustatytos tarp šių rodiklių: α_{s1} -kazeino, β -kazeino kiekio bei β -laktoglobulino ir RKT; α_{s2} -kazeino kiekio, urėjos koncentracijos bei laktozės kiekio ir pH; pH ir buferiškumo (Δ pH). Tarp termostabilumo ir sudėties rodiklių koreliacijų nenustatėme.

Tarp fermentinės koagulacijos ir sudėties rodiklių mūsų darbe nustatytos tik silpnos koreliacijos. Didėjant κ -kazeino, β -kazeino bei bendro kazeino kiekiui, FKT trumpėja, didėjant pH FKT ilgėja. Fermentinės sutraukos stiprumui teigiamos įtakos turi κ -kazeino, β -kazeino, α_{s1} -kazeino bei bendro kazeino kiekiai, kalcio koncentracija.

4.2. Pieno baltymų virškinamumo tyrimai

Pieno baltymų biologinė vertė įprastai išreiškiama jų aminorūgščių sudėtimi. Žinoma, kad didesnis nepakeičiamųjų aminorūgščių kiekis lemia aukštesnę šių baltymų biologinę vertę, lyginant su kitais, ypač augalinės kilmės, baltymais. Tačiau baltymų biologinės vertės nustatymui ne mažiau svarbu yra žinoti, kaip greitai žmogaus organizmas gali pasisavinti baltymus, t.y. koks yra jų biologinis prieinamumas.

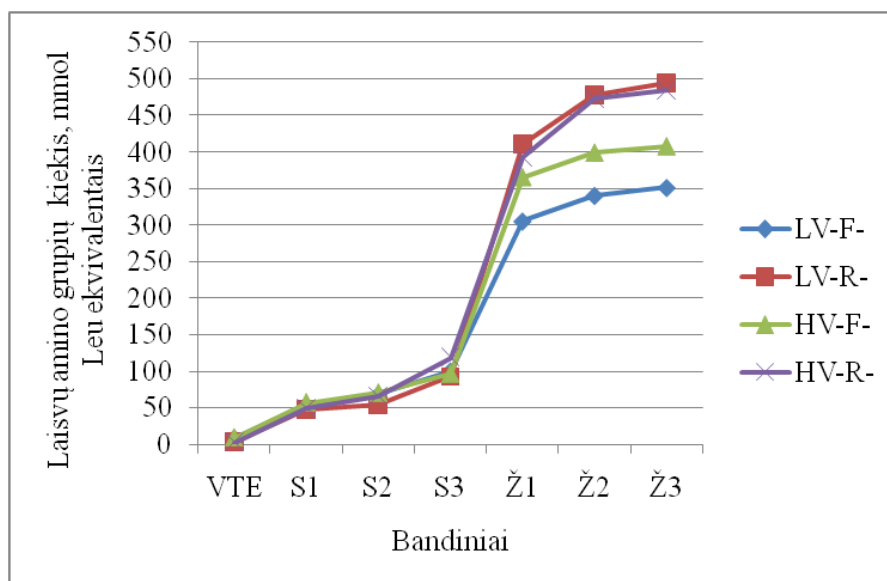
Šiame tyrimų etape lyginome senojo genotipo karvių ir Holšteino veislės karvių pieno baltymų biologinę vertę, atlikdami jų bei iš jų pagamintų rūgštinės ir fermentinės sutraukos virškinamumo tyrimus *in vitro*. Tuo tikslu imitavome pieno baltymų virškinimą skrandyje bei plonosiose žarnose ir skirtingais virškinimo etapais vertinimo tokius rodiklius: baltymų hidrolizės laipsnį fluoresamininiu metodu, baltymų hidrolizės produktų kokybinę sudėtį SDS-PAGE metodu bei baltymų hidrolizės metu susidariusių peptidų kokybinę ir kiekybinę sudėtį SCh-ESI-MS/MS metodu.

4.2.1. Pieno baltymų hidrolizės laipsnio įvertinimas virškinimo *in vitro* etapuose

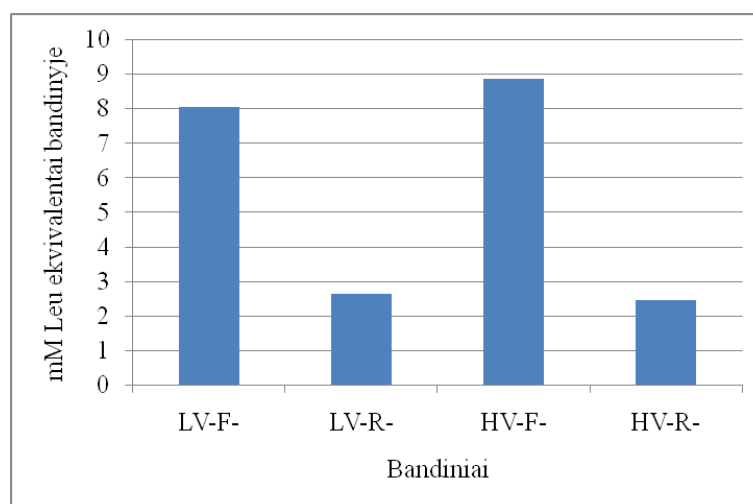
Iš senojo genotipo ir Holšteino veislės karvių pieno pagamintų rūgštinės bei fermentinės sutraukų proteolizės laipsnis virškinimo metu įvertintas naudojant fluoresciminę analizę, kuria nustatomas laisvų aminorūgščių ir peptidų pirminių amino grupių kiekis, išreikštas mMol Leu ekvivalentais. Nustatėme, kad visų mėginių virškinimo metu laisvų aminorūgščių ir mažos molekulinės masės peptidų koncentracija palaipsniui didėja veikiant proteolitiniams virškinimo fermentams (13 pav.). Virškinimo skrandyje metu (S1, S2, S3 bandiniai atitinkamai paimti po 30 min., 60 min., 120 min. virškinimo skrandyje imitavimo) abiejų veislių karvių pieno produktų hidrolizavimo tendencijos panašios. Akivaizdus skirtumas atsiranda prasidėjus virškinimo žarnyne etapui (Ž1, Ž2, Ž3 bandiniai atitinkamai paimti po 30 min., 60 min., 120 min. virškinimo žarnyne imitavimo). Nustatėme, jog po 4 valandų virškinimo imitavimo *in vitro* sistemoje (Ž3) daugiau (500 mMol Leu ekvival.) mažos molekulinės masės junginių buvo atskelta nuo baltymų grandinės rūgštiniu būdu gamintoje sutraukoje nei nuo baltymų fermentiniu būdu gamintoje sutraukoje (350-400 mMol Leu ekvival.). Barbe ir kt. [41] aprašė tyrimą, kurio metu nustatyta, jog pieno rūgštiniai ir fermentiniai geliai pasižymi skirtinga virškinimo kinetika. Įrodyta, jog pieno baltymų koaguliavimo procesas turi įtakos pieno produktų mitybinei vertei atpalaiduojamų aminorūgščių atžvilgiu. Virškinant fermentiniu būdu gautą pieno sutrauką į kraujo plazmą patenka ženkliai mažesni kiekiai aminorūgščių nei virškinant rūgštinės koaguliacijos būdu gautą pieno sutrauką. Toks skirtumas aiškinamas tuo, jog fermentiniu būdu koaguliavusio pieno kazeino micelės pH yra aukštesnis nei rūgštiniu būdu (pH 4,6), todėl praeina ilgesnis laikas, kol pepsinas pradeda hidrolizuoti baltymus (pepsinolizė prasideda kai terpės pH 2). Taip pat hidrolizės skirtumai gali atsirasti dėl skirtingos sutraukų makrostruktūros. Tik 25 % kazeino aminorūgščių pavidalu aptinkama kraujo plazmoje praėjus 12 valandų po virškinimo pradžios, kai tuo tarpu pasisavinama 90 % rūgštiniu būdu koaguliavusių pieno baltymų [83, 110].

Tiek iš Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės veislės pieno, tiek iš Holšteino veislės karvės pieno pagamintos rūgštinės sutraukos virškinimo tendencijos mažos molekulinės masės junginių susidarymo atžvilgiu panašios (atitinkamai LV–R ir HV–R kreivės). Priešingai šiai tendencijai, akivaizdus skirtumas matomas tarp iš skirtingų karvių veislių pieno pagamintos fermentinės sutraukos virškinimo – nuo fermentinės sutraukos, pagamintos iš holšteinizuotos veislės karvių pieno, atskeliamas didesnis kiekis laisvų aminorūgščių ir peptidų (skirtumas apie 50 mMol Leu ekvival.).

Lyginant pieno baltymų koaguliacijos įtaką laisvų aminorūgščių susidarymui, matoma, jog didesnis laisvų aminorūgščių ir peptidų kiekis randamas fermentinės sutraukos (LV-F, HV-F) nei rūgštinės sutraukos (LV-R, HV-R) VTE bandiniuose (14 pav.)



13 pav. Laisvų amino grupių skaičius (išreikštas mMol Leu ekvivalentų koncentracija bandinyje) kitimas pieno baltymų virškinimo metu: LV-F – fermentinė sutrauka, pagaminta iš senojo genotipo karvių pieno, LV-R – rūgštinė sutrauka, pagaminta iš senojo genotipo karvių pieno, HV-F – fermentinė sutrauka, pagaminta iš Holšteino veislės karvių pieno, HV-R – rūgštinė sutrauka, pagaminta iš Holšteino veislės karvių pieno. Bandinių skiedimas, nepriklausomai nuo virškinimo etapo, normalizuotas pagal mažiausią skiedimą.



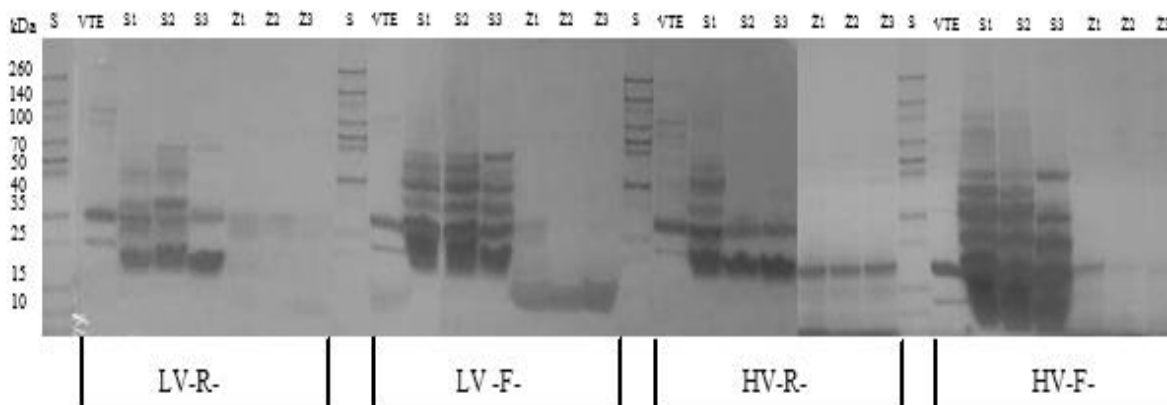
14 pav. Laisvų amino grupių skaičius, išreikštas mMol Leu ekvivalentais, skirtingu būdu gautų sutraukų vandenyje tirpiuose ekstraktuose

Pieno bandiniuose laisvų aminorūgščių kiekis buvo toks mažas, kad identifikuoti nepavyko. Žinoma, jog sveikų karvių piene baltymų skilimas nevyksta. Baltymų skilimo produktų daugėja didėjant somatinių ląstelių skaičiui (SCC) karvių užkrėstų *S. Uberis* piene [39].

4.2.2. Pieno baltymų proteolizės produktų kokybinis įvertinimas įvairiuose virškinimo *in vitro* etapuose

Anksčiau aptartus rezultatus apie mažos molekulinės masės baltymų skilimo produktų didėjimo tendencijas virškinimo metu patvirtina ir baltymų hidrolizės produktų kokybinės analizės rezultatai, kuriuos gavome SDS–PAGE metodu. Žinoma, kad kazeino frakcijų molekulinė masė yra 11÷25 kDa. 15 paveiksle matoma, jog virškinimo pradžioje visų sutraukų bandiniuose vyrauja didesnės molekulinės masės azoto junginiai (kazeino frakcijos). Tai rodo, jog baltymai nėra pilnai suvirškinami skrandyje. Svarbiausias baltymų virškinimo ir pasisavinimo etapas – proteolizė, įvyksta žarnyne [83]. Prasidėjus virškinimo plonosiose žarnose etapui tiek fermentinės tiek rūgštinės sutraukos virškinimo sultyse matoma, jog stambiamolekuliai junginiai yra visiškai hidrolizuoti iki mažos molekulinės masės (<11 kDa) azoto junginių (kazeino frakcijos hidrolizės produktų).

Abiejų veislių karvių pieno sutraukų vandens ekstraktų (VTE) profiliai yra panašūs. Ant poliakrilamido gelio matomas vandenyje ištirpęs kazeinas bei galimai β–laktoglobulinas (18 kDa) [42] (šis baltymas teoriškai turėjo būti pašalintas išrūgų atskyrimo metu (žr. 3.6 skyrių), tačiau likučiai galimai liko prikibę prie kazeino micelių aglomeratų iki išplovimo vandeniu – VTE paruošimo).



15 pav. Sutraukų baltyminių medžiagų kitimo profiliai virškinimo metu, nustatyti elektroforezės metodu (SDS-PAGE)

4.2.3. Baltymų virškinimo *in vitro* metu susidariusių peptidų profilis

Peptidų profilio analizė Sch–ESI–MS/MS metodu atlikta skirtingų karvių (Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės veislės LV, Holšteino veislės karvės HV) skirtingais būdais (fermentiniu F ir rūgštiniu R) pagamintų sutraukų vandeniniams ekstraktams (VTE) ir mėginiams po 2 val. virškinimo skrandyje (S3) ir 2val. virškinimo žarnose (Ž3). Gauti peptidai identifikuoti naudojant Mascot duomenų bazę ir priskirti tam tikros kazeino frakcijos (β , α_{s1} , α_{s2} arba κ) proteolizės produktams.

Biologiškai aktyvūs peptidai gali susidaryti dviem keliais: pačiuose pieno produktuose, priklausomai nuo jų gamybos sąlygų ir baltymų skilimo procesų bei žmogaus organizme, virškinant pieno baltymus. Tyrimo metu identifikuoti bioaktyvūs peptidai, susidarę tiek technologinio proceso, tiek virškinimo imitavimo *in vitro* sistemoje metu.

Analizuodami duomenis radome peptidų, kurie atskelti ne tik nuo kazeino bet ir nuo β -laktoglobulino baltymo molekulės. Kad rūgštinės ir fermentinės sutraukų bandiniuose galimai yra β -laktoglobulino parodė ir elektorforezės rezultatai (15 pav).

Peptidų, atskeltų nuo išrūgų baltymo β -laktoglobulino radome tik bandiniuose po sutraukų 2 val. virškinimo skrandyje. Pasibaigus virškinimo žarnyne imitavimo procesui β -laktoglobulino hidrolizė buvo įvykusi pilnai. Abiejų tiriamų karvių pieno sutraukų iš β -laktoglobulino pepsino atskeltų peptidų profilis panašus (8 lentelė). Literatūroje pažymima, jog natyvinis β -laktoglobulinas yra atsparesnis virškinimui skrandžio fermentais nei kazeinas dėl savo antrinės struktūros [48], tačiau Pinto ir kt. [123] nustatė, jog β -laktoglobulinas tampa jautresnis virškinimo fermentams po kaitinimo ir yra visiškai suvirškinamas po 40 min. veikimo pepsinu (aktyvumas 3800 U/mg).

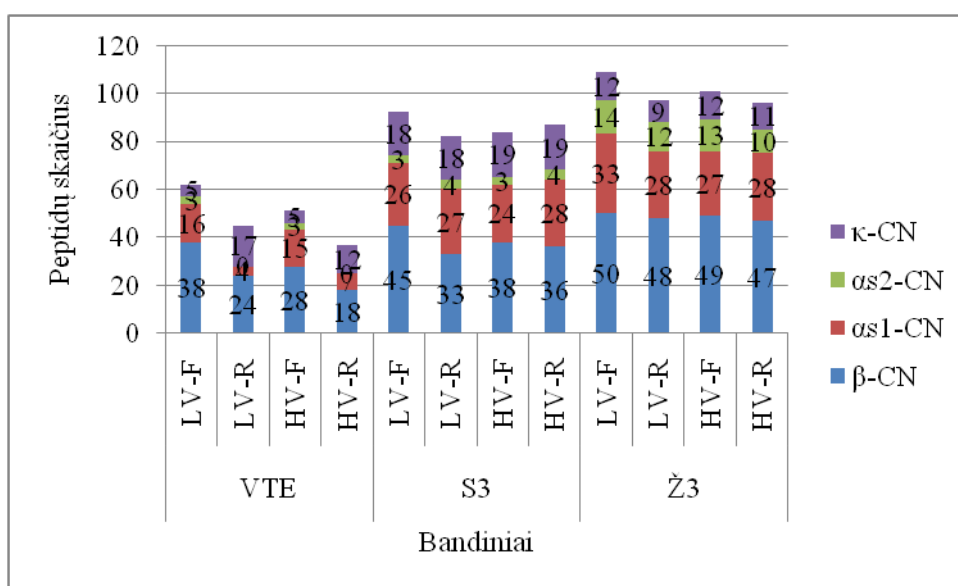
18 lentelė. Rūgštinės ir fermentinės sutraukų virškinimo *in vitro* skrandžio etapo pabaigoje susidarę peptidai, kurių prekursorius išrūgų baltymas β -laktoglobulinas

Identifikuota masė	Teorinė masė	Padėtis grandinėje	Peptidas	S3 bandinys			
				LV-F	LV-R	HV-F	HV-R
901,508	901,502	12–19	IQKVAGTW	+	+	+	+
955,502	955,509	33–41	DAQSAPLRV	+	+	+	+
1068,636	1068,593	32–41	LDAQSAPLRV	+	+	+	+
1104,559	1104,585	02–11	IVTQTMKGLD	+	+	+	+
1129,581	1129,613	10–19	LDIQKVAGTW				+
1488,641	1488,735	42–54	YVEELKPTPEGDL		+	+	+

Atlikę bandinių chromatografinę analizę, kaip detektorius naudojant masių spektroskopą, ir išanalizavę duomenis duomenų bazėje Mascot (Matrix Science, MA, US) identifikavome 317 skirtingus peptidus, atskeltus fermentinės ir rūgštinės sutraukų technologinio proceso metu, arba

šių sutraukų virškinimo *in vitro* metu, veikiant proteazėms (pepsino, tripsino, chimotripsino ir kt., esančioms virškinimo sulčių sudėtyje. Nustatėme, kad 151 peptidas buvo atskeltas nuo β -kazeino molekulės, 81 peptidas nuo α_{s1} -kazeino molekulės, 25 – nuo α_{s2} -kazeino molekulės ir 60 – nuo κ -kazeino molekulės. Iš viso identifikavome 317 skirtingų peptidų (iš jų 10 fosfopeptidų), kurių prekursorius yra pagrindinis pieno baltymas kazeinas. Kazeinas sudaro apie 80 % visų pieno baltymų, α_{s1} -, α_{s2} -, β -, ir κ -kazeinų frakcijos pasiskirsčiusios atitinkamai santykiais 4:1:4:1 [40]. Mūsų tyrimo duomenimis gautų peptidų kokybinis pasiskirstymas apytiksliai lygus 3:1:6:2. Schmelezer ir kt. [124] atliko β -kazeino frakcijos rūgštinę hidrolizę su HCl bei hidrolizę pepsinu ir identifikavo 125 skirtingus peptidus. Zhao ir kt. [48] atliko išgryninto β -kazeino virškinamumą *in vitro* sistemoje ir identifikavo tik 14 peptidų. Kai kurie iš jų rasti ir šio tiriamojo darbo bandiniuose (fragmentai 193–209, 193–207, 129–142, 177–189, 164–176).

Peptidų, gautų iš tam tikros pieno baltymų frakcijos pasiskirstymas bandiniuose pavaizduotas 16 paveiksle.



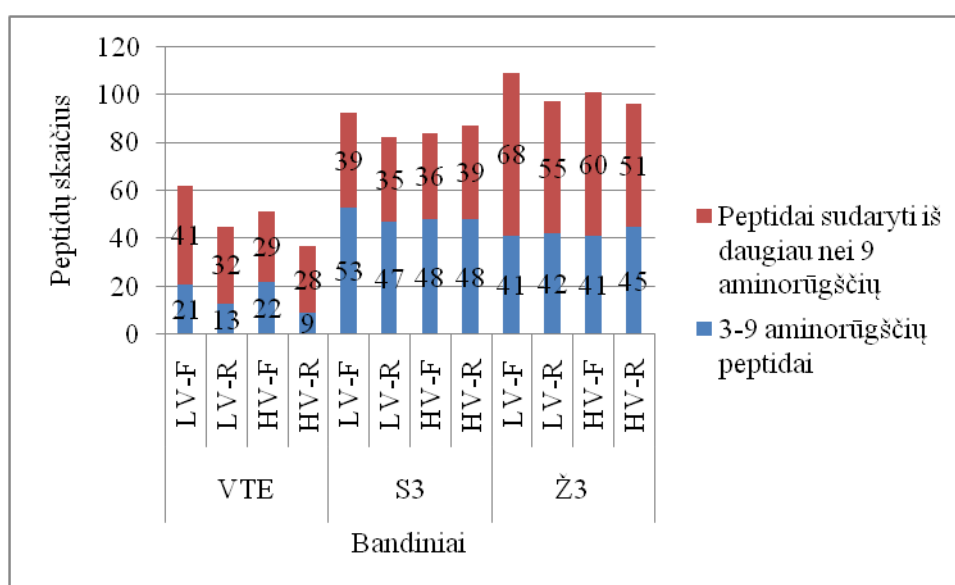
16 pav. Peptidų, gautų iš sutraukų skirtingų kazeino frakcijų technologinio proceso ir virškinimo metu, kiekybinis pasiskirstymas

Diagramoje matoma, jog daugiausiai peptidų tiek technologinio proceso metu tiek virškinimo skirtinguose etapuose metu buvo atskelta nuo β -kazeino grandinės, nes tai didžiausia kazeino frakcija. Svarbu pažymėti, kad Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno fermentinės sutraukos proteolizės profilis pasižymi didžiausiu skirtingų peptidų kiekiu.

Identifikuoti peptidai sudaryti iš mažiausiai 5 (rasta visuose bandiniuose), daugiausiai 25 aminorūgščių (identifikuotas peptidas atskeltas nuo Holšteino veislės karvės pieno rūgštinės

sutraukos β -kazeino frakcijos po 2 val. virškinimo skrandyje) (žr. 1 priedas). Bioaktyvūs peptidai, gaunami iš pieno baltymų, paprastai būna sudaryti iš 2–20 aminorūgščių [87]. Mažos molekulinės masės peptidams priskyrėme peptidus, kurie sudaryti iš 3–9 aminorūgščių [88]. Mažų – didelių peptidų pasiskirstymas bandiniuose pavaizduotas 17 pav.

Fermentinės ir rūgštinės sutraukų vandeniniuose ekstraktuose (VTE bandiniai) nustatytas mažesnis bendras peptidų kiekis (ypač mažos molekulinės masės), nei tų pačių sutraukų bandiniuose po virškinimo. Abiejų sutraukų virškinimo metu atskeliamų nuo baltymų grandinės peptidų skaičius didėja: po 2 val. virškinimo žarnyne (Ž3 bandiniai) bendras peptidų skaičius yra didesnis nei po 2 val. virškinimo skrandyje (S3 bandiniai). 17 paveiksle matoma, jog po virškinimo plonosiose žarnose daugėja didesnių peptidų, o mažos molekulinės masės peptidų skaičius nežymiai mažėja.



17 pav. Peptidų, gautų iš sutraukų skirtingų kazeino frakcijų technologinio proceso ir virškinimo metu, kiekybinis pasiskirstymas bandiniuose pagal aminorūgščių kiekį

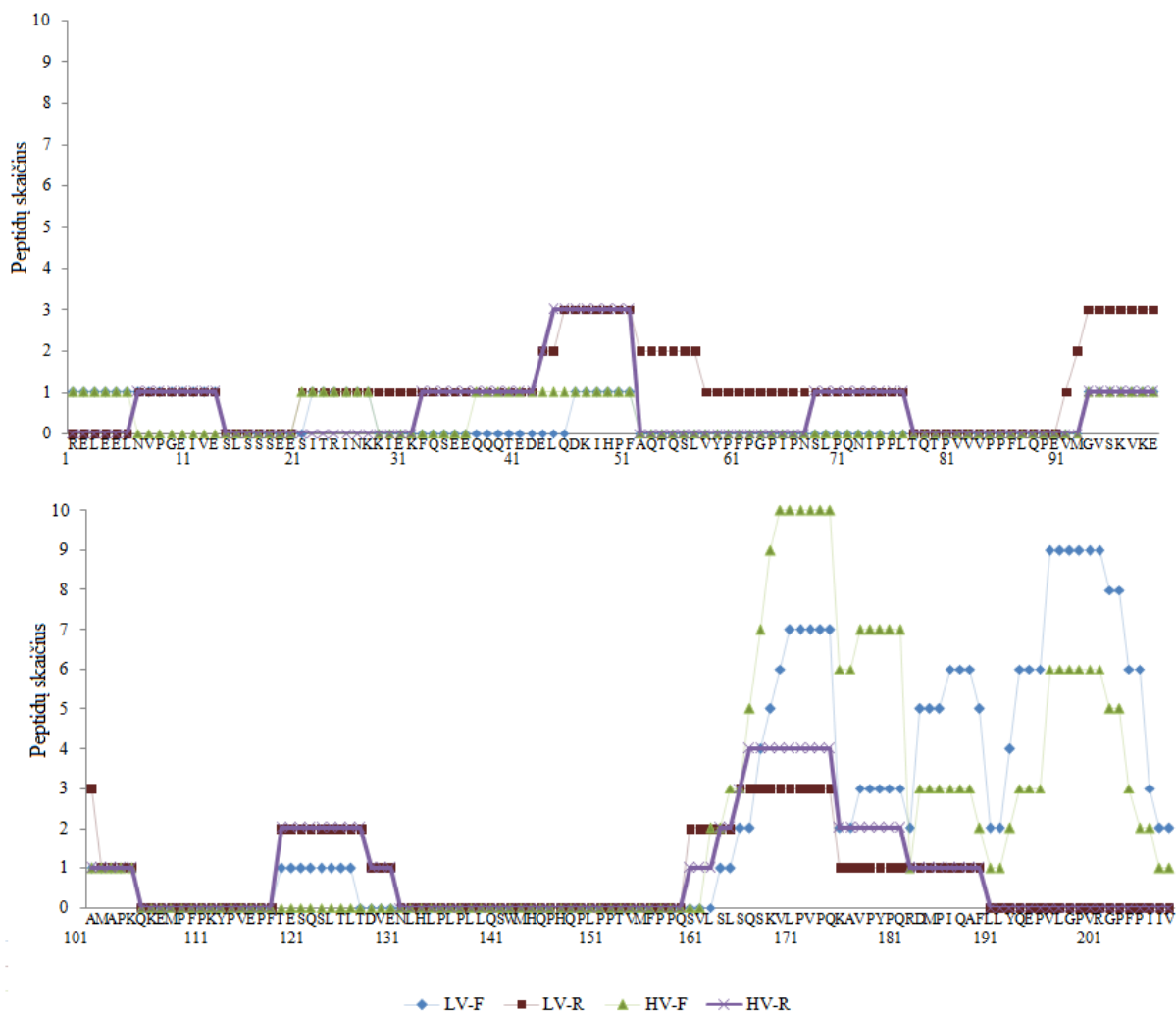
4.2.4. Baltymų skilimo ir peptidų susidarymo skirtumai fermentinėje bei rūgštinėje sutraukoje

Tiek fermentinėje, tiek rūgštinėje sutraukoje peptidai pradeda formotis pieno technologinio apdorojimo metu. Pienarūgštės raugo bakterijos, naudojamos rūgštinės sutraukos gamyboje kaip pagrindinis technologinis veiksnys bei fermentinės sutraukos gamyboje pH sumažinimui iki fermento renino optimalaus pH (6–6,6), išskiria fermentus, kurie pradeda baltymų hidrolizę.

Išanalizavę VTE peptidų atskeltų nuo β -kazeino grandinės profilius gavome, kad iš 55 skirtingų peptidų tik 4 rasti visuose bandiniuose (18 pav.). 20 peptidų radome tik abiejų veislių

karvių pieno fermentinių sutraukų vandeniniuose ekstraktuose, 5 peptidai buvo identifikuoti tik Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pieno fermentinėje sutraukoje. Abiejų analizuojamų karvių pieno rūgštinėse sutraukose rasti 9 peptidai, 7 peptidai identifikuoti tik Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės rūgštinės sutraukos VTE, peptidų būdingų tik Holšteino veislės karvės pieno rūgštinei ar fermentinei sutraukai nerasta. Iš κ -kazeino grandinės fermentinės sutraukos gamybos metu buvo atskelta mažiau peptidų nei rūgštinės sutraukos gamybos metu (19 pav.). Identifikavome 5 peptidus (vienas iš jų pasižymi bioaktyvumu), kurie būdingi abiejų tiriamų veislių karvių pieno fermentinėms sutraukoms. 3 iš šių 5 peptidų rasti ir rūgštinų sutraukų vandeniuose ekstraktuose. Rūgštinės sutraukos vandeniuose ekstraktuose rasta iš viso 20 peptidų, iš kurių 8 būdingi tik Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pieno rūgštinei sutraukai, 3 – Holšteino veislės karvės pieno rūgštinei sutraukai. 45 % peptidų būdingi abiejų veislių karvių rūgštinų sutraukų vandeniniams ekstraktams. Iš α_{s2} -kazeino rūgštinės sutraukos gamybos metu neatskeltas nė vienas peptidas, rasti 3 peptidai, kurie būdingi abiejų tiriamų karvių veislių pieno fermentinių sutraukų vandeniniams ekstraktams. α_{s1} -kazeino grandinė technologinio proceso metu suskaldyta taip, kad 9 % peptidų rasti visuose tirtuose bandiniuose, 41 % peptidų būdingi tik fermentinių sutraukų vandeniniams ekstraktams, 14 % identifikuota tik rūgštinų sutraukų vandeniniuose ekstraktuose (iš viso 21 peptidas). 3 peptidai būdingi tik Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pieno fermentinei sutraukai, tuo tarpu 2 peptidai rasti tik Holšteino veislės karvės pieno fermentinės sutraukos vandeniniame ekstrakte. 1 peptidas būdingas tik Holšteino veislės karvės pieno rūgštinei sutraukai, Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pieno rūgštinėje sutraukoje nerasta peptidų, kurie būtų būdingi tik jai vienai.

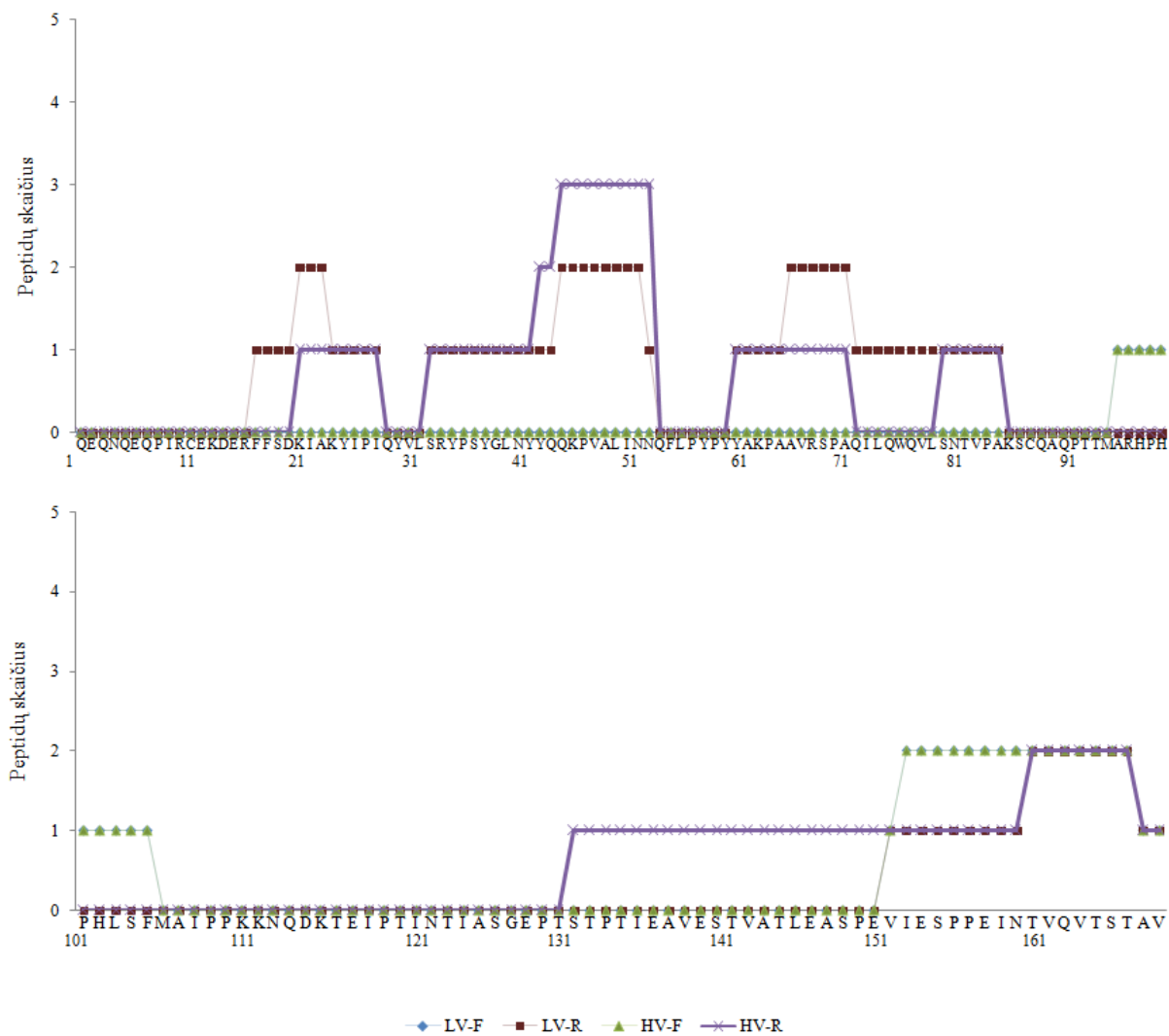
Gauta tendencija, jog didesnis skirtingų peptidų kiekis rastas fermentinės sutraukos bandiniuose prieš virškinimą. Fluoresamininės analizės, kurios metu nustatytas laisvų amino grupių kiekis, išreikštas mMol Leu ekvivalentais, rezultatai parodė, jog daugiau mažos molekulinės masės junginių yra bandiniuose, kurie pagaminti naudojant pienarūgštes bakterijas ir fermentą, o ne vien pienarūgštes bakterijas (17 pav). Renino poveikis labiausiai pasireiškia 167–209 β -kazeino grandinės fragmente. Čia akivaizdžiai atskelta daugiau skirtingų peptidų nuo fermentinės sutraukos vandeninių ekstraktų (LV-F ir HV-F kreivės), nei nuo rūgštinės sutraukos vandeninių ekstraktų (LV-R ir LV-F kreivės). Rūgštinės sutraukos β -kazeino 41–81 regionas jautresnis hidrolizei nei fermentinės sutraukos 18 pav.



18 pav. Vandenyje tirpių ekstraktų (VTE) β -kazeino frakcijos hidrolizės produktų profilis

Fermentinės sutraukos gamybos metu hidrolizuotas α_{s2} -kazeino grandinės galas – 166–195 regionas. Kai tuo tarpu α_{s1} -kazeino grandinės hidrolizės produktų rasta daugiausiai atskeltų nuo grandinės pradžios.

Fermentinės sutraukos gamyboje κ -kazeino suskaldymas ties jautriausia jungtimi (105–106) yra svarbiausias žingsnis fermentinės sutraukos susidarymo procese [55]. Išanalizavus fermentinių sutraukų VTE gautas 1 peptidas atskeltas nuo para- κ -kazeino grandinės (96–105), likę 4 yra glikomakropeptido hidrolizės produktai. Glikomakropeptido grandinės galinės grupės neatsparios hidrolizei, 3 peptidai rasti ir rūgštinių sutraukų vandeniniuose ekstraktuose. Kiti peptidai, identifikuoti rūgštinių sutraukų bandiniuose atskelti nuo 21–85 κ -kazeino grandinės dalių.



19 pav. Vandenyje tirpių ekstraktų (VTE) κ -kazeino frakcijos hidrolizės produktų profilis

Kartieji peptidai

Karčiųjų peptidų susidarymas priklauso nuo gamybai naudojamų pienarūgščių bakterijų. Jų pagrindiniai prekursoriai α_{s1} -ir β -kazeinai. Šie peptidai turi įtakos galutinio produkto skoniui. Sutraukų VTE bandiniuose nustatėme kartųjį peptidą atskeltą nuo β -kazeino grandinės (176–182 fragmentas, KAVPYPQ) [125].

4.2.5. Peptidų profilio kitimas pieno fermentinės ir rūgštinės sutraukų virškinimo *in vitro* metu

β -kazeino hidrolizė

50 % bendro skirtingų peptidų atskeltų nuo β -kazeino grandinės identifikuotų po 2 val. virškinimo skrandyje imitavimo *in vitro* sistemoje būdingi abiejų tiriamų karvių pieno abiejų tipų sutraukų S3 bandiniams, iš jų 16 % pasižymi bioaktyvumu. 10 % bioaktyvių peptidų atsparūs tolimesnei hidrolizei ir rasti Ž3 bandiniuose po virškinimo žarnyne imitavimo *in vitro* sistemoje.

1 peptidas būdingas tik Holšteino veislės karvės pieno abiejų tipų sutraukų Ž3 bandiniams. Skirtumų tarp sutraukos tipo virškinimo žarnyne peptidų profilio atžvilgiu daugiau – rasta 3 ir 2 peptidai būdingi tik atitinkamai fermentinių ir rūgštinių sutraukų Ž3 bandiniams nepriklausomai nuo karvės veislės. 13 peptidų rasti tik viename kažkuriame Ž3 bandinyje iš 4 (6 peptidai – LV–F–S3 bandinyje, 2 – LV–R–S3, 2 – HV–F–S3, 3 – HV–R–S3). Po 2 val. virškinimo žarnyne rasti 44 skirtingi peptidai, 8 iš jų pasižymi bioaktyviomis savybėmis, 5 iš jų būdingi abiejų tiriamų karvių abiejų tipų sutraukų Ž3 bandiniams. 35 % peptidų rastų Ž3 bandiniuose buvo rasti ir S3 bandiniuose. 50 % bendro skirtingų peptidų skaičiaus identifikuoti visuose Ž3 bandiniuose, 1 peptidas būdingas tik senojo genotipo Lietuvos juodmargės karvės pieno abiejų tipų sutraukų Ž3 bandiniams, 3 – Holšteino veislės karvės pieno abiejų tipų sutraukų Ž3 bandiniams, 1 iš jų pasižymi biologiniu aktyvumu (VYPFPGPIPNSLPQNIPPLTQT 59–80 fragmentas)

α_{s1} –kazeino hidrolizė

58 % skirtingų peptidų atskeltų nuo α_{s1} –kazeino grandinės identifikuotų po 2 val. virškinimo skrandyje imitavimo *in vitro* sistemoje būdingi abiejų tiriamų karvių pieno abiejų tipų sutraukų S3 bandiniams, iš jų 18 % pasižymi bioaktyvumu, 36 % peptidų yra atsparūs tolimesnei hidrolizei ir žarnyno fermentų veiklai, todėl randami ir bandiniuose po 2 val. virškinimo žarnyne (Ž3 bandiniai). 4 peptidai yra būdingi tik Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pieno sutraukos proteolizės skrandyje produktams (1 peptidas būdingas tik rūgštinės sutraukos S3 bandiniui, 1 – tik fermentinės sutraukos S3 bandiniui), 5 peptidai būdingi tik Holšteino veislės karvės pieno sutraukos proteolizės skrandyje produktams (3 iš jų būdingi tik rūgštinės sutraukos bandiniui po virškinimo (S3)). 2 peptidai būdingi abiejų tiriamų karvių rūgštinių sutraukų S3 bandiniams, kai tuo tarpu tik fermentinių sutraukos S3 bandiniui būdingų peptidų nerasta. Bandiniuose po 2 val. virškinimo žarnyne imitavimo *in vitro* sistemoje radome 38 skirtingus peptidus, 42 % identifikavome visuose Ž3 bandiniuose. 2 peptidai buvo identifikuoti tik fermentinių sutraukų Ž3 bandiniuose, 1 peptidas tik rūgštinių abiejų karvių veislių pieno sutraukų Ž3 bandiniuose. Peptidų, būdingų tik vienos kaž kurios veislės abiejų tipų sutraukų Ž3 bandiniams nenustatėme.

α_{s2} –kazeino hidrolizė

40 % bendro skirtingų peptidų atskeltų nuo α_{s2} –kazeino grandinės identifikuotų po 2 val. virškinimo skrandyje imitavimo *in vitro* sistemoje skaičiaus būdingi abiejų tiriamų karvių pieno abiejų tipų sutraukų S3 bandiniams. Abiejų veislių karvių pieno sutraukų S3 bandiniai tarpusavyje nesiskiria peptidų profiliu, skirtumas yra tik tarp skirtingų sutraukų S3 bandinių. Visi peptidai hidrolizuojami iki aminorūgščių per 2 val. virškinimo žarnyne imitavimą *in vitro*

sistemoje – Ž3 bandiniuose nerastas nė vienas peptidas, kuris būtų nustatę anksčiau. 41 % peptidų rastų Ž3 bandiniuose būdingas visiems. Radome po 1 peptidą, kuris būdingas: tik Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pieno abiejų tipų sutraukų Ž3 bandiniams; tik Holšteino veislės karvės pieno abiejų tipų sutraukų Ž3 bandiniams; tik fermentinių sutraukų Ž3 bandiniams nepriklausomai nuo pieno, bei tik rūgštinių sutraukų Ž3 bandiniams nepriklausomai nuo pieno. Visuose Ž3 bandiniuose rastas bioaktyvumu pasižymintis peptidas (AMKPW 189–193 fragmentas).

κ-kazeino hidrolizė

2 peptidai, kurie buvo būdingi rūgštinių sutraukų VTE bandiniams išlieka arba atsiranda visuose bandiniuose po 2 val. virškinimo skrandyje imitavimo *in vitro* sistemoje, vienas iš jų atsparus tolimesnei hidrolizei ir rastas visuose Ž3 bandiniuose. 65 % peptidų, kuriuos radome S3 bandiniuose yra būdingi visiems keturiems tirtiems S3 bandiniams. Juose nustatėme 2 bioaktyvumu pasižyminčius peptidus (VQVTSTAV 162–169 fragmentas, FSDKIAKYIPIQ 18–29 fragmentas). Rasta po 1 peptidą, kuris būdingas tik fermentinių sutraukų Ž3 bandiniams nepriklausomai nuo pieno, bei tik rūgštinių sutraukų Ž3 bandiniams nepriklausomai nuo pieno. Po 2 val. virškinimo imitavimo žarnyne *in vitro* sistemoje nustatėme 3 peptidus, kurie radome ir bandiniuose po virškinimo skrandyje fazės. Iš 17 peptidų būdingų Ž3 bandiniams 6 rasti visuose bandiniuose nepriklausomai nuo karvės veislės ar sutraukos tipo, 3 peptidai būdingi tik fermentinių sutraukų Ž3 bandiniams, 2 tik rūgštinių sutraukų bandiniams.

4.2.6. Bioaktyvūs peptidai, nustatyti pieno fermentinės ir rūgštinės sutraukų virškinimo *in vitro* metu

Bioaktyvūs peptidai iš pieno baltymų gali būti gauti tokiais būdais: pieno fermentacija proteolitinėmis startinėmis kultūromis, proteolitiniais mikrobiologinės ar augalinės kilmės fermentais arba fermentinė hidrolizė virškinimo fermentais [126].

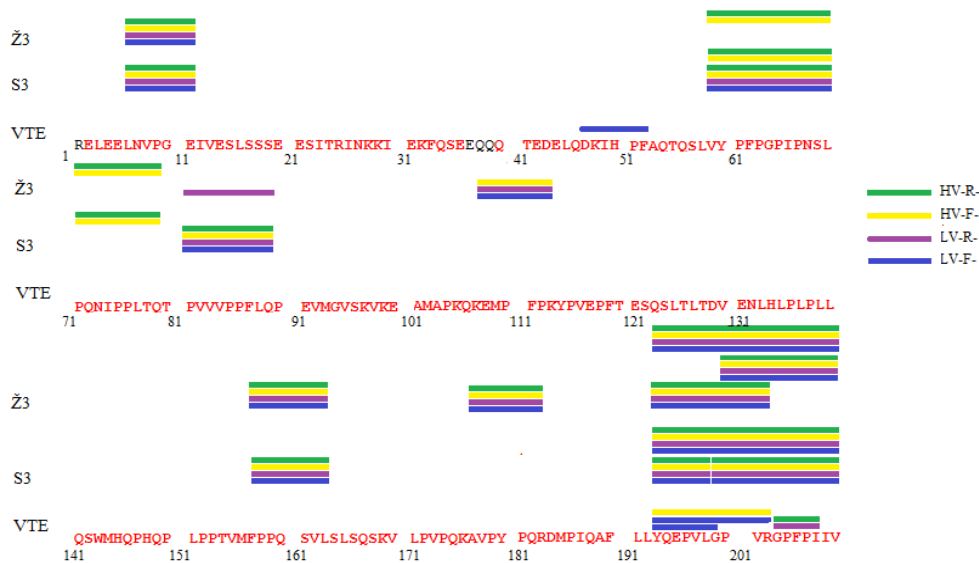
Remiantis užsienio autorių bioaktyvių peptidų, gaunamų iš pieno baltymų virškinimo metu, tyrimais, išnagrinėtas Lietuvos senojo genotipo juodmargių veislės karvės ir Holšteino veislės karvės pieno rūgštinių ir fermentinių sutraukų bioaktyvumu pasižyminčių peptidų atpalaidavimo profilis virškinimo metu ir prieš virškinimą (VTE). Rezultatai pateikti 2 priedo lentelėse.

Tarp bioaktyviomis savybėmis pasižyminčių peptidų daugiausiai identifikavome ACE inhibitorinį poveikį turinčių peptidų: 27 peptidai iš 30. Šie inhibitoriai sumažina širdies, kraujagyslių ligų riziką [101, 127]. Pieno baltymų peptidams taip pat būdingas antioksidacinis

veikimas [44] (žr. 5 lentelė). Šiame tiriamajame darbe neidentifikuotas nė vienas antioksidaciniu veikimu pasižymintis peptidas.

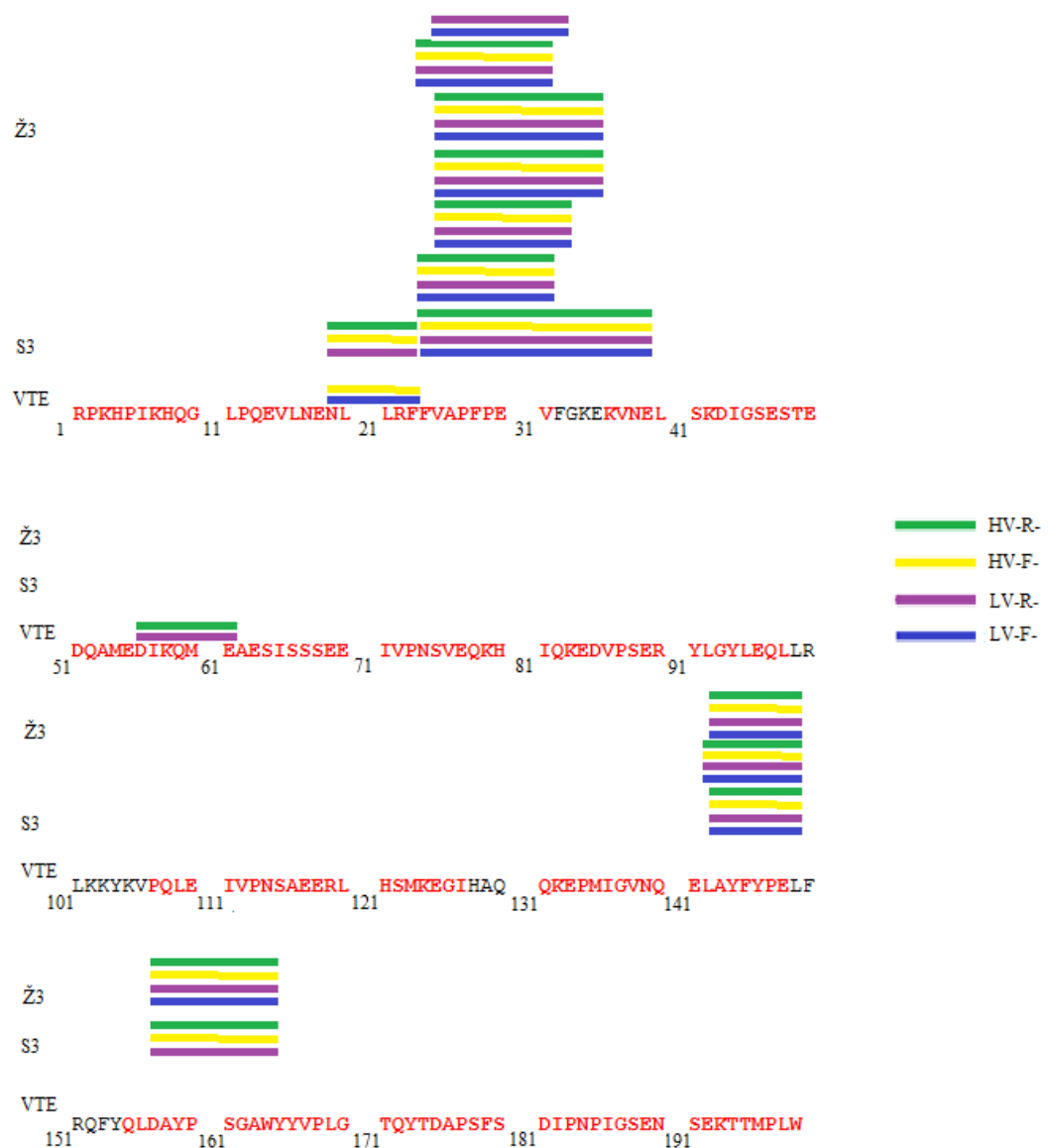
Daugiausia bioaktyvių peptidų radome atskeltų nuo β -kazeino frakcijos, iš viso 14. 11 iš jų ACE inhibitoriai, o likę trys - imunomodulatorinis-antimikrobinis peptidas, β -kazoksinas bei katepsino B inhibitorius. Taip pat daug ACE inhibitorių atskelta nuo α_{s1} -kazeino proteolizės metu (11 peptidų). Stuknyte ir kt. [101] ištyrė peptidus gautus iš 12 skirtingų rūšių sūrių vandeninių ekstraktų ir po veikimo virškinimo fermentais, pasižymintius ACE inhibitoriniu poveikiu. Analizuotų peptidų (β -kazeino 84–86, 74–76, 134–138, 133–138 ir α_{s1} -kazeino 90–93, 90–94, 143–148, 143–149 fragmentai) koncentracija VTE buvo labai plačiose ribose – nuo 0,87 iki 331 mg/kg. Mokslininkė nustatė, kad peptidų kiekis priklausė nuo gamybos būdo ir brandinimo laiko – sūrio laikymo metu daugėja bioaktyviomis savybėmis pasižymintį peptidų. Mūsų darbe analizuotų šviežiai pagamintų sutraukų VTE bandiniuose anksčiau minėti peptidai neidentifikuoti.

Svarbu paminėti, kad akivaizdžių bioaktyvių peptidų profilio skirtumų fermentinėse ir rūgštinėse sutraukose nepastebėta. Daugelis bioaktyvių peptidų identifikuoti visuose bandiniuose. Po Holšteino veislės karvės pieno fermentinės ir rūgštinės sutraukų virškinimo žarnyne išlieka ACE inhibitoriniu poveikiu pasižymintis peptidas buvęs β -kazeino 59–80 padėtyje, kai tuo tarpu po Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pieno sutraukų virškinimo žarnyne jo nelieka (20 pav.). VTE rasti bandiniai neišliko virškinimo metu ir buvo suskaidyti iki aminorūgščių, todėl jų potencialus fiziologinis poveikis galimai nepasireikštų vartotojo sveikatai.



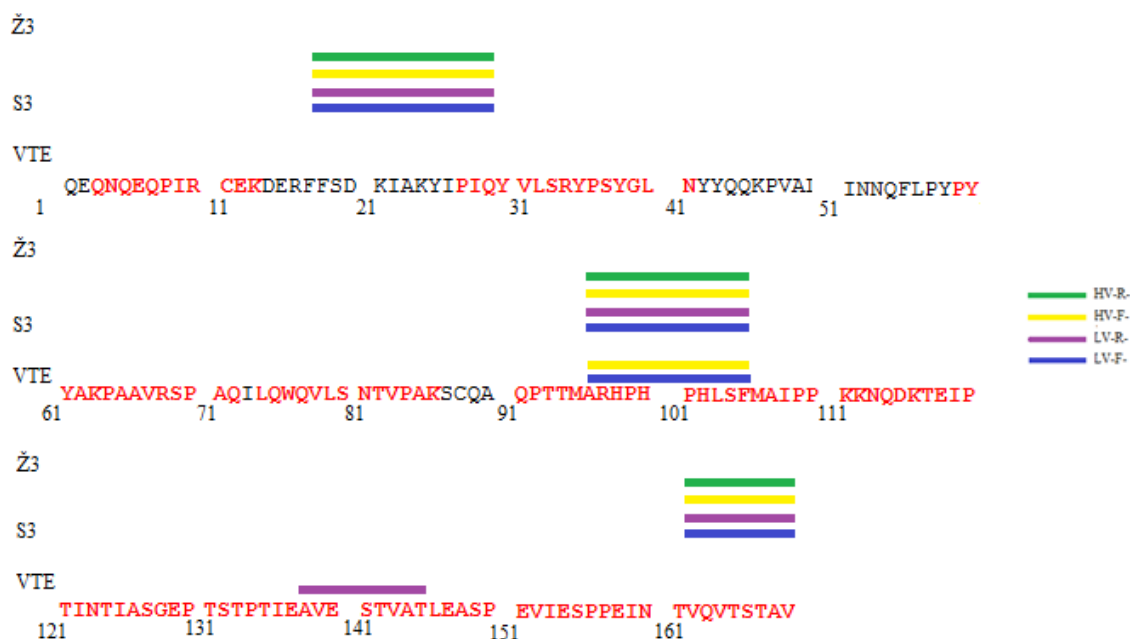
20 pav. Bioaktyvūs peptidai, atskelti nuo β -kazeino grandinės sutraukos gamybos metu (VTE), po virškinimo skrandyje (S3), po virškinimo žarnyne (Ž3)

Po Senojo genotipo Lietuvos juodmargės karvės pieno abiejų tipų sutraukų virškinimo skrandyje (LV-F-S3 ir LV-R-S3 bandiniai) identifikuotas ACE inhibitorius, kuris užėmė 25–32 (VAPFPEVF) padėtį α_{s1} -kazeino molekulėje, nerastas Holšteino veislės sutraukų Ž3 bandiniuose po virškinimo žarnyne (21 pav.). Kiti bioaktyvūs peptidai, kuriuos identifikavome po virškinimo žarnyne fazės (ties Ž3) rasti visuose bandiniuose. VTE rasti bandiniai taip pat neišliko virškinimo metu ir buvo suskaidyti iki aminorūgščių, todėl jų potencialus fiziologinis poveikis galimai nepasireikštų vartotojo sveikatai. Dauguma bioaktyvių peptidų identifikuočių po virškinimo skrandyje rasti ir bandiniuose po virškinimo žarnyne, taigi bioaktyvūs peptidai yra atsparūs tolimesnei hidrolizei.



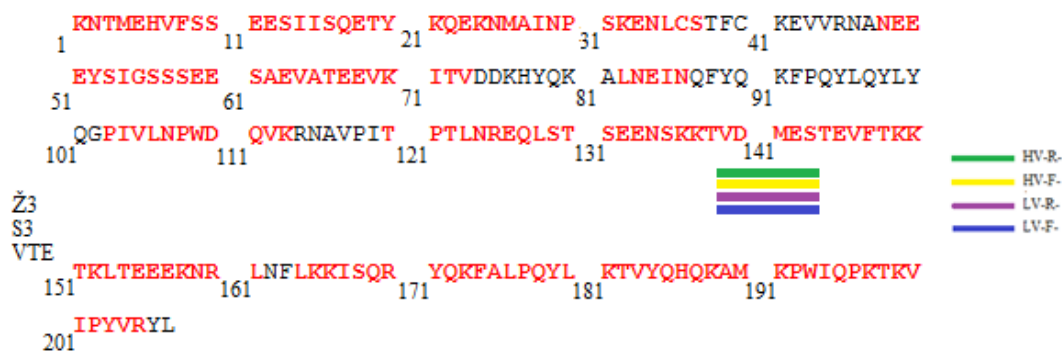
21 pav. Bioaktyvūs peptidai atskelti nuo α_{s1} -kazeino grandinės sutraukos gamybos metu (VTE), po virškinimo skrandyje (S3), po virškinimo žarnyne (Ž3)

Peptidai po κ -kazeino virškinimo skrandyje (S3 bandiniai) neidentifikuoti po virškinimo žarnyne (Ž3 bandiniai) (22 pav.).



22 pav. Bioaktyvūs peptidai atskelti nuo κ -kazeino grandinės sutraukos gamybos metu (VTE), po virškinimo skrandyje (S3), po virškinimo žarnyne (Ž3)

Po α_{s2} -kazeino virškinimo skrandyje identifikuotas ACE inhibitoriniu poveikiu pasižymintis peptidas rastas visuose bandiniuose (23 pav.)



23 pav. Bioaktyvūs peptidai atskelti nuo α_{s2} -kazeino grandinės sutraukos gamybos metu (VTE), po virškinimo skrandyje (S3), po virškinimo žarnyne (Ž3)

Fosfopeptidai

Tarp identifiikuotų peptidų radome tik 10 peptidų turinčių fosforo. Crus-Huerta ir kt. [97] atliko tyrimą, kurio metu po 1 val. virškinimo skrandyje ir 1 val. virškinimo žarnyne imitavimo *in vitro* identifikavo 44 peptidus, kuriuose yra fosforo grupę prisijungusio serino. Manoma, kad fosfopeptidai, turintys grandinėje tris fosforilintas serino molekules, prie kurių prisijungusios dvi glutamo rūgšties molekulės (fragmentas SpSpSpEE), yra atsparūs tolimesnei hidrolizei ir jų funkcija žarnyne – metalų jonų apsaugojimas nuo nusėdimo [97].

19 lentelė. Identifikuoti kazeinofosfopeptidai po virškinimo žarnyne (S3 bandiniuose)

Nr.:	Identifikuota masė	Teorinė masė	Padėtis grandinėje	Peptidas	Kazeino frakcija	Bandinys			
						LV -F	LV -R	HV -F	HV -R
1	2261,845	2264,061	75-93	FQS _p EEQQQTEDE LQDKIHP	β	+	+	+	+
2	1222,489	1222,523	110-119	EIVPNS _p AEER	α _{s1}	+	+	+	+

Mūsų tyrimo rezultatai parodė, jog po virškinimo žarnyne imitavimo nuo kazeino atskelti tik 2 fosfopeptidai, kurie galimai atsparūs tolimesnei hidrolizei ir turi potencialią naudą vartotojo sveikatai (19 lentelė). Su Crus-Huerta ir kt. [97] gautais duomenimis sutampa tik peptidas Nr. 2. Fosforą prisijungusių aminorūgščių kiekis priklauso nuo genetinio varianto, ir gali būti skirtingas skirtingų veislių ar individų karvių pieno baltymams [37].

IŠVADOS

1. Pirmą kartą ištirta Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno baltymų frakcijų kokybinė ir kiekybinė sudėtis. Nustatyta, kad žiemos sezono bandiniuose buvo mažiausiai bendro kazeino ir β -laktoglobulino (atitinkamai $31,64 \pm 3,07$ g/l ir $7,04 \pm 0,81$ g/l), daugiausiai – vasaros sezono bandiniuose (atitinkamai $35,50 \pm 5,59$ g/l ir $8,00 \pm 1,25$ g/l). Didžiausios κ -, α_{s2} -, α_{s1} -, β - kazeino frakcijų koncentracijos taip pat nustatytos vasaros sezono mėginiuose (atitinkamai $3,45 \pm 0,97$, $2,22 \pm 0,68$, $9,04 \pm 1,45$, $20,79 \pm 3,70$ g/l).
2. Pirmą kartą nustatytos Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių fermentinės sutraukos savybės parodė, kad iš 219 ištirtų pieno bandinių tik 2 % nesudarė sutraukos per mažiau nei 60 min. Taip pat nustatyta, kad fermentinę sutrauką greičiausiai sudarė vasaros pienas – vidutiniškai per $18,84 \pm 6,58$ min.
3. Apskaičiavus koreliacijos koeficientus tarp Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno sudėties ir technologinių savybių, nustatytos koreliacijos tarp: κ -kazeino kiekio ir rūgštinės sutraukos susidarymo trukmės ($0,57$, $P < 0,001$); kalcio kiekio ir rūgštinės sutraukos susidarymo trukmės ($0,51$, $P < 0,01$); κ -kazeino ir rūgštinės sutraukos stiprumo ($-0,78$, $P < 0,01$); kalcio kiekio ir rūgštinės sutraukos stiprumo ($-0,67$, $P < 0,01$); κ -kazeino kiekio ir fermentinės sutraukos susidarymo trukmės ($-0,26$, $P < 0,01$), κ -kazeino ir fermentinės sutraukos stiprumo ($0,33$, $P < 0,01$); kalcio kiekio ir fermentinės sutraukos stiprumo ($0,20$, $P < 0,01$).
4. Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno baltymų biologinę vertę įvertinus baltymų virškinamumu *in vitro* sąlygomis, nustatyta, kad rūgštinės sutraukos baltymų hidrolizė vyko greičiau nei fermentinės sutraukos baltymų. Po 4 val. virškinimo imitavimo fermentinės baltymų sutraukos bandiniuose laisvų aminorūgščių kiekis išreikštas mMol Leu ekvivalentais padidėjo nuo 8 iki 400 mMol Leu ekvivalentų, o rūgštinės sutraukos – nuo 2 iki 500 mMol Leu ekvivalentų.
5. Atlikus Lietuvos senojo genotipo juodmargių karvių pieno bei Holšteino veislės karvių pieno fermentinės ir rūgštinės sutraukų virškinimą *in vitro* sąlygomis, iš viso identifikuota 317 skirtingų peptidų. 30 iš jų pasižymi biologinėmis savybėmis (daugiausiai ACE inhibitorinėmis). Lietuvos senojo genotipo juodmargės karvės pieno fermentinei sutraukai būdingas didžiausias skirtingų peptidų kiekis – identifikuoti 109 peptidai. Nustatyta, kad peptidai pradeda formotis dar sutraukų technologinio proceso metu (sutraukose identifikuotas kartusis peptidas – β -kazeino grandinės 176–182 fragmentas KAVPYPQ).

BIBLIOGRAFINIŲ NUORODŲ SĄRAŠAS

- [1] LIETUVOS RESPUBLIKOS ŽEMĖS ŪKIO MINISTERIJA. Pieno pramonės apžvalga [žiūrėta 20170331]. Prieiga per: <https://zum.lrv.lt/lt/veiklos-sritys/zemes-ir-maisto-ukis/maisto-pramone/pieno-pramone>
- [2] ALIPANAH M. and KALASHNIKOVA L.A. Influence of K-casein Genetic Variant on Cheese Making Ability. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2007, 6(7), 855–857
- [3] SUMMER A., MALACARNE M., MARTUZZI F., MARIANI P. Structural and functional characteristics of Modenese cow milk in Parmigiano-Reggiano cheese production. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Parma*. 2002, 22, 163–174.
- [4] DE MARCHI M., DAL ZOTTO R., CASSANDRO M., BITTANTE G. Milk coagulation ability of five dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*. 2007, 90, 3986–3992.
- [5] BULLETIN OF THE INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. The world dairy situation. 2016, 485. ISSN 0250-5118 [žiūrėta 2017-03-25]. Prieiga per: <http://www.idfa.org/docs/default-source/d-news/world-dairy-situationsample.pdf>
- [6] LUCEY J.A., THOMSON A., BOLAND M. and SINGH H. Milk protein gels. In: Eds. *Milk proteins – from expression to food*. San Diego, CA, USA: Academic press 2009, pp. 449–481.
- [7] DONATO L. and GUYOMARCH F. Formation and properties of the whey protein/κ-casein complexes in heat-treated skim milk – A review. *Dairy Sci. Technol.* 2009, 89, 3–29.
- [8] HALLEN-ADAMS H. E., WENNER N., KULDAU G. A., TRAIL F. (Deoxynivalenol biosynthesis-related gene expression during wheat kernel colonization by *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*. 2011, 10, 11091–1096.
- [9] MALEVIČIŪTĖ J., TUŠAS S., MICEIKIENĖ I. Genetic diversity of four Lithuanian cattle breeds based on blood plasma protein and erythrocyte antigen system polymorphism. *Veterinarija ir zootechnika*. 2003, 22(44), 62–68.
- [10] THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. *United Nations*. 1992, [žiūrėta 2017-03-15]. Prieiga per: <http://www.un.org/en/events/biodiversityday/convention.shtml>
- [11] JUKNA Č. Galvijininkystė. *Terra Publica*: Kaunas. 1998, pp. 12-13. ISBN 9986-522-07-2
- [12] MICEIKIENĖ I. Lietuvos žemės ūkio gyvūnai, jų vertė bei jos didinimo galimybės. *Terra Publica*: Kaunas. 2007.
- [13] MALEVIČIŪTĖ J., BALTRĖNAITĖ L., MICEIKIENĖ I. Domestic cattle breed diversity in Lithuania. *Veterinarija ir zootechnika*. 2002, 20 (42). ISSN 1392-2130.
- [14] LENSTRA J.A. and FELIUS M. Genetic aspects of domestication. In: GARRICK D.J. and RUVINSKY A. eds. *The Genetics of Cattle, 2nd Edition*. CAB International: London, 2015, pp. 19-33. ISBN-13: 978178642215
- [15] GANDINI G. C., VILLA E. Analysis of the cultural value of local livestock breeds: a methodology. *J. Anim. Breed. Genet.* 2003, 120, 1–11.
- [16] FAO. Commission on genetic resources for food and agriculture. *Ninth Session*: Rome, 6–8 July 2016 [žiūrėta 2017-03-26]. Prieiga per: <http://www.fao.org/3/a-mq948e.pdf>
- [17] LIETUVOS RESPUBLIKOS VYRIAUSYBĖS NUTARIMAS. Dėl nacionalinės 2014–2020 metų gyvulininkystės sektoriaus plėtros programos patvirtinimo 2013 m. gruodžio 4 d. nr. 1162 Vilnius Lietuvos respublikos vyriausybės nutarimas ministras pirmininkas Algirdas Butkevičius 2013 m. gruodžio 4 d. Nr. 1162 Vilnius
- [18] LIETUVOS ŽEMĖS ŪKIS. *Faktai ir skaičiai*. 2016, 2 (18) [žiūrėta 2017-03-13]. Prieiga per: <https://www.vic.lt/?mid=75>
- [19] LIETUVOS ŪKINIŲ GYVŪNŲ GENETINIŲ IŠTEKLIŲ IŠSAUGOJIMO PROGRAMA Patvirtinta Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro 2008m. Vasario 6d. Įsakymu Nr. 3D-58
- [20] LIETUVOS RESPUBLIKOS GYVULIŲ VEISLININKYSTĖS ĮSTATYMAS. 1994 m. vasario 8 d. Nr. I-384 Vilnius
- [21] Lietuvos juodmargių galvijų gerintojų asociacijos internetinis puslapis [žiūrėta 2017-02-27], prieiga per: Prieiga per: <http://ljgga.lt/apie-mus/>

- [22] ŠILEIKA A. Nacionaliniai gentiniai ištekliai. *Mano ūkis*. 2009/5 [Žiūrėta 2017-03-12]. Prieiga per: <http://www.manoukis.lt/mano-ukis-zurnalas/gyvulininkyste/1856-nacionaliniai-genetiniai-istekliai>
- [23] JUKNA Č. Galvijininkystė. *Terra Publica*: Kaunas. 1998, pp. 12-13. ISBN 9986-522-07-2
- [24] PAULIUKAS K., MASIULIENĖ A. Juodmargių ir holšteino veislės rinktinių karvių bei jų f1, f2, f3, f4 kartos mišrūnių pieno produkcijos ir reprodukcijos rodiklių palyginimas. *Veterinarija ir zootechnika*. 2001 14 (36).
- [25] KUOSA J., JUOZAITIENĖ V., PALECKAITIS M. Holšteino ir Britanijos fryzų bulių panaudojimas Lietuvos juodmargiams gerinti. *Veterinarija ir zootechnika*. 1997, 4 (26).
- [26] ADOMAITIS J. Lietuvos juodmargiai – ištvermingi. Ūkininko patarėjas, [žiūrėta 2017-03-05]. Prieiga per: <http://ukininkopatarejas.lt/lietuvos-juodmargiai-istvermingi/>
- [27] LIETUVOS ŪKINIŲ GYVŪNŲ GENETINIŲ IŠTEKLIŲ IŠSAUGOJIMO PROGRAMA. Veislių, įtrauktų į Lietuvos ūkinių gyvūnų genetinių išteklių išsaugojimo programą, apibūdinimai 5 priedas, [žiūrėta 2017-01-05]. Prieiga per: <https://zum.lrv.lt/lt/naujienos/patvirtinta-nauja-lietuvos-ukiniu-gyvunu-genetiniu-istekliu-issaugojimo-programa>
- [28] SENOJO GENOTIPO LIETUVOS JUODMARGIAI GALVIJAI. *Gyvulininkystės institutas*, [žiūrėta 2017-02-06]. Prieiga per: <http://gic.lsmuni.lt/lt/gyvunai/galvijai/senojo-genotipo-lietuvos-juodmargiai-galvijai>
- [29] JENSEN R.G. Handbook of milk composition. *Academic Press*, California 92101-4495. 1995, pp. 2-3.
- [30] CASHMAN K.D. Milk minerals (including trace elements) and bone health. *International Dairy Journal*. 2006, 16, 1389–1398.
- [31] GUSTAVSSON F., GLANTZ M., BUITENHUIS A.J., LINDMARK-MÅNSSON H., STÅLHAMMAR H., ANDREN A. and PAULSSON M. Factors influencing chymosin-induced gelation of milk from individual dairy cows: Major effects of casein micelle size and calcium. *International Dairy Journal*. 2014, 39, 201-208.
- [32] JANSEN A., ZANDE E., MEERT W., FINK G.R. and VERTREPEN K.J. Distalchromatins tructure influences localnucleosome positions and gene expression. *NucleicAcidsRes*. 2012, 40(9), 3870-3885.
- [33] MALACARNE M., FRANCESCHI P., FORMAGGIONI P., SANDRI S., MARIANI P., and SUMMER A Influence of micellar calcium and phosphorus on rennet coagulation properties of cows milk. *J DairyRe*. 2014, 81, 129–136.
- [34] MUIR D., HANNAH D. Lactose properties, production, applications. In: Hubert ROGINSKI, et al., eds. *Encyklopedia of dairy sciences*. Academic Press: London, 2003, pp. 1525-1529. ISBN 0-12-227235-8
- [35] SCHAAF SMA G. Nutritional Significance of lactose and lactose derivatives. In: Hubert ROGINSKI, et al., eds. *Encyklopedia of dairy sciences*. Academic Press: London, 2003, pp. 1529-1533. ISBN 0-12-227235-8
- [36] FOX P.F. Fat globules in milk. In: Hubert ROGINSKI, et al., eds. *Encyklopedia of dairy sciences*. Academic Press: London, 2003, pp. 1564-1576. ISBN 0-12-227235-8
- [37] CAROLI M., CHESSA S., ERHARDT G. J. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle:Effect on animal breeding and human nutrition. *J. Dairy Sci*. 2009, 92, 5335–5352.
- [38] BONFATTI V., GRIGOLETTO L., CECCHINATO A., GALLO L., CARNIER P. Validation of a new reversed-phase high –performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1195, 101 – 106.
- [39] LARSEN L.B., RASMUSSEN M.D., BJERRING M., NIELSEN J.H. Proteases and protein degradation in milk from cows infected with *Streptococcus uberis*. *International Dairy Journal*. 2004, 14, 899-907.

-
- [40] BONIZZI I., BUFFONI J.N., FELIGNI M. Quantification of bovine fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real product context. *Journal of Chromatography A*. 2009, 1216, 165 – 168.
- [41] BARBÉF., MENARDO I., GOUARI. Y., BUFFIÈRE C., FAMELARTM.H., LAROCHEB., FEUNTEUNS.L., RÉMONDD., DUPONTD. Acid and rennet gels exhibit strong differences in the kinetics of milk protein digestion and amino acid bioavailability. *Food Chem.*, 2014, 143, 1-8.
- [42] FARRELL H. M., JIMENEZ-FLORES JR.R., BLECK G. T., BROWN E. M., BUTLER J. E., CREAMER L. K., HICKS C. L., HOLLAR C. M., NG-KWAI-HANG K. F., SWAISGOOD H. E. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *J Dairy Sci*. 2004, 87, 1641–1674.
- [43] VELOSOCANA C.A., TEIXEIRAB NATE'RCIA I. FERREIRAA M.P. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea–polyacrylamide gel electrophoresis Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*. 2002, 967, 209–218.
- [44] PETRAT-MELIN B., ANDERSEN P., RASMUSSEN J. T., POULSEN N. A., LARSEN L. B. YOUNG J. F. *In vitro* digestion of purified beta-casein variants A1, A2, B, and I: Effects on antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory capacity. *Journal of Dairy Science*. Accepted for publication, 2014.
- [45] CREAMER L. K. Casein nomenclature, structure and association properties. In: Hubert ROGINSKI, et al., eds. *Encyklopedia of dairy sciences*. Academic Press: London, 2003, pp. 1895-1902. ISBN 0-12-227235-8
- [46] HORNE D.S. Caseins, micellar structure. In: Hubert ROGINSKI, et al., eds. *Encyklopedia of dairy sciences*. Academic Press: London, 2003, pp. 1902-1909. ISBN 0-12-227235-8
- [47] YAZDIS.Y., CORREDIG M., DALGLEISH D. G. Studying the structure of β -casein-depleted bovine casein micelles using electron microscopy and fluorescent polyphenols. *Food Hydrocolloids*. 2014, 42, 171-177.
- [48] ZHAO D., LE T., NIELSEN S.D AND LARSEN L.B. Proteolysis and diestibilitychange of β -lactoglobulin and β -casein during storage of post-hydrolyzed milk: A study of a model system with commercial lactases. *Journal of Agriculture and Food Shemistry*. Accepted for publication. 2017.
- [49] CHEEMA M., MOHAN M.S. COMPAGNA S.R., JURAT-FUENTES J.L., HARTE F.M. The association of low-molecular-weight hydrofobic compounds with native casein micelles in bovine milk. *J. Dairy science*. 2015, 98, 5155-5163.
- [50] GLANTZ M., DEVOLD T. G., VEGARUD G. E., LINDMARK MÅNSSON H., STÅLHAMMAR H., PAULSSON M. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. *J. Dairy Sci*. 2010, 93, 1444–1451.
- [51] DALGLEISH D.G., CORREDIG M. The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing Annual Review . *Food Science and Technology*. 2012, 33, 449-467.
- [52] MILK AND MILK PRODUCTS. Market summaries. FAO, [žiūrėta 2017-04-05]. Prieiga per:
http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Dairy/Documents/FO_Oct_16_DAIRY.pdf
- [53] BITTANTE G., PENASA M. and CECCHINATO A. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *J. Dairy Sci.*, 2012, 95, 6843-6870.
- [54] MISHRA R., GOVINDASAMY-LUCEYAND S., LUCEY J. Rheological properties of rennet-induced gels during the coagulation and cutting process: impact of processing conditions. *Journal of texture studies*. 2005, 36, 190 – 212.
- [55] FREDERIKSEN P. D., ANDERSEN K. K., HAMMERSHØJ M., POULSEN H. D., SØRENSEN J., BAKMAN M., QVIST K. B. and LARSEN L. B. Composition and effect of

-
- blending of noncoagulating, poorly coagulating, and well-coagulating bovine milk from individual Danish Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 2011, 94, 4787–4799.
- [56] CASSANDRO M., COMIN A., OJALA M., DAL ZOTTO R., DE MARCHI M., GALLO L., CARNIER P., and G. BITTANTE. Genetic parameters of milk coagulation properties and their relationships with milk yield and quality traits in Italian Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 2008, 91, 371–376.
- [57] BUCHBERGER, J., DOVC, P. Lactoprotein genetic variants in cattle and cheese making ability. *Food Technol. Biotechnol.* 2000, 38, 91–98.
- [58] CECCHINATO, A., CARNIER, P. Short communication: Statistical models for the analysis of coagulation trait using coagulation and non coagulating milk in formation. *J. Dairy Sci.* 2011, 94, 4214–4219.
- [59] DE MARCHI, M., DAL ZOTTO, R., CASSANDRO, M., BITTANTE, G. Milk coagulation ability of five dairy cattle breeds. *J. Dairy Sci.* 2007, 90, 3986–3992.
- [60] FEAGAN, J.T., BAILAY, L.F., HEHIR, A.F., MCLEAN, D.M., ELLIS, N.J.S. Coagulation of milk proteins. I. Effect of genetic variants of milk proteins on rennet coagulation and heat stability of normal milk. *Aust. J. Dairy Technol.* 1972, 27, 129–134.
- [61] GREEN, M.L., MORANT, S.V. Mechanism of aggregation of casein micelles in rennet-treated milk. *J. Dairy Res.* 1981, 48, 57–63.
- [62] JAKOB, E., PUHAN, Z. Technological properties of milk influenced by genetic polymorphism of milk proteins—A review. *Int. Dairy J.* 1992, 2, 157–178.
- [63] JÖUDU, I., HENNO, M., KAART, T., PÜSSA, T., KÄRT, O. The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *Int. Dairy J.* 2008, 18, 964–967.
- [64] MAYER, H.K., ORTNER, M., TSCHAGER, E., GINZINGER, W. Composite milk protein phenotypes in relation to composition and cheesemaking properties of milk. *Int. Dairy J.* 1997, 7, 305–310.
- [65] TYRISEVÄ, A.M., VAHLSTEN, T., ROUTTINEN, O., OJALA, M. Noncoagulation of milking Finnish Ayrshire and Holstein-Friesian cows and effect of herds on milk coagulation ability. *J. Dairy Sci.* 2004;87:3958–3966.
- [66] WEDHOLM A., LARSEN L. B., LINDMARK-MANSSON H., KARLSSON A. H., ANDRE´A. Effect of Protein Composition on the Cheese-Making Properties of Milk from Individual Dairy Cows. *J. Dairy Sc.* 2006, 89, 3296–3305.
- [67] LARSEN, L.B., BENFELDT, C., RASMUSSEN, L.K., PETERSEN, T.E. Bovine milk procathepsin D and cathepsin D: Coagulation and milk protein degradation. *J. Dairy Res.* 1996, 63, 119–130.
- [68] OJALA, M., FAMULA, T.R., MEDRANO, J.F. Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. *J. Dairy Sci.* 1997, 80, 1776–1785.
- [69] SCHAAR, J. Effects of κ -casein genetic variants and lactation number on the renneting properties of individual milks. *J. Dairy Res.* 1984, 51, 397–406.
- [70] TYRISEVÄ, A.M., IKONEN, T., OJALA, M. Repeatability estimates for milk coagulation traits and non-coagulation of milk in Finnish Ayrshire cows. *J. Dairy Res.* 2003, 70, 91–98.
- [71] CHOI J., HORNE D. S., LUCEY J. A. Effect of insoluble calcium concentration on endogenous syneresis rate in rennet-coagulated bovine milk. *J. Dairy Sci.* 2015, 98, 5955–5966.
- [72] GUSTAVSSON F., GLANTZ M., BUITENHUIS A.J., LINDMARK-MANSSON H., STÅLHAMMAR H., ANDREN A., PAULSSON M. Factors influencing chymosin-induced gelation of milk from individual dairy cows: Major effects of casein micelle size and calcium. *International Dairy Journal.* 2014, 39, 201–208.
- [73] LUCEY J.A., THOMSON A., BOLAND M. and SIGH H. Milk protein gels. In: Eds. *Milk proteins – from expression to food*. San Diego, CA, USA: Academic press 2009, pp. 449–481.

-
- [74] POULSEN NA, BERTELSEN HP, JENSEN HB, GUSTAVSSON F, GLANTZ M, MÅNSSON HL, ANDRÉN A, PAULSSON M, BENDIXEN C, BUITENHUIS AJ, LARSEN LB. The occurrence of non-coagulating milk and the association of bovine milk coagulation properties with genetic variants of the caseins in 3 Scandinavian dairy breeds. *J. Dairy Sci.* 2013 96 (8), 4830-4842.
- [75] HALLEN E.A., ALLMERE T., NASLUND J., ANDREN A. and LUNDEN A. Effect on genetic polymorphism of milk proteins on rheology. *International Dairy Journal.* 2007, 17, 791-799.
- [76] MAKINEN O.E., UNIACKE-LOWE T., O'MAHONY J. A., ARENDT E.K. Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT-treated plant-based milk substitutes and lactose free bovine milk. *Food Chemistry.* 2015, 168, 630-638.
- [77] GLANTZ M., LINDMARK MÅNSSON H., H. STÅLHAMMAR, AND PAULSSON M. Effect of polymorphisms in the leptin, leptin receptor, and acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGAT1*) genes and genetic polymorphism of milk proteins on cheese characteristics. *J. Dairy Sci.* 2011, 94, 3295-3304.
- [78] GALANI D. And APENTEN R. K.O. Heat-induced denaturation and aggregation of β -Lactoglobulin: kinetics of formation of hydrophobic and disulphide-linked aggregates. *International Journal of Food Science and Technology*, 1999, 34, 467-476.
- [79] SINGH H. Heat stability of milk International. *Journal of Dairy Technology.* 2004, 57, 111-119.
- [80] CHEN B., LEWIS M. J., GRANDISON A.S. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chemistr.* 2014, 158, 216-223.
- [81] PARK Y.W. Comparison of buffering components in goat and cow milk. *Small Ruminant Research.* 1992, 8, 75-78.
- [82] SALAUN F., MIETTON B. and GAUCHERON F. Buffering capacity of dairy products. *International Dairy Journal.* 2005, 15, 95-109.
- [83] VERCRUYSSSE L. CAMP J. AND SMAGGHE G. ACE Inhibitory Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysates of Animal Muscle Protein: A Review. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2005, 53(21), 8106-8115.
- [84] REMOND, D. POMIES, C. JULIEN, J. GUINARD-FLAMENT Performance of dairy cows milked twice daily at contrasting intervals. *Animal.* 2009, 3, 1463-1471.
- [85] PETRAUSKAS D. Virškinamojo trakto anatomija ir fiziologija. *Farmacija ir laikas.* 2005, 8, 30-35.
- [86] MINEKUS M., ALMINGER M., ALVVITO P., BALLANCE S., BOHN T., BOURLIEU C., CARRIERE F., BOUTROU R., CORREDIG M., DUPONT D., DUFOUR C., EGGER L., GOLDING M., KARAKAY S., KIRKHUS, FEUNTEUN B. S. LE, LESMES U., MACIERZANKA A., MCKIE A., MARZE S., MCCLEMENTS D. J., MENARD O., RECIO I., SANTOS C.N., SINGH R.P., VEGAUD G.E., WICKHAM M.S.J., WEITSCHIES W., BRODKORB A. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Function.* 2014, 5, 1113-1124.
- [87] MOHANTY D.P., MOHAPATRA S., MISRA S., SAHU SAUDI P.S. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Journal of Biological Sciences.* 2016, 23, 577-583.
- [88] KOPF-BOLANZ K.A., SCHWANDER F., GIJS M., VERGÈRES G., PORTMANN R., EGGER L. Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion. *International Dairy Journal.* 2014, 35, 130-138.
- [89] DEVLE H., NAESS-ANDERSEN C.F., RUKKE E.O., VEGUARD G.E., EKEBERG D., BARFOD S. Rheological characterization of milk during digestion with human gastric and duodenal enzymes. *Annual transactions of the nordic rheology society.* 2012, 20, 271-276.

-
- [90] RINALDI LL., GAUTHIER F., BRITTEN M., TURGEON S.L. *In vitro* gastrointestinal digestion of liquid and semi-liquid dairy matrixes. *Food Science and Technology*. 2014, Acceptedmanuscript.
- [91] RIOUX L.E., TURGEON S.L. Theratio of casein to wheyproteinimpactsyogurtdigestioninvitro. *Food dig*. 2012, 3, 25-35.
- [92] DIGESTIVE ENZYMES, SPECIFICITY AND PH: THEORY [Žiūrėta 2017-04-20] Prieiga per: https://www.liverpool.ac.uk/~agmcLen/Medpracs/practical_3/theory_3.html
- [93] C. E.H., SCH R., ULBRICH-HOFMANN R. NEUBERT R.H.H., RAITHK. Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine –casein. *Journal of Chromatography A*. 2004, 1055, 87–92.
- [94] NONGONIERMA A. B., FITZGERALD R. J. The scientific evidence fort he role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. *Journal of FunctionalFoods*. 2015, 17, 640–656.
- [95] MOHANTY D.P., MOHAPATRA S., MISRA S., SAHU SAUDI P.S. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Journal of Biological Sciences*. 2016, 23, 577–583.
- [96] PHELAN M., AHERNE A., FITZGERALD R., and O'BRIEN N. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, idustrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*. 2009, 19, 643-654.
- [97] CRUZ-HUERTA E., GARÇKA-NEBOT M.J., MIRALLES B., RECIO I., AMIGO L. Caseinophosphopeptides released after tryptic hydrolysis versussimulated gastrointestinal digestion of a casein-derived by-product . *Food Chemistry*. 2015, 168, 648–655.
- [98] ADT I., DUPAS C., BOUTROU R., OULAHAL N., NOEL C. D. MOLLÉ, JOUVET, THIERRY DEGRAEVE P. Identification of caseinophosphopeptides generatedt hrough in vitro gastro-intestinal digestion of Beaufort cheese. *International Dairy Journal*. 2011, 21, 129-134.
- [99] MAENO M., YAMAMOTO N., TAKAN T. Identification of an Antihypertensive Peptide from Casein Hydrolysate Produced by a Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*. 1996, 79(8), 1316-1321.
- [100] JIN Y., YU Y., QI Y., WANG F., YAN J., ZOU H., Peptide profiling and the bioactivity of yogurt in the simluated gastrointestinal digestion. *Journal of Proteomics*. 2016, 141, 24-46.
- [101] STUKNYTE M., CATTANEO S., MASOTTI F., DE NONI I. Ocurence and fate of ACE-inhibitor peptides in cheeses and their digestates following in vitro static gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*. 2015, 168, 27-33.
- [102] SOFIA V. SILVA, XAVIER MALCATA F. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*. 2005, 15, 1–15.
- [103] CONTRERAS M., CARRO'N R, MONTERO M.J., RAMOS M., RECIO I. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*. 2009, 19, 566–573.
- [104] DE NONI I, STUKNYTE M., CATTANEO S. Identification of β -casomorphins 3 to 7 in cheeses and in their *in vitro* gastro intestinal digestates. *Food Science and Technology*. 2015, 63, 550-555.
- [105] PEPE G., CARLO G., TENORE V., MASTROCINQUE ., STUSIO P., AND CAMPIGLIA P. Potential Anticarcinogenic Peptides from Bovine Milk. *Journal of Amino Acids*. 2013, 1-7. Article ID 939804.
- [106] PHELAN M., AHERNE A., FITZGERALD R.J., O'BRIEN N.M. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*. 2009, 19, 643–654.
- [107] PETRAŠKIENĖ R., MICEIKIENĖ I. Holšteino veislės genų buliaus genotipe įtaka dukterų reprodukciniams savybėms . *Veterinarija ir zootechnika*. 2006, 33 (55).
- [108] GUDONIS A. Pieno gaminių technologija. Technologija: Kaunas. 2012, pp. 205-236. ISBN, 978-609-02-0703-1.

- [109] MALINAUSKYTĖ E., RAMANAUSKAITĖ J., LESKAUSKAITĖ D., DEVOLD T. G., SCHÜLLER R. B. and VEGARUD G. E. Effect of human and simulated gastric juices on the digestion of whey proteins and carboxymethylcellulose-stabilised O/W emulsions. *Food Chemistry*. 2014, 165, 104-112.
- [110] MING-FANG X., Jin-Feng D., Ming-Xia X., Xi-Fei C., Xiao-Cong Z., Cong-Qing W. and Wei-Jun Z. Study on Differences of Milk Proteins by Liquid Chromatography-Mass Spectrometer. *Chin J Anal Chem*. 2014, 42(4), 501–506.
- [111] LE T.T., NIELSEN, S. D., VILLUMSEN, N.S., KRISTIANSEN, G. H., NIELSEN, L.R., NIELSEN, S.B., HAMMERSHOJ, M. and LARSEN, L.B., Using proteomics to characterise storage-induced aggregates in acidic whey protein isolate drinks. *Int. Dairy J*. 2016, 60, 39-46.
- [112] JUOZAITIENĖ V., ANSKIENĖ L., JAPERTIENĖ R., JUOZAITIS A., STANKEVIČIUS R., ČERNAUSKIENĖ J., ŽYMANTIENĖ J., ŽILAITIS V. Dependence of dairy cows milk ability traits on genotype. *Veterinarija ir zootechnika*. 2016, 73(95), 32-36.
- [113] PAULIUKAS K., MASIULIENĖ A. Juodmargių ir holšteino veislės rinkinių karvių bei jų f1, f2, f3, f4 kartos mišrūnių pieno produkcijos ir reprodukcijos rodiklių palyginimas. *Veterinarija ir zootechnika*. 2001 14 (36).
- [114] KRÍŽOVA L., HANUŠ O., ROUBAL P., KUČERA J., HADROVA S. The effect of cattle breed, season and type of diet on nitrogen fractions and amino acid profile of raw milk. *ArchivTierzucht*. 2013, 56, 709-719.
- [115] ALBAAJ A., FOUCRAS G. and RABOISSON D. Changes in milk urea around insemination are negatively associated with conception success in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2017, 100, 3257-3265.
- [116] HA M., A. BEKHITEL-DIN, MCCONNELL M., MASON S. and CARNE A. Fractionation of whey proteins from red deer (*Cervus elaphus*) milk and comparison with whey proteins from cow, sheep and goat milks. *Small Ruminant Research*. 2014, 120, 125–134.
- [117] PIENO SUPIRKIMO TAISYKLĖS. Patvirtintos Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro 2001 m. gegužės 9 d. įsakymu Nr.146 (Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro 2009 m. gruodžio 10d. įsakymo Nr. 3D-963 redakcija)
- [118] GLANTZ M., GUSTAVSSON F., BERTELSEN H.P., STALHAMMAR H., LINDMARK-MANSSON H., POULSON M., BENDIXEN C. and GREGERSEN V.R. Bovine chromosomal regions affecting rheological traits in acid-induced skim milk gels. *J. Dairy Sci*. 2015, 98, 1273-1285.
- [119] SALAUN F., MIETTON B. and GAUCHERON F. Buffering capacity of dairy products. *International Dairy Journal*. 2005, 15, 95–109.
- [120] LIN Y., KELLY, A.L., O'MOHONY J., and GUINEE T.P. Fortification of milk protein content with different protein powders alters its compositional, rennet gelation, heat stability and ethanol stability characteristics. *International Dairy Journal*. 2016, 61, 220-227.
- [121] O'CONNELL J.E. and FOX P.F. The two-stage coagulation of milk proteins in the minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: Effect of casein micelle size. *Journal of Dairy Science*. 2000, 83(3), 378–386.
- [122] SINGH H. Heat stability of milk International. *Journal of Dairy technology*. 2004, 57, 111-119.
- [123] PINTO M.S., LEONIL J., HENRY G., CAUTY C., CARVAHLO A.F. and BOUHALLAB S. Heating and glycation of beta-lactoglobulin and beta-casein: Aggregation and *in vitro* digestion. *Food res. Int*. 2014, 55, 70-76.
- [124] SCHMELZER C.E.H., SCHOPS R., REYNELL L., ULBRICH-HOFMANN R., NEUBERT R.H.H., RAITH K. Peptic digestion of β -casein. Time course and fate of possible bioactive peptides. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1166, 108-115.
- [125] LEMIEUX L., SIMARD R. Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. Le

Lait, INRA Editions. 1992, 72 (4), 335-385. Prieiga per: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00929300/document>

[126] PHELAN M., AHERNE A., FITZGERALD R., and O'BRIEN N. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*. 2009, 19, 643-654.

[127] ONDETTI M.A., RUBIN B., CUSHMAN D.W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*. 1977, 196(4288), 441-444.

PRIEDAI

1 PRIEDAS

Priede pateiktos lentelės, kuriose pavaizduotas peptidų, atskeltų nuo tam tikros kazeino frakcijos iš Lietuvos senojo genotipo juodmargės veislės karvės pieno (LV) arba Holšteino veislės karvės pieno (HV) fermentinių (F) arba rūgštinių (R) sutraukų, profilio kitimas prieš virškinimą (VTE) ir virškinimo metu (po 2 val. virškinimo skrandyje S3 ir 2 val. virškinimo žarnyne Ž3). Peptidai pateikti aminorūgščių grandinės ilgėjimo tvarka ir išdėstyti pagal padėtį grandinėje. Paryškintu šriftu pateikti bioaktyviomis savybėmis pasižymintys peptidai.

1 lentelė. β–kazeino hidrolizės produktai

Aminorūgščių skaičius	Padėtis grandinėje	Aminorūgščių seka	Prieš virškinimą (VTE)				Po 2 val virškinimo skrandyje (S3)				Po 2 val virškinimo žarnyne (Ž3)			
			LV		HV		LV		HV		LV		HV	
			F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R
a	b	c	d	e	f	g	h	j	k	l	m	n	o	p
5	171-175	LPVPQ	+		+									
5	178-182	VPYPQ	+		+									
5	203-207	GPFPI		+		+								
5	205-09	FPIIV	+		+									
6	01-06	RELEEL	+		+									
6	22-27	SITRIN		+		+								
6	23-28	ITRINK 2: Ph (ST)	+											
6	47-52	DKIHPF	+	+	+	+								
6	53-58	AQTQSL		+										
6	120-125	TESQSL		+		+								
6	126-131	TLTDVE		+		+								
6	161-166	SVLSLS	+	+		+								
6	170-175	VLPVPQ	+		+									
6	183-188	RDMPIQ	+											
6	184-189	DMPIQA 2: Oxid. (M)	+		+		+		+		+		+	
6	187-192	IQAFLL	+											
6	193-198	YQEPVL	+				+	+	+	+				
7	46-52	QDKIHPF		+										
7	47-53	DKIHPFA	+											
7	169-175	KVLPVPQ	+	+	+									
7	176-182	KAVPYPQ	+	+	+	+				+				
7	183-189	RDMPIQA	+				+			+				
7	184-190	DMPIQAF	+		+									
8	7-14	NVPGEIVE	+	+										
8	120-127	TESQSLTL	+											
8	161-168	SVLSLSQS		+		+								
8	168-175	SKVLPVPQ	+		+									

1 lentelė. Tęsinys

a	b	c	d	e	f	g	h	j	k	l	m	n	o	p
8	197-204	VLGPVRGP	+		+									
8	199-206	GPVRGPF	+											
9	29-37	KIEKFQSEE 7:Ph(ST)		+		+								
9	38-46	QQQTEDELQ		+	+	+								
9	44-52	ELQDKIHPF		+		+								
9	69-77	SLPQNIPPL		+		+								
9	93-101	MGVSKVKEA		+										
9	120-128	TESQSLTLT		+		+								
9	167-175	QSKVLPVPQ		+		+								
10	92-101	VMGVSKVKEA		+										
10	166-175	SQSKVLPVPQ	+	+	+	+								
10	183-192	RDMPIQAFL	+		+									
10	193-202	YQEPVLGPVR	+		+						+	+	+	+
10	19-206	VLGPVRGPF	+		+									
11	194-204	QEPVLGPVRGP	+		+									
11	197-207	VLGPVRGPFPI	+		+									
12	57-68	SLVYPPFGPIHN		+										
12	94-105	GVSKVKEAMAPK	+	+	+	+								
12	164-175	SLSQSKVLPVPQ	+		+	+								
12	193-204	YQEPVLGPVRGP	+		+									
13	170-182	VLPVPQKAVPYPQ	+		+									
13	194-206	QEPVLGPVRGPF	+		+									
14	75-88	PPLTQTPVVVPPFL		+										
14	169-182	KVLPVPQKAVPYPQ	+		+	+								
14	193-206	YQEPVLGPVRGPF	+		+									
15	16-182	SKVLPVPQKAVPYPQ	+		+									
17	166-182	SQSKVLPVPQKAVPYPQ	+		+									
5	125-129	LTLTD					+	+	+	+	+	+	+	+
5	185-189	MPIQA					+		+					
5	191-195	LLYQE								+				
6	06-11	LNVPGE					+	+	+	+	+	+	+	+
6	122-127	SQSLTL					+	+	+	+				
6	124-129	SLTLTD					+							
7	157-163	FPPQSVL					+	+	+	+	+	+	+	+
7	192-198	LYQEPVL					+	+	+	+				
7	193-199	YQEPVLG					+	+	+	+	+	+	+	+
8	81-88	PVVVPPFL					+		+			+		
8	133-140	LHLPLPLL						+		+				
9	81-89	PVVVPPFLQ					+	+	+	+		+		
9	132-140	NLHLPLPLL					+	+	+	+				
10	46-55	QDKIHPFAQT					+							
10	49-58	IHPFAQTQSL					+	+	+	+				
10	115-124	PVEPFTESQS					+							
10	133-142	LHLPLPLLQS						+						
10	199-208	GPVRGPFPII					+							

1 lentelė. Tęsnys

a	b	c	d	e	f	g	h	j	k	l	m	n	o	p
10	200-209	PVRGPFPIIV					+	+	+	+	+	+	+	+
11	45-55	LQDKIHFAQT					+	+	+	+				
11	130-140	VENLHLPLPLL					+	+	+	+	+			+
11	132-142	NLHLPLPLLQS					+	+	+					
11	199-209	GPVRGPFPIIV					+	+	+	+				
12	59-70	VYFPGPIPNL					+	+	+	+				
12	81-92	PVVVPPFLQPEV					+	+	+	+	+	+	+	+
12	129-140	DVENLHLPLPLL					+		+	+	+	+		
12	164-175	SLSQSKVLPVPQ					+		+					
13	45-57	LQDKIHFAQTQS					+	+	+	+				
13	58-70	LVYFPGPIPNL							+	+				
13	81-93	PVVVPPFLQPEVM					+	+	+	+	+	+	+	+
13	81-93	PVVVPPFLQPEVM _{13:Ox}					+	+	+	+				
13	128-140	TDVENLHLPLPLL					+	+	+	+		+	+	
13	164-176	SLSQSKVLPVPQK					+							
13	177-189	AVPYPQRDMPIQA					+		+	+				
13	193-205	YQEPVLGPVRGPF					+	+	+	+			+	
14	45-58	LQDKIHFAQTQSL					+	+	+	+				
14	81-94	PVVVPPFLQPEVMG					+	+	+	+	+			
14	127-140	LTDVENLHLPLPLL								+		+		
14	129-142	DVENLHLPLPLLQS					+	+	+					
14	143-156	WMHQPHQPLPPTVM					+	+	+	+				
14	193-206	YQEPVLGPVRGPF							+		+		+	
14	196-209	PVLGPVRGPFPIIV					+	+	+	+	+	+	+	+
15	128-142	TDVENLHLPLPLLQS					+	+	+	+				
16	193-208	YQEPVLGPVRGPFPII					+	+	+	+	+	+	+	
16	194-209	QEPVLGPVRGPFPIIV						+						
17	166-182	SQSKVLPVPQKAVPYPQ							+					
17	193-209	YQEPVLGPVRGPFPIIV					+	+	+	+	+	+	+	+
18	192-209	LYQEPVLGPVRGPFPIIV						+		+			+	
19	75-93	PPLTQTPVVVPPFLQPEVM 4: Phospho (ST) 6: Phospho (ST) 19: Oxidation (M)					+				+	+	+	
22	59-80	VYFPGPIPNLQPNIPLTQT					+		+	+			+	+
26	164-189	SLSQSKVLPQKAVPYPQRDMPIQA								+				
5	184-188	DMPIQ											+	
5	193-197	YQEPV											+	+
6	53-58	AQTQSL									+	+	+	+
6	108-113	EMPFPK									+	+	+	+
6	114-119	YPVEPF									+	+	+	+
6	120-125	TESQSL									+	+	+	+
6	128-133	TDVENL									+	+	+	+
6	134-139	HLPLPL											+	+
6	157-162	FPPQSV									+	+	+	+
6	170-175	VLPVPQ									+	+	+	+

1 lentelė. Tęsinys

a	b	c	d	e	f	g	h	j	k	l	m	n	o	p
6	177-182	AVPYPQ									+	+	+	+
6	196-201	PVLGPV												+
6	203-208	GPFPII									+	+	+	+
7	120-126	TESQSLT									+			
7	170-176	VLPVPQK									+	+	+	+
7	177-183	AVPYPQR									+	+	+	
7	184-190	DMPIQAF									+	+		+
8	45-52	LQDKIHPF									+	+	+	+
8	49-56	IHPFAQTQ											+	
8	59-66	VYPPFGPI									+	+		
8	106-113	HKEMPFPK									+	+	+	+
9	58-66	LVYPPFGPI										+		
9	193-201	YQEPVLGPV									+	+	+	+
9	199-207	GPVRGPFPI									+			+
10	59-68	VYPPFGPIP											+	+
10	114-123	YPVEPFTESQ									+	+	+	+
10	130-139	VENLHLPLPL									+	+	+	+
10	192-201	LYQEPVLGPV												+
11	58-68	LVYPPFGPIP												+
11	81-91	PVVVPPFLQPE									+	+	+	+
11	114-124	YPVEPFTESQS										+		+
11	129-139	DVENLHLPLPL									+	+	+	+
12	69-80	SLPQNIPPLTQT												+
12	108-119	EMPFKYPVEPF									+	+	+	+
12	128-139	TDVENLHLPLPL									+	+	+	+
12	196-207	PVLGPVRGPFPI									+	+		+
13	127-139	LTDVENLHLPLPL									+	+	+	+
13	128-140	TDVENLHLPLPL									+	+	+	
14	67-80	HNSLPQNIPPLTQT									+	+		
14	106-119	HKEMPFKYPVEPF									+			
14	126-139	TLTDVENLHLPLPL									+	+	+	+
15	193-207	YQEPVLGPVRGPFPI									+	+	+	+
16	194-209	QEPVLGPVRGPFPIIV									+		+	
20	33-52	FQSEEQQTDELQDKIHPF 3: Phospho (ST)									+	+	+	+

2 lentelė. α_{s1} -kazeino hidrolizės produktai

Aminorūgščių skaičius	Padėtis grandinėje	Aminorūgščių seka	Prieš virškinimą (VTE)				Po 2 val virškinimo skrandyje (S3)				Po 2 val virškinimo žarnyne (Ž3)			
			LV		HV		LV		HV		LV		HV	
			F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R
a	b	c	d	e	f	g	h	j	k	l	m	n	o	p
5	17-21	NENLL			+									
5	19-23	NLLRF	+		+									
6	14-19	EVLNEN			+									
6	15-20	VLNENL	+				+							
6	18-23	ENLLRF	+		+	+								
6	25-30	VAPFPE	+		+			+	+	+				
6	56-61	DIKQME		+		+								
7	10-16	GLPQEV	+		+									
7	14-20	EVLNENL	+		+									
7	17-23	NENLLRF	+	+	+	+								
7	24-30	FVAPFPE	+		+	+								
8	16-23	LNENLLRF	+		+									
9	15-23	VLNENLLRF	+		+									
9	51-59	DQAMEDIKQ	+											
9	71-79	IVPNSVEQK 5:Phospho (ST)				+								
9	115-123	SAEERLHSM 5:Phospho (ST)		+		+								
9	131-139	QKEPMIGVN	+	+	+	+								
10	12-21	PQEVNENLL	+		+									
10	14-23	EVLNENLLRF	+		+									
13	01-13	RPKHPIKHQGLPQ	+		+									
16	01-16	RPKHPIKHQGLPQEV	+							+				
5	149-153	LFRQF								+				
6	144-149	YFYPEL					+	+	+	+	+	+		+
6	159-164	YPSGAW					+	+						
6	174-179	TDAPSF					+	+	+	+				
7	25-31	VAPFPEV						+		+			+	+
7	143-149	AYFYPEL					+	+	+	+	+	+	+	+
7	157-163	DAYPSGA						+						
7	166-172	YVPLGTQ								+	+			
7	173-179	YTDAPSF					+	+	+	+	+	+	+	+
8	24-31	FVAPFPEV					+	+	+	+	+	+	+	+
8	25-32	VAPFPEVF					+	+	+	+	+	+		
8	142-149	LAYFYPEL					+	+	+	+				
8	157-164	DAYPSGAW					+	+	+	+	+	+	+	+
8	165-172	YYVPLGTQ					+	+	+	+	+	+		
8	166-173	YVPLGTQY					+				+	+		
9	24-32	FVAPFPEVF					+	+	+	+	+			
9	165-173	YYVPLGTQY								+				+

2 lentelė. Tęsinys

a	b	c	d	e	f	g	h	j	k	l	m	n	o	p
9	165-173	YYVPLGTQY					+	+	+		+			
10	180-189	SDIPNPIGSE							+	+				
10	190-199	NSEKTTMPLW							+	+				
11	25-35	VAPFPEVFGKE					+	+	+	+	+	+	+	+
11	81-91	IQKEDVPSERY					+	+						
11	99-109	LRLKKYKVPQL					+	+	+	+				
11	110-120	EIVPNSAEERL 6: Phospho (ST)					+	+	+	+				
11	154-164	YQLDAYPSGAW					+			+				
12	24-35	FVAPFPEVFGKE					+	+	+	+			+	
12	165-176	YYVPLGTQYTDA					+	+	+					
14	166-179	YVPLGTQYTDAPSF						+		+				
15	25-39	VAPFPEVFGKEKVNE					+	+	+					
15	165-179	YYVPLGTQYTDAPSF					+	+	+	+				
16	24-39	FVAPFPEVFGKEKVNE					+	+	+	+				
17	180-196	SDIPNPIGSENSEKTTM					+	+	+	+				
20	180-199	SDIPNPIGSENSEKTTMPLW					+	+	+	+				
5	95-99	LEQLL									+	+	+	+
5	104-108	YKVPQ									+	+	+	
5	194-198	TTMPL									+	+	+	+
5	195-199	TMPLW											+	+
6	104-109	YKVPQL										+	+	+
6	173-178	YTDAPS										+		
7	165-171	YYVPLGT											+	+
7	166-172	YVPLGTQ									+			
7	180-186	SDIPNPI									+	+	+	+
8	08-15	HQGLPQEV												+
8	84-91	EDVPSERY									+	+	+	+
8	165-172	YYVPLGTQ									+		+	+
8	166-173	YVPLGTQY									+		+	
9	08-16	HQGLPQEV									+	+		+
9	24-32	FVAPFPEVF									+	+	+	+
9	25-33	VAPFPEVFG									+		+	
9	165-173	YYVPLGTQY									+	+	+	
10	24-33	FVAPFPEVFG									+	+	+	+
10	25-34	VAPFPEVFGK									+	+		+
10	110-119	EIVPNSAEER 6: Phospho (ST)									+	+	+	+
10	133-142	EPMIGVNQEL									+			
11	24-34	FVAPFPEVFGK									+	+	+	+
11	25-35	VAPFPEVFGKE									+	+	+	
11	80-90	HIQKEDVPSER									+	+	+	+
12	80-91	HIQKEDVPSERY									+	+	+	+
14	180-193	SDIPNPIGSENSGK									+	+	+	+
18	125-142	EGIHAQQKEPMIGVNQEL									+	+	+	+

3 lentelė. α_{s2} -kazeino hidrolizės produktai

Aminorūgščių skaičius	Padėtis grandinėje	Aminorūgščių seka	Prieš virškinimą (VTE)				Po 2 val virškinimo skrandyje (S3)				Po 2 val virškinimo žarnyne (Ž3)					
			LV		HV		LV		HV		LV		HV			
			F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R		
5	166-170	ALPQY					+		+							
6	168-173	PQYLKT	+			+										
7	189-195	TKVIPYV	+			+										
10	166-175	ALPQYLKTVY	+			+										
7	80-86	YQKFPQY					+	+	+	+						
16	91-106	YQGPIVLNPWDQVKRN						+			+					
21	91-111	YQGPIVLNPWDQVKRNAVPIT					+	+	+	+						
24	91-114	YQGPIVLNPWDQVKRNAVPITPTL						+			+					
5	189-193	AMKPW										+	+	+	+	
6	89-94	YQKFPQ										+	+	+	+	
6	115-120	NAVPIT										+	+	+	+	
6	198-203	TKVIPY										+	+	+		
7	89-95	YQKFPQY										+	+	+	+	
7	107-113	NPWDQVK										+	+			
7	198-04	TKVIPYV										+		+	+	
8	81-88	ALNEINQF										+	+	+	+	
8	115-122	NAVPITPT												+	+	
9	81-89	ALNEINQFI										+				
9	115-123	NAVPITPTL										+	+	+		
9	153-161	LTEEEKNRL										+		+		
10	71-80	ITVDDKHYYQK										+				
13	100-112	YQGPIVLNPWDQV										+	+	+	+	
14	99-112	LYQGPIVLNPWDQV											+		+	
14	100-113	YQGPIVLNPWDQVK										+	+	+	+	
15	99-113	LYQGPIVLNPWDQVK										+	+			

4 lentelė. κ–kazeino hidrolizės produktai

Aminorūgščių skaičius	Padėtis grandinėje	Aminorūgščių seka	Prieš virškinimą (VTE)				Po 2 val virškinimo skrandyje (S3)				Po 2 val virškinimo žarnyne (Ž3)			
			LV		HV		LV		HV		LV		HV	
			F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R
a	b	c	d	e	f	g	h	j	k	l	m	n	o	p
5	75-79	QWQVL		+										
5	161-165	TVQVT		+		+								
6	18-23	FSDKIA		+										
6	80-85	SNTVPA		+		+								+
7	161-167	TVQVTST	+	+	+	+								
8	21-28	KIAKYIPI		+		+								
8	153-160	IESPPEIN	+		+									
9	33-41	SRYPYGLN		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	42-50	YYQQKPVAL		+										
9	45-53	QKPVALINN		+		+								
9	66-74	AVRSPAQIL		+										
9	132-140	STPTIEAVE				+								
9	138-146	AVESTVATL		+										
9	143-151	VATLEDSPE 9: Phospho (ST)				+								
9	152-160	VIESPPEIN	+	+	+	+								
9	161-169	TVQVTSTAV	+	+	+	+								
10	96-105	ARHPHPLSF	+		+		+	+	+	+				
11	42-52	YYQQKPVALIN		+										
11	43-53	YQQKPVALINN				+								
11	61-71	YAKPAAVRSPA		+		+								
11	141-151	STVATLEDSPE 9: Phospho (ST)		+										
12	42-53	YYQQKPVALINN		+										
5	51-55	INNQF					+		+					
6	33-38	SRYPY					+	+	+	+				
8	22-29	IAKYIPIQ							+					
8	31-38	VLSRYPY					+	+	+	+				
8	42-49	YYQQKPVA					+	+	+		+		+	+
8	43-50	YQQKPVAL					+	+	+	+				
8	162-169	VQVTSTAV					+	+	+	+				
9	22-30	IAKYIPIQY					+	+	+	+				
9	42-50	YYQQKPVAL					+	+	+	+				
9	67-75	VRSPAQILQ					+	+	+	+	+	+	+	+
9	161-169	TVQVTSTAV								+				
10	33-42	SRYPYGLNY					+	+	+	+				
10	51-60	INNQFLPYPY					+	+	+	+	+	+	+	+
10	67-76	VRSPAQILQW								+				
10	67-76	VRSPAQILQW					+	+	+					
11	31-41	VLSRYPYGLN								+				

4 lentelė. Tęsinys

a	b	c	d	e	f	g	h	j	k	l	m	n	o	p
11	56-66	LPYPYAKPAA					+	+	+	+				
12	18-29	FSDKIAKYIPIQ					+	+	+	+				
13	18-30	FSDKIAKYIPIQY					+	+	+	+				
13	125-137	IASGEPTSTPTTE						+		+				
16	51-66	INNQFLPYPYAKPAA					+	+	+	+				
5	25-29	YIPIQ									+		+	
5	56-60	LPYPY									+	+	+	+
6	25-30	YIPIQY									+			
6	61-66	YAKPAA									+	+	+	+
6	162-167	VQVTST										+		+
7	17-23	FFSDKIA												+
7	18-24	FSDKIAK									+	+	+	
7	42-48	YYQQKPV									+	+	+	+
8	17-24	FFSDKIAK									+		+	
10	77-86	QVLSNTVPAK											+	
11	76-86	WQVLSNTVPAK									+		+	
12	113-124	NQDKTEIPTINT										+		+

2 PRIEDAS

Priede pateiktos lentelės, kuriose nurodyti peptidai pasižymintys bioaktyviomis savybėmis gauti iš kazeino frakcijų. 1, 2, 3, 4 – bandiniai vandeniniai ekstraktai (VTE) atitinkamai senojo genotipo Lietuvos juodmragės veislės karvės pieno fermentinės (F) ir rūgštinės (R) sutraukos bei Holšteino veislės karvės pieno fermentinės (F) ir rūgštinės (R) sutraukos, –2, –4 bandiniai atitinkamai po 2 val. virškinimo skrandyje imitavimo *in vitro* sistemoje (S3) ir po 2 val. virškinimo žarnyne imitavimo *in vitro* sistemoje (Ž3). Lentelėse taip pat nurodytas bendras boaktyvių peptidų skaičius bandinyje ir jų biofunkcijos.

1 lentelė. Bioaktyvūs peptidai atskelti nuo β -kazeino grandinės

β -kazeinas																		
Nr.	Id. masė	Teor. masė	Peptido seka	Padėtis grandinėje	Bandiniai												Biofunkcija	Nuoroda
					1	1-2	1-4	2	2-2	2-4	3	3-2	3-4	4	4-2	4-4		
a	b	c	d	e	f	g	h	j	k	l	m	n	o	p	r	s	t	u
1	829,344	829,445	AVPYPQR	177–183			+			+			+				ACE inhibitorius	[102]
2	1156,607	1156,624	YQEPVLGPVR	193–202	+		+			+	+		+			+	ACE inhibitorius	[102]
3	747,378	747,363	EMPFPK	108–113			+			+			+			+	ACE inhibitorius	[94, 102]
4	747,339	747,380	YQEPVL	193–198	+	+			+	+		+			+		ACE inhibitorius	[102]
5	1880,132	1880,056	YQEPVLGPVRGPFPIIV	193–209		+	+		+	+		+	+		+	+	Imunomodulatoriai, antimikrobiniai	[102]
6	755,411	755,397	DKIHPF	47–52	+			+			+			+			β -kazoksinas	[124]
7	628,330	627,264	LNVPGE	6–11		+	+		+	+		+	+		+	+	ACE inhibitorius	[103]
8	787,435	786,314	FPPQSVL	157–163		+	+		+	+		+	+		+	+	ACE inhibitorius	[103]
9	2390,275	2390,196	VYFPFGPIPNLSLPQNIPPLTQ T	59–80		+			+			+	+		+	+	ACE inhibitorius	[103]
10	1151,694	1150,628	GPVRGPFPIIV	199–209		+			+			+			+		ACE inhibitorius	[103]
11	1094,672	1093,698	PVRGPFPIIV	200–2009		+	+		+	+		+	+		+	+	ACE inhibitorius	[103]
12	995,592	994,648	PVVVPPFLQ	81–89		+			+	+					+		ACE inhibitorius	[103]

1 lentelė. Tęsinys

a	b	c	d	e	f	g	h	j	k	l	m	n	o	p	r	s	t	u
13	1300.694	1299.738	VYPFPGPIPNSL	59–70		+			+			+			+		ACE inhibitorius	[103]
14	530.284	530.297	GPFPI	203–207				+						+			Katepsino B inhibitorius	[111]
Bendras bioaktyvių peptidų skaičius bandinyje					3	9	7	2	9	9	2	8	8	2	9	7		

2 lentelė. Bioaktyvūs peptidai atskelti nuo α_{s1} -kazeino grandinės

α_{s1} -kazeinas																		
Nr.	Id. masė	Teor. masė	Peptido seka	Padėtis grandinėje	Bandiniai											Biofunkcija	Nuoroda	
					1	1-2	1-4	2	2-2	2-4	3	3-2	3-4	4	4-2			4-4
1	865.358	865.361	DAYPSGAW	157–164		+	+		+	+		+	+		+	+	ACE inhibitorius	[102]
2	763.365	762.363	DIKQME	56–61				+							+		ACE inhibitorius	[103]
3	1001.520	1000.569	FRQFYQL	150–156								+					ACE inhibitorius	[103]
4	662.398	661.392	NLLRF	19–23	+				+		+	+			+		ACE inhibitorius	[103]
5	831.392	830.298	YFYPEL	144–149		+	+		+	+		+			+	+	ACE inhibitorius	[103]
6	1219.636	1218.654	VAPFPEVFGKE	25–35		+	+		+	+		+	+		+	+	ACE inhibitorius	[103]
7	902.429	901.373	AYFYPEL	143–149		+	+		+			+	+		+	+	ACE inhibitorius	[103]
8	905.477	904.364	FVAPFPEV	24–31		+	+		+	+		+	+		+	+	ACE inhibitorius	[103]
9	1836.953	1835.749	FVAPFPEVFGKEKV NE	24–39		+			+			+			+		ACE inhibitorius	[103]
10	905.477	904.479	VAPFPEVF	25–32		+	+		+	+		+			+		ACE inhibitorius	[103]
11	1015.513	1014.427	LAYFYPEL	142–149		+			+			+			+		ACE inhibitorius	[103]
Bendras bioaktyvių peptidų skaičius bandinyje					1	8	6	1	9	5	1	10	4	1	9	5		

3 lentelė. Bioaktyvūs peptidai atskelti nuo α_{s2} -kazeino grandinės

α_{s2} -kazeinas																		
Nr.	Id. masė	Teor. masė	Peptido seka	Padėtis grandinėje	Virškinimo bandiniai											Biofunkcija	Nuorodas	
					1	1-2	1-4	2	2-2	2-4	3	3-2	3-4	4	4-2			4-4
1	631,281	631,315	AMKPW	189–193			+			+			+			+	ACE inhibitorius	[102]
Bendras bioaktyvių peptidų skaičius bandinyje					0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1		

4 lentelė. Bioaktyvūs peptidai atskelti nuo κ -kazeino grandinės

κ -kazeinas																		
Nr.	Id. masė	Teor. masė	Peptido seka	Padėtis grandinėje	Virškinimo bandiniai											Biofunkcija	Nuoroda	
					1	1-2	1-4	2	2-2	2-4	3	3-2	3-4	4	4-2			4-4
1	711.944	1422.799	FSDKIAKYIPIQ	18–29		+			+			+			+		ACE inhibitorius	[103]
2	400.205	1198.623	ARHPHPLSF	96–105	+	+			+			+			+		ACE inhibitorius	[103]
3	890.400	890.483	AVESTVATL	138–146				+									ACE inhibitorius	[103]
4	804.404	804.446	VQVTSTAV	162–169		+			+			+			+		ACE inhibitorius	[103]
Bendras bioaktyvių peptidų skaičius bandinyje					1	3	0	1	3	0	0	3	0	0	3	0		