

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Neringa Kasiulionytė**

**Kazeino funkcinių savybių pakeitimas modifikuojant micelės  
struktūrą arba maišant su kitais pieno baltymais**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovė**  
Prof. dr. Daiva Leskauskaitė

**KAUNAS, 2018**

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Kazeino funkcinių savybių pakeitimas modifikuojant micelės  
struktūrą arba maišant su kitais pieno baltymais**

Baigiamasis magistro projektas

**Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)**

**Vadovė**

Prof. dr. Daiva Leskauskaitė

**Recenzentė**

Lekt. dr. Renata Žvirdauskienė

**Projekto autorė**

Neringa Kasiulionytė

**KAUNAS, 2018**



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Neringa Kasiulionytė

**Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)**

„Kazeino funkcinių savybių pakeitimas modifikuojant micelės struktūrą  
arba maišant su kitais pieno baltymais“

**AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

2018 m. birželio 4 d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Neringos Kasiulionytės**, baigiamasis projektas tema „Kazeino funkcinių savybių pakeitimas modifikuojant micelės struktūrą arba maišant su kitais pieno baltymais“ 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 mokėjusi.

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

---

*(vardą ir pavardę įrašyti ranka)*

---

*(parašas)*

## TURINYS

1. Įvadas .....	7
2. Literatūros apžvalga .....	8
2.1. Kazeino micelės struktūra ir savybės .....	8
2.2. Kazeino produktai .....	12
2.3. Funkcinės savybės ir jų modifikavimo būdai.....	13
2.3.1. Tirpumas.....	13
2.3.2. Gebėjimas formuoti gelį.....	16
2.3.3. Gebėjimas putoti .....	18
2.3.4. Emulsavimo savybės .....	19
2.4. Kazeino biologinė vertė .....	22
2.5. Kazeino virškinamumui įtaką darantys faktoriai .....	24
2.6. Apibendrinimas .....	25
3. Medžiagos ir tyrimų metodai .....	27
3.1. Medžiagos .....	27
3.2. Mėginių ruošimas .....	27
3.2.1. Pieno baltymų produktų funkcinių savybių tyrimams skirtų mėginių ruošimas.....	27
3.2.2. Demineralizuotų kazeino micelių tirpalų funkcinių savybių tyrimams skirtų mėginių ruošimas .....	28
3.2.3. Micelinio kazeino ir demineralizuoto kazeino mėginių ruošimas imituojamame pieno ultrafiltrate.....	28
3.3. Tyrimo metodai .....	29
3.3.1. Baltymų produktų sudėties vertinimas.....	29
3.3.2. Baltymų produktų funkcinių savybių nustatymas.....	30
3.3.3. Baltymų virškinamumo nustatymas .....	32
4. Rezultatai ir jų aptarimas.....	36
4.1. Baltymų produktų sudėties tyrimai .....	36
4.2. Pieno baltymų produktų funkcinės savybės .....	37
4.3. Micelinio kazeino demineralizacijos įtaka funkcinėms savybėms .....	47
4.4. Micelinio kazeino demineralizacijos įtaka virškinamumui.....	53
4.5. Pieno baltymų virškinamumo tirpale ir aliejus vandenyje tipo emulsijų tarpfazyje palyginimas	59
5. Išvados.....	63
Bibliografinių nuorodų sąrašas.....	64

Kasiulionytė, Neringa. Kazeino funkcinių savybių pakeitimas modifikuojant micelės struktūrą arba maišant su kitais pieno baltymais. Magistro baigiamasis projektas / vadovė prof. dr. Daiva Leskauskaitė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Technologijų mokslai, Maisto technologijos.

Reikšminiai žodžiai: kazeinas, micelė, demineralizacija, funkcinės savybės, virškinamumas.

Kaunas, 2018. 70 p.

## Santrauka

Šio projekto tikslas – įvertinti kazeino funkcinių savybių ir *in vitro* virškinamumo priklausomybę nuo kazeino būvio, kuris buvo keičiamas micelinį kazeiną demineralizuojant arba maišant su kitais pieno baltymais. Buvo paruošti ir tiriami pieno baltymų produktų vandeniniai tirpalai ir emulsijos. Didėjant micelinio kazeino demineralizacijos laipsniui, termostabilumas, putojimo geba ir emulsavimo aktyvumas didėjo, bet putų ir emulsijų stabilumas mažėjo. Tiriant termostabilumą, buvo nustatytos dvi tendencijos: micelinio kazeino ir kalcio kazeinato termostabilumas didėjo, didėjant pH, o lieso pieno milteliai ir pieno baltymų koncentratas didžiausiu termostabilumu pasižymėjo, esant pH 6,6 ir 6,8 atitinkamai. Sumaišius micelinį kazeiną su liesu pienu, putojimo geba padidėjo. Tačiau pieno baltymų produktų maišymas su liesu pienu nedarė įtakos baltymų emulsavimo aktyvumui. Emulsavimo aktyvumas didėjo, didėjant baltymų koncentracijai. Buvo nustatyta, kad didesnis baltymų kiekis adsorbuojamas aliejus vandenyje tipo emulsijų tarpfazyje, kai micelinis kazeinas yra sumaišytas su liesu pienu, o ne naudojamas atskirai.

*In vitro* virškinamumo tyrimo rezultatai parodė, kad pieno baltymų hidrolizė yra greitesnė, kai jie adsorbuoti aliejus vandenyje tipo emulsijų tarpfazyje, o ne būdami vandens tirpaluose. Vandens tirpaluose micelinis kazeinas buvo virškinamas greičiau nei demineralizuotas kazeinas, tačiau aliejus vandenyje tipo emulsijų tarpfazyje demineralizuotas kazeinas buvo virškinamas greičiau nei micelinis kazeinas.

Kasiulionytė, Neringa. The Changes of Functional Properties of Casein by Modifying the Micellar Structure or Blending with Other Milk Proteins. Master's Final Degree Project / supervisor prof. dr. Daiva Leskauskaitė. Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.  
Study field and area (study field group): Technological Sciences, Food Technology.  
Key words: casein, micelle, demineralization, functional properties, digestibility  
Kaunas, 2018. 70 pages.

## Summary

The aim of this study was to evaluate relationship between the state of casein and its functionality and *in vitro* digestibility. State of casein was changed either by demineralizing micellar casein or blending with other milk proteins. Aqueous solutions and emulsions of dairy proteins were made and examined. As degree of demineralization of micellar casein increased, thermal stability and foaming increased, but foam stability and emulsion stability decreased. Two different patterns of thermal stability were observed: thermal stability of micellar casein and calcium caseinate increased as pH increased while proteins of skim milk powder and milk protein concentrate exhibited maximum stability at pH 6,6 and 6,8 respectively. Blending micellar casein with skim milk resulted in increased foaming. However, blending of proteins had little effect on the emulsifying activity of proteins. Emulsifying activity increased as a function of protein concentration. It was concluded that higher amount of protein is adsorbed at the interface when micellar casein is in the mixture with skim milk than alone.

Analysis of *in vitro* digested samples revealed that digestion of milk proteins is more efficient when they are adsorbed at the surface of oil droplet than dispersed in water. Demineralized casein was not digested as efficient as micellar casein when dispersed in water. However, demineralized casein was digested faster than micellar casein when adsorbed at the interface of emulsion.

## SANTRUMPOS

a/v – aliejus vandenyje

dMK1 – demineralizuotas micelinis kazeinas, kurio gamybai naudota 12 mmol/kg trinatrio citrato

dMK2 – demineralizuotas micelinis kazeinas, kurio gamybai naudota 102 mmol/kg trinatrio citrato

HL – hidrolizės laipsnis

IBI – išrūgų baltymų izoliatas

IPIUF – imituojamas pieno ultrafiltratas

ISS – imituojamas skrandžio skystis

IŽS – imituojamas plonosios žarnos skystis

KKN – kalcio kazeinatas

LPM – lieso pieno milteliai

MK – micelinis kazeinas

OFA – o-ftaldialdehidas

PBK – pieno baltymų koncentratas

TSC – trinatrio citratas

## 1. Įvadas

Pienas visada buvo svarbi žmogaus mitybos dalis, o pirmaisiais gyvenimo metais – pagrindinė. Tai baltymų, riebalų ir angliavandenių šaltinis, kurio sudėtyje taip pat yra mineralų bei bioaktyviųjų junginių. Daug metų į pieną žiūrėta kaip į žaliavą, naudojamą maisto pramonėje. Šis požiūris, be abejo, svarbus ir šiandien, tačiau pastaruoju metu pienas vertinamas kaip komponentų, pasižyminčių unikaliomis savybėmis, sistema. Pieno sudedamąsias dalis siekama išskirti, išgryninti, ištirti funkcines savybes bei pritaikyti šiuolaikinio žmogaus poreikių tenkinimui. Nors mokslas apie pieną ir jo komponentus pradėjo vystyti daugiau nei prieš šimtą metų, besikeičiantis žmonių požiūris bei tobulėjančios analizės technikos suteikia galimybę labiau įsigilinti į pieno komponentų savybes.

Iš visų pieno sudedamųjų dalių daugiausia mokslininkų dėmesio sulaukia baltymai, tiriamos jų funkcinės savybės bei pokyčiai biologinėse sistemose. Dažniausiai šios dvi sritys nagrinėjamos atskirai, tačiau šiame projekte siekiama nustatyti ryšį tarp pagrindinio pieno baltymo kazeino būvio terpėje, sąveikos su kitais terpėje esančiais komponentais, funkcinių savybių bei *in vitro* virškinamumo. Projekto rezultatų nauda – gilesnės žinios apie kazeino funkcinių savybių pokyčius, priklausomai nuo jo būvio terpėje, bei galimybė pritaikyti šias žinias, kuriant naujus maisto produktus, atsižvelgiant į virškinamumą.

### Projekto tikslai:

1. įvertinti kazeino funkcines savybes, modifikuojant micelės struktūrą arba maišant su kitais pieno baltymais;
2. ištirti kazeino *in vitro* virškinamumo priklausomybę nuo micelės struktūros.

### Projekto uždaviniai:

1. nustatyti ir palyginti įvairių pieno baltymų produktų bei jų mišinių funkcines savybes;
2. nustatyti kazeino micelės demineralizacijos laipsnio įtaką kazeino funkcinėms savybėms;
3. nustatyti kazeino micelės demineralizacijos laipsnio įtaką kazeino virškinamumui, imituojant virškinimo sąlygas *in vitro* tyrimu;
4. palyginti pieno baltymų virškinamumą, kai jie yra vandens tirpale ir adsorbuoti aliejus vandenyje tipo emulsijų tarpfazyje.



## 2. Literatūros apžvalga

### 2.1. Kazeino micelės struktūra ir savybės

Pieno baltymus galima suskirstyti į dvi pagrindines frakcijas: kazeiną ir išrūgų baltymus. Kazeinas yra fosfoproteinų grupė, kuri gali būti išskiriama nuosėdomis pieną rūgštinant ir pasiekus kazeino izoelektrinį tašką pH 4,6 arba paveikus fermentu reninu. Atskyrus rūgštinę arba fermentinę sutrauką pieno serume lieka išrūgų baltymai. Kazeinas sudaro apie 80 % pieno baltymų, o išrūgų baltymai – 20 %.

Kazeino frakcija yra nevienalytė, ją sudaro molekulės, tarpusavyje besiskiriančios molekuline mase, aminorūgščių kiekiu bei seka, fosfato liekanų skaičiumi. Pagal šias ir kitas savybes išskiriamas  $\alpha_{s1}$ –,  $\alpha_{s2}$ –,  $\beta$ – ir  $\kappa$ –kazeinas (žr. 1 lent.). Šios frakcijos atitinkamai sudaro 38, 10, 35 ir 12 % viso karvių pieno kazeino [1].

1 lent. Kazeino frakcijų savybės [1]

Savybės	$\alpha_{s1}$	$\alpha_{s2}$	$\beta$	$\kappa$
Molekulinė masė	23612	25228	23980	19005
Aminorūgščių skaičius	199	207	209	169
Koncentracija piene (g/l)	12–15	3–4	9–11	2–4
Fosfato liekanų skaičius	8–9	10–13	4–5	1–2
Prolino liekanų skaičius	17	10	35	20
pI	4,96	5,27	5,20	5,54

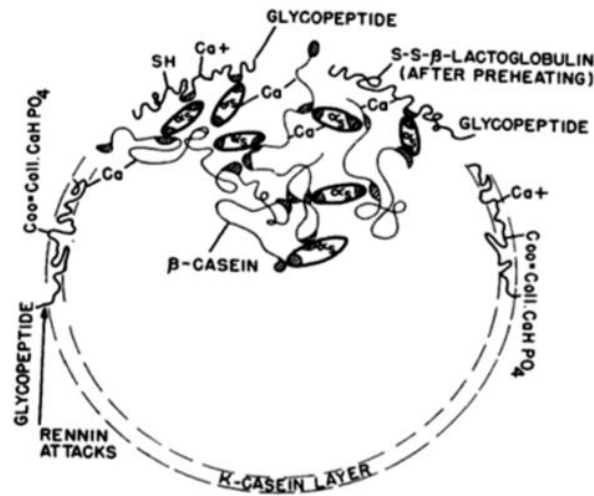
Kazeino molekulėms būdinga nevientisa antrinė struktūra, dėl šios priežasties jos pasižymi dideliu lankstumu. Antrinės struktūros formavimąsi trikdo sąlyginai didelis aminorūgšties prolino kiekis (pavyzdžiui,  $\beta$ –kazeine 35 iš 209 aminorūgščių yra prolinas) [1]. Prolinas yra nepolinė aminorūgštis, todėl įjungta į peptidinę grandinę nesudaro vandenilinių ryšių, palaikančių antrinę struktūrą. Kazeiną sudarančios aminorūgštys išsidėsto tokia seka, kad susidaro hidrofiliiniai ir hidrofobiniai regionai, svarbūs erdvinės struktūros formavimuisi.

Aminorūgščių serino ir treonino šoninėje grandinėje yra hidroksigrupė, prie kurios gali prisijungti fosfatas. Prijungtų fosfato grupių skaičius frakcijose yra nevienodas:  $\alpha_s$ –kazeine jų yra 8–13, o  $\kappa$ –kazeine tik 1–2. Pagal tai frakcijos yra apibūdinamos kaip jautrios ( $\alpha_{s1}$ –,  $\alpha_{s2}$ – ir  $\beta$ –kazeinas) ir nejautrios ( $\kappa$ –kazeinas) kalcio jonų koncentracijos pokyčiui. Esant 6 mM kalcio jonų koncentracijai, jautrios frakcijos tampa netirpiomis, iškrenta nuosėdomis dėl besiformuojančių kalcio fosfato tiltelių. Karvių piene kalcio jonų koncentracija yra apie 30 mM, tačiau jautrių frakcijų nuosėdos nesusidaro, todėl daroma prielaida, kad  $\kappa$ –kazeinas apsaugo  $\alpha_{s1}$ –,  $\alpha_{s2}$ – ir  $\beta$ –kazeiną nuo kalcio jonų poveikio. Šis reiškinys pagrįstas koloidinių dalelių, vadinamų kazeino micelių, formavimusi [1].

Kazeino micelės yra sferinės formos dalelės, kurių skersmuo svyruoja nuo 50 iki 500 nm (vidutiniškai apie 120 nm), o masė – nuo  $10^6$  iki  $3 \cdot 10^9$  Da (vidutiniškai apie  $10^8$  Da). Micelių koncentracija karvių piene yra  $10^{14}$ – $10^{16}$  micelių viename mililitre pieno. Viena nuo kitos šios dalelės nutolusios maždaug 250 nm atstumu. Apie 94 % kazeino micelės sausosios masės sudaro baltymai, o likusius 6 % – koloidinis kalcio fosfatas [1].

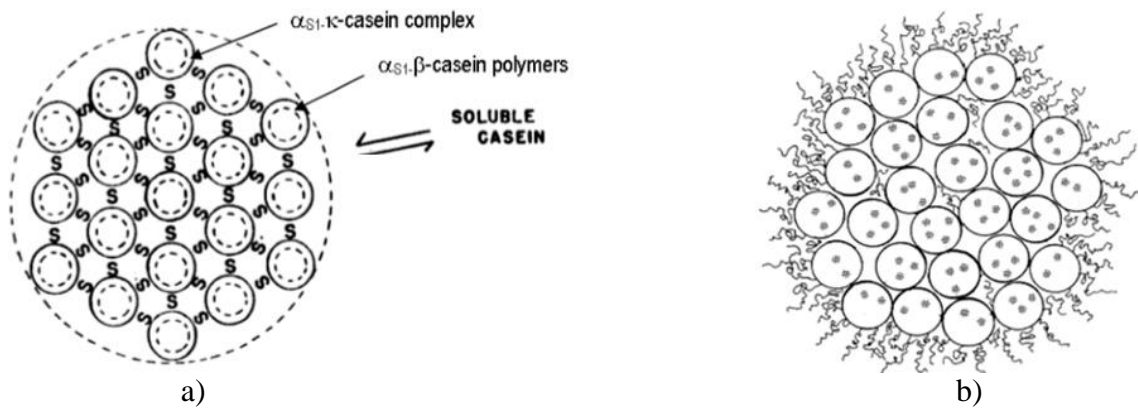
Kazeino micelės struktūrai aprašyti buvo pasiūlyti keli modeliai. Pagrindinės sąlygos, kurias turi tenkinti micelės modelis yra šios: 1)  $\kappa$ -kazeinas turi išsidėstyti tokiu būdu, kad apsaugotų  $\alpha_{s1}$ –,  $\alpha_{s2}$ – ir  $\beta$ -kazeiną nuo kalcio jonų poveikio; 2) reninas turi specifiskai ir greitai hidrolizuoti  $\kappa$ -kazeiną; 3) kaitinant kazeiną su išrūgų baltymais,  $\beta$ - ir  $\kappa$ -kazeinas turi sudaryti disulfidiniais ryšiais stabilizuotus kompleksus [1, 2]. Pašalinus koloidinį kalcio fosfatą, micelės dydis sumažėja iki  $10^6$  Da, todėl kalcio fosfato įtaka micelės struktūros palaikymui akivaizdi. Micelės taip pat suardomos jas paveikus urėja, 35 % etanoliu (esant  $70^\circ\text{C}$  temperatūrai) arba pakeičiant pH iki daugiau nei 9, tačiau šiais atvejais koloidinis kalcio fosfatas neištirpsta, o tai rodo, kad micelės struktūrą taip pat palaiko hidrofobinės sąveikos ir vandeniliai ryšiai [1]. Atsižvelgiant į šias sąlygas, buvo pasiūlyti micelės struktūros modeliai, kuriuos galima suskirstyti į tris kategorijas: dangalo–šerdies (angl. *coat–core*), subvienetų (submicelių) (angl. *subunit (sub–micelles)*) ir vidinės struktūros (angl. *internal structure*) [3].

Dangalo–šerdies modeliui pasiūlytos kelios variacijos. Vienos iš jų atveju  $\alpha_{s1}$ – ir  $\beta$ -kazeino monomerai, besijungdami į mažos molekulinės masės kompleksus, sudaro šerdį, stabilizuotą kalcio fosfatu.  $\alpha_{s1}$ – ir  $\kappa$ -kazeinas taip pat formuoja kompleksus, kurie sudaro išorinį sluoksnį (dangalą),  $\kappa$ -kazeinui orientuojantis į išorę. Kitu atveju micelės šerdį sudaro tankiai susilanksčiusios  $\alpha_{s1}$ -kazeino molekulės, prisijungusios prie ne taip tankiai išsidėsčiusių  $\beta$ -kazeino molekulių (žr. 1 pav.). Micelės paviršius padengtas  $\kappa$ -kazeinu, tačiau šiame modelyje, priešingai nei aptartame prieš tai, kalcio fosfatas lokalizuotas tiek šerdyje, tiek dangale. Dar viena dangalo–šerdies modelio variacija yra kazeino micelė, kurios šerdį sudaro  $\alpha_{s1}$ -kazeino ir koloidinio kalcio fosfato karkasas, prie kurio hidrofobine sąveika prisijungęs  $\beta$ -kazeinas. Micelės šerdį dengia  $\alpha$ - ir  $\kappa$ -kazeino kompleksų sluoksnis, kuriame  $\kappa$ -kazeino koncentracija sąlyginai didelė [3].



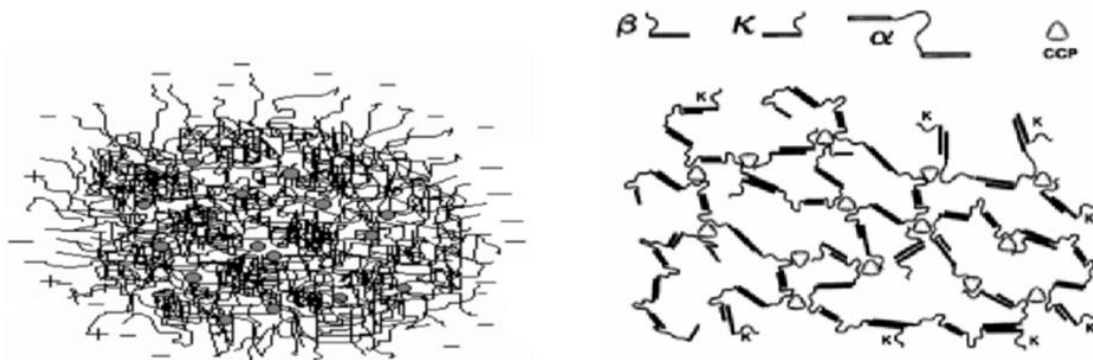
1 pav. Kazeino micelės struktūra pagal dangalo–šerdis modelį [3]

Subvienetų (submicelių) modelyje daroma prielaida, kad micelė sudaryta iš mažesnių dalelių – submicelių. Šio modelio variacijos taip pat yra kelios. Vienoje iš jų teigiama, kad submicelių vidinė dalis sudaryta iš  $\alpha_{s1}$ - ir  $\beta$ -kazeino polimerų, o išorinė dalis – iš  $\alpha_{s1}$ - ir  $\kappa$ -kazeino kompleksų (žr. 2 pav. a). Submicelės yra stabilizuotos hidrofobine sąveika ir kalcio kazeinato ryšiais, o tarpusavyje submicelės yra sujungtos koloidiniu kalcio fosfatu. Kita teorija teigia, kad submicelėms būdinga įvairi sudėtis kazeino frakcijų atžvilgiu. Pagal tai submicelės skirstomos į sudarytas iš  $\alpha_{s1}$ - ir  $\beta$ -kazeino ir sudarytas iš  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - ir  $\kappa$ -kazeino. Pastarosios išsidėsto micelės išorėje, nukreipiant  $\kappa$ -kazeiną į išorę, o  $\alpha_{s1}$ - ir  $\beta$ -kazeiną į vidinę dalį. Submicelės, sudarytos tik iš  $\alpha_{s1}$ - ir  $\beta$ -kazeino, sutelktos micelės viduje. Ši subvienetų modelio variacija paremta hidrofobine ir hidrofiline sąveika, tačiau kalcio fosfato įtaka nėra aptarta. Labiausiai pripažįstama variacija yra kazeino micelė (žr. 2 pav. b), sudaryta iš 12–15 nm skersmens sferinių subvienetų. Kiekvieno subvieneto sudėtyje yra 20–25 kazeino molekules, o jų struktūra stabilizuojama hidrofobine sąveika ir kalcio fosfato ryšiais. Išskiriami du submicelių tipai: pirmasis, kai submicelės sudarytos iš  $\alpha_s$ - ir  $\beta$ -kazeino, ir antrasis, kai submicelę sudaro  $\alpha_s$ - ir  $\kappa$ -kazeinas. Pirmosios pasižymi hidrofobiškumu ir išsidėsto micelės viduje, o antrosios, labiau hidrofiliškos, micelės paviršiuje. Išsikišusi hidrofiliškos dalis sukuria „plaukuotą sluoksnį“ (angl. *hairy layer*), kuris trikdo tolimesnę submicelių agregaciją dėl erdvinio išsidėstymo ir elektrostatinės stūmos jėgų [3].



2 pav. Kazeino micelės struktūra pagal subvienetų (submicelių) modelį [3]

Kazeino micelė, atitinkanti vidinės struktūros modelį, susidaro vykstant  $\beta$ -kazeino polimerizacijai. Prie linijinės struktūros polimero nuosekliai jungiasi  $\alpha_{s1}$ -kazeinas, o prie pastarojo –  $\kappa$ -kazeinas, kuris apriboja agregato dydį ir yra orientuotas į išorę. Koloidinis kalcio fosfatas sujungia polimerus ir stabilizuoja micelę. Kita pasiūlyta šio modelio variacija yra kazeino micelė, apibūdinama kaip trimatis tinklas, pasižymintis geliui būdinga struktūra su jame esančiomis koloidinio kalcio fosfato mikrogranulėmis bei į išorę išsikišančiomis  $\kappa$ -kazeino hidrofilinėmis dalimis, formuojančiomis „plaukuotą sluoksnį“. Dvigubo ryšio modelis priskiriamas vidinės struktūros modelių kategorijai (žr. 3 pav.). Pasak šios teorijos, baltymai kazeino micelėse yra susieti dviejų tipų ryšiais – hidrofobine sąveika ir elektrostatische stūma. Hidrofobinė sąveika yra pagrindinė jėga, lemianti kazeino micelių formavimąsi, o elektrostatinė stūma yra veiksnys, ribojantis agregatų dydį.  $\alpha_{s1}$ - ir  $\beta$ -kazeinas jungiasi hidrofobiniais ryšiais. Prie fosfoserino liekanų jungiasi kalcio jonai. Tokiu būdu ne tik stabilizuojama micelės struktūra, bet ir mažinamos elektrostatinės stūmos jėgos, todėl kazeino molekulės dar labiau suartėja.  $\kappa$ -kazeinas, neturėdamas pakankamai didelio fosfato liekanų skaičiaus, su kitomis frakcijomis sąveikauja tik hidrofobiniais ryšiais. Taigi, kazeino micelę stabilizuoja hidrofobinė sąveika bei ryšiai, susidarantys tarp fosfoserino liekanų ir kalcio jonų, o  $\kappa$ -kazeinas apriboja kazeino micelės dydį. [3]



3 pav. Kazeino micelės struktūra pagal dvigubo ryšio modelį [3]

Kazeino micelės yra labai atsparios terminiam apdorojimui. Jos nesuyra kaitinant 140°C temperatūroje 15–20 minučių ir esant pH 6,7. Micelės koaguliuoja tik esant aplinkos pokyčiams, pavyzdžiui, sumažėjus pH dėl laktozės skilimo į rūgštis, kazeino defosforilinimo, glikomakropeptido atskilimo nuo  $\kappa$ -kazeino, išrūgų baltymų denatūravimo ir sąveikos su kazeino micelėmis, tirpaus kalcio fosfato nusėdimo ant kazeino micelės [4]. Pieną parūgštinus iki ne mažiau kaip pH 5,5, koloidinis kalcio fosfatas ištirpsta ir micelės praranda stabilumą, tačiau po to pakoregavus pH vertę iki pH 6,7, kazeino micelės sugrįžta į natyvinį būvį [1].

Kazeino micelės nėra suardomos pieną centrifuguojant: susidariusi granulė nesunkiai grąžinama į pradinį būvį pamaišius. Micelės struktūros nepraranda ir pramoninio homogenizavimo metu. Jos išlieka stabilios esant iki 200 mM kalcio jonų koncentracijai 50°C temperatūroje. Slėgio padidėjimas iki 2–300 MPa lemia micelės didėjimą, tačiau esant didesniai slėgiui micelės dydis sumažėja [5].

## 2.2. Kazeino produktai

Pagrindiniai kazeino produktai yra rūgštinis ir fermentinis kazeinas. Jų gamyba atspindi pavadinimuose: rūgštinis kazeinas gaminamas parūgštinus liesą pieną iki kazeino izoelektrinio taško pH 4,6, naudojant pieno, druskos arba sieros rūgštį, o fermentinis kazeinas – pieną traukiant fermentu reninu. Susidariusios sutraukos yra kelis kartus perplaunamos 45–60°C temperatūros vandeniui, centrifuguojamos ir džiovinamos 50–65°C temperatūroje iki 12 % drėgmės [6, 7]. Šiais būdais pagamintas kazeinas yra netirpus vandenyje.

Micelinis kazeinas yra tirpus vandenyje. Jis gaunamas atliekant lieso pieno mikrofiltraciją ir diafiltraciją, po to išdžiovinant purkštuvinėje džiovykloje. Kitas tirpus kazeino produktas – kazeinatas. Tai yra kazeino druskos, gaunamos rūgštinį kazeiną neutralizavus natrio, kalio, kalcio arba magnio hidroksidais bei išdžiovinus purkštuvinėje džiovykloje. Didžiausiu tirpumu vandenyje pasižymi natrio kazeinatas, sudarydamas klampų koloidinį tirpalą. Kalcio kazeinatas, palyginus su natrio kazeinatu, mažiau tirpus vandenyje, tačiau jo tirpalai pasižymi mažesne klampa. Kalio kazeinato savybės panašios į natrio kazeinato, o magnio kazeinato – į kalcio kazeinato [6].

Kiti produktai, kuriuose pagrindinę baltymų dalį sudaro kazeinas, yra koprecipitatas, pieno baltymų koncentratas ir izoliatai, pieno miltai ir lieso pieno miltai. Šiuose produktuose, kaip ir piene, 80 % baltymų sudaro kazeinas, o likusius 20 % – išrūgų baltymai. Koprecipitatas gaunamas pakaitinus liesą pieną iki 85–95°C temperatūros ir jį paveikus kalcio chloridu, o po to išdžiovinant purkštuvinėje džiovykloje. Koprecipitatomis būdingas geras tirpumas vandenyje [7]. Pieno baltymų

koncentratai ir izoliatai gaminami taikant ultrafiltraciją ir diafiltraciją bei retentantą išdžiovinant purkštuvinėje džiovykloje. Pieno baltymų koncentracija pieno baltymų koncentratuose yra 36–85 %, o produktai, kuriuose baltymų koncentracija >85 %, vadinami pieno baltymų izoliatais [8]. Pieno baltymų produktų cheminė sudėtis pateikta 2-oje lentelėje.

2 lent. Pieno baltymų produktų cheminė sudėtis [6]

Produktas	Baltymų kiekis, %	Riebalų kiekis, %	Laktozės kiekis, %	Palenų kiekis, %	Drėgmės kiekis, %
Pieno baltymų koncentratas 56	56,0	1,2	30,0	8,0	4,8
Pieno baltymų koncentratas 70	70,0	1,2	16,8	7,6	4,2
Pieno baltymų koncentratas 80	80,0	1,5	5,8	7,4	4,8
Pieno baltymų izoliatas	90,0	2,0	1,0	2,0	4,3
Micelinis kazeinas	85,0	2,0	<0,5	8,0	5,0
Rūgštinis kazeinas	85,2	2,0	<0,5	2,8	10,0
Fermentinis kazeinas	84,0	2,0	1,6	4,2	10,0
Koprecipitatas	89–94	1,5	1,5	4,5	5,0
Natrio kazeinatas	89,0	2,5	1,0	5,0	4,0
Kalcio kazeinatas	88,0	2,5	1,0	6,0	4,0

Tiesiog sukonzentruojant ir džiovinant pieną arba liesą pieną, gaunami atitinkamai pieno arba lieso pieno miltai. Palyginus šiuos produktus su pieno baltymų koncentratais pieno miltuose yra daugiau laktozės (apie 50 %). Jie gerai tirpsta vandenyje [7].

## 2.3. Funkcinės savybės ir jų modifikavimo būdai

### 2.3.1. Tirpumas

Dauguma pieno baltymų produktų yra gaminami miltelių pavidalu, todėl norint juos efektyviai panaudoti, visų pirma, reikia ištirpinti, kad susidarytų tikrasis tirpalas arba koloidinė dispersija. Baltymų tirpumui įtaką daro įvairūs faktoriai: baltymų prigimtis ir struktūra, tirpalo pH, joninė jėga, tirpinimo temperatūra, miltelių fizikinės ir cheminės savybės, sandėliavimo trukmė.

Priklausomai nuo vandens sąveikos su baltymais yra išskiriamos kelios vandens rūšys. Surištas vanduo prie baltymų molekulių hidrofilinių šoninių grandinių jungiasi vandenilniais ryšiais. Jo kiekis priklauso nuo polinių grupių skaičiaus bei erdvinės baltymo struktūros, kuri sąlygoja su vandeniu sąveikaujančių grupių fizišką pasiekiamumą, tai yra dėl tam tikros molekulės konformacijos dalis hidrofilinių grupių gali būti užmaskuotos molekulės viduje. Tiesiogiai su baltymais sąveikaujančios vandens molekulės sudaro monosluoksnį, jos nedalyvauja cheminėse reakcijose, negali būti tirpikliu ir neužšąla. Pavyzdžiui, 100 g sauso kazeino vidutiniškai prisijungia 5,6 g vandens monosluoksnyje, o  $\beta$ -laktoglobulino – 6,7 g [9]. Monosluoksnį gaubia dar keletas sluoksnių vandens molekulių, kurios sąveikauja su polinėmis funkcinėmis grupėmis, tačiau ne taip

stipriai, kaip esančios monosluoksnyje. Laivas vanduo nėra chemiškai susijęs su baltymais, todėl molekulės gali laisvai judėti visame tirpalo tūryje.

Terpės pH lemia baltymų tirpumą. Baltymų molekulės dėl šoninių grandinių funkcinų grupių ir terminalinių karboksi– bei aminogrupių gebėjimo jonizuotis gali turėti teigiamą, neutralų arba neigiamą krūvį, priklausantį nuo terpės pH. pH vertė, kuriai esant baltymo molekulės bendras krūvis yra lygus nuliui, vadinama izoelektriniu tašku. Susilyginus teigiamų ir neigiamų krūvių kiekiui, elektrostatinės stūmos jėgos pasidaro mažiausios, todėl izoelektriniame taške baltymų molekulės suartėja ir baltymai yra mažiausiai tirpūs. Kazeino izoelektrinis taškas yra pH 4,6. Tolstant nuo izoelektrinio taško baltymų molekulės įgyja krūvį: teigiamą, kai pH vetė mažesnė nei izoelektriniame taške, arba neigiamą, kai pH vetė didesnė nei izoelektriniame taške. Šiais atvejais elektrostatinės stūmos jėgos sustiprėja, baltymų tirpumas padidėja.

Baltymų tirpumą taip pat lemia druskų koncentracija tirpale (tirpalo joninė jėga). Baltymų molekulėse yra polinių grupių, kurios sąveikauja tarpusavyje. Padidinus neutralių druskų kiekį iki tam tikros koncentracijos baltymų tirpumas didėja, nes druskos mažina elektrostatinės traukos jėgas, egzistuojančias tarp baltymų. Šis reiškinys vadinamas išsūdrymu. Toliau didinant tirpalo joninę jėgą, stebimas baltymų tirpumo sumažėjimas – išsūdrymas, nes druskos hidratuojasi ir baltymams pasiekiamo vandens kiekis sąlyginai sumažėja. Rehidratuojant pieno baltymų miltelius druskų koncentracija tirpale priklauso nuo pradinio mineralų kiekio milteliuose arba papildomai pridėdamų druskų. Mineralų kiekis milteliuose susijęs su gamybos procesu: pieno baltymų koncentratuose, kuriuose baltymų kiekis 40 %, bendras mineralų kiekis vidutiniškai 1,5 karto didesnis nei pieno baltymų koncentratuose, kuriuose baltymų kiekis 80 % [8]. Šis skirtumas susidaro dėl taikomos diafiltracijos. Skirtingi mineralai nevienodais kiekiais pašalinami iš retentanto, pavyzdžiui, kalio sumažėjimas yra labiau pastebimas nei kalcio, nes pastarasis yra susijungęs su kazeinu. Mineralų kiekybę ir kokybę susiejus su pieno baltymų koncentratų tirpumu paaiškėjo, kad mėginiai, turintys mažesnę kalcio, magnio ir fosforo bei didesnę natrio kiekį, pasižymėjo geresniu tirpumu [8]. Siekiant padidinti baltymų tirpumą pieno baltymų koncentratų gamybos metu kalcio jonai gali būti pakeičiami natrio jonais retentantą po ultrafiltracijos perleidžiant per jonų mainų kolonėlę [10]. Tirpesni pieno baltymų koncentrato milteliai gaunami pridėdant 50–150 mM natrio chlorido diafiltracijos metu [11].

Padidinus tirpinimo temperatūrą iki 40–50°C pieno baltymų milteliai tirpsta geriau nei esant kambario temperatūrai [12], nes tokiu būdu yra skatinamas vandens molekulių judėjimas į daleles [13]. Tačiau esant aukštesnei temperatūrai išyra nekovalentiniai ryšiai ir suardomi disulfidiniai

tilteliai, todėl išrūgų baltymai denatūruoja, sąveikaudami tarpusavyje ir (arba) su kazeinu bei sudarydami netirpias nuosėdas. Be to, mažesnės baltymų koncentracijos milteliai yra tirpesni nei didelės baltymų koncentracijos [8].

Pieno baltymų produktų tirpumui įtaką daro miltelių paviršiaus ypatybės. Dalelės, turinčios lygų paviršių, tirpsta prasčiau nei tos, kurių paviršius grublėtas. Tai gali būti paaiškinta tuo, kad grublėtų dalelių paviršiaus plotas yra didesnis, todėl ir sąveika su vandeniu yra intensyvesnė. Taikant tuos pačius džiovavimo parametrus pieno baltymų koncentrato gamybos metu dalelės pasižymi lygiu paviršiumi, o džiovinant liesą pieną – grublėtu. Miltelių dalelių paviršiaus ypatybės taip pat susijusios su džiovavimo temperatūra, pavyzdžiui, pašildžius orą iki 77°C ir juo džiovinant sukonzentruotus pieno baltymus gaunamos lygaus paviršiaus dalelės, o esant pradinei temperatūrai 178°C – grublėto [14]. Taikant sąlyginai žemą džiovavimo temperatūrą kazeinas sukonzentruojamas dalelių paviršiuje. Esant aukštesnei džiovavimo temperatūrai kazeinas tolygiai pasiskirsto dalelės tūryje [15].

Pastebėta, kad ilgėjant sandėliavimo trukmei pieno baltymų koncentrato miltelių tirpumas mažėja, o esant didesnei sandėliavimo temperatūrai gebėjimas tirpti prarandamas greičiau. Laikant miltelius 20°C temperatūroje tirpumas mažai pakinta per 60 parų, tačiau, esant sandėliavimo temperatūrai 50°C per 10 parų tirpumas sumažėja iki 5 kartų lyginant su pradiniu. Nepriklausomai nuo sandėliavimo temperatūros išskiriamos trys tirpumo praradimo fazės: pirmoji, kai tirpumas nekinta keleta parų (kuo didesnė temperatūra, tuo šis skaičius mažesnis), antroji, kai tirpumas staigiai sumažėja, bei trečioji, kai pasiekus tirpumo minimumą jis išlieka pastovus (apie 20 % nuo pradinio tirpumo). Tirpumo sumažėjimas siejamas su gretimų kazeino molekulių hidrofobine sąveika. Kazeinui sąveikaujant tarpusavyje miltelių dalelė tarsi pasidengiamo pluta, kuri veikia kaip barjeras ir trikdo sąveiką su vandeniu. Antroji tirpumo praradimo fazė prasideda tik tuomet, kai dalelės yra visiškai padengiamos kazeino aglomeratų tinklu. Miltelių dalelės yra nevienodo dydžio, kazeinas mažesnių dalelių paviršiuje greičiau sudaro „plutą“, todėl stebimas nuoseklus tirpumo mažėjimas. Kadangi kazeino ir išrūgų baltymų kiekis pieno baltymuose yra 80 % ir 20 % atitinkamai, tai ir minimalus tirpumas siejamas su išrūgų baltymais, kurie sandėliavimo metu tirpumo nepraranda [13].



### 2.3.2. Gebėjimas formuoti gelį

Maisto pramonėje svarbi baltymų savybė yra gebėjimas sudaryti gelį, dar vadinama želatinizacija. Gelis – nepertraukiama tridimensinė struktūra, kurios karkasą sudaro tarpusavyje sąveikaujantys baltymai, ertmėse sulaikydami skystąją fazę (dažniausiai vandenį su jame ištirpusiomis medžiagomis arba disperguotais riebalų rutulėliais). Želatinizacija įvyksta dėl poveikio fermentais, terpės pH, joninės jėgos ar temperatūros pokyčio. Bendruoju atveju gelio susidarymą galima suskirstyti į dvi fazes: pirmosios fazės metu baltymų molekulės išsilankstydamos denatūruoja, o antrosios – denatūravusios molekulės agreguojasi, sudarydamos tinklą. Kadangi kazeinas ir išrūgų baltymai pasižymi skirtingomis savybėmis, tai ir jų gelio susidarymo mechanizmai skiriasi. Kazeinas yra reikalingas fermentinio ir rūgštinio gelio susidarymui, o išrūgų baltymų pokyčiai aktualūs susidarant geliui aukštoje temperatūroje.

Paveikus pieną fermentu reninu, suardomas micelės paviršiuje esančio  $\kappa$ -kazeino peptidinis ryšys tarp 105 ir 106 aminorūgščių fenilalanino ir metionino, atpalaiduojant para- $\kappa$ -kazeiną ir  $\kappa$ -kazeino glikomakropeptidą. Sumažėjus kazeino micelės erdviniam stabilumui, atveriamos hidrofobinės ir kalcio jonų poveikiui jautrios zonos. Kazeino micelės tarpusavyje jungiasi per kalcio fosfato tiltelius ir sudaro gelį. Gelis pradeda formotis, kai atpalaiduojama 85–90 %  $\kappa$ -kazeino glikomakropeptido [16, 17]. Šis skaičius vadinamas gelio susidarymo kritine verte [17]. Kritinė vertė pasiekama nevienodu greičiu skirtingos kokybės ir kiekybės mineralų tirpaluose, pavyzdžiui, pieno baltymų koncentratą ištirpinus piene ir paveikus reninu,  $\kappa$ -kazeinas skyla greičiau nei tuo atveju, kai vietoj pieno naudojamas vanduo su pridėtais kalcio jonais. Be to, pieno baltymų koncentrato vandeniniame tirpale hidrolizė taip pat vyksta greičiau nei vandeniniame tirpale su pridėtais kalcio jonais. Tai reiškia, kad ne visas  $\kappa$ -kazeinas pasiekiamas fermentams, todėl daroma prielaida, kad dalis  $\kappa$ -kazeino įsiterpia į kalcio kazeinato agregatus [17]. Svarbu paminėti, kad tirpalų pH vertės buvo vienodos, todėl hidrolizės greičiui įtakos skirtingų mėginių atžvilgiu neturėjo. Vis dėlto daug reikšmingesnė kalcio funkcija yra antrosios želatinizacijos fazės metu. Kai kalcio chlorido koncentracija tirpale mažesnė nei 2 mM, gelis nesudaro, nepaisant to, kad  $\kappa$ -kazeino hidrolizė įvyko. Esant kalcio chlorido koncentracijai 400 mg/kg, micelių agregacija prasideda atpalaidavus 40 %  $\kappa$ -kazeino glikomakropeptido. Kuo didesnis netirpus, micelėje esančio kalcio kiekis, tuo greičiau susidaro gelis, nes skatinamas kalcio fosfato tiltelių formavimasis tarp kazeino micelių. Tirpus kalcio koncentracija reikšminga agregacijos pradžioje – tokiu būdu mažinamos stūmos jėgos tarp micelių [17]. Taip pat nustatyta, kad gelio susidarymą trikdo nemicelinis kazeinas, nors fermentų aktyvumas nepakinta. Manoma, kad kazeinas sąveikauja su renino paveiktais

baltymais, todėl pakitus erdvinei struktūrai padidėja stūmos jėgos ir trikdoma agregacija [18]. Taigi, nemicelinio kazeino poveikis gelio susidarymui yra neigiamas, o tirpaus ir netirpaus kalcio – teigiamas.

Rūgštinis kazeino gelis gaunamas sumažinus pieno pH iki kazeino izoelektrinio taško, tai yra pH 4,6. Artėjant prie izoelektrinio taško kazeino micelės jungiasi į didesnius agregatus, o iš pastarųjų formuojasi tridimensinis tinklas. Izoelektriniame taške susilyginus teigiamų ir neigiamų krūvių skaičiui, koloidinis kalcio fosfatas atskyla nuo micelės, suyra  $\kappa$ -kazeino hidrofilišnis sluoksniu, todėl stabilumą praradusios molekulės jungiasi tarpusavyje hidrofobine sąveika ir sudaro gelį [19]. Įprastas pH mažinimo būdas yra laktozės rauginimas pienarūgščių bakterijų kultūromis, susidarant pieno rūgščiai. Taip pat pienas gali būti paveikiamas rūgštinančiais agentais, pavyzdžiui, gliukono  $\delta$ -laktonu, kuris vandenyje virsta gliukurono rūgštimi [20]. Naudojant rūgštinančius agentus išvengiama galimų pienarūgščių bakterijų kultūrų kokybės skirtumų, tai yra gamybos procesas gali būti lengviau kontroliuojamas.

Pieno baltymų tirpalą paveikus karščiu gali susidaryti gelis, priklausomai nuo baltymų sudėties, koncentracijos, kaitinimo temperatūros ir trukmės. Kadangi kazeinas yra termostabilių baltymų frakcija, geliui sudaryti reikalingi išrūgų baltymai, ypač  $\beta$ -laktoglobulinai, kurie negrįžtamai denatūruoja aukštesnėje nei 70°C temperatūroje [21]. Kaitinant išrūgų baltymų molekulės išsilanksto, prarasdamos tretinę ir antrinę konfigūraciją bei atverdamos reaktingas sulfhidrilo grupes. Joms reaguojant tarpusavyje susidaro disulfidiniai tilteliai tarp gretimų molekulių, todėl sudaro dideli agregatai. Sulfhidrilo grupių kiekis išrūgų baltymuose didesnis nei kazeine, tačiau keletas jų yra kai kuriose kazeino frakcijose ( $\alpha_{s2}$ - ir  $\kappa$ -kazeine) [1]. Dėl šio priežasties kazeinas gali dalyvauti susidarant geliui dėl poveikio karščiu. Gelis gaunamas šildant 12–20 % lieso pieno miltelių vandeninį tirpalą pridėjus druskų [22]. Esant didesnei miltelių koncentracijai, gaunamas tvirtesnis gelis dėl didesnio kiekio susidarantių disulfidinių ryšių. Kalcio jonai taip pat skatina tvirtesnio pieno baltymų gelio susidarymą. Išrūgų baltymų koncentrato vandeninio tirpalo gelis susidaro esant 7,5 % baltymų koncentracijai, kaitinant 100°C temperatūroje 10 min ir esant pH 7. Išrūgų baltymų gelio savybės labai priklauso nuo terpės pH bei joninės jėgos. Kai pH vertė mažesnė už 7, gaunamas standus gelis. Esant pH 9, išrūgų baltymų želatinizacijos savybės pagerėja, nes suyra disulfidiniai ryšiai ir skatinamas molekulės išsilankstymas, todėl gelis susidaro greičiau ir tam reikalinga žemesnė temperatūra. Tačiau didinant pH nuo 9 iki 11, gelio tvirtumas mažėja, o šildant vienodos pH vertės išrūgų baltymų tirpalus didėjant temperatūrai 80–110°C ribose, buvo gautas tvirtesnis gelis [22]. Kai į išrūgų baltymų tirpalą pridedama druskos,

pavyzdžiui, 0,2 M natrio chlorido, gelis pasižymi standumu. Pakeitus kalcio jonus natrio jonais, gaunamas tvirtesnis gelis, tačiau želatinizacija trunka ilgiau [22]. Susidarant geliui svarbu, kad agregacija vyktų lėčiau nei molekulių išsilankstymas. Kai agregacija vyksta pakankamai lėtai, gaunamas tvarkingos, nuoseklios struktūros gelis, pasižymintis didesniu tvirtumu ir vandens sulaikymo geba.

### 2.3.3. Gebėjimas putoti

Pieno baltymai svarbūs sudarant maisto putas, kurios gaminamos į baltymų tirpalą inkorporuojant oro burbuliukus. Pieno baltymų molekulėse yra hidrofiliniai ir hidrofobiniai regionai, todėl joms būdingos paviršiaus aktyvių medžiagų savybės. Kad susidarytų putos, baltymai turi būti tirpūs, gebėti greitai migruoti tirpale ir orietuotis tarpfazėje taip, kad padengtų oro burbuliukų paviršių, sudarydami plėvelę. Hidrofiliniai molekulės regionai orientuojasi į vandens fazę, o hidrofobiniai – į oro. Tirpale baltymų hidrofobiniai regionai įprastai būna užmaskuoti, tačiau veikiant tirpalą mechaniškai, molekulės iš dalies denatūruoja, išsilanksto, atveria hidrofobinius regionus, kurie orientuojasi oro burbuliukų kryptimi. Per daug intensyvus mechaninis poveikis gali sąlygoti baltymų koaguliaciją ir taip sumažinti putų stabilumą. Didesne putojimo geba pasižymi tie baltymai, kurių molekulės greičiau išsilanksto, tai yra jiems nebūdinga nuosekli antrinė struktūra. Pavyzdžiui,  $\beta$ -kazeinas pasižymi netvarkinga konfigūracija, sudaryta iš tiesių atkarpų, kilpų ir atsikišusio N-terminalinio molekulės galo, todėl tarpfazėje orientuojasi greičiau nei  $\alpha$ -laktalbuminas, globulinis baltymas, kuris denatūruoja ne taip intensyviai dėl egzistuojančių vidinių kovalentinių ryšių [23]. Tačiau stabilesnes putas sudaro antrinės ir tretinės konfigūracijos baltymai, nes mechaninio poveikio metu jie geba išlaikyti didžiąją dalį savo struktūros, todėl formuoja tvirtesnes plėveles, palyginus su neapibrėžtos konfigūracijos baltymais [22]. Oro burbuliukus gaubianti baltymų plėvelė atskiria juos tarpusavyje dėl vyraujančių elektrostatinės stūmos jėgų. Tarp baltymais stabilizuotų oro burbuliukų yra plonas skysčios ruožas. Tai dar vienas faktorius, lemiantis putų stabilumą: mažos klampos skysčiai, veikiami gravitacijos, iš šio ruožo išteka greičiau nei didelės klamos. Kita vertus, klampesnė vandeninė fazė trikdo baltymų migravimą tarpfazės link, putos formuojasi lėčiau. Atsiskiriant vandeninei fazei nuo oro, burbuliukai suartėja, plėvelė suplonėja ir įvyksta koalescencija [22].

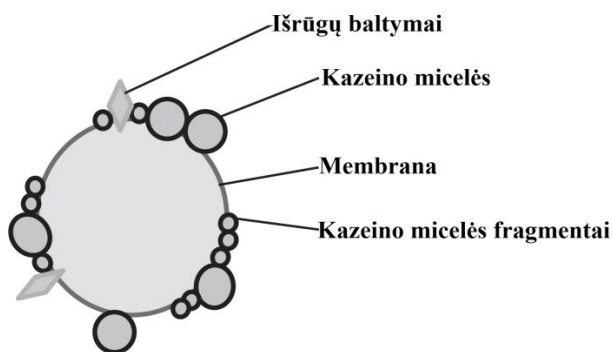
Putojimo gebai ir putų stabilumui įtaką daro tokie veiksniai kaip baltymų koncentracija, tirpalo pH ir joninė jėga, pirminio terminio apdoravimo temperatūra bei temperatūra putų gamybos metu [22, 24]. Liesame piene baltymų koncentracija (3 %) yra pakankama stabiliai putai sudaryti.

Liesą pieną praskiedus 4 kartus, putojimo geba ir putų stabilumas nepakinta [24]. Naudojant lieso pieno miltelių tirpalą putų gamybai, pastebėta, kad didinant sausųjų medžiagų kiekį tirpale, putų tūris mažėja, o stabilumas – didėja [25]. Tai aiškinama didesne tirpalo klampa, kuri sąlygoja baltymų migravimo tarpfazio link trikdymą ir lėtesnį vandens fazės atsiskyrimą. Pavyzdžiui, 5 % baltymų koncentracijos lieso pieno miltelių tirpalo putų tūris buvo didesnis nei tirpalo, kuriame baltymų koncentracija buvo 10 % [26]. Putojimo geba ir putų stabilumas išlieka nepakitę, esant pH 6–7 [24]. Sumažinus pH iki 5,6, putų tūris padidėja, nes  $\beta$ -kazeinas disocijuoja nuo micelės ir greičiau padengia tarpfazį [27]. Esant pH 4,5–5,0, pieno putojimo geba yra mažiausia, nes kazeinas izoelektriniame taške koaguliuoja [28]. Tačiau kai kurie baltymai, pavyzdžiui,  $\alpha$ -laktalbuminas, izoelektriniame taške nekoaguliuoja, nes yra hidratuoti, ir sudaro patvariausias plėveles dėl to, kad baltymų tarpusavio sąveika yra stipriausia. Kai pH vertė yra didesnė nei 7, putų tūris išlieka pastovus, tačiau stabilumas padidėja. Tai siejama su daliniu kazeino micelės suyrimu ir klamos didėjimu [27]. Kazeino micelė taip pat gali būti suardoma keičiant mineralų balansą: micelėje esantis kalcis iš jos pašalinamas į tirpalą pridėjus citrato arba heksametafosfato jonų, etilendiamintetraacto rūgšties. Šiuo atveju padidėja nemicelinio kazeino kiekis tirpale ir jis greičiau adsorbuojasi vandens ir oro sąlyčio vietoje [24]. Padidinus tirpalo joninę jėgą, putojimo geba padidėja, nes baltymai įsūdomi ir elektrostatinės stūmos jėgos sumažėja, plėvelė susidaro greičiau [22]. Temperatūros įtaka putojimo gebai ir putų stabilumui gali būti nagrinėjama dviem aspektais – pirminio terminio apdoravimo ir putų gamybos. Palyginus pasterizuoto pieno putojimą su ultra aukšta temperatūra apdoroto pieno putojimu, šie rodikliai tarpusavyje mažai skiriasi [29]. Priklausomai nuo pieno pH terminio apdoravimo metu išrūgų baltymai denatūruodami jungiasi su kazeinu (pH 6,2–6,5) arba sudaro aglomeratus pieno serume (pH 6,7–7,0) [30]. Pastarieji trikdo baltymų plėvelės formavimąsi tarpfazyje, todėl putų stabilumas mažėja [24]. Nustatyta, kad didinant temperatūrą putų gamybos metu putų tūris didėja, nes aukštesnė temperatūra lemia mažesnę pieno klampą ir lengvesnį baltymų migravimą bei adsorbciją tarpfazyje [30]. Stabiliausios putos gaunamos, kai pieno temperatūra yra 45°C. Šis reiškinys siejamas su išrūgų baltymų erdvinės konfigūracijos išsaugojimu (nepakankamu denatūravimu) bei plėvelės, sudarytos iš kazeino, formavimusi [30].

#### **2.3.4. Emulsavimo savybės**

Pieno baltymai stabilizuoja įvairias dispersines sistemas, tai yra ne tik putas, bet ir emulsijas. Emulsijai sudaryti reikalingi trys komponentai: du vienas kitame netirpstantys skysčiai (pavyzdžiui,

vanduo ir aliejus) bei medžiaga, pasižyminti paviršiaus aktyvumu. Pastarosios savybes atitinka pieno baltymai. Kaip ir putų stabilizavimo atveju, sudarant emulsijas svarbūs hidrofiliniai ir hidrofobiniai baltymo molekulės regionai, atitinkamai besiorientuojantys į vandens ir aliejaus fazes. Išskiriami du emulsijų tipai: aliejus vandenyje (a/v) ir vanduo aliejuje (v/a). Pienas yra a/v tipo emulsija, kurioje riebalų rutulėliai, apgaubti iš polinių lipidų (fosfolipidų, sfingolipidų) ir minorinių baltymų (mucino, ksantino dehidrogenazės arba oksidazės, adipofilino, butirofilino) sudaryta membrana [31], pasiskirstę vandens fazėje. Homogenizuojant pieną riebalų rutulėlio paviršiuje adsorbuojasi ir kiti pieno baltymai – kazeinas ir išrūgų baltymai (žr. 4 pav.).



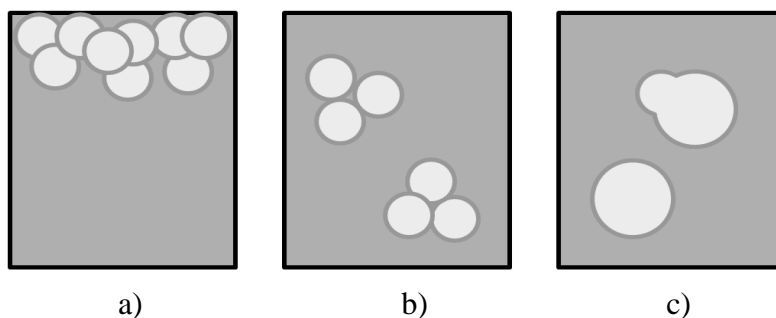
4 pav. Homogenizuoto pieno riebalų rutulėlis [23]

Baltymų adsorbcijos tarpfazyje pagrindinė varomoji jėga yra hidrofobinių radikalų, pakeičiančių vandens molekules fazių sąlyčio zonoje, pašalinimas iš vandens fazės. Adsorbciją taip pat skatina baltymų išsilankstymas dėl mechaninio poveikio ir natyvinės struktūros persitvarkymas. Šių procesų metu mažėja sistemos laisvoji energija ir tarpfazinė įtemptis [32]. Lankstūs baltymai, turintys didesnę nepolinių grupių, yra efektyvesni tarpfazinės įtempties mažinimo atžvilgiu už baltymus, kuriems būdinga antrinė ir tretinė konfigūracija ir mažesnis nepolinių grupių skaičius [33]. Pieno baltymai paviršiaus aktyvumo mažėjimo tvarka išsidėsto taip:  $\beta$ -kazeinas, monodispersinės kazeino micelės, serumo albuminas,  $\alpha$ -laktalbuminas,  $\alpha_s$ -kazeinas,  $\kappa$ -kazeinas,  $\beta$ -laktoglobulinas [32]. Mažesnės molekulinės masės medžiagos (pavyzdžiui, peptidai) tarpfazio link migruoja ir plėvelę sudaro greičiau, tačiau emulsijos stabilumas nėra užtikrinamas dėl paviršiaus aktyvių medžiagų tarpusavio sąveikos stygiaus tarpfazyje, tai yra susidariusios plėvelės nėra patvarios. Kazeinu arba lieso pieno miltelių baltymais stabilizuotose emulsijose gali vykti kazeino proteolizė, kurią katalizuoja plazminas, todėl susidarantys peptidai mažina emulsijos stabilumą [22].

Pagrindiniai parametrai, apibrėžiantys emulsiklio, šiuo atveju pieno baltymų, savybes yra emulsavimo geba, emulsavimo aktyvumas ir emulsijos stabilumas. Emulsavimo geba yra didžiausias aliejaus kiekis, kuris gali būti disperguojamas baltymų vandeniniame tirpale iki tol, kol

įvyksta fazių inversija. Emulsavimo aktyvumas – žinomos koncentracijos baltymų tirpalo stabilizuotas tarpfazio paviršiaus plotas. Emulsavimo aktyvumas išreiškiamas  $m^2/g$ . Emulsijos

stabilumas yra laiko trukmė, per kurią įvyksta fazių inversija [34]. Emulsijos stabilumas yra sąlyginis – sakoma, kad emulsija yra stabili, jei fazių atsiskyrimas nėra pastebimas produkto galiojimo laikotarpiu. Emulsija praranda stabilumą dėl fizinių ir cheminių veiksnių. Pastariesiems priskiriami procesai, kurių metu kinta emulsuoto riebalų rutulėlio cheminė sudėtis, pavyzdžiui, vyksta oksidacija ir hidrolizė [35]. Fizinis nestabilumas susijęs su riebalų rutulėlių erdviu išsidėstymu arba dydžio pasiskirstymu. Fizinio nestabilumo atvejai (žr. 5 pav.) yra flokuliacija, koalescencija ir riebalų lašelių iškilimas į emulsijos paviršių (angl. *creaming*). Pastarojo proceso metu riebalų lašeliai dėl gravitacijos ar centrifugavimo kyla į paviršių, tačiau tarpusavyje nesusijungia, jų dydis nepakinta. Koalescencija yra riebalų rutulėlių didėjimas dėl baltymų plėvelės plonėjimo ir rutulėlių jungimosi. Riebalų rutulėlių suartėjimas vadinamas flokuliacija [32]. Šie reiškiniai gali vykti ir atskirai, ir kartu.



5 pav. Emulsijų fizinio nestabilumo atvejai: a) riebalų lašelių iškilimas į emulsijos paviršių; b) flokuliacija; c) koalescencija [23]

Emulsijų stabilumas priklauso nuo daugelio faktorių (tirpalo pH, joninės jėgos, baltymų koncentracijos ir kt.), kurių poveikis analogiškas dujų vandenyje dispersinėms sistemoms (putoms). Esant nepakankamai baltymų koncentracijai, emulsijos netrukus po homogenizacijos suyra, nes aplink riebalų rutulėlius nesusidaro vientisa baltymų plėvelė [22, 32]. Kai tirpalo pH vertė yra artima baltymo izoelektriniam taškui, baltymų molekulių tarpusavio sąveika yra stipriausia, todėl ir plėvelė pasižymi patvarumu [22]. Vis dėlto kazeinas izoelektriniame taške koaguluoja, tampa netirpus ir yra prastas emulsiklis [23], tačiau keičiant pH (rūgštinant arba šarminant) elektrostatinės stūmos jėgos padidėja ir baltymų plėvele padengti riebalų rutulėliai nesusartėja, emulsija išlieka stabili [32]. Padidinus tirpalo joninę jėgą, elektrostatinės stūmos jėgos bei emulsijos stabilumas sumažėja [22]. Temperatūros poveikis emulsijoms priklauso nuo jas stabilizuojančių baltymų,

pavyzdžiui, kazeinu stabilizuotose emulsijose koalescencija neįvyksta jas pakaitinus iki 120°C temperatūros, o emulsijos, stabilizuotos lieso pieno miltelių baltymais (kazeinu ir išrūgų baltymais), suyra arba sudaro gelį dėl išrūgų baltymų denatūravimo, priklausomai nuo baltymų koncentracijos [22]. Be minėtų veiksnių emulsijos kokybei įtaką daro homogenizavimo įranga ir parinkti parametrai (rotoriaus sukimosi greitis, homogenizavimo trukmė ir temperatūra).

Taigi, pieno baltymų funkcinės savybės, visų pirma, priklauso nuo cheminės sudėties, baltymą sudarančių aminorūgščių kokybės ir kiekybės, nes būtent aminorūgščių šoninių grandinių funkcinės grupės lemia gebėjimą dalyvauti tam tikrose reakcijose, molekulės išsidėstymą erdvėje bei fizinių patvarumą. Keičiant įvairius parametrus (pH, joninę jėgą, temperatūrą ir kt.), kinta baltymo molekulės natyvinis būvis, todėl modifikuojamos jo funkcinės savybės.

#### **2.4. Kazeino biologinė vertė**

Pienas yra svarbi žmogaus mitybos dalis, o kūdikių – pagrindinė. Pieno baltymai žmogaus organizmui suteikia energiją bei nepakeičiamas aminorūgštis, reikalingas kūno audinių sintezei ir regeneracijai. Šiomis dienomis aktuali ne tik aminorūgščių kokybė, bet ir pieno baltymų virškinamumas, susidarantys metabolitai, jų absorbcija ir poveikis žmogaus organizmui. Baltymų hidrolizės produktai – peptidai ir laisvos aminorūgštys. Kai kurie peptidai pasižymi bioaktyvumu, tai yra atlieka specifinę funkciją organizme. Bioaktyvūs peptidai gaminami kaip maisto papildai *in vitro* būdu, tačiau gali susidaryti *in vivo* žmogaus organizme virškinimo metu. Pastarieji fiziologinę funkciją atlieka, kai yra absorbuojami virškinamajame trakte arba būdami tiesiog jame [23]. Proteolitiniai fermentai žmogaus organizme skirstomi į endogeninius, gaminamus virškinamojo trakto organų, ir egzogeninius, kuriuos išskiria žarnyno mikroorganizmai [36]. Dėl fermentų gausos ir galimai skirtingos virškinimo eigos *in vivo* proteolizės produktai gali skirtis, nepaisant to, kad virškinamas tas pats substratas [23].

Bioaktyviesiems kazeino peptidams būdingos antihipertenzinės, antioksidacinės bei imunomodulatorinės savybės. Įvairūs kazeino frakcijų fragmentai yra angiotenziną konvertuojančio fermento inhibitoriai. Šie peptidai trikdo angiotenzino I virsmą angiotenzinu II. Pastarasis skatina kraujagyslių sienelių susitraukimą ir kraujospūdžio didėjimą, o tai susiję su širdies kraujagyslių ligomis, todėl kazeino bioaktyvieji peptidai svarbūs jų prevencijai [37]. Antioksidacinės peptidų savybės grindžiamos jų gebėjimu neutralizuoti laisvuosius radikalus ir prisijungti metalų jonus. Palyginus su nehidrolizuotais baltymais arba laisvomis aminorūgštimis, bioaktyvieji peptidai pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu. Tam tikros funkcinės grupės aktualios

antioksidaciniam poveikiui, pavyzdžiui, histidino imidazolo grupė gali prisijungti metalo jonus ir neutralizuoti aktyvias deguonies formas, cisteino sulfhidrilo grupė sąveikauja su laisvaisiais radikalais [23]. Laisvos aminorūgštys nėra lygiavertės kazeinui kaip antioksidacinės medžiagos, o tai reiškia, kad antioksidaciniam poveikiui svarbi pirminė kazeino molekulių struktūra [38]. Serino fosforilintos liekanos, esančios kazeino sudėtyje, bei jų būdinga seka (–SerP–SerP–SerP–Glu–Glu) yra efektyvi prisijungiant katijonus ir sudarant kompleksus su kalciumu, geležimi ir cinku. Oksidacinis stresas organizme skatina Alzheimerio ligos, aterosklerozės, diabeto, vėžio vystymąsi, todėl antioksidacinės kazeino peptidų savybės gali būti taikomos šių ligų rizikos mažinimui [38]. Imunomodulatoriniai peptidai veikia imuninę sistemą, reguliuodami citokinų ir antikūnų sintezę. Jie gaunami iš  $\alpha_{s1}$ –,  $\beta$ – ir  $\kappa$ –kazeino frakcijų, veikiant proteolitiniais fermentais [36]. Bioaktyvių kazeino peptidų pavyzdžiai pateikti 3-oje lentelėje.

3 lent. Kazeino bioaktyvūs peptidai [36–38]

Funkcija	Fermentas	Kazeino frakcija	Fragmentas	Peptido aminorūgščių seka
Antihipertenzinė	Tripsinas	$\alpha_{s1}$	194–199	Thr–Thr–Met–Pro–Leu–Trp
	Tripsinas	$\beta$	177–183	Ala–Val–Pro–Tyr–Pro–Gln–Arg
	Pepsinas	$\alpha_{s2}$	89–95	Tyr–Gln–Lys–Phe–Pro–Gln–Tyr
Antioksidacinė	Tripsinas	$\beta$	169–176	Lys–Val–Leu–Pro–Val–Pro–Glu–Lys
	Tripsinas	$\beta$	98–105	Val–Lys–Glu–Ala–Met–Ala–Pro–Lys
	Pepsinas	$\alpha_{s1}$	144–149	Tyr–Phe–Tyr–Pro–Glu–Leu
Imunomodulatorinė	Pepsinas/ chimozinas	$\beta$	193–209	Tyr–Gln–Gln–Pro–Val–Leu–Gly–Pro– Val–Arg–Gly–Pro–Phe–Pro–Ile–Ile–Val
	Tripsinas	$\beta$	60–70	Tyr–Pro–Phe–Pro–Gly–Pro–Ile–Pro– Asn–Ser–Leu
	Tripsinas	$\kappa$	38–39	Tyr–Gly
	Tripsinas	$\kappa$	17–21	Phe–Phe–Ser–Asp–Lys

Taigi, kazeino biologinei vertei svarbi ne tik kokybinė aminorūgščių sudėtis, bet ir jo virškinamumas žmogaus organizme. Fermentai specifiškai veikia substratą, todėl kazeino hidrolizės intensyvumas priklauso nuo molekulės būvio maiste, tai yra pakitus erdvinei struktūrai galimi virškinamumo pokyčiai. Tai reiškia, kad nuo kazeino būsenos priklauso susidarantys metabolitai ir jų kiekis, o nuo pastarųjų – poveikis sveikatai.



## 2.5. Kazeino virškinamumui įtaką darantys faktoriai

Baltymų hidrolizė vyksta dalyvaujant biologiniams katalizatoriams fermentams. Kad vyktų fermentinė reakcija, yra reikalingas substratas, jį skaidantis fermentas bei tam tikros terpės sąlygos. Baltymai virškinami skrandyje bei plonojoje žarnoje. Skrandyje pagrindinė proteazė yra pepsinas, o plonojoje žarnoje – tripsinas ir chimotripsinas. Fermentai yra baltyminės medžiagos, todėl jų aktyvumas priklauso nuo terpės parametrų, iš kurių svarbiausi temperatūra, pH ir joninė jėga. Minėti faktoriai daro įtaką fermentų erdvinei konfigūracijai, o nuo to priklauso aktyviųjų centrų, prie kurių jungiasi substratas, išsidėstymas ir galimybė katalizuoti fermentinę reakciją.

Fermentai pasižymi specifiškumu – jie skaido tik tam tikrus substratus. Specifiškumas susijęs tiek su fermento, tiek su substrato savybėmis, tai yra fermento ir substrato erdvinis išsidėstymas turi būti suderintas taip, kad pastarasis galėtų jungtis prie fermento aktyviojo centro. Fermentų specifiškumo laipsnis gali skirtis. Iš žmogaus proteazių mažiausiu specifiškumu pasižymi pepsinas, kuris skaido peptidinius ryšius, esančius tarp įvairių aminorūgščių [39]. Didesnis specifiškumas būdingas tripsinui. Šis fermentas katalizuoja peptidinio ryšio, kuriuo sujungtas argininas arba lizinas, skilimą. Chimotripsinas skatina baltymų hidrolizę peptidinio ryšio, jungiančio aminorūgštis, kurių sudėtyje yra aromatinis žiedas, vietoje [39].

Fermentai yra baltymai, todėl jie jautrūs terpės pokyčiams. Visų pirma, fermentų aktyvumas priklauso nuo temperatūros. Optimali temperatūra fermentinėms reakcijoms, katalizuojamoms žmogaus organizmo fermentais, vykti yra apie 37°C, tai yra lygi žmogaus kūno temperatūrai. Mažėjant temperatūrai, fermentinių reakcijų greitis taip pat mažėja [40]. Daugeliui fermentų būdinga ketvirtinė struktūra, todėl jie yra termolabilūs: fermentus paveikus aukšta temperatūra (78–80°C), jie negrįžtamai denatūroja ir nebegali katalizuoti fermentinės reakcijos [39]. Fermentų aktyvumui taip pat svarbus terpės pH. Jam kintant keičiasi elektrostatinė sąveika tarp fermentų sudarančių subvienetų. Pavyzdžiui, elektrostatinei sąveikai susilpnėjus, subvienetai gali disocijuoti ir tokiu būdu prarasti aktyvumą, o elektrostatinei sąveikai sustiprėjus, subvienetai gali suartėti ir užmaskuoti aktyviuosius centrus. Terpėje esantys elektrolitai taip pat daro įtaką fermentinei veiklai. Sąveikaudami su išorėje esančiomis polinėmis funkcinėmis grupėmis, jonai gali keisti molekulių krūvį. Pasikeitus krūviui, kinta erdvinė konfigūracija, o jos pokyčiai gali lemti fermento aktyvumo praradimą [41].

Nors terpės parametrų įtaka fermentams labai reikšminga, žmogaus organizme jie yra pastovūs. Atsižvelgiant į tai aišku, kad baltymų hidrolizės efektyvumas žmogaus organizme labiau priklauso nuo substrato savybių, o ne terpės parametrų. Baltymų skaidymas prasideda skrandyje,

tačiau substrato smulkinimas burnoje yra svarbus, nes kramtant maistą didėja jo paviršiaus plotas, taigi, gerėja fermento ir substrato sąlyčio galimybės, o tai skatina hidrolizę. Skrandyje baltymai yra veikiami druskos rūgštimi ( $\text{pH} \sim 2$ ), todėl denatūroja, atveria prieš tai molekulės viduje užmaskuotus regionus. Dėl šios priežasties pepsinas gali efektyviau skaidyti baltymus. Dažniausiai baltymai į skrandį patenka jau denatūravę maisto gaminimo metu, taikant terminį apdorojimą, mechaninį poveikį ar dėl sąveikos su kitais komponentais. Tačiau kartais labiau denatūravę baltymai gali būti virškinami lėčiau, pavyzdžiui, sterilizuoto pieno baltymų hidrolizė yra lėtesnė nei pasterizuoto pieno [42]. Baltymų skaidymas pepsinu yra svarbus tolimesnei hidrolizei plonojoje žarnoje: kuo didesnis hidrolizės laipsnis pasiekiamas skrandžio fazės metu, tuo greičiau vyksta proteolizė, katalizuojama tripsino [43]. Skirtingos konfigūracijos baltymai virškinami nevienodai, pavyzdžiui,  $\beta$ -laktoglobulinas, kuriam būdinga vientisa antrinė struktūra, pepsinu *in vitro* virškinamas lėčiau nei  $\beta$ -kazeinas, kuriam vientisa antrinė struktūra nėra būdinga [44]. Be to, kiti maisto komponentai gali daryti įtaką baltymų virškinamumui: skaidulinės medžiagos (kviečių sėlenos, pektinas, ligninas) trikdo kazeino hidrolizę [45].

Taigi, nekeičiant hidrolizės sąlygų (temperatūros, pH, joninės jėgos, fermento aktyvumo ar koncentracijos), jos eiga priklauso nuo substrato savybių – paviršiaus ploto, sąveikos su kitais komponentais, denatūravimo laipsnio, tai yra faktorių, susijusių su erdvinio molekulių išsidėstymu.

## 2.6. Apibendrinimas

Pagrindinis pieno baltymas – kazeinas – sudarytas iš  $\alpha_{s1-}$ ,  $\alpha_{s2-}$ ,  $\beta$ - ir  $\kappa$ -kazeino molekulių. Jos tarpusavyje skiriasi aminorūgščių sudėtimi, kiekiu bei seka. Šie iš pirmo žvilgsnio nedideli skirtumai lemia esmines kazeino frakcijų savybes. Priklausomai nuo aminorūgščių serino ir treonino kiekio molekulėje, kazeino frakcijos skirstomos į kalcio jonams jautrias ( $\alpha_{s1-}$ ,  $\alpha_{s2-}$ ,  $\beta$ -kazeinas) ir nejautrias ( $\kappa$ -kazeinas). Kalcio jonų koncentracijos pokyčiui jautrios molekulės, esant kalcio jonams aplinkoje, tarpusavyje jungiasi kalcio fosfato ryšiais ir koaguliuoja. Pieno kalcio jonų koncentracija pakankama vykti minėtam procesui, tačiau nuosėdos nesiformuoja dėl ypatingo kazeino molekulių išsidėstymo:  $\kappa$ -kazeinas apsaugo  $\alpha_{s1-}$ ,  $\alpha_{s2-}$  ir  $\beta$ -kazeiną nuo kalcio jonų poveikio, sudarant kazeino micelę. Kazeino micelės funkcinės savybės skiriasi nuo atskirų kazeino frakcijų savybių, o šios nėra vienodos tarp skirtingų frakcijų.

Pieno baltymai maisto pramonėje yra svarbūs funkciniai ingredientai. Kazeino molekulės neturi vientisos antrinės struktūros, todėl yra lanksčios ir termostabilios. Be to jas sudarančios aminorūgštys išsidėsto taip, kad susiformuotų hidrofiliniai ir hidrofobiniai regionai, o tai svarbu

baltymų plėvelės formavimui putų ir emulsijų gamybos metu. Piene taip pat yra globulinių išrūgų baltymų, pasižyminčių termolabilumu ir lėtesne nei kazeino adsorbcija tarpfazėje. Kazeino funkcinės savybės priklauso nuo terpės parametrų bei sąveikos su joje esančiais komponentais. Keičiant kazeino micelės struktūrą, funkcinės savybės taip pat kinta. Suardžius micelę, į terpę patenka kazeino monomerai, kuriems būdingos visai kitokios savybės nei miceliniam kazeinui.

Micelės struktūros pokyčiai gali būti reikšmingi ne tik funkcinėms savybėms, bet ir virškinamumui. Kadangi fermentai yra specifiški, tai baltymų erdvinės struktūros pokyčiai gali turėti įtakos proteolizės efektyvumui.

Šio projekto tikslai – įvertinti kazeino funkcinės savybes, modifikuojant micelės struktūrą arba maišant su kitais pieno baltymais bei ištirti kazeino *in vitro* virškinamumo priklausomybę nuo micelės struktūros. Šiems tikslams pasiekti buvo suformuluoti projekto uždaviniai: nustatyti ir palyginti įvairių pieno baltymų produktų bei jų mišinių funkcinės savybes, nustatyti kazeino micelės demineralizacijos laipsnio įtaką kazeino funkcinėms savybėms, nustatyti kazeino micelės demineralizacijos laipsnio įtaką kazeino virškinamumui, imituojant virškinimo sąlygas *in vitro* tyrimu, palyginti pieno baltymų virškinamumą, kai jie yra vandens tirpale ir adsorbuoti a/v tarpfazėje.

### 3. Medžiagos ir tyrimų metodai

#### 3.1. Medžiagos

Micelinis kazeinas (MK), kuriame pagal gamintojo kokybės sertifikatą yra 74 % baltymų, 6 % angliavandenių, 1,5 % riebalų, kalcio kazeinatas (KKN), kuriame pagal gamintojo kokybės sertifikatą yra 88 % baltymų, 0,2 % angliavandenių, 1,2 % riebalų, ir pieno baltymų koncentratas (PBK), kuriame pagal gamintojo kokybės sertifikatą yra 80 % baltymų, 5 % angliavandenių, 1,5 % riebalų, buvo pirkti iš „MyProtein“ (Jungtinė Karalystė), lieso pieno milteliai (LPM) iš „Marijampolės pieno konservų“ (Lietuva), kuriuose pagal gamintojo kokybės sertifikatą yra 34 % baltymų, < 4 % drėgmės, 50–54 % laktozės ir 4 % pelenų, išrūgų baltymų izoliatas (IBI) Lacprodan DI-9213 iš „Arla Foods Ingredients Group“ (Danija), kuriame pagal gamintojo kokybės sertifikatą yra 88,5 % baltymų, < 6 % drėgmės, 0,1 % laktozės, < 1 % riebalų. „Obelių“ rapsų aliejaus tiekėjas „Rukola“ (Lietuva), sacharozės – „Nordic Sugar Kėdainiai“ (Lietuva). Naudotų analitinio grynumo cheminių reagentų gamintojai „Sigma–Aldrich“ (JAV): NaOH, HCl, urėja, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , NaCl,  $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , „Pefabloc<sup>®</sup> SC“,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , trishidroksi–metilaminometanas,  $\beta$ –merkaptoetanolis, trifluoracto rūgštis, acetonitrilas, Tris–Cl, ditiotreitolis, trometanolis, natrio tetraboratas, o–ftaldialdehididas, hidroksipropilmetilceliuliozė, 3–morfolino propano sulfoninė rūgštis, etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druskos dihidratas, citrinos rūgštis, acto rūgštis, natrio acetatas; „Merck KGaA“ (Vokietija): glicinas,  $\text{CaCl}_2$ , glicerolis; „Rechem“ (Slovakija):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaN}_3$ , trinatrio citratas, kalio citratas, trinatrio citrato dihidratas; „Carl Roth“ (Vokietija): natrio dodecilsulfatas. Fermentai kiaulių kasos pankreatinas ir pepsinas iš kiaulių skrandžio gleivinės gauti iš „Sigma–Aldrich“ (JAV). Tirpalų gamybai naudotas distiliuotas vanduo arba ultra grynumo vanduo.

#### 3.2. Mėginių ruošimas

##### 3.2.1. Pieno baltymų produktų funkcinių savybių tyrimams skirtų mėginių ruošimas

Funcinių savybių tyrimams buvo naudojami vieno pieno baltymų produkto tirpalai arba pagaminti maišant kelių pieno baltymų produktų tirpalus. Pirmuoju atveju mėginiai buvo paruošti tirpinant MK, KKN, PBK, IBI ir LPM distiliuotame vandenyje 50°C temperatūros vandens vonelėje Grant JB Nova JBN5 20 min ir maišant. Buvo pagaminti 2 %, 3 % ir 8 % baltymų koncentracijos tirpalai. Mišinių gamybai, visų pirma, buvo paruoštas 3,3 % baltymų koncentracijos LPM vandeninis tirpalas (baltymų koncentracija atitinka baltymų kiekį žaliame piene), į kurį pridėta vieno iš baltymų produktų – MK, KKN, PBK, IBI arba LPM – tiek, kad baltymų koncentracija tirpale būtų

8 % (baltymų iš LPM ir baltymų iš antrojo produkto santykis 3,3:4,7). Milteliai buvo tirpinami 50°C temperatūros vandens vonelėje maišant 20 min. Analogiškai buvo pagaminti tirpalai, kuriuose bendra baltymų koncentracija 1,2 % arba 2 %, o baltymų iš LPM ir baltymų iš antrojo produkto santykis 3,3:4,7. Iki tyrimų tirpalai laikyti šaldytuve (4°C).

### **3.2.2. Demineralizuotų kazeino micelių tirpalų funkcinių savybių tyrimams skirtų mėginių ruošimas**

Kazeino demineralizavimas buvo atliktas, remiantis Lazzaro ir kt. aprašyta metodika [46], naudojant dializės membraną. Šiuo atveju donorinis (tiriamasis) tirpalas buvo MK tirpalas, apdorotas trinatrio citratu (TSC), o akceptorinis tirpalas –  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,005 mol/kg) ir  $\text{CaCl}_2$  (0,005 mol/kg) tirpalas. Visi tirpalai buvo ruošiami ultra grynumo vandenyje.

Donorinių tirpalų ruošimas. Į 8 % MK vandeninį tirpalą pridėta natrio azido (1,6 g/kg). MK tirpalas laikytas 6 val. vandens vonelėje su maišymo galimybe GFL 1092, esant 40°C temperatūrai ir 120 rpm. Po to tirpalas maišytas 16 val. magnetine maišykle Biosan MSH 300 kambario temperatūroje (18–20°C). Į MK tirpalą įpiltas skirtingas kiekis 0,85 M TSC tirpalo. Gauti du tirpalai: MK1, kuriame TSC koncentracija 12 mmol/kg, ir MK2, kuriame TSC koncentracija 102 mmol/kg. Toliau abiejų tirpalų apdorojimas buvo atliekamas taip pat. Tirpalai buvo maišyti 30 min magnetine maišykle 18–20°C temperatūroje. Po 12 val. laikymo šaldytuve (4°C) tirpalų pH pakoreguotas iki pH 7, naudojant 1 M NaOH arba 1 M HCl. Taip diafiltravimui paruošti kazeino tirpalai buvo supilti į celiuliozės membranos dializės vamzdelius D9652–100FT, kurių vidinis skersmuo 33 mm, ir patalpinti į akceptoriniu tirpalu užpildytą talpą.

Akceptorinis tirpalas buvo ruošiamas ultra grynumo vandenyje tirpinant  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,005 mol/kg) ir  $\text{CaCl}_2$  (0,005 mol/kg). Kazeino tirpalų diafiltravimą sudarė du etapai. Pirmasis etapas truko 48 val., jo metu donorinio ir akceptorinio tirpalų tūrių santykis buvo 1:44. Pirmojo etapo metu akceptorinis tirpalas buvo pakeistas 4 kartus, maždaug kas 12 val. Antrasis etapas truko 15 val., donorinio ir akceptorinio tirpalų tūrių santykis buvo 1:11. Demineralizuoti mėginiai dMK1 ir dMK2 iki tyrimų buvo laikomi šaldytuve (4°C) arba liofilizuoti.

### **3.2.3. Micelinio kazeino ir demineralizuoto kazeino mėginių ruošimas imituojamame pieno ultrafiltrate**

MK, dMK1, dMK2 buvo tirpinami imituojamame pieno ultrafiltrate (IPUF), esant baltymų koncentracijai 24 mg/ml. IPUF buvo pagamintas maišant 20 ml tirpalo A (distiliuotame vandenyje

ištirpintos druskos:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (79 g/l), kalio citratas (60 g/l), trinatrio citrato dihidratas (89,6 g/l),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (9 g/l)), 20 ml tirpalo B (distiliuotame vandenyje ištirpintos druskos:  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (15 g/l), KCl (30 g/l)) ir 20 ml tirpalo C (distiliuotame vandenyje ištirpintos druskos:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (66 g/l),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (32,6 g/l)) su 940 ml distiliuoto vandens.

### 3.3. Tyrimo metodai

#### 3.3.1. Baltymų produktų sudėties vertinimas

##### Baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu

Mėginys (apie 1 g) buvo dedamas į kolbą, pilama 20 ml koncentruotos  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ir dedama katalizatoriaus tabletė, sudaryta iš  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{TiO}_2$ . Kolba buvo kaitinama krosnelėje Behrotest InKjel 635 M 90 min  $400^\circ\text{C}$  temperatūroje, kol jos turinys tapo skaidrus, melsvai žalsvo atspalvio. Mėginys buvo distiliuojamas distiliavimo aparate Behrotest Behr S3: į mineralizatą automatiškai įpiltas koncentruotas NaOH, distiliatas surinktas kolboje 3 % boro rūgšties tirpale. Distiliatas buvo titruojamas 0,1 N HCl, naudojant Taširo indikatorius, kol tirpalo spalva iš žalios pakito į violetinę. Azoto kiekis ( $N$ ) mėginyje apskaičiuotas pagal formulę:

$$N = \frac{14 \cdot n \cdot (V_1 - V_0)}{1000 \cdot m}, \% \quad (1)$$

čia:  $n$  – titravimui naudojamos HCl normalinė koncentracija, ekv/l,  $V_1$  – HCl kiekis, sunaudotas mėginiui nutitruoti, ml,  $V_0$  – HCl kiekis, sunaudotas tuščiam mėginiui nutitruoti, ml,  $m$  – mėginio masė, g.

Baltymų kiekis ( $B$ ) milteliuose apskaičiuojamas, įvertinus koeficientą 6,37, pagal formulę:

$$B = N \cdot 6,37, \% \quad (2)$$

čia:  $N$  – azoto kiekis mėginyje, %.

Baltymų kiekis nustatytas analizuojant du lygiagrečius bandinius, o rezultatai pateikiami kaip dviejų matavimų vidurkis.

##### Kazeino frakcijų nustatymas efektyviaja skysčių chromatografija

Mėginiai buvo sumaišyti su denatūruojančiu buferiu, kurį sudarė 8 M šlapalo, 165 mM Tris buferio, 44 mM natrio citrato ir 0,3 %  $\beta$ -merkaptioetanolio, santykiu 1:5. Mėginiai buvo filtruoti per  $0,45 \mu\text{m}$  porų dydžio celiuliozės membranių filtrą Chromafil RC-45/25 ir analizuoti naudojant Shimadzu Prominence chromatografinę įrangą (Shimadzu Corp., Japonija) su diodų matricos detektoriumi ir automatiniu mėginių įvedimo įrenginiu, LC Solutions programinę įrangą, atvirkščią fazijų kolonėlę Vydac 218TP C18 (porų dydis  $5 \mu\text{m}$  300A,  $250 \times 4,6 \text{mm}$ , Grace Alltech, JAV). Buvo

nustatytas bangos ilgis 220 nm, kolonėlės temperatūra 35°C, tekėjimo greitis 1 ml/min. Judriosios fazės binarinis gradientas buvo sudarytas iš eliuento A 0,1 % trifluoracto rūgšties vandenyje ir eliuento B 0,07 % trifluoracto rūgšties acetonitrile. Gradiento programa: 0–5 min izokratinė eliucija 4 % B, 5–15 min linijinis gradientas B nuo 4 iki 25 %, 15–29 min linijinis gradientas B nuo 25 iki 45 %, 29–32 min linijinis gradientas B nuo 45 iki 90 %, 32 – 35 min izokratinė eliucija 90 % B, 35–40 min linijinis gradientas į pradines sąlygas 4 % B. Injekcijos tūris 20 µl. Kazeino frakcijų pasiskirstymas mėginiuose apskaičiuotas pagal piko plotą, o kiekybiškai kazeino frakcijos įvertintos remiantis gradavimo grafikais.

### 3.3.2. Baltymų produktų funkcinių savybių nustatymas

#### Dalelių dydžio nustatymas

Dalelių dydis buvo nustatytas naudojant lazerio šviesos difrakcijos dalelių dydžio analizatorių MasterSizer 2000. Rezultatai gauti kaip dalelių dydžio pasiskirstymo grafikai bei D[3,2] (dalelės skersmuo, apskaičiuotas įvertinus paviršiaus plotą). Buvo taikytas dalelių refrakcijos indeksas 1,53, o vandens – 1,33. Dalelių dydis įvertintas atlikus tris lygiagrečius matavimus.

#### Termostabilumo priklausomybės nuo pH įvertinimas

Mėginiai (po 5 ml mėgintuvėlyje) buvo kaitinami aliejaus vonelėje WiseBath WB6 140°C temperatūroje, kol mėgintuvėlių turinys koaguliudavo. Termostabilumas apibrėžiamas laiko trukme, reikalinga mėginiui koaguliuoti. Bandytas atliktas tiriant du lygiagrečius mėginius, o rezultatai pateikti grafiškai vaizduojant koaguliavimo trukmės priklausomybę nuo pH.

#### Putojimo gebos ir putų stabilumo nustatymas

10 ml mėginio buvo įpilta į graduotą 50 ml tūrio mėgintuvėlį, maišyta maišykle VWR VV3 5 min kambario temperatūroje. Mėginių tūris buvo fiksuojamas iškart po maišymo, praėjus 5, 10 ir 30 min po maišymo. Putojimo geba (PG) apskaičiuojama pagal formulę:

$$PG = \frac{V_{pr} - V_0}{V_0} \cdot 100, \% \quad (3)$$

čia:  $V_0$  – mėginio tūris prieš maišymą, ml,  $V_{pr}$  – mėginio tūris iškart po maišymo, ml.

Putų stabilumas (PS) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$PS = \frac{V_{pab} - V_0}{V_{pr} - V_0} \cdot 100, \% \quad (4)$$

čia:  $V_0$  – mėginio tūris prieš maišymą, ml,  $V_{pr}$  – mėginio tūris iškart po maišymo, ml,  $V_{pab}$  – mėginio tūris po 30 min po maišymo, ml.

Buvo atlikti du lygiagretūs bandymai. Rezultatai pateikiami kaip dviejų matavimų vidurkis.

#### Emulsijų gravitacinio stabilumo įvertinimas

Emulsijos buvo gaminamos rapsų aliejų ir baltymų tirpalus maišant santykiu 3:7, naudojant homogenizatorių T18 basic ULTRA–TURRAX (24000 rpm 5 min). Emulsijos buvo supiltos į graduotus 30 ml tūrio mėgintuvėlius. Atsiskyrusios vandens fazės tūris buvo fiksuojamas 21 parą kiekvieną dieną, esant kambario temperatūrai (18–20°C). Emulsijų gravitacinis stabilumas ( $ES$ ) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$ES = \frac{V_{vand}}{V_{pr}} \cdot 100, \%; \quad (5)$$

čia:  $V_{vand}$  – atsiskyrusios vandens fazės tūris, ml,  $V_{pr}$  – pradinis emulsijos tūris, ml.

Emulsijų gravitaciniam stabilumui įvertinti buvo stebimi du lygiagretūs bandiniai, o rezultatai pateikiami kaip dviejų matavimų vidurkis.

#### Emulsijų tarpfazio baltymų kiekybinis ir kokybinis įvertinimas

Emulsijos buvo gaminamos rapsų aliejų ir baltymų tirpalus maišant santykiu 3:7, naudojant homogenizatorių T18 basic ULTRA–TURRAX (24000 rpm 5 min). 44 ml emulsijos buvo sumaišyta su 5 g sacharozės 50 ml centrifugavimo mėgintuvėliuose. Mėgintuvėliai buvo centrifuguojami 20 min 200 g 4°C temperatūroje centrifuga MPW–260 RH. Susidaręs riebalų sluoksnis buvo atskirtas. Riebalai buvo perkelti į kitą centrifugavimo mėgintuvėlį, disperguoti 15 ml 4 % natrio dodecilsulfato tirpale. Mėginiai buvo centrifuguojami 20 min 1500 g 4°C temperatūroje. Tarpfazyje neadsorbuotų baltymų kiekis buvo nustatytas vandens fazėje, susidariusioje po pirmojo centrifugavimo, o adsorbuotų baltymų kiekis – po antrojo centrifugavimo. Baltymų kiekis buvo nustatytas Kjeldalio metodu. Baltymų kiekis, padengęs riebalų rutulėlio paviršių, ( $C_{balt}$ ) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$C_{balt} = \frac{m_{ads}}{S_b}, \text{ mg/m}^2; \quad (6)$$

čia:  $m_{ads}$  – tarpfazyje adsorbuotų baltymų kiekis, mg,  $S_b$  – emulsijos riebalų rutulėlių bendras paviršiaus plotas, m<sup>2</sup>.

Tarpfazyje adsorbuotų baltymų kiekis ( $m_{ads}$ ) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$m_{ads} = m_{balt} \cdot \%_{ads}, \text{ mg}; \quad (7)$$



čia:  $m_{balt}$  – baltymų kiekis emulsijoje, mg,  $\%_{ads}$  – tarpfazyje adsorbuotų baltymų dalis.

Emulsijos riebalų rutulėlių bendras paviršiaus plotas ( $S_b$ ) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$S_b = S_d \cdot \frac{V_{al}}{V_d}, m^2; \quad (8)$$

čia:  $S_d$  – riebalų rutulėlio paviršiaus plotas,  $m^2$ ,  $V_{al}$  – riebalų tūris emulsijoje,  $m^3$ ,  $V_d$  – riebalų rutulėlio tūris,  $m^3$ .

Riebalų rutulėlio paviršiaus plotas ( $S_d$ ) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$S_d = \pi \cdot d^2, m^2; \quad (9)$$

o riebalų rutulėlio tūris ( $V_d$ ) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$V_d = \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot d^3, m^3; \quad (10)$$

čia:  $d$  – riebalų rutulėlio skersmuo, m.

Kazeino frakcijos tarpfazyje identifikuotos, taikant efektyviają skysčių chromatografiją pagal anksčiau aprašytą metodą.

### 3.3.3. Baltymų virškinamumo nustatymas

#### Kazeino virškinamumo in vitro tyrimas

Virškinimo *in vitro* būdu procedūra atlikta pagal literatūroje pateiktą aprašymą [47]. Baltymų virškinamumo tyrimui buvo pagaminti MK, dMK1, dMK2 vandeniniai tirpalai, kuriuose baltymų koncentracija buvo 24 mg/ml, o LPM – 30 mg/ml. LPM pasirinkti kaip kontrolinis mėginys. Baltymų koncentracija mėginiuose skiriasi, nes siekiama užtikrinti, kad kazeino kiekis mėginiuose būtų vienodas (LPM sudėtyje 80 % baltymų yra kazeinas, 20 % – išrūgų baltymai). MK ir LPM tirpalai ruošti 50°C temperatūros vandens vonelėje maišant 20 min, o dMK1 ir dMK2 tirpalai šildomi nebuvo.

*In vitro* virškinimą sudarė dvi fazės – skrandžio ir plonosios žarnos. Virškinimas seilių fermentais burnoje nebuvo atliekamas, nes šioje fazėje virškinami angliavandeniai, veikiant  $\alpha$ -amilazei, o tiriamuose mėginiuose šio fermento substrato nėra, be to, tyrimo tikslas yra įvertinti baltymų virškinamumą. Pradžioje buvo paruošti žinomo aktyvumo fermentų kiaulių skrandžio gleivinės pepsino (aktyvumas 1716 U/mg) ir kiaulių kasos pankreatino (aktyvumas pagal tripsiną 6,68 U/mg) tirpalai, fermentus sumaišius atitinkamai su imituojamu skrandžio skysčiu (ISS) ir imituojamu plonosios žarnos skysčiu (IŽS). ISS sudarė vandenyje ištirpinti komponentai: KCl (6,9 mmol/l),  $KH_2PO_4$  (0,9 mmol/l),  $NaHCO_3$  (25 mmol/l), NaCl (47,2 mmol/l),  $MgCl_2(H_2O)_6$  (0,1 mmol/l),  $(NH_4)_2CO_3$  (0,5 mmol/l). IŽS sudarė vandenyje ištirpinti komponentai: KCl (6,8 mmol/l),  $KH_2PO_4$  (0,8 mmol/l),  $NaHCO_3$  (85 mmol/l), NaCl (38,4 mmol/l),  $MgCl_2(H_2O)_6$  (0,33 mmol/l).

Fermentų koncentracija ISS arba IŽS parenkama taip, kad sumaišius su mėginiu pepsino aktyvumas būtų 2000 U/ml, o pankreatino pagal tripsiną – 100 U/ml.

Skrandžio fazės pradžioje į 5 mėgintuvėlius pilama po 1 ml mėginio, 800 µl ISS su ištirpintu pepsinu ir 5 µl 0,3 M CaCl<sub>2</sub>. Naudojant 0,1 M HCl koreguojamas pH iki pH 3. Tuomet įpilama distiliuoto vandens, kad mėginio tūris būtų 2 ml. Mėginiai sumaišomi maišykle VELP Scientifica ZX3. Į mėgintuvėlius įdedami magnetai. Mėgintuvėliai dedami į 37°C temperatūros vandens vonelę su imersiniu kaitinimo cirkulatoriumi JULABO ir po vonele esančia magnetine maišykle IKA Labortechnik RCT basic, kuri virškinimo metu įjungama. Po 60 min virškinimo išimamas vienas mėgintuvėlis, reakcija stabdoma į jį pilant 1 M NaHCO<sub>3</sub>, kol pasiekamas pH 7, mėginys nedelsiant dedamas į šaldiklį (–18°C) ir jame laikomas iki tyrimų. Likę 4 mėgintuvėliai išimami po 90 min virškinimo, iš kurių viename reakcija stabdoma anksčiau aprašytu būdu, o kiti trys paruošiami virškinimui plonosios žarnos fazėje. Į šiuos mėgintuvėlius pilama po 1600 µl IŽS su jame ištirpintu pankreatinu ir 5 µl 0,3 M CaCl<sub>2</sub>. Naudojant 0,1 M NaOH koreguojamas pH iki pH 7. Tuomet įpilama distiliuoto vandens, kad mėginio tūris būtų 4 ml. Mėginiai sumaišomi maišykle, dedami į vandens vonelę ir virškinami tokiomis pačiomis sąlygomis kaip ir skrandžio fazės metu. Mėgintuvėliai po vieną išimami po 5, 30 ir 120 min virškinimo, reakcija juose stabdoma pridėjus 5 mM proteinazės K inhibitoriaus „Pefabloc® SC“, mėginiai nedelsiant dedamas į šaldiklį (–18°C) ir jame laikomi iki tyrimų. Buvo atlikti du lygiagretūs to paties mėginio virškinimai.

#### *Natrio dodecilsulfato – poliakrilamido gelio elektroforezė*

Mėginiai, suvirškinti *in vitro* būdu, bei nevirškinti mėginiai buvo praskiesti iki vienodos kazeino koncentracijos (6 mg/ml) ir sumaišyti su mėginio buferiu, sudarytu iš 0,125 M Tris–Cl, 4 % natrio dodecilsulfato, 20 % glicerolio, 2 % 2–merkaptoetanolio ir 31 mg/ml ditiotreitolio, santykiu 1:1. Emulsijos prieš maišymą su mėginio buferiu buvo centrifuguotos 5 min 5000 g kambario temperatūroje centrifuga IEC Micromax, tyrimams naudota vandens fazė. Mėginiai buvo kaitinami 5 min krosnelėje Thermolyne Type 17600 Dri–Bath 95°C temperatūroje. Elektroforezė buvo vykdoma naudojant Bio–Rad įrangą (Bio–Rad Laboratories, JAV). Elektroforezės indas Bio–Rad Mini–PROTEAN Tetra System buvo užpildytas elektrodų (tekėjimo) buferiu, sudarytu iš 0,0025 M trometamolio, 0,0192 M glicino, 0,01 % natrio dodecilsulfato. Į elektroforezės inde patalpinto gelio Mini–PROTEAN TGX Stain–Free šulinėlius buvo lašinamas standartas Bio–Rad Precision Plus Protein (5 µl) bei mėginiai (10 µl). Elektroforezė buvo vykdoma apie 40 min, esant elektrinei įtampai 200 V, naudojant maitinimo šaltinį Bio–Rad Power Pac Basic. Pasibaigus elektroforezei

geliai buvo išimti iš dėklo, perplauti distiliuotu vandeniu ir nuskaityti gelių vaizduokliu Bio–Rad Gel Doc EZ. Gelio paveikslas gautas naudojant programinę įrangą Image Lab.

Baltymų hidrolizės laipsnio nustatymas spektrofotometru

Suvirškinti bei nevirškinti mėginiai buvo praskiesti 3 kartus, po to mėginiai po skrandžio fazės papildomai praskiesti 2 kartus, o po plonosios žarnos fazės – 5 kartus. Mėginiai buvo sumaišyti su o-ftaldialdehido (OFA) buferiu, kurį sudarė 50 mM natrio tetraborato, 1 % natrio dodecilsulfato, 6 mM OFA, 28,5 mM β–merkaptoetanolio, santykiu 1:4 300 μl tūrio polipropileno 96 šulinėlių mikrolėkštelėse. Spektrofotometru SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, JAV) buvo išmatuota absorbcija, esant 340 nm bangos ilgiui. Rezultatai buvo pateikti leucino ekvivalentais, įvertinus fermentų įtaką bei tuščią mėginį (vanduo sumaišytas su OFA buferiu be OFA santykiu 1:4). Leucino ekvivalentai apskaičiuoti remiantis gradavimo grafiku. Taip pat apskaičiuotas hidrolizės laipsnis (HL) pagal formulę:

$$HL = \frac{n_h}{n_v} \cdot 100, \%; \quad (11)$$

čia:  $n_h$  – hidrolizuotų peptidinių ryšių skaičius, vnt.,  $n_v$  – peptidinių ryšių skaičius prieš hidrolizę (priimama, kad vidutiniškai  $n_v=200$ , nes hidrolizuojamus baltymus sudaro baltymų, turinčių skirtingą kiekį aminorūgščių, mišinys), vnt.

Hidrolizuotų peptidinių ryšių skaičius ( $n_h$ ) apskaičiuotas pagal formulę:

$$n_h = \frac{1}{\varepsilon} \cdot \left( \frac{F_h \cdot A_h}{C_h} - \frac{F_{nh} \cdot A_{nh}}{C_{nh}} \right), \%; \quad (12)$$

čia:  $\varepsilon$  – molinis absorbcijos koeficientas ( $\varepsilon=4412 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , apskaičiuotas remiantis literatūra [48] ir įvertinus analizuojamo tirpalo stulpo aukštį),  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $F_h$  – hidrolizuoto mėginio skiedimo koeficientas, įvertinantis papildomą skiedimą bei skiedimą sumaišius su OFA buferiu,  $A_h$  – hidrolizuoto mėginio absorbcija,  $C_h$  – hidrolizuoto mėginio molinė baltymų koncentracija po pirmojo skiedimo (apskaičiuota priėmus, kad hidrolizuojamų baltymų molekulinė masė 20000 g/mol), M,  $F_{nh}$  – nehidrolizuoto mėginio skiedimo koeficientas,  $A_{nh}$  – nehidrolizuoto mėginio absorbcija,  $C_{nh}$  – nehidrolizuoto mėginio molinė baltymų koncentracija po pirmojo skiedimo, M.

Absorbcija išmatuota dviejų lygiagrečių virškinimų metu gautuose mėginiuose, iš kiekvieno paruošiant tris bandinius, tai yra, vieno virškinimo vienas mėginys buvo tirtas trimis lygiagrečiais matavimais, o teoriškai vienodų mėginių skaičius spektrofotometrinės analizės metu buvo šeši. Rezultatai pateikti kaip šešių matavimų vidurkis.

### Kapiliarinė elektroforezė

Mėginiai buvo praskiesti iki vienodos kazeino koncentracijos (6 mg/ml) ir sumaišyti su mėginio buferiu, sudarytu iš 6 M šlapalo, 0,83 mg/ml hidroksipropilmetilceliuliozės, 42 mM 3–morfolino propano sulfoninės rūgšties, 167 mM trometamolio, 67 mM etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druskos dihidrato ir 7,9 mg/ml ditiotreitolio, santykiu 2:3. Mėginiai buvo sumaišyti maišykle VELP Scientifica ZX3, 1 val. maišomi orbitaline maišykle BOECO OS–10, esant 150 rpm, ir centrifuguoti 5 min 5000 g kambario temperatūroje centrifuga IEC Micromax. Mėginiai filtruoti per 0,45 μm porų dydžio polietersulfono membranių filtrą (Millex, Airija). Mėginiai buvo analizuojami naudojant Agilent kapiliarinės elektroforezės įrangą (Agilent Technologies, JAV) bei Agilent ChemStation programinę įrangą (versija B.03.02(341)), suderintą su temperatūros reguliavimo įranga Minichiller (Huber, Vokietija). Atskyrimas buvo atliktas naudojant silikagelio kapiliarą, kurio vidinis skersmuo 50 μm, o ilgis 56 cm, esant 45°C temperatūrai ir linijiniam įtampos gradientui nuo 0 iki 25 kV 0–3 min, o po to – pastoviai 25 kV įtampai. Mėginiai injektuoti 20 s, esant 34,5 mbar slėgiui. Ultravioletinių spindulių detekcija buvo vykdoma, esant 214 nm bangos ilgiui. Kapiliaras buvo plautas 5 min 0,1 M NaOH, po to 20 min tekėjimo buferiu, sudarytu iš 6 M šlapalo, 0,83 mg/ml hidroksipropilmetilceliuliozės, 20 mM natrio citrato, 0,19 M citrinos rūgšties. Rezultatai vaizduojami elektroferogramose.

### Nekazeininio azoto kiekio nustatymas

Vandeniniai baltymų tirpalai (baltymų koncentracija 24 mg/ml) buvo pašildyti iki 35°C temperatūros ir sumaišyti su acetato buferiu, sudarytu iš 0,67 % acto rūgšties ir 0,067 M natrio acetato, santykiu 2:3. Mėginių pH pakoreguotas 0,1 M HCl iki pH 4,6. Mėginiai centrifuguoti 20 min 3000 g kambario temperatūroje. Azoto kiekis supernatante nustatytas Kjeldalio metodu.

## 4. Rezultatai ir jų aptarimas

### 4.1. Baltymų produktų sudėties tyrimai

Pirmajame tyrimų etape buvo nustatyti tyrimams parinktų pieno baltymų produktų sudėtis. Kadangi tolimesniuose tyrimuose reikia ruošti pieno baltymų produktų tirpalus su žinomu baltymų kiekiu, reikia žinoti tikslų baltymų kiekį produktuose.

Nustatytas baltymų kiekis produktuose pagal bendrą azoto kiekį pateiktas 4-oje lentelėje. Gauti rezultatai mažai skyrėsi (iki 2 %) nuo nurodytų baltymų kiekių gamintojų pateiktose produktų specifikacijose, išskyrus MK, kurio nustatytas baltymų kiekis buvo 7,5 % didesnis nei nurodytas specifikacijoje.

4 lent. Baltymų kiekis pieno baltymų produktuose

Mėginys	Baltymų kiekis, %
MK	81,50 ± 0,75
KKN	89,90 ± 0,89
PBK	79,16 ± 0,84
IBI	89,70 ± 0,30
LPM	33,80 ± 0,97

Kadangi pieno baltymai gali ženkliai skirtis pagal atsikrų kazeino frakcijų sudėtį, svarbu žinoti ne tik bendrą baltymų kiekį produkte, bet ir jų kokybinę sudėtį. Atlikus tyrimą, buvo nustatyta, kokią dalį kazeino sudaro skirtingos frakcijos (žr. 5 lent.). Visuose mėginiuose daugiausia buvo  $\beta$ -kazeino (59,5–63,4 %), o mažiausia –  $\alpha_{s2}$ -kazeino (1,7–5,5 %). Pasiskirstymas tarp  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - ir  $\kappa$ -kazeino frakcijų vidutiniškai buvo 24, 3, 61 ir 12 % atitinkamai.

5 lent. Kazeino frakcijų pasiskirstymas pieno baltymų produktuose

Mėginys	Frakcijos kiekis kazeine, %			
	$\alpha_{s1}$	$\alpha_{s2}$	$\beta$	$\kappa$
MK	26,7	2,8	59,5	11,1
KKN	26,3	2,8	63,4	7,4
PBK	27,2	1,7	61,5	9,6
LPM	16,2	5,5	60,3	18,0

Literatūroje nurodyta, kad  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - ir  $\kappa$ -kazeino frakcijos karvių piene atitinkamai sudaro 38, 10, 35 ir 12 % viso karvių pieno kazeino [1], tačiau kituose šaltiniuose teigiama, kad frakcijų pasiskirstymas yra 20, 17, 38 ir 25 % atitinkamai [49]. Skirtinga frakcijų sudėtis priklauso nuo karvių veislės, jų šėrimo būdo ir sezono įtakos [50], todėl įvairiuose mėginiuose gali kisti.

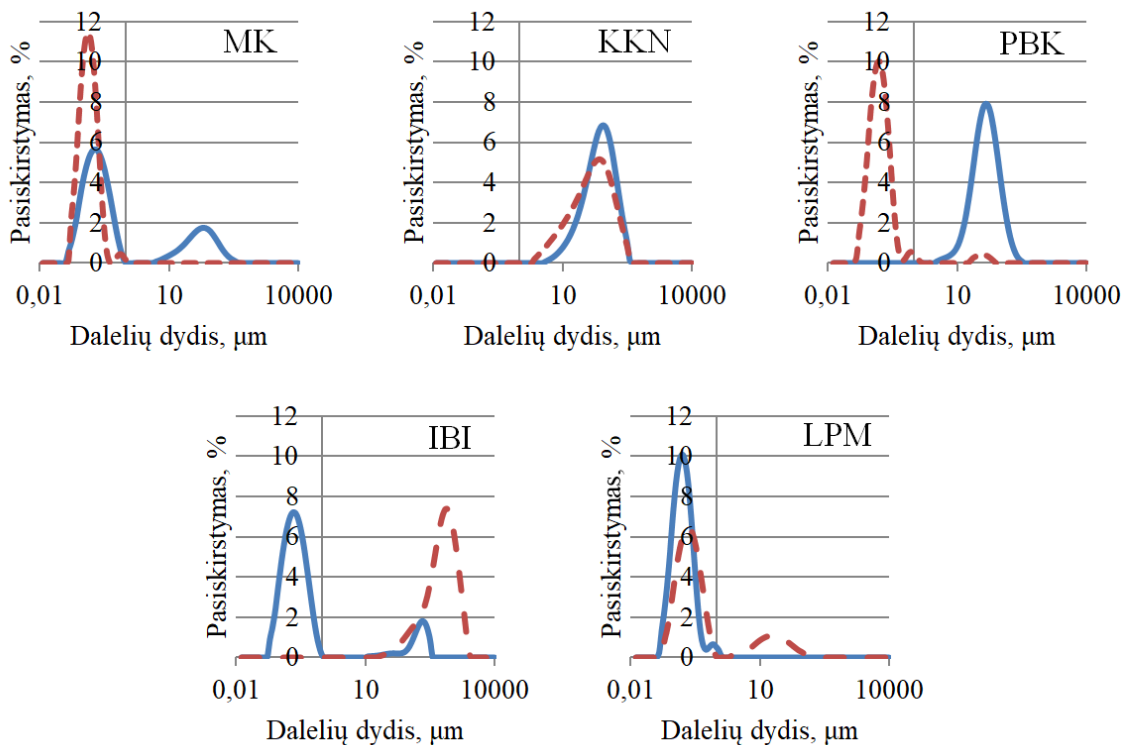
## 4.2. Pieno baltymų produktų funkcinės savybės

### Kazeino dalelių dydis

Buvo nustatytas kazeino dalelių dydis pieno baltymų produktų tirpaluose, priklausomai nuo terminio tirpalų apdoravimo ir pH. Tuo tikslu pieno baltymų produktų vandeniniai tirpalai buvo apdoroti termiškai 90°C temperatūroje 1 min. Taip pat buvo keistas tirpalų pH nuo 6,2 iki 7,0.

Iš 6-ame paveiksle pateiktų grafikų, kuriuose pavaizduotas kazeino dalelių dydžio pasiskirstymas, matyti, kad termiškai neapdorotas MK tirpalas buvo polidispersinė sistema, kurioje vyravo 0,04–1 µm dalelės ir buvo 4–240 µm dydžio dalelių. Pastarųjų nebuvo aptikta termiškai apdorotame MK tirpale, dauguma dalelių buvo 0,05–0,4 µm. Terminis apdorojimas ženkliai nepakeitė KKN dalelių dydžio pasiskirstymo, jos šiek tiek sumažėjo. Priešingai KKN, termiškai neapdoroto PBK tirpalo dalelės sumažėjo nuo 3–275 µm iki 0,04–1,2 µm. Tokia dalelių mažėjimo tendencija, pastebima po terminio apdoravimo, gali būti susijusi su suteikiama šilumine energija, kuri skatina dalelių rehidratavimąsi [51]. IBI atveju stebimas priešingas procesas: po terminio apdoravimo susidaro 20–2200 µm dydžio aglomeratai, nes denatūravę išrūgų baltymai koaguliuoja. Kazeinas, dominuojantis MK, KKN ir PBK, yra termostabilių baltymų grupė, kuri pasirinktomis terminio apdoravimo sąlygomis nekoaguliuoja. Šią kazeino savybę lemia micelinė struktūra ir hidrofilinis apvalkalėlis, sudarytas iš κ-kazeino. Termiškai neapdorotų LPM dalelių dydis buvo 0,04–1 µm. Šių dalelių kiekis po terminio apdoravimo sumažėjo, nes susidarė 2–120 µm dydžio aglomeratai. Šį procesą lėmė išrūgų baltymų denatūravimas ir sąveika tarpusavyje bei su kazeino molekulėmis. Termiškai apdorotame PBK tirpale taip pat yra 15–55 µm dalelių, kurios galėjo susidaryti dėl išrūgų baltymų cheminių pokyčių arba likti dėl nepakankamos rehidratacijos.

Dalelių dydžio pasiskirstymui įtakos neturėjo tai, kad į mėginius buvo pridėta LPM, tai yra pieno baltymų produktų vandeninių tirpalų ir mišinių vandeninių tirpalų dalelių pasiskirstymo grafikai atrodė identiškai. LPM smailės, vaizduojančios 0,05–1 µm daleles, galėjo persidengti mišiniuose su MK, PBK ir IBI dalelių smailėmis, tačiau šio dydžio dalelės nebuvo užfiksuotos KKN tirpale. LPM ir KKN baltymų santykis tirpale 3,3:4,7 atitinkamai, todėl KKN dalelės galėjo tapti dominuojančiomis, o LPM dalelių analizatorius nenustatė. Tirpalo pH įtaka dalelių dydžiui buvo įvairi priklausomai nuo produkto ir terminio apdoravimo (žr. 6 lent.). Termiškai nepadorotuose MK tirpaluose, esant pH 6,2–6,4, 0,04–1 µm dalelių buvo daugiau nei 4–240 µm dalelių, o kai pH 6,5–7,0 – atvirkščiai. Pavyzdžiui, esant pH 6,2, 0,2 µm skersmens dalelių buvo 5,5 %, o 40 µm – 3 %, o



6 pav. Dalelių dydžio pasiskirstymas termiškai neapdorotuose (—) ir apdorotuose (--) pieno baltymų produktų vandeniniuose tirpaluose (8%)

kai tirpalo pH buvo 6,9, 0,2  $\mu\text{m}$  skersmens dalelių buvo 3,25 %, o 40  $\mu\text{m}$  – 3,8 %. Termiškai apdoroto MK tirpalo dalelių pasiskirstymo grafikas buvo tapatus 6–ame paveiksle pavaizduotajam ir nesikeitė, kintant pH. Priešinga tendencija pastebima KKN tirpaluose: termiškai neapdoroti mėginiai pasižymėjo monodispersiškumu (dalelių dydis 4–240  $\mu\text{m}$ ), nepriklausomai nuo pH, o termiškai apdorotiems mėginiams pH įtaka buvo reikšminga. Visų termiškai apdorotų KKN tirpalų dalelių dydžio pasiskirstymo grafikuose yra dvi smailės, reprezentuojančios 0,04–1  $\mu\text{m}$  ir 1–160  $\mu\text{m}$  daleles, išskyrus tirpalą, kurio pH 6,9. Pastarajame vyrauja tik 1–160  $\mu\text{m}$  dalelės, iš jų daugiausia (7,3 %) 105  $\mu\text{m}$  dalelių. Svarbu paminėti, kad šio tirpalo pH koregavimui buvo sunaudotas mažiausias rūgšties/šarmo kiekis, kuris galimai buvo nepakankamas dalelių rehidratacijai skatinti. Šiuos skirtumus galėtų paaiškinti skirtinga miltelių tirpinimo trukmė, tačiau tai neatitinka mėginių ruošimo metodikos. Remiantis kitų mokslininkų atliktais tyrimais [52], KKN tirpaluose yra 0,1–2  $\mu\text{m}$  ir 2–90  $\mu\text{m}$  dalelės. Pastarųjų kiekis mažėja ilgėjant tirpinimo trukmei, o mažesnių dalelių susidaro daugiau. Taigi, siekiant, kad KKN tirpale susidarytų mažesnės nei 1  $\mu\text{m}$  skersmens dalelės, būtina optimizuoti tirpinimo procesą.

6 lent. Pieno baltymų produktų vidutinis dalelių dydis ( $\mu\text{m}$ ), priklausomai nuo terminio apdoravimo ir pH

Produktas	Terminiškai neapdoroti								
	pH								
	6,2	6,3	6,4	6,5	6,6	6,7	6,8	6,9	7,0
MK	0,2 $\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,0$	0,4 $\pm 0,0$	0,5 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,4 $\pm 0,0$	0,5 $\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,0$
KKN	31,3 $\pm 1,1$	34,9 $\pm 1,5$	31,8 $\pm 0,9$	33,0 $\pm 1,0$	35,4 $\pm 1,2$	33,3 $\pm 1,1$	32,6 $\pm 0,9$	34,8 $\pm 0,6$	39,0 $\pm 1,1$
PBK	43,9 $\pm 2,1$	40,9 $\pm 2,2$	53,6 $\pm 2,8$	45,8 $\pm 2,5$	58,3 $\pm 2,6$	55,5 $\pm 1,8$	51,4 $\pm 2,4$	32,5 $\pm 1,4$	38,2 $\pm 1,9$
IBI	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$
LPM	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$
Produktas	Terminiškai apdoroti								
	pH								
	6,2	6,3	6,4	6,5	6,6	6,7	6,8	6,9	7,0
MK	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$
KKN	0,2 $\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,0$	99,1 $\pm 0,9$	0,2 $\pm 0,0$
PBK	124,3 $\pm 8,9$	63,2 $\pm 3,0$	72,1 $\pm 1,9$	55,6 $\pm 7,3$	23,4 $\pm 2,7$	0,2 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$
IBI	376,3 $\pm 16,6$	393,4 $\pm 28,2$	428,4 $\pm 24,7$	352,5 $\pm 9,1$	390,9 $\pm 15,6$	416,0 $\pm 12,8$	308,1 $\pm 8,3$	199,0 $\pm 44,0$	0,2 $\pm 0,0$
LPM	63,3 $\pm 3,7$	55,6 $\pm 0,4$	50,4 $\pm 3,4$	0,2 $\pm 0,0$	0,2 $\pm 0,0$	0,2 $\pm 0,0$	0,2 $\pm 0,0$	0,2 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$

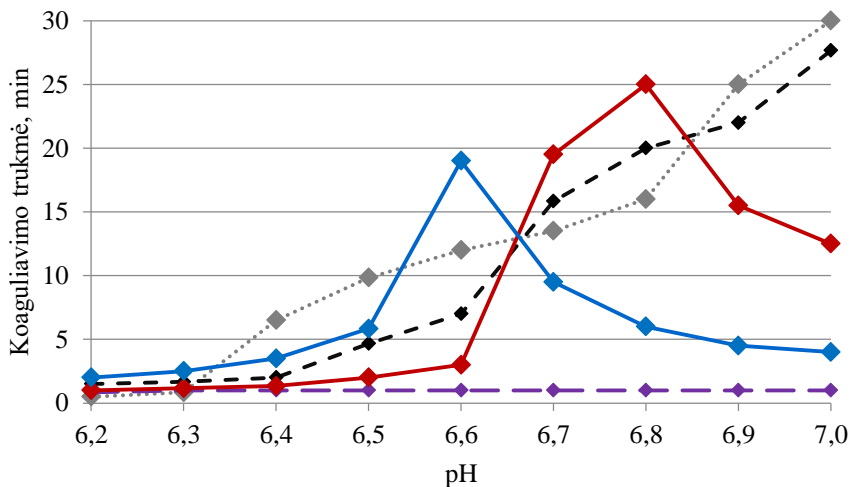
Terminiškai neapdorotuose PBK tirpaluose dalelių dydis buvo 5–210  $\mu\text{m}$ , daugiausia (8 %) buvo 50  $\mu\text{m}$  dalelių. Šiems mėginiams pH pokyčiai įtakos neturėjo, tačiau mėginius apdorojus termiškai tarp skirtingo pH mėginių skirtumai akivaizdūs. Nekoreguotas PBK tirpalo pH 6,8, kuriam esant ir didėjant iki 7,0, tirpale buvo 0,04–1  $\mu\text{m}$  dalelės. Sumažinus pH iki 6,7, pradėjo formuotis 2–240  $\mu\text{m}$  dalelės, kurių santykis su mažomis dalelėmis (0,04–1  $\mu\text{m}$ ) išsilygino, pasiekus pH 6,6. Esant pH 6,2–6,5, tirpale liko tik 2–240  $\mu\text{m}$  skersmens dalelės. PBK tirpalui analogiškas LPM atvejis, kai mėginiai yra termiškai apdoroti. Esant pH 6,6–7,0, LPM tirpale yra 0,04–1  $\mu\text{m}$  dalelės. Kai pH 6,5, pradeda formuotis 1,5–10  $\mu\text{m}$  dalelės. Sumažinus pH iki 6,4 šios dalelės dominavo, 0,04–1  $\mu\text{m}$  dalelių tirpale nebeliko. Esant pH 6,2–6,3 dalelių dydis buvo 3–720  $\mu\text{m}$ , iš kurių daugiausia (6,7 %) 40  $\mu\text{m}$  skersmens dalelių. Kaip ir termiškai neapdorotiems PBK tirpalams, pH nedarė įtakos termiškai neapdorotų LPM dalelių dydžiui, tačiau, priešingai nei PBK, LPM tirpaluose vyravo 0,04–1  $\mu\text{m}$  dydžio dalelės, iš kurių daugiausia (10 %) 0,14  $\mu\text{m}$  skersmens dalelių. Taigi, galima teigti, kad miltelių gamybos būdas bei baltymų koncentracija produkte labai susijusi su rehidracinėmis savybėmis: didesnės baltymų koncentracijos milteliai pasižymi blogesniu tirpumu vandenyje [53].



Nepriklausomai nuo pH pokyčio, termiškai neapdorotų IBI tirpalų dalelių dydis nekito (0,04–1  $\mu\text{m}$ ). Termiškai apdorotuose IBI tirpaluose šio dydžio dalelės egzistavo tik esant pH 7,0. Mažėjant pH dalelės didėjo: iš pradžių susidarė monodispersinė sistema (pH 6,9), kurioje vyravo 2–720  $\mu\text{m}$  dalelės, iš jų daugiausia (5,2 %) 120  $\mu\text{m}$  skersmens, o pH pasiekus 6,8 ir toliau mažėjant, dalelių, kurių dydis 10–160  $\mu\text{m}$ , kiekis taip pat mažėjo, susidarant 160–1100  $\mu\text{m}$  skersmens aglomeratams, iš kurių daugiausia (10 %) 480  $\mu\text{m}$  dalelių. Apibendrinant pH įtaką dalelių dydžiui, aišku, kad termiškai apdorotos dalelės yra jautresnės pH pokyčiams, jeigu miltelių sudėtyje yra išrūgų baltymų, pasižyminčių termolabilumu. Dėl gautos šiluminės energijos molekulės denatūruoja, keičia erdvinę struktūrą, todėl pH pokytis lemia ne tik išorėje esančių polinių funkcinių grupių krūvio kaitą, bet ir tų, kurios iki terminio apdorojimo buvo užmaskuotos molekulės viduje. Krūvio pokyčiai sąlygoja molekulių tarpusavio sąveiką bei didesnių dalelių susidarymą. Tokia tendencija nėra pastebima MK ir KKN tirpaluose, nes šie baltymai yra termostabilūs, o didesnių dalelių buvimas susijęs su rehidratacinėmis savybėmis.

### Termostabilumas

Pieno baltymų produktų vandeninių tirpalų termostabilumas, esant pH 6,2–7,0, pavaizduotas 7-ame paveiksle. Mažiausiu termostabilumu pasižymėjo IBI tirpalas, nepriklausomai nuo pH. Baltymai koaguliavo greičiau nei per 1 min, nes buvo suardyta antrinė konfigūracija bei susidarė nauji kovalentiniai ryšiai tarp gretimų molekulių sulfhidrilo grupių, tai yra susidarė disulfidiniai ryšiai.



7 pav. Pieno baltymų produktų termostabilumo priklausomybė nuo pH: MK (.....), KKN (- -), PBK (-), IBI (- -) ir LPM (-)

PBK ir LPM baltymų sudėtis teoriškai nesiskiria (80 % visų baltymų sudaro kazeinas, o 20 % – išrūgų baltymai), todėl pastebima tokia pati tendencija: tirpalai stabiliausi, esant nekoreguotam arba mažai koreguotam pH (PBK tirpalo pradinis pH 6,81 bei termostabilumo maksimumas – 6,80, o LPM tirpalo – 6,57 ir 6,60 atitinkamai), o jį keičiant baltymai koaguluoja greičiau. Didžiausias termostabilumas stebimas tada, kai prie kazeino micelės paviršiuje esančio  $\kappa$ -kazeino disulfidiniu ryšiu prisijungia išrūgų baltymas  $\beta$ -laktoglobulinas ir, tarsi, sudaro apvalkalą, tokiu būdu apsaugodamas micelę nuo temperatūros poveikio. Tęsiant kaitinimą, vyksta defosforilinimas, susidaro nauji kovalentiniai ryšiai, todėl micelės stabilumas prarandamas ir baltymai koaguluoja [54, 55]. Mažėjant pH, PBK ir LPM tirpalai koaguliavo greičiau. Su tuo susijusi  $\beta$ -laktoglobulino savybė sujungti kalcio jonus: kuo pH mažesnis už pH, kuriam esant stebimas termostabilumo maksimumas, tuo mažiau kalcio jonų sujungia  $\beta$ -laktoglobulinas, tuo daugiau jų lieka tirpale, todėl yra skatinama koaguliacija [54]. Termostabilumo mažėjimas PBK ir LPM tirpaluose, kai pH didesnis už pH, kuriam esant tirpalai termostabiliausi, aiškinamas tuo, kad  $\kappa$ -kazeinas disocijuoja nuo micelės, todėl netenkama „apsauginio sluoksnio“, baltymai koaguluoja [54]. MK ir KKN tirpalų pradinės pH vertės buvo 6,79 ir 6,80 atitinkamai. Padidinus pH, mėginių termostabilumas padidėjo, o mažinant pH – mažėjo. Mažinant pH, elektrostatinės stūmos jėgos mažėja, todėl kazeino micelės greičiau agreguojasi ir koaguluoja. Be to, MK ir KKN tirpaluose nebuvo išrūgų baltymų, kurie yra labiau susiję su terminiu nestabilumu.

### Putojimo savybės

Geros putojimo savybės būdingos tų baltymų tirpalams, kurie geba greitai išsilankstyti bei padengti vandens ir oro sąlyčio vietą, o putų stabilumas susijęs su baltymų gebėjimu išsilaikyti tarpfazyje, sudarant patvarią plėvelę. Pieno baltymų produktų putojimo savybių tyrimo rezultatai pateikti 7-oje lentelėje. Didžiausia putojimo geba pasižymėjo PBK (92,5 %), mažiausia – IBI (47,5 %). MK ir KKN putojo geriau (77,5 %) negu LPM (70 %). Nors PBK ir LPM baltymų kokybinė sudėtis tokia pati, LPM sudėtyje be baltymų dar yra laktozės, kuri tirpdama vandenyje didina klampą, todėl putojimo geba sumažėja. Be to, PBK sudėtyje yra emulsiklio sojų leticino, kuris galėjo daryti įtaką bandymo rezultatams. Sojų leticino taip pat buvo MK ir KKN mėginiuose, todėl šiuos mėginius galima palyginti su PBK, nepaisant leticino įtakos. Kazeino molekulės pasižymi lankstumu, o išrūgų baltymams būdinga globulės forma. Globuliniams baltymams išsilankstyti reikalinga papildoma energija, todėl teoriškai didesne putojimo geba turėtų pasižymėti MK ir KKN mėginiai nei PBK, tačiau gauti rezultatai yra priešingi. Įdomu tai, kad į mėginius pridėjus LPM,

putojimo geba padidėjo. IBI atveju šis pokytis (IBI putojimo geba 47,5 %, IBI mišinio – 132,5 %) gali būti aiškinamas kazeino pridėjimu ir greita jo migracija tarpfazio link, tačiau putojimo geba taip pat padidėjo MK ir KKN atveju, kai kazeino kiekis mėginyje sąlyginai sumažėjo. Kiti mokslininkai taip pat pastebėjo, kad į liesą pieną pridėjus išrūgų baltymų arba natrio kazeinato putojimo geba padidėjo, nepriklausomai nuo to, kad vienu atveju kazeino ir išrūgų baltymų santykis sumažėjo, o kitu – padidėjo [56].

7 lent. Pieno baltymų produktų putojimo geba ir putų stabilumas

Mėginys	Putojimo geba, %	Putų stabilumas, %
MK	77,5 ± 2,5	16,1 ± 4,2
KKN	77,5 ± 2,5	0,00 ± 0,0
PBK	92,5 ± 2,5	0,00 ± 0,0
IBI	47,5 ± 2,5	78,9 ± 1,1
LPM	70,0 ± 0,0	3,60 ± 3,6
MK mišinys	85,0 ± 4,1	11,8 ± 2,5
KKN mišinys	85,0 ± 4,1	0,00 ± 0,0
PBK mišinys	82,5 ± 3,1	3,00 ± 2,7
IBI mišinys	132,5 ± 2,0	18,9 ± 2,8
LPM mišinys	70,0 ± 0,0	3,50 ± 2,9

Stabiliausias putas sudarė IBI (putų stabilumas 78,9 %) arba IBI mišinys (18,9 %). Antrinę išrūgų baltymų konfigūraciją stabilizuojantys vandeniliniai ryšiai lemia patvaresnės plėvelės formavimąsi, todėl ir globulinių baltymų tirpalų putos yra stabilesnės už putas, kurių tarpfazį sudaro antrine struktūra nepasižymintys baltymai (kazeinas). Šis dėsnīgumas aprašomas literatūroje: putos, kuriose dominuoja kazeinas, yra mažiau stabilios už putas, kurias stabilizuoja išrūgų baltymai [57].

#### Emulsavimo savybės

Šiame darbo etape baltymų emulsavimo savybės buvo įvertintos keliais rodikliais: emulsijų riebalų rutulėlių dydžių, emulsijų gravitaciniu stabilumu laikymo metu bei baltymų kiekiu, kuris geba adsorbuotis tarpfazyje a/v.

Pagaminus emulsijas a/v, kurių vandeninę fazę sudarė pieno baltymų produktų vandeniniai tirpalai (baltymų koncentracija 2 %) ir mišinių vandeniniai tirpalai (baltymų koncentracija 1,2 % ir 2 %), buvo nustatyta, kad visos jos – monodispersinės sistemos, tai yra riebalų rutulėlių dydis pasiskirstė mažame regione. Vidutinis riebalų rutulėlių skersmuo  $D[3,2]$ , nustatytas pagal paviršiaus plotą, pateiktas 8-oje lentelėje.

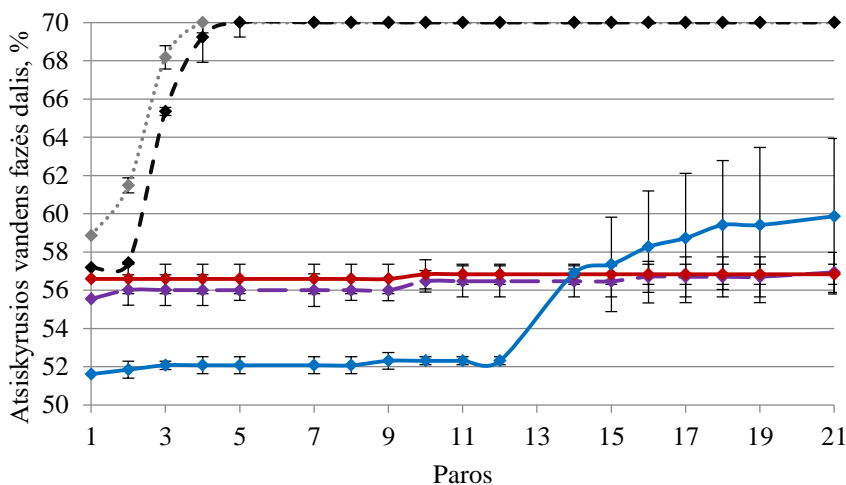
8 lent. Emulsijų, kurių vandeninę fazę sudarė pieno baltymų produktų vandeniniai tirpalai, riebalų rutulėlių dydis

Mėginys	D[3,2], esant tam tikrai baltymų koncentracijai vandeninėje fazėje, $\mu\text{m}$	
	Baltymų koncentracija 1,2 %	Baltymų koncentracija 2 %
MK	–	$8,0 \pm 0,10$
KKN	–	$8,7 \pm 0,03$
PBK	–	$9,0 \pm 0,02$
IBI	–	$9,8 \pm 0,05$
LPM	–	$8,1 \pm 0,02$
MK mišinys	$16,1 \pm 0,09$	$8,5 \pm 0,20$
KKN mišinys	$16,5 \pm 0,25$	$9,3 \pm 0,02$
PBK mišinys	$20,3 \pm 0,01$	$8,4 \pm 0,01$
IBI mišinys	$20,2 \pm 0,07$	$10,0 \pm 0,02$
LPM mišinys	$20,6 \pm 0,02$	$8,1 \pm 0,01$

Dalelių dydis buvo nustatytas iškart po emulsijų gamybos, todėl mažesnės dalelės rodo didesnę paviršiaus aktyviosios medžiagos, šiuo atveju – baltymo, emulsavimo aktyvumą. Tai yra kuo mažesnės dalelės, tuo didesnis bendras jų paviršiaus plotas, tuo tarpfazį sudarantis baltymas yra lankstesnis ir efektyviau padengia riebalų rutulėlio paviršių. Mažiausios dalelės ( $8,0 \mu\text{m}$ ) susidarė emulsijoje, stabilizuotoje MK baltymais. IBI baltymais stabilizuotos emulsijos riebalų rutulėliai buvo didžiausi ( $9,8 \mu\text{m}$ ). Mišiniuose MK ir KKN emulsijų dalelių dydžiai buvo mažiausi ( $16,1$ – $16,5 \mu\text{m}$ ), esant baltymų koncentracijai 1,2 %. Šiek tiek didesnės dalelės ( $20,2$ – $20,6 \mu\text{m}$ ) buvo nustatytos PBK, IBI ir LPM baltymais stabilizuotose emulsijose (baltymų koncentracija 1,2 %). MK ir KKN sudaro kazeinas, o PBK ir LPM yra išrūgų baltymų. Kazeino molekulės neturi konkrečios antrinės struktūros, todėl veikiami mechaniškai greičiau išsilanksto ir adsorbuojasi tarpfazyje. Išrūgų baltymai yra globulės formos, jų konfigūraciją stabilizuoja vandeniliniai ryšiai, kuriems nutraukti reikalinga energija. Taigi, esant tokioms pačioms energijos sąnaudoms, kazeino adsorbcija tarpfazyje yra greitesnė negu išrūgų baltymų. Dėl šios priežasties IBI emulsijos riebalų rutulėliai buvo didesni (IBI –  $9,8 \mu\text{m}$ , IBI mišinio –  $10,0 \mu\text{m}$ ) nei kitų mėginių ( $8,0$ – $9,3 \mu\text{m}$ ), kai baltymų koncentracija buvo 2 %. Lyginant tais pačiais baltymais stabilizuotas emulsijas, tačiau skiriantis baltymų koncentracijai, aišku, kad esant didesnei koncentracijai baltymai gali padengti didesnę paviršiaus plotą, todėl gaunami mažesni riebalų rutulėliai. Padidinus baltymų koncentraciją nuo 1,2 % iki 2 %, riebalų rutulėliai sumažėjo 1,8–2,5 karto.

Emulsijų stabilumas, vertintas kaip atsiskyrusios vandens fazės dalis, pavaizduotas 8–ame paveiksle. Visos emulsijos buvo nestabilios, nes jau po 1 paros daugiau nei 50 % vandeninės fazės atsiskyrė. Su tuo gali būti susijusi nepakankama baltymų koncentracija (1,2 % vandeninėje fazėje). Mokslininkams ištyrus baltymų koncentracijos įtaką emulsijų stabilumui, buvo gauti įvairūs

rezultatai, priklausomai nuo produkto, pavyzdžiui, tiriant tos pačios baltymų koncentracijos PBK, didžiausias emulsijų stabilumas buvo stebimas, esant 2–4 % arba daugiau nei 5 % baltymų [58]. Taigi, baltymų emulsavimo savybės priklauso ne tik jų koncentracijos, bet ir kitų faktorių (gamybos būdo, miltelių rehidratacinių savybių, mineralų kiekio bei kokybės ir pan.).



8 pav. Emulsijų, stabilizuotų MK (.....), KKN (- -), PBK (-), IBI (- -) ir LPM (-) baltymais, gravitacinis stabilumas

MK ir KKN baltymais stabilizuotose emulsijose matomas stabilumo mažėjimas 2–4 paromis, o 5–ąją parą emulsijos buvo visiškai išsisluoksniavusios. Emulsijų, kurių sudėtyje buvo PBK arba IBI, stabilumas per 21 parą mažai kito: PBK atsiskyrusios vandens fazės dalis padidėjo nuo 56,6 % iki 56,8 %, o IBI – nuo 55,5 % iki 56,9 %. LPM baltymais stabilizuotoje emulsijoje galima išskirti dvi fazes: pirmąją, trukusią 12 parų nuo emulsijų pagaminimo, kurios metu atsiskyrusios vandens fazės dalis nekito, ir antrąją (12–21 para), kai buvo stebimas emulsijos stabilumo mažėjimas. Emulsijų, kaip ir putų, stabilizavimui svarbi baltymų savybė sudaryti patvarią plėvelę, o su tuo susijusi antrinė struktūra. Mėginiuose, stabilizuotuose PBK, IBI ir LPM, buvo išrūgų baltymų, todėl šių emulsijų stabilumas didesnis nei emulsijų, stabilizuotų MK ir KKN baltymais, kuriems nebūdinga antrinė struktūra. Emulsijos, kurios sudėtyje buvo LPM, didėjančią nestabilumą po 12 parų galima paaiškinti mikrobine veikla, nes eksperimentas vykdytas ne aseptinėmis sąlygomis kambario temperatūroje (18–20°C). Vykstant baltymų hidrolizei, plėvelė suyra, aliejaus ir vandens fazės atsiskiria.

### Baltymų adsorbsija tarpfazyje a/v

Nustačius skirtingą baltymų produktų įtaką emulsijų fazių išsisluoksniavimui, rezultatų paaiškinimui reikėjo nustatyti, koks kiekis iš vandens fazėje esančių baltymų adsorbavosi a/v tarpfazyje. Šio rodiklio nustatymo rezultatai pateikti 9-oje lentelėje. Daugiausia baltymų adsorbavosi LPM stabilizuotų emulsijų tarpfazyje (34,50 % visų mėginyje esančių baltymų), o mažiausia – IBI (12,98 %). Šie rezultatai rodo, kad LPM baltymai adsorbuojasi greičiau nei IBI baltymai, esant parinktomis homogenizavimo sąlygoms. IBI baltymai yra globuliniai, o LPM jie sudaro tik 20 % visų baltymų, o likę 80 % baltymų (kazeinas) neturi antrinės struktūros, todėl yra lankstesni ir greičiau adsorbuojasi vandens ir aliejaus sąlyčio vietoje. Kadangi tiek emulsijose, tiek putose pagrindiniai komponentai yra hidrofilinė ir hidrofobinė fazės bei paviršiaus aktyvioji medžiaga, tai šių sistemų savybės yra panašios. Taigi, tų pačių mėginių baltymų adsorbcija tarpfazyje, nepriklausomai nuo to, ar hidrofobinė fazė buvo aliejus ar oras, vyko analogiškai: IBI mėginiai pasižymėjo tiek mažesne putojimo geba, tiek mažesniu emulsijos tarpfazyje adsorbuotų baltymų kiekiu, palyginus su LPM arba tokios pačios baltymų sudėties PBK. Tai yra minėtų bandymų rezultatai tarpusavyje koreliuoja.

9 lent. Baltymų, adsorbuotų a/v tarpfazyje, kiekis, kai emulsijos buvo gamintos su skirtingais pieno baltymų produktais

Mėginys	Tarpfazyje adsorbuotų baltymų kiekis, %
MK	25,07 ± 0,47
KKN	22,27 ± 0,59
PBK	27,27 ± 0,22
IBI	12,98 ± 0,67
LPM	34,50 ± 0,58
MK mišinys	37,41 ± 0,35
KKN mišinys	35,59 ± 0,55
PBK mišinys	47,93 ± 0,94
IBI mišinys	40,33 ± 0,72
LPM mišinys	35,31 ± 0,81

MK ir KKN mėginiuose dominavo kazeinas, tačiau tarpfazyje adsorbavosi mažiau baltymų (25,07 % ir 22,27 % atitinkamai) nei PBK ir LPM mėginiuose (27,27 % ir 34,50 % atitinkamai), kurių baltymuose kazeino buvo 80 %. Įdomu, kad analogiški rezultatai gauti ir putojimo gebos nustatymo tyrime. Tai reiškia, kad ne vien baltymo lankstumas yra svarbus adsorbcijos greičiui, bet ir jo sąveika su kitais terpėje esančiais baltymais. Sumaišius pieno baltymų produktus su LPM, buvo nustatyta, kad visuose mėginiuose tarpfazyje adsorbuotų baltymų kiekis padidėjo 1,5–3,1 karto, išskyrus LPM, nes LPM yra tapatus LPM mišiniui, todėl šie mėginiai gali būti naudojami kaip kontroliniai. Tokia pati tendencija buvo pastebėta nustatant putojimo gebą.

Toliau buvo apskaičiuotas riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis emulsijoje. Rezultatai pateikti 10-oje lentelėje. Didžiausias riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis nustatytas emulsijose, stabilizuotose LPM baltymais ( $31,04 \text{ mg/m}^2$ ), o mažiausias – IBI baltymais stabilizuotose emulsijose ( $9,89 \text{ mg/m}^2$ ). Didesnis riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis buvo PBK baltymais stabilizuotoje emulsijoje ( $19,09 \text{ mg/m}^2$ ) nei MK ir KKN ( $15,60 \text{ mg/m}^2$  ir  $15,07 \text{ mg/m}^2$  atitinkamai). Nepriklausomai nuo pagrindinio komponento, visuose mišiniuose riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis padidėjo 1,7–3,2 karto (išskyrus LPM), palyginus su riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekiu emulsijose, kurios buvo stabilizuotos atskirų pieno baltymų produktų baltymais. Didžiausias skirtumas yra tarp IBI ir IBI mišinio, kuriuose riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis tarpfazyje  $9,89 \text{ mg/m}^2$  ir  $31,61 \text{ mg/m}^2$  atitinkamai.

10 lent. Riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis, kai emulsijos buvo gamintos su skirtingais pieno baltymų produktais

Mėginys	Riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis, $\text{mg/m}^2$
MK	$15,60 \pm 0,55$
KKN	$15,07 \pm 0,23$
PBK	$19,09 \pm 0,74$
IBI	$9,89 \pm 0,48$
LPM	$31,04 \pm 0,63$
MK mišinys	$38,54 \pm 0,59$
KKN mišinys	$25,04 \pm 0,61$
PBK mišinys	$45,85 \pm 0,73$
IBI mišinys	$31,61 \pm 0,55$
LPM mišinys	$32,28 \pm 0,49$

Apskaičiuotas baltymų kiekis, padengęs riebalų rutulėlio paviršių, yra didesnis nei nurodytas literatūroje. Pavyzdžiui, kiti autoriai nustatė, kad riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis emulsijose, stabilizuotose įvairių PBK baltymais, buvo  $1\text{--}14 \text{ mg/m}^2$  [58], o  $\beta$ -kazeino kiekis riebalų rutulėlio paviršiuje buvo  $2\text{--}3 \text{ mg/m}^2$  [59]. Įvairių bandymų sąlygos (baltymų koncentracija vandeninėje fazėje, aliejaus ir vandeninės fazės santykis, emulsijų gamybos įranga bei temperatūra) skyrėsi, o nuo jų priklausė rezultatai.

Efektyviosios dujų chromatografijos rezultatai parodė, kad po pirmojo centrifugavimo visas kazeinas buvo pašalintas nuo riebalų rutulėlio paviršiaus, nepriklausomai nuo mėginio. LPM vandeninėje fazėje, gautoje po antrojo centrifugavimo, buvo identifikuotas tik  $\beta$ -laktoglobulinas. Tai reiškia, kad pastarasis baltymas geriau adsorbuojasi tarpfazyje nei kazeinas. Šie rezultatai neprieštarauja literatūroje aprašomai teorijai, kad globuliniai baltymai sudaro patvaresnes plėveles nei baltymai, kuriems nebūdinga antrinė struktūra (pavyzdžiui, kazeinas) [60].

### 4.3. Micelinio kazeino demineralizacijos įtaka funkcinėms savybėms

Daugelis pieno baltymų funkcinių savybių aiškinama pagrindinio baltymo – kazeino – miceline struktūra ir jos ypatumais, todėl kitame tyrimų etape buvo siekiama iš dalies suardyti kazeino micles, ištirpinant jų struktūrą palaikantį kalcį, ir nustatyti demineralizuoto kazeino funkcines savybes. Micelinį kazeiną apdorojus skirtingu TSC kiekiu, buvo gauti demineralizuoto kazeino tirpalai su skirtingu demineralizavimo laipsniu – dMK1 ir dMK2, kurie buvo naudoti tyrimuose. Kuo didesniu TSC kiekiu paveikiamos kazeino micelės, tuo daugiau kalcio iš jų pašalinama. Kadangi kalcio fosfatas jungia kazeino molekules, tai jį pašalinus molekulių tarpusavio ryšiai susilpnėja, o kazeino monomerai gali disocijuoti nuo micelės ir patekti į terpę. Taigi, dMK1 atveju terpėje dalis molekulių yra disocijavusios nuo micelės, o dMK2 tirpale disocijavusių molekulių kiekis yra didesnis nei dMK1 tirpale.

#### Demineralizuoto kazeino baltymų kiekybinis įvertinimas

Visų pirma buvo įvertintas baltymų kiekis dMK1 ir dMK2 vandeniniuose tirpaluose bei milteliuose. Rezultatai pateikti 11-oje lentelėje. Vandeniniuose dMK1 ir dMK2 tirpaluose, gautuose po diafiltracijos, baltymų kiekis mažesnis nei prieš diafiltraciją (8 %). Šis sumažėjimas gali būti paaiškintas osmosinio slėgio išsilyginimu abipus membranos, tai yra vanduo praskiedė membranoje esantį tirpalą, todėl baltymų kiekis sąlyginai sumažėjo.

11 lent. Baltymų kiekis demineralizuotame kazeine

Mėginys	Baltymų kiekis, %
dMK1 (vandeninis tirpalas)	5,09 ± 0,55
dMK2 (vandeninis tirpalas)	4,12 ± 0,69
dMK1 (milteliai)	86,26 ± 0,99
dMK2 (milteliai)	80,36 ± 0,45

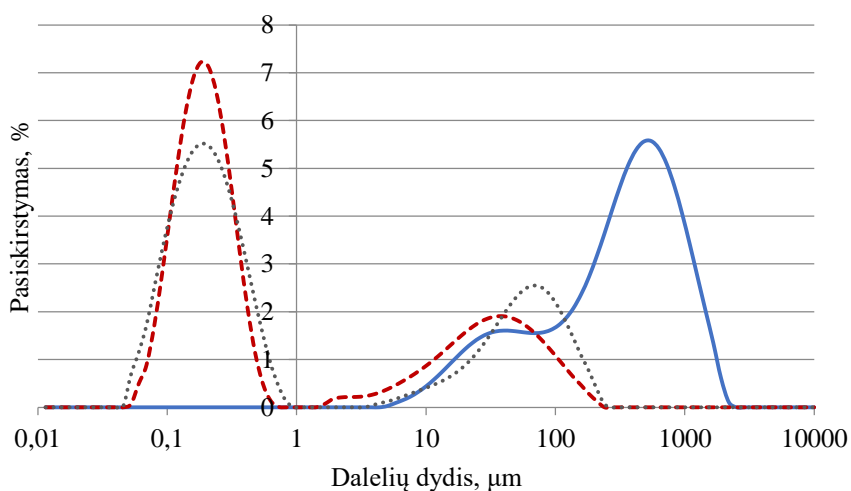
Baltymų kiekis dMK1 yra didesnis nei dMK2, nors jų gamybai buvo taikyta ta pati procedūra, tačiau dMK2 gamybos metu buvo naudotas 8,5 karto didesnis TSC kiekis, taigi, jo koncentracija membranos viduje buvo didesnė, o tai lėmė intensyvesni vandens molekulių veržimąsi į membranoje esantį tirpalą.

#### Demineralizuoto kazeino dalelių dydis

Vandeninių dMK1 ir dMK2 tirpalų, gautų po diafiltracijos, dalelių dydžio pasiskirstymas pavaizduotas 9 paveiksle. Abiems mėginiams būdingos 5–210 μm dalelės, kurios taip pat buvo pastebėtos MK vandeniniame tirpale. Jų buvimas susijęs su nepakankama rehidracija. Skirtumas



tarp dMK1 ir dMK2 yra tas, kad dauguma dalelių dMK1 yra sąlyginai stambios (160–1500  $\mu\text{m}$ ), o dMK2 – smulkios (0,06–0,7  $\mu\text{m}$ ). Demineralizuojant kazeiną, iš micelės pašalinamas kalcis, todėl micelės struktūra destabilizuojama. Kuo daugiau į tirpalą pridedama TSC, tuo daugiau kalcio pašalinama iš micelės. Atsiskyrus  $\kappa$ -kazeinui, hidrofobinės  $\alpha_{s1}$ - ir  $\alpha_{s2}$ - ir  $\beta$ -kazeino frakcijos gali sąveikauti ir sudaryti didelius (160–1500  $\mu\text{m}$ ) agregatus, kurie stabilizuojami likusiu kalcio fosfatu ir hidrofobine sąveika. Padidinus TSC kiekį, likęs kalcis taip pat pašalinamas, todėl hidrofobinių kazeino frakcijų agregatus stabilizuoti gali tik hidrofobinė sąveika.



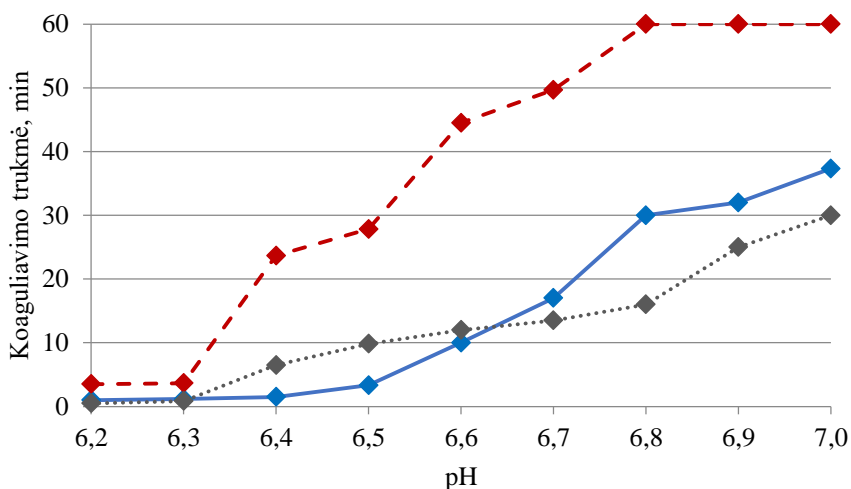
9 pav. Kazeino demineralizavimo įtaka dalelių dydžio pasiskirstymui: MK (...), dMK1 (—) ir dMK2 (---)

Vis dėlto pašalinus kalcį iš micelės, kazeinas tirpale egzistuoja monomerų ir kazeino nanodalelių pavidalu [61]. Agregatų suyrimą gali lemti ne tik kalcio trūkumas, bet ir fermento plazmino poveikis: stabilios struktūros netekę ir išsidėstymą erdvėje pakeitę baltymai dalyvauja hidrolizės procesuose [62]. Gautus rezultatus taip pat galima paaiškinti, jei mėginio paėmimas buvo netikslus, tai yra dideli agregatai galėjo ne tik egzistuoti dMK2 tirpale, bet ir nusėsti ant indo dugno, todėl analizuojamos buvo tik dispersinėje terpėje pasiskirsčiusios dalelės.

### Termostabilumas

Ištyrus demineralizacijos įtaką termostabilumui, paaiškėjo, kad dMK1 ir dMK2 tirpaluose stebima tendencija analogiškai MK tirpalui (žr. 10 pav.), tai yra didėjant pH, termostabilumas didėjo. MK termostabilumas buvo mažesnis už abiejų mėginių (dMK1 ir dMK2) termostabilumą, o dMK2 buvo termostabilus nei dMK1. Praėjus 30 min nuo kaitinimo pradžios, daugiau nei pusė

dMK2 mėginių nebuvo koaguliavę, todėl analizės laikas pratęstas iki 60 min. Vis dėlto dMK2 mėginai, kurių pH buvo 6,8–7,0, nekoaguliavo.



10 pav. Kazeino demineralizavimo įtaka termostabilumo priklausomybei nuo pH:  
MK (...), dMK1 (—) ir dMK2 (---)

Kaip ir MK atveju, termostabilumo mažėjimas mažėjant pH dMK1 ir dMK2 mėginiuose susijęs su mažėjančia elektrostatine stūma ir micelių agregavimusi. Didesnį dMK2 stabilumą, palyginus su dMK1, lemia mažesnis koloidinio kalcio fosfato kiekis dėl didesnio šio tirpalo demineralizacijos laipsnio. Kalcio fosfato ryšiai yra svarbūs baltymų koaguliavimui. Tokie patys dėsniniai aprašomi literatūroje [63, 64].

### Putojimo savybės

Demineralizuoto kazeino putojimo geba ir putų stabilumas pateiktas 12-oje lentelėje. Mėginio dMK1 putojimo geba (25 %) buvo mažesnė nei dMK2 (40 %), tačiau dMK1 sudarė stabilesnes putas nei dMK2 (10 % ir 0 % atitinkamai). Demineralizuojant kazeiną, monomerai disocijuoja nuo micelės, todėl greičiau pasiekia tarpfazį putų gamybos metu. Taigi, kuo daugiau kalcio pašalinta iš micelės, tuo didesnė putojimo geba [65].

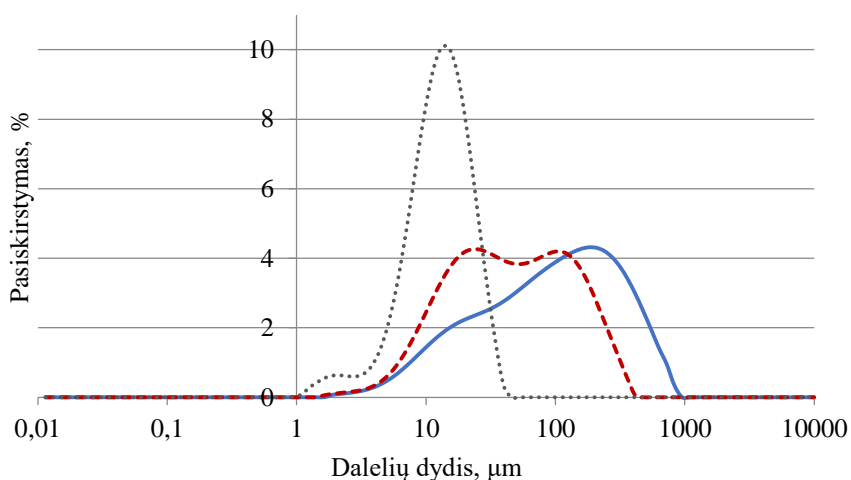
12 lent. Kazeino demineralizavimo įtaka putojimo gebai ir putų stabilumui

Mėginys	Putojimo geba, %	Putų stabilumas, %
MK	77,5 (± 2,5)	16,1 (± 4,2)
dMK1	25,0 (± 0,0)	10,0 (± 2,0)
dMK2	40,0 (± 0,0)	0,00 (± 0,0)

Vis dėlto disocijavus  $\kappa$ -kazeinui, hidrofobinės frakcijos gali agreguotis, sudaryti nuosėdas, kurios nedalyvauja putų stabilizavime. Dėl šios priežasties MK putojimo geba yra didesnė nei dMK1 ir dMK2. Be to, baltymų koncentracija MK (8 %) buvo didesnė nei dMK1 ir dMK2 (5,09 % ir 4,12 % atitinkamai), o tai susiję su putojimo savybėmis [57]. Neatsižvelgiant į baltymų koncentracijos skirtumus bei frakcijų tirpumą, pastebima tendencija, kad mažėjant koloidinio kalcio fosfato kiekiui, putų stabilumas taip pat mažėja: MK – 16,1 %, dMK1 – 10 %, dMK2 – 0 %. Kalcio jonai reikšmingi micelės stabilizavimui. Kuo daugiau kalcio jonų, tuo daugiau ryšių, lemiančių plėvelės patvarumą bei putų stabilumą.

### Emulsavimo savybės

Emulsijose, pagamintose naudojant dMK1 ir dMK2 vandeninius tirpalus, kuriuose baltymų koncentracija atitinkamai buvo 5,09 % ir 4,12 %, dalelių dydis buvo plačiai pasiskirstęs (žr. 11 pav.). Riebalų rutulėliai dMK1 emulsijoje buvo 1,7–830  $\mu\text{m}$  dydžio, o dMK2 – 1,5–420  $\mu\text{m}$ . Pastarojoje emulsijoje dalelių dydžio moda buvo 25  $\mu\text{m}$ , o dMK1 – 180  $\mu\text{m}$ . Šie rezultatai rodo, kad pašalinus daugiau kalcio iš micelės ją sudarantys baltymai greičiau adsorbuojasi tarpfazėje, nes tarpusavyje nėra sujungti kalcio fosfato ryšiais ir tirpale egzistuoja kaip monomerai [46, 61].

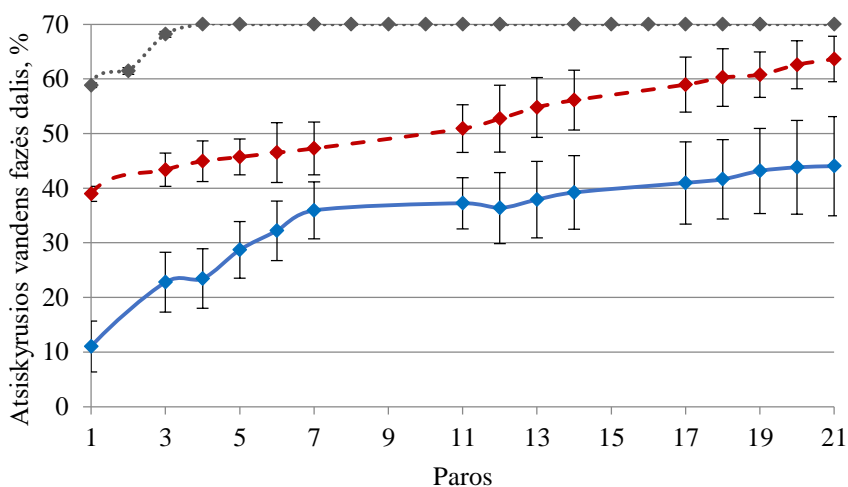


11 pav. Kazeino demineralizavimo įtaka dalelių dydžio pasiskirstymui emulsijose, kurių stabilizavimui naudoti MK (...), dMK1 (—) ir dMK2 (---)

Nors šie dėsningumai pastebimi tarp dMK1 ir dMK2 emulsijų, palyginus su MK, pastarajame mėginyje susidarė mažesni riebalų rutulėliai (8,5  $\mu\text{m}$ , esant baltymų koncentracijai 2 %). Taigi, dMK1 ir dMK2 emulsijose nustatytos didelės dalelės (420–830  $\mu\text{m}$ ) galėjo būti tirpumą praradusių kazeino frakcijų agregatai.

Emulsijų, pagamintų naudojant dMK1 ir dMK2, stabilumas pavaizduotas 12-ame paveiksle. Mėginių stabilumas tyrimo metu nuosekliai mažėjo, staigaus stabilumo pokyčio, kuris buvo užfiksuotas MK atveju, nebuvo. Palyginus emulsiją, stabilizuotą MK, su emulsijomis, stabilizuotomis dMK1 arba dMK2, pastarųjų išsisluoksniavimas įvyko ne taip greitai ir ne taip intensyviai. Šis skirtumas gali būti susijęs su skirtingomis baltymų koncentracijomis vandens fazėje: MK – 1,2 %, dMK1 – 5,09 % ir dMK2 – 4,12 %.

Atsiskyrusios vandens fazės kiekis emulsijoje, stabilizuotoje dMK1, per 21 parą padidėjo nuo 7,7 % iki 30,8 %, o dMK2 – nuo 27,3 % iki 44,5 %. Taigi, dMK1 emulsija buvo stabilesnė nei dMK2. Daugiau koloidinio kalcio fosfato turintis dMK1 sudarė patvaresnę plėvelę nei dMK2. Tokie dėsningumai aprašomi literatūroje ir aiškinami elektrostatinės stūmos mažėjimu tarp kazeino molekulių dėl susidarančių ryšių tarp kalcio ir fosfoserino liekanų [66]. Su emulsijų stabilumo skirtumu gali būti susijęs ir baltymų tirpumas: esant didesniai demineralizavimo laipsniui, hidrofobinės frakcijos labiau agreguojasi, praranda tirpumą ir negali adsorbuotis tarpfazyje, todėl dMK2 emulsijos stabilumas mažesnis nei dMK1.



12 pav. Kazeino demineralizavimo įtaka emulsijų, stabilizuotų MK (...), dMK1 (—) ir dMK2 (---) baltymais, stabilumui

Nors kalcio kiekis MK micelėse buvo didžiausias, emulsija, stabilizuota MK baltymais, išsisluoksniavo daug greičiau nei dMK1 ar dMK2 emulsijos, tačiau koloidinio kalcio fosfato įtaką emulsijų stabilumo skirtumui tarp šių mėginių vertinti sudėtinga dėl skirtingos baltymų koncentracijos.

#### Demineralizuoto kazeino adsorbsija tarpfazyje a/v

Demineralizuotu kazeinu stabilizuotų emulsijų tarpfazyje adsorbuotų baltymų kiekis bei riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis pateiktas 13-oje lentelėje. Emulsijos, stabilizuotos dMK1, a/v tarpfazyje adsorbavosi mažiau baltymų (62,54 %) nei emulsijos, stabilizuotos dMK2 (66,21 %). Didesnis micelės disagregavimo laipsnis lemia didesnę kazeino monomerų kiekį terpėje, kurie geba greičiau adsorbuotis tarpfazyje. Palyginus MK su demineralizuotais mėginiais, gauti rezultatai patvirtino, kad emulsavimo savybės pagerėja, pašalinus koloidinį kalcio fosfatą. Šiuo atveju hidrofobinių kazeino frakcijų įtaka nebuvo pastebėta, kaip putojimo gebos analizėje (MK putojo geriau nei dMK1 ar dMK2). Tokius rezultatus galima paaiškinti energijos sąnaudų skirtumu gaminant putas ir emulsijas: emulsijų gamyboje šlyties jėga galėjo skatinti kazeino adsorbciją tarpfazyje.

13 lent. Demineralizuoto kazeino adsorbsija tarpfazyje

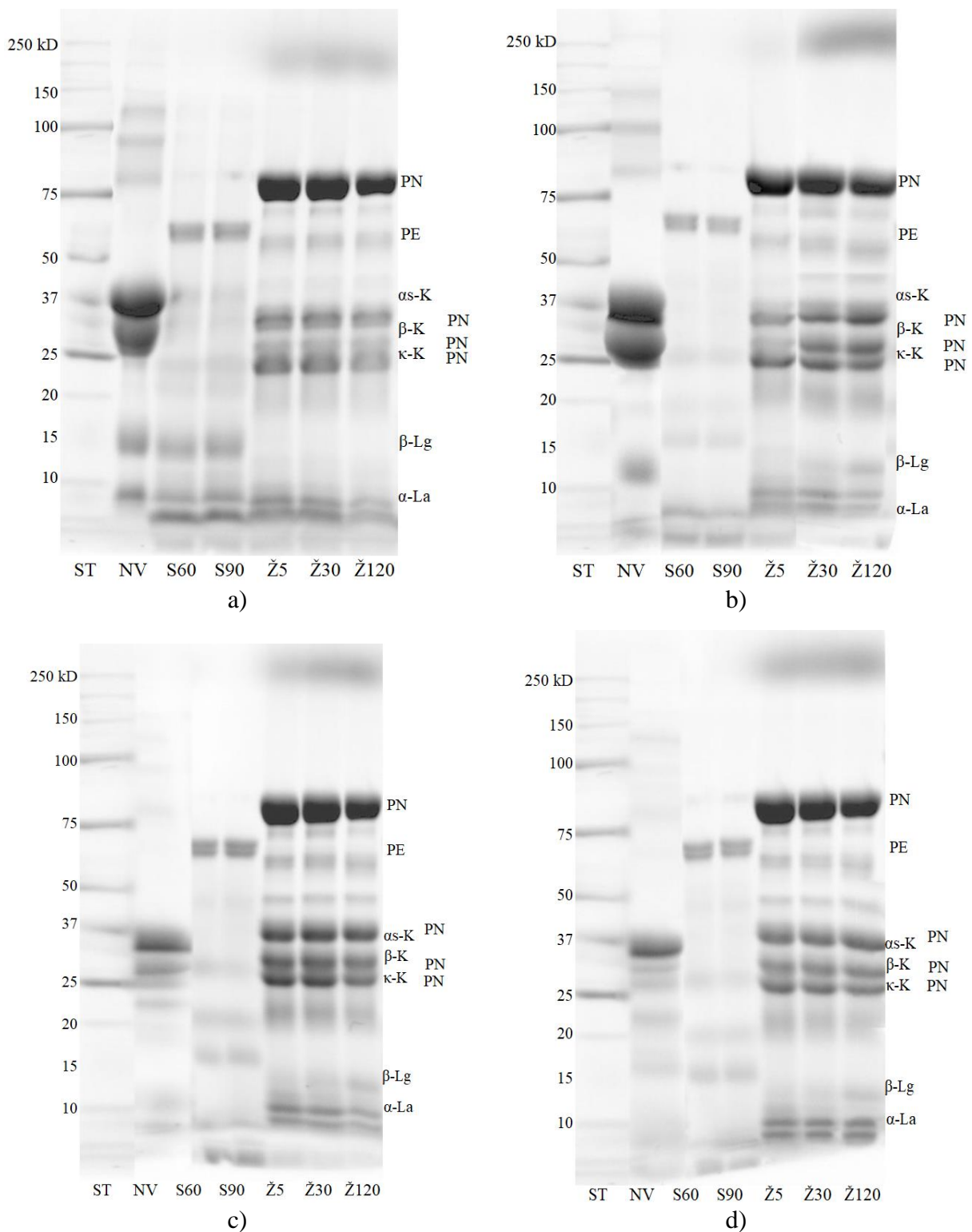
Mėginys	Tarpfazyje adsorbuotų baltymų kiekis, %	Riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis, mg/m <sup>2</sup>
MK	25,07 ± 0,47	15,60 ± 0,55
dMK1	62,54 ± 0,54	1638,54 ± 1,60
dMK2	66,21 ± 0,66	772,96 ± 0,99

Didėjant baltymų koncentracijai vandeninėje fazėje, adsorbuotų baltymų kiekis taip pat didėja [46]. Būtent tai pastebima tirtuose mėginiuose, juos lyginant su mėginiais, aprašytais literatūroje, arba tarpusavyje, pavyzdžiui, baltymų koncentracija dMK1 vandeninėje fazėje 5,09 %, dMK2 – 4,09 %, o MK – 2 %, bei riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis 1638,54 mg/m<sup>2</sup>, 772,96 mg/m<sup>2</sup> ir 15,60 mg/m<sup>2</sup> atitinkamai. Didelis riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis aiškinamas daugiasluoksnių struktūrų formavimusi: iš pradžių susiformuoja baltymų monosluoksnis, prie kurio po to jungiasi kiti baltymai [23, 67]. Šio proceso varomoji jėga yra baltymų molekulių nepolinių šoninių grandinių pašalinimas iš vandeninės fazės [67]. Ypač didelis riebalų rutulėlio paviršių padengusių baltymų kiekis dMK1 ir dMK2 atveju galėjo būti susijęs su plačiu dalelių dydžio pasiskirstymu, dėl ko parinkti vidutinį dalelių skersmenį sudėtinga.

#### 4.4. Micelinio kazeino demineralizacijos įtaka virškinamumui

Šio darbo etapo tikslas buvo įvertinti kazeino demineralizacijos įtaką jo virškinamumui. Buvo atliktas micelinio kazeino bei demineralizuoto kazeino virškinimas *in vitro* modelinėje sistemoje, imituojančioje sąlygas dviejuose virškinamojo trakto etapuose – skrandžio ir žarnyno. Šiame kazeino virškinamumo tyrime lieso pieno milteliai buvo naudojami kaip kontrolinis mėginys. Baltymų virškinamumas buvo nustatytas periodiškai imant virškinamų baltymų mėginius (kaip nurodyta 3.3.3.1. skyriuje) ir vertinant jų kokybinės sudėties pokyčius gelių elektroforezės, laisvų amino grupių kiekį leucino ekvivalentais ir kapiliarinės elektroforezės metodu.

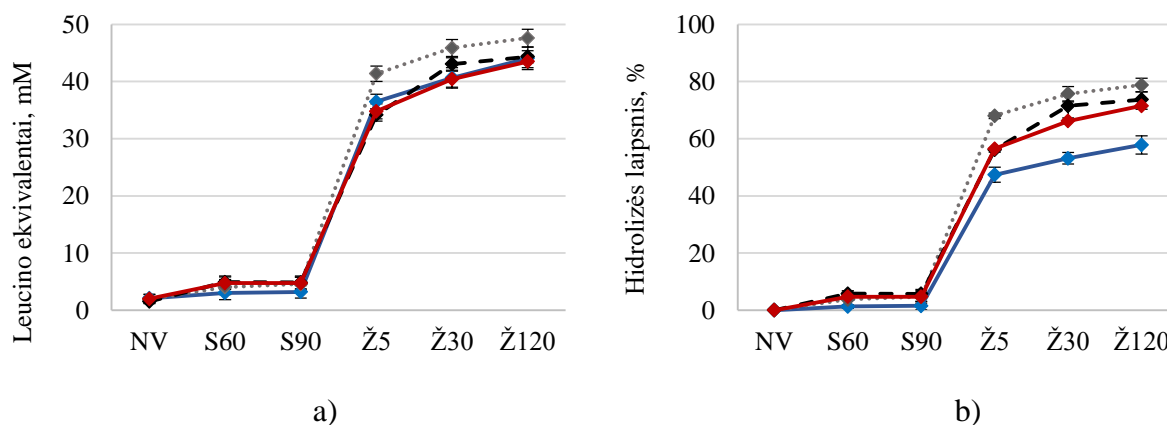
Gelių elektroforezės metu gautuose paveiksluose (žr. 13 pav.) pavaizduoti vandeninių tirpalų baltymai ir jų hidrolizės produktai įvairių *in vitro* virškinimo stadijų metu. Nevirškintame LPM vandeniniame tirpale (žr. 13 pav. a) matomos  $\alpha_s$ -,  $\beta$ - ir  $\kappa$ -kazeino frakcijos,  $\beta$ -laktoglobulinas ir  $\alpha$ -laktalbuminas. Tai pagrindiniai pieno baltymai, juos identifikuoja ir kiti autoriai [68, 69]. Po 60 min virškinimo skrandžio fazėje kazeinas buvo suskaidytas į mažesnės molekulinės masės junginius: matomos blyškios juostos, reprezentuojančios 20–25 kD molekules bei molekules, mažesnes nei 10 kD. Šioje fazėje esančios ~ 60 kD molekulės yra fermentas pepsinas [70], kuris aktyviai skaidė kazeiną, tačiau mažai veikė  $\alpha$ -laktalbuminą ir  $\beta$ -laktoglobuliną. Pastarasis buvo suskaidytas per pirmąsias 5 min virškinimo plonosios žarnos fazėje, veikiant fermentų mišiniui pankreatinui. Pankreatiną sudarė keletas fermentų, todėl plonosios žarnos fazėje matomos ~ 75 kD, 25–35 kD molekules reprezentuojančios juostos. Palyginus nevirškintą LPM vandeninį tirpalą su MK (žr. 13 pav. b), pastarajame nėra  $\alpha$ -laktalbumino, o  $\beta$ -laktoglobulino juosta ne tokia ryški. Šie baltymai pašalinami MK gamybos metu. Nevirškintame MK vandeniniame tirpale aiškiai matomos kazeiną reprezentuojančios juostos. Kaip ir LPM atveju, virškinant MK 60 min skrandžio fazėje, kazeinas buvo suskaidytas į mažesnės molekulinės masės junginius. Skrandžio ir plonosios žarnos fazėse taip pat matomos būdingos pepsino ir pankreatino juostos.



13 pav. Baltymai ir jų hidrolizės produktai įvairiose *in vitro* virškinimo stadijose LPM (a), MK (b), dMK1 (c) ir dMK2 (d) vandeniniuose tirpaluose; čia: ST – standartas, NV – nevirškintas mėginys, S60 ir S90 – skrandžio fazės mėginiai, atitinkamai virškinti 60 ir 90 min, Ž5, Ž30 ir Ž120 – plonosios žarnos fazės mėginiai, atitinkamai virškinti 5, 30 ir 120 min, PN – pankreatinas, PE – pepsinas,  $\alpha_s$ -K,  $\beta$ -K,  $\kappa$ -K – atitinkamai  $\alpha_s$ -,  $\beta$ - ir  $\kappa$ -kazeinas,  $\beta$ -Lg –  $\beta$ -laktoglobulinas,  $\alpha$ -La –  $\alpha$ -laktalbuminas

Demineralizavus kazeiną, jo kiekis mėginiuose mažėjo, didėjant demineralizavimo laipsniui, nepriklausomai nuo to, kad baltymų kiekis mėginiuose buvo vienodas. Kazeino frakcijas reprezentuojančios juostos nevirškintame dMK1 mėginyje (žr. 13 pav. c) yra ryškesnės nei dMK2 (žr. 13 pav. d), tačiau labiau išblyškusios nei MK. Šiuos rezultatus galima pagrįsti tuo, kad suardžius micelę hidrofobinės frakcijos praranda tirpumą, sudaro nuosėdas, todėl stebimas jų kiekio sumažėjimas. Palyginus nevirškintą dMK1 mėginį su dMK2, matyti, kad demineralizavimui jautresnis ir galimai labiau praradęs tirpumą yra  $\beta$ -kazeinas nei  $\alpha_s$ -kazeinas, tai yra didėjant demineralizavimo laipsniui,  $\beta$ -kazeiną reprezentuojančios juostos ryškumas sumažėja daug labiau nei vaizduojančios  $\alpha_s$ -kazeiną. Vandeninių dMK1 ir dMK2 tirpalų skrandžio virškinimo fazėse matomos blyškios juostos, reprezentuojančios ~ 20 kD ir mažesnes nei 10 kD molekules, susidarančias kazeino hidrolizės metu. Abiejų mėginių skrandžio ir plonosios žarnos fazėse taip pat matomos būdingos fermentų juostos. Micelės disagregavimo įtaką virškinamumui gelių elektroforezės metodu vertinti sudėtinga, nes susiduriama su tirpumo problema, o naudojami fermentai yra labai aktyvūs ir per greitai hidrolizuoja baltymus, kad būtų galima užfiksuoti pokyčius.

Hidrolizės įvertinimas laisvų amino grupių kiekiu, išreikštu leucino ekvivalentais, yra naudingas, kai norima palyginti pieno baltymų virškinamumą su kitos kilmės baltymų virškinamumu. Kadangi pieno baltymai yra plačiai išnagrinėti, žinoma jų aminorūgščių sudėtis bei seka, molekulinė masė, tai virškinamumą tiksliau galima įvertinti, apskaičiavus hidrolizės laipsnį (HL). Baltymų hidrolizės įvertinimas leucino ekvivalentais ir HL pateiktas 14-ame paveiksle.



14 pav. Baltymų hidrolizės įvertinimas leucino ekvivalentais (a) ir apskaičiuotu HL (b) įvairiose *in vitro* virškinimo stadijose LPM (—), MK (....), dMK1 (— —) ir dMK2 (—) vandeniniuose tirpaluose; čia: NV – nevirškintas mėginys, S60 ir S90 – skrandžio fazės mėginiai, atitinkamai virškinti 60 ir 90 min, Ž5, Ž30 ir Ž120 – plonosios žarnos fazės mėginiai, atitinkamai virškinti 5, 30 ir 120 min

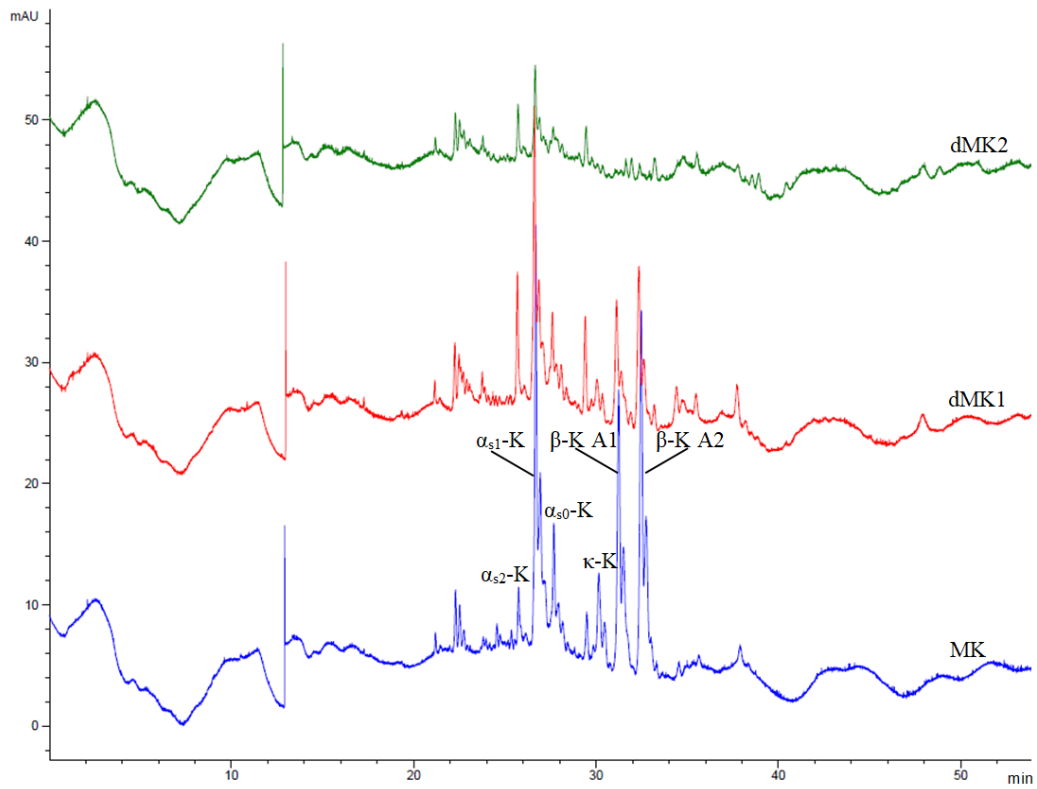


Hidrolizė prasideda skrandžio fazėje (HL 1,3–5,8 %), o plonosios žarnos fazėje vyksta greitai (HL 47,4–78,8 %). MK, dMK1 ir dMK2 buvo virškinami geriau nei LPM visose virškinimo stadijose. Nuo kitų mėginių LPM skiriasi tuo, kad juose yra išrūgų baltymų. Be to, gelių elektroforezės rezultatai parodė, kad  $\beta$ -laktoglobulinas sunkiai virškinamas skrandžio fazės metu. Taigi, apibendrinus šių dviejų bandymų rezultatus, galima teigti, kad kazeinas yra virškinamas greičiau nei išrūgų baltymai, o dėl lėtesnio pastarųjų virškinimo gaunamas mažesnis LPM baltymų HL, palyginus su kitais mėginiais.

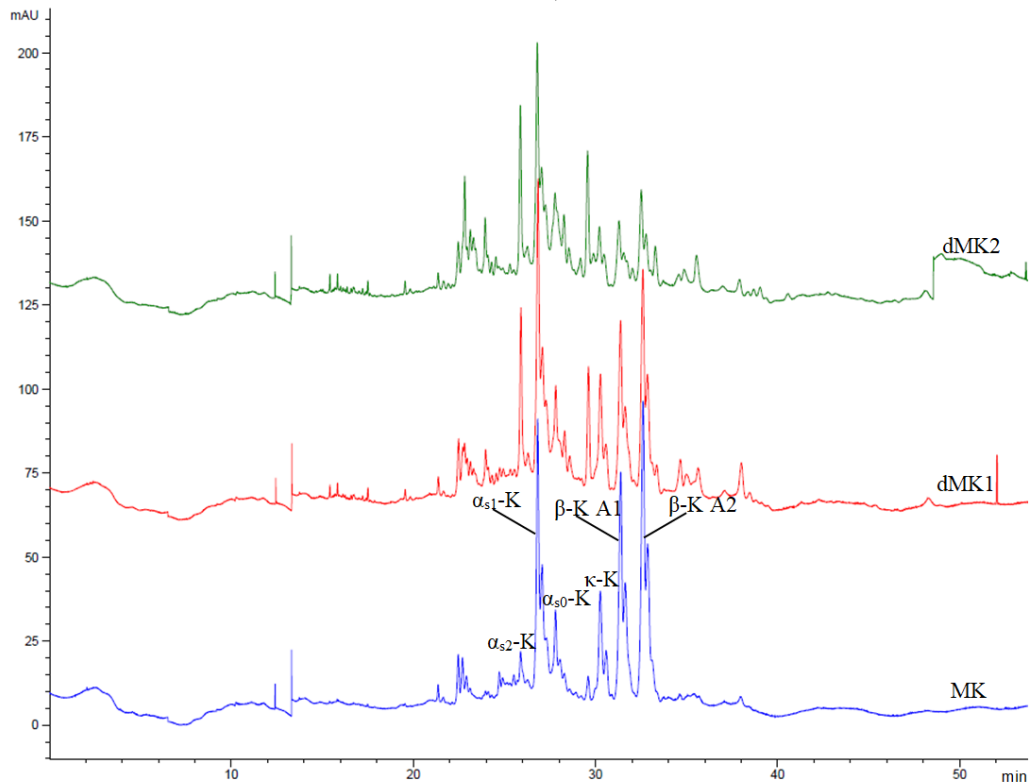
Micelės disagregavimas daro įtaką kazeino virškinamumui. Vandeninguose tirpaluose virškinamumas blogėjo, didėjant demineralizavimo laipsniui: geriausiai buvo virškinamas MK (galutinis HL 78,8 %), o dMK1 ir dMK2 hidrolizė vyko ne taip intensyviai (galutiniai HL 73,7 % ir 71,5 % atitinkamai). Fermentinės reakcijos priklausomos nuo fermento bei substrato erdvinės struktūros, tai yra ne tik fermente turi egzistuoti aktyvieji centrai, prie kurių jungiasi substratas, bet ir substrato erdvinis išsidėstymas turi būti palankus fermento–substrato komplekso susidarymui [71]. Vykstant kazeino demineralizacijai, micelės struktūra keičiasi, disocijuojant monomerams. Atsiskyrus  $\kappa$ -kazeinui, hidrofobinės kazeino frakcijos patenka į vandeninę terpę, todėl molekulės skatinamos suartėti. Šie pokyčiai gali trikdyti fermentų veiklą, kuri susijusi su mažesniu dMK1 ir dMK2 HL, palyginus su MK. Be to, pienas yra pagrindinis maisto medžiagų šaltinis naujagimiams, galimai dėl šios priežasties kazeino virškinamumas geresnis būtent natyvinėje būsenoje, tai yra tokios formos, kokį naujagimis gauna iš motinos [72].

Siekiant nustatyti, kurios kazeino frakcijos yra lengviau virškinamos, šių frakcijų tyrimui skirtinguose virškinimo etapuose buvo pritaikyta kapiliarinė elektroforezė. Nevirškintų MK, dMK1 ir dMK2 mėginių elektroferogramose (duomenys nepateikiami), remiantis literatūra [73], buvo identifikuotos  $\alpha_{s0}$ –,  $\alpha_{s1}$ –,  $\alpha_{s2}$ –,  $\beta$ – (A1 ir A2 variantai) ir  $\kappa$ -kazeino frakcijos. Nevirškintame LPM mėginyje be minėtų baltymų taip pat buvo  $\alpha$ -laktalbumino ir  $\beta$ -laktoglobulino, o  $\alpha_{s0}$ – ir  $\alpha_{s2}$ -kazeino frakcijos nebuvo aptiktos. Mėginių, gautų po 60 bei 90 min virškinimo skrandžio fazėje, elektroferogramose nebuvo nei kazeinui, nei išrūgų baltymams būdingų smailių. Tai reiškia, kad baltymai buvo suskaidyti į mažesnės molekulinės masės junginius, kurie elektroferogramose buvo matomi kaip didelis kiekis mažų smailių įvairiais migracijos laikais. Šie rezultatai yra analogiški rezultatams, gautiems gelių elektroforezės metu.

Kapiliarinę elektroforezę pritaikius MK, dMK1 ir dMK2 vandeninių tirpalų bei IPUF tirpalų analizei, paaiškėjo, kad baltymų tirpumas priklauso nuo tirpale esančių jonų. MK, dMK1 ir dMK2 vandeninių tirpalų elektroferogramoje (žr. 15 pav. a) matomos būdingos kazeino frakcijų smailės.



a)



b)

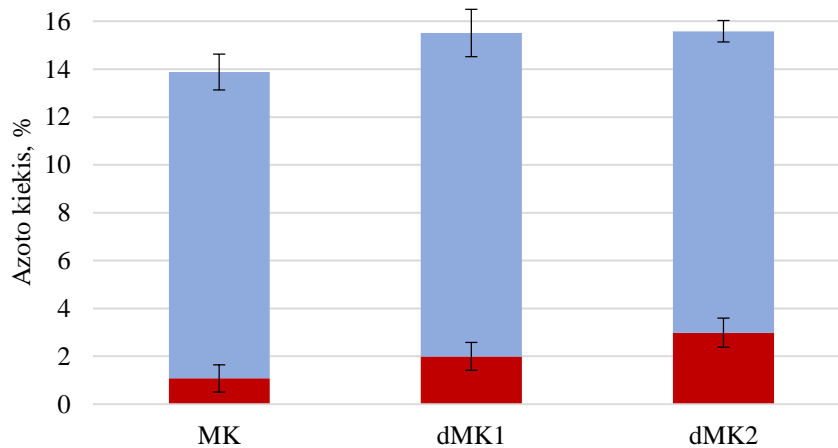
15 pav. MK (—), dMK1 (—) ir dMK2 (—) vandeninių tirpalų (a) ir IPUF tirpalų (b) elektroferogramos; čia  $\alpha_{s0}$ -K,  $\alpha_{s1}$ -K,  $\alpha_{s2}$ -K,  $\beta$ -K (A1 ir A2 variantai) ir  $\kappa$ -K atitinkamai  $\alpha_{s0}$ -,  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - (A1 ir A2 variantai) ir  $\kappa$ -kazeino frakcijos

Būdingos kazeino frakcijų smailės taip pat pastebimos IPUF tirpalų elektroferogramoje (žr. 15 pav. b). Nors vandeniniai ir IPUF mėginiai buvo ruošti analogiškai, tai yra baltymų koncentracija juose buvo vienoda, tų pačių frakcijų kiekiai vandeniniuose tirpaluose buvo daug mažesni nei IPUF tirpaluose. Pavyzdžiui,  $\alpha_{s1}$ -kazeino MK vandeniniame tirpale buvo 2,2 karto mažiau nei IPUF tirpale. Taigi, terpėje sudarius pienui būdingą elektrolitų balansą, kazeino frakcijos tampa tirpesnės, palyginus su jų tirpumu distiliuotame vandenyje.

Nepriklausomai nuo to, ar milteliai buvo tirpinami distiliuotame vandenyje, ar IPUF, didėjant demineralizavimo laipsniui, nustatytų kazeino frakcijų kiekis mažėjo. Vis dėlto koloidinio kalcio fosfato kiekio mažėjimas nevienodai veikia skirtingas frakcijas: labiausiai sumažėja  $\beta$ -kazeiną iliustruojančios smailės, o  $\alpha_{s2}$ -kazeiną vaizduojanti smailė pakinta sąlyginai nedaug. Taikant gelių elektroforezę, taip pat buvo pastebėta, kad demineralizavimas didesnę įtaką daro  $\beta$ -kazeino tirpumui nei  $\alpha_s$ -kazeino.  $\beta$ -kazeino kiekio mažėjimą, didėjant demineralizavimo laipsniui, galima sieti ne tik su tirpumo mažėjimu, bet ir plazmino aktyvumu. Plazminas yra susijęs su kazeino micelėmis [74], o ją suardžius patenka į terpę kartu su kazeino monomerais [75]. Tokiu būdu kazeinas tampa labiau pasiekiamas fermentui plazminui, katalizuojančiam proteolizę [75]. Literatūroje nurodoma, kad iš visų kazeino frakcijų  $\beta$ -kazeinas yra labiausiai veikiamas plazmino [76, 77], todėl šios frakcijos kiekio mažėjimas stebimas, didėjant demineralizavimo laipsniui.

Kapiliarinės elektroforezės rezultatai patvirtino, kad beveik visas kazeinas yra suvirškinamas skrandžio fazės metu. Taikant kapiliarinę elektroforezę, taip pat buvo nustatyta, kad elektrolitų balansas svarbus kazeino frakcijų tirpumui, o skirtingų frakcijų tirpumas, esant jonų kokybiniais ir kiekybiniais pokyčiams, kinta nevienodai. Micelės suardymas lemia plazmino bei kazeino monomerų patekimą į terpę, todėl skatinama jų proteolizė.

Siekiant išaiškinti tam tikrų kazeino frakcijų kiekio mažėjimą nevirškintuose mėginiuose didėjant demineralizavimo laipsniui, buvo nustatytas nekazeininio azoto kiekis, kuris pavaizduotas 16-ame paveiksle kaip dalis bendro azoto kiekio MK, dMK1 ir dMK2 milteliuose. Didėjant demineralizavimo laipsniui, nekazeininio azoto kiekis didėjo. MK, dMK1 ir dMK2 milteliuose jo atitinkamai buvo 1,07 %, 1,99 % ir 2,99 %, o tai sudarė 8,39 %, 14,75 % ir 23,70 % viso milteliuose esančio azoto.



16 pav. Nekazeininio azoto kiekis (—) bendrame azote (—)

Nekazeininio azoto kiekio didėjimą galėjo nulemti proteolitinio fermento plazmino aktyvumas. Demineralizuojant kazeiną ir jo monomerams patenkant į terpę, plazminas gali greičiau sudaryti fermento–substrato kompleksą ir taip skatinti baltymų hidrolizę [75]. Plazmino aktyvumas galėtų būti ginčytinas, jei pienas, naudojamas MK gamyboje, būtų apdorotas ultra aukšta temperatūra, nes šiomis sąlygomis plazminas denatūruoja, tačiau pieną pasterizuojant 72°C temperatūroje 15 sekundžių plazmino aktyvumas sumažėja tik iki 10 % [78]. Proteolizę taip pat gali skatinti mikrobinės kilmės fermentai. Nors gaminant dMK1 ir dMK2 diafiltracija nebuvo vykdoma aseptinėmis sąlygomis, buvo naudojamas natrio azidas, stabdantis mikrobinę veiklą, todėl baltymų hidrolizė labiau susijusi su plazminu, o ne mikrobinės kilmės fermentais.

Taigi, proteolizė intensyvėjo, didėjant demineralizavimo laipsniui, o šiuos rezultatus susiejus su kapiliarinės elektroforezės rezultatais galima teigti, kad didžiausią įtaką nekazeininio azoto kiekio didėjimui darė  $\beta$ -kazeino hidrolizės produktai.

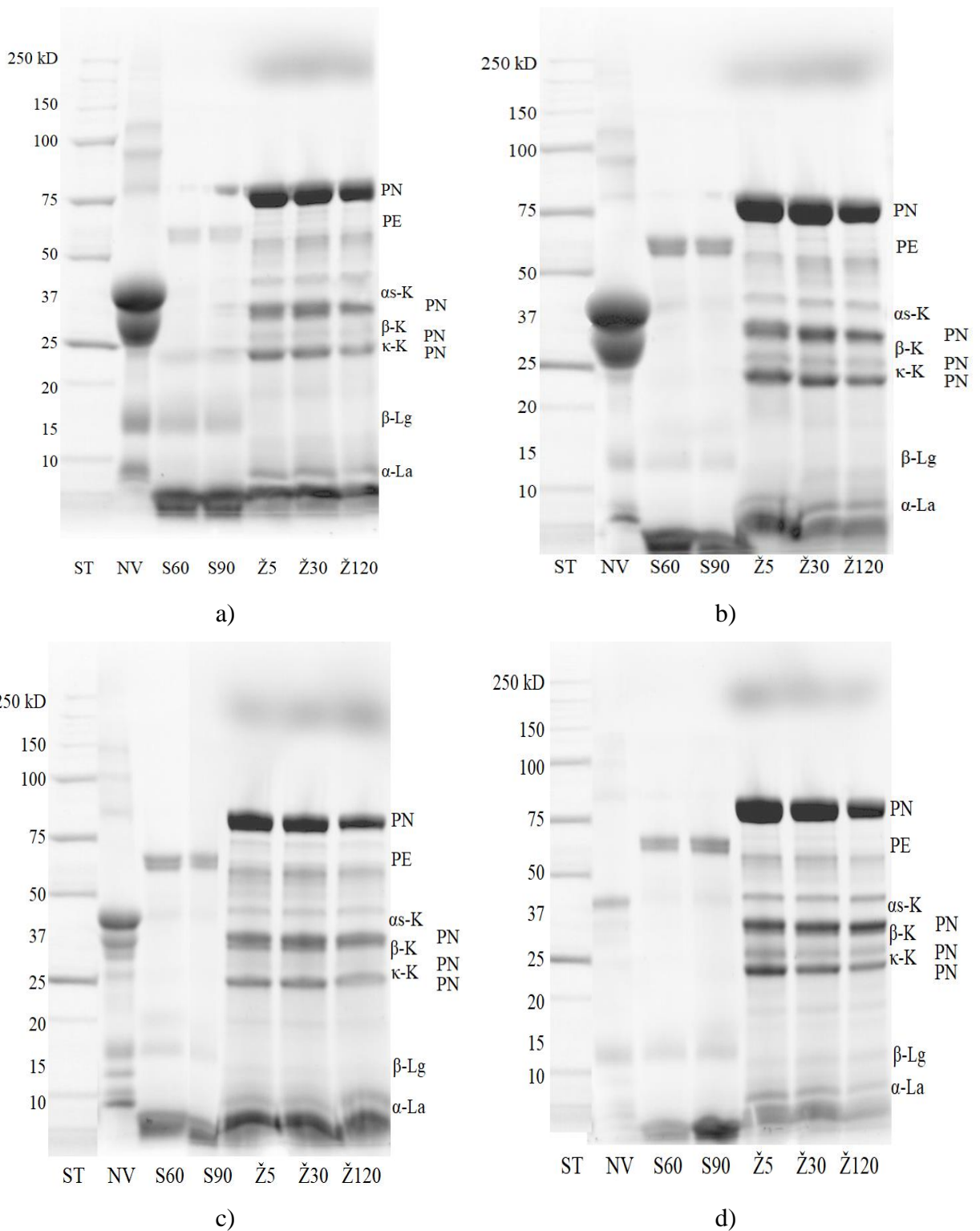
#### 4.5. Pieno baltymų virškinamumo tirpale ir aliejus vandenyje tipo emulsijų tarpfazyje palyginimas

Ankstesniuose tyrimuose buvo nustatyta, kad kazeino demineralizacija daro įtaką baltymų adsorbcijai riebalų rutulėlio paviršiuje, gaminant šiais baltymais stabilizuotas emulsijas. Taip pat buvo nustatyta kazeino demineralizacijos įtaka baltymų virškinamumui. Mokslinėje literatūroje yra duomenų apie skirtingą baltymų virškinamumą, kai jie yra vandeniniame tirpale ir kai jie adsorbuojasi tarpfazyje a/v [79]. Todėl paskutinio darbo etapo tikslas buvo palyginti įvairių pieno baltymų virškinamumą tirpale bei tarpfazyje a/v.

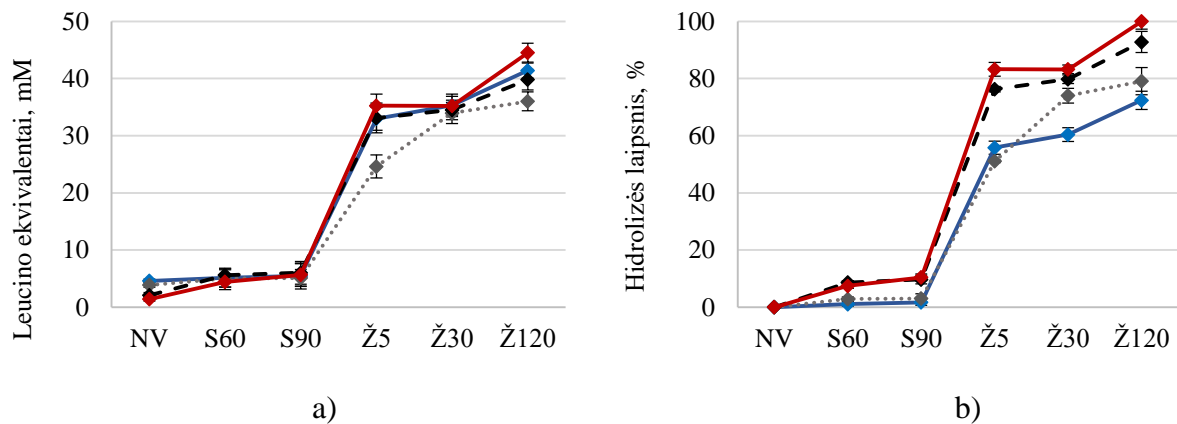
Atlikus emulsijų virškinimą *in vitro* būdu ir įvertinus tarpfazyje a/v esančių baltymų hidrolizę, galima pastebėti keletą skirtumų, palyginus su baltymų vandeninių tirpalų virškinamumo rezultatais. Nevirškintame LPM mėginyje (žr. 17 pav. a) matomi tie patys baltymai:  $\alpha_s$ -,  $\beta$ - ir  $\kappa$ -kazeinas,  $\beta$ -laktoglobulinas,  $\alpha$ -laktalbuminas. Skrandžio fazėje kazeino frakcijos yra hidrolizuojamos, todėl susidaro mažesnės nei 10 kD molekulės, o  $\sim 25$  kD molekulės reprezentuojančios juostos yra labai blyškios. Vandeninio LPM tirpalo skrandžio fazėje 20–25 kD molekulių buvo daugiau nei LPM emulsijos, o mažesnių nei 10 kD – mažiau. Be to LPM emulsijose skrandžio fazėje neliko  $\alpha$ -laktalbumino, o  $\beta$ -laktoglobuliną reprezentuojančios juostos tapo blyškesnės, palyginus tiek su nevirškintu mėginiu, tiek su skrandžio fazėje virškintais LPM vandeniniais tirpalais. Tai galėtų reikšti, kad baltymams išsilanksčius ir adsorbavusis tarpfazyje jie pasidaro labiau pasiekiami fermentams, todėl hidrolizė vyksta intensyviau. Nevirškintame MK emulsijos mėginyje (žr. 17 pav. b) identifikuoti būdingieji pieno baltymai, kurie skrandžio fazės metu yra suvirškinami. Matomos tik neryškios  $\beta$ -laktoglobulino juostos. Gaminant ir tiriant emulsijas, stabilizuotas dMK1 (žr. 17 pav. c) ar dMK2 (žr. 17 pav. d), nevirškintuose mėginiuose pastebima ta pati tendencija, kaip ir vandeninių tirpalų atveju: didėjant demineralizavimo laipsniui, nustatytas kazeino kiekis mažėja. Kaip ir prieš tai, šis reiškinys gali būti susijęs su hidrofobinių frakcijų tirpumo mažėjimu. Visuose mėginiuose buvę baltymai visiškai suvirškinti plonosios žarnos fazėje per 5 min. Visų mėginių skrandžio ir plonosios žarnos fazėse matomos būdingos pepsiną ir pankreatiną reprezentuojančios juostos.

Palyginus baltymų virškinamumą, ištirtą taikant gelių elektroforezę, vandeniniame tirpale ir emulsijos riebalų rutulėlio paviršiuje, panašu, kad pastaruoju atveju hidrolizė vyksta intensyviau.

Pritaikius spektrofotometrinę analizę emulsijas stabilizuojančių baltymų virškinamumo tyrimui, hidrolizė buvo įvertinta leucino ekvivalentais bei HL (žr. 18 pav.). Remiantis leucino ekvivalentais (žr. 18 pav. a), pastebėta, kad virškinimas skrandžio fazėje vyko intensyviau baltymams esant emulsijos riebalų rutulėlio paviršiuje, o plonosios žarnos fazėje hidrolizė buvo greitesnė vandeniniuose tirpaluose nei emulsijose.



17 pav. Baltymai ir jų hidrolizės produktai įvairiose *in vitro* virškinimo stadijose LPM (a), MK (b), dMK1 (c) ir dMK2 (d) emulsijose; čia: ST – standartas, NV – nevirškintas mėginys, S60 ir S90 – skrandžio fazės mėginiai, atitinkamai virškinti 60 ir 90 min, Ž5, Ž30 ir Ž120 – plonosios žarnos fazės mėginiai, atitinkamai virškinti 5, 30 ir 120 min, PN – pankreatinas, PE – pepsinas, α<sub>s</sub>-K, β-K, κ-K – atitinkamai α<sub>s</sub>-, β- ir κ-kazeinas, β-Lg – β-laktoglobulinas, α-La – α-laktalbuminas



18 pav. Baltymų hidrolizės įvertinimas leucino ekvivalentais (a) ir apskaičiuotu HL (b) įvairiose *in vitro* virškinimo stadijose LPM (—), MK (....), dMK1 (— —) ir dMK2 (—) emulsijose; čia: NV – nevirškintas mėginys, S60 ir S90 – skrandžio fazės mėginiai, atitinkamai virškinti 60 ir 90 min, Ž5, Ž30 ir Ž120 – plonosios žarnos fazės mėginiai, atitinkamai virškinti 5, 30 ir 120 min

Apskaičiavus HL, buvo aišku, kad baltymų virškinamumas priklausė nuo to, ar jie buvo vandeniniame tirpale, ar emulsijos tarpfazyje. Visais atvejais (išskyrus MK) baltymai buvo hidrolizuojami geriau būdami tarpfazyje nei vandeniniuose tirpaluose. Galutiniai LPM, dMK1 ir dMK2 emulsijų baltymų HL buvo 72,4 %, 92,8 % ir 100 %, o vandeniniuose tirpaluose atitinkamai – 57,8 %, 73,7 % ir 71,5 %. MK greičiau buvo virškinamas vandeniniame tirpale nei emulsijoje, pavyzdžiui, po 5 min virškinimo plonosios žarnos fazėje MK vandeninio tirpalo baltymų HL buvo 68 %, o emulsijos baltymų HL – 51 %. Nepaisant to, galutiniai HL vandeniniame tirpale ir emulsijoje buvo panašūs – 78,8 % ir 79,1 % atitinkamai.

Įdomu yra tai, kad vandeniniuose tirpaluose didėjant demineralizavimo laipsniui, virškinamumas mažėjo, o emulsijose – didėjo. Kaip minėta anksčiau, HL mažėjimą didėjant demineralizavimo laipsniui galėjo lemti hidrofobinių kazeino frakcijų tirpumo mažėjimas. Gaminant emulsijas, baltymai veikiami mechaniškai, todėl daromas poveikis jų erdvinei struktūrai. Papildomos energijos sąnaudos gali paskatinti baltymų adsorbciją tarpfazyje, o dėl to lengviau susidaro fermento–substrato kompleksas, todėl virškinimas intensyvėja. Literatūroje taip pat aprašoma greitesnė  $\beta$ -kazeino hidrolizė, jam esant emulsijos riebalų rutulėlio paviršiuje nei vandeniniame tirpale [79].

## 5. Išvados

1. Nustatyta, kad skirtingi pieno baltymų produktai pasižymėjo skirtingomis funkcinėmis savybėmis, kurioms įtaką darė teminis apdorojimas, pH bei pieno baltymų produktų maišymas su liesu pienu:
  - 1.1. kazeino dalelių dydžiui įtaką darė terminis apdorojimas: mažesnės dalelės buvo mėginiuose, kuriuose dominavo kazeinas, nes suteikta šiluminė energija skatino rehidrataciją; mėginiuose, kuriuose buvo išrūgų baltymų, dėl denatūravimo susidarė baltymų aglomeratai ir buvo užfiksuotos didesnės dalelės; pH įtaka dalelių dydžiui buvo įvairi priklausomai nuo produkto ir terminio apdorojimo;
  - 1.2. micelinio kazeino, kalcio kazeinato termostabilumas didėjo, didėjant pH; lieso pieno miltelių tirpalo termostabilumo maksimumas buvo stebimas, esant pH 6,6, o pieno baltymų koncentrato tirpalo – pH 6,8; išrūgų baltymai buvo termolabilūs ir koaguliavo netrukus;
  - 1.3. pieno baltymų produktų maišymas su lieso pieno milteliais lėmė putojimo gebos didėjimą, nepriklausomai nuo to, ar kazeino ir išrūgų baltymų santykis mažėjo, ar didėjo; putų stabilumas buvo susijęs su išrūgų baltymų kiekiu didėjimu. Emulsavimo aktyvumas didėjo didėjant baltymų koncentracijai, tačiau pieno baltymų produktų maišymas su lieso pieno milteliais buvo mažiau reikšmingas nei baltymų koncentracijos pokytis;
  - 1.4. emulsijos, kurių tarpfazyje buvo išrūgų baltymų, buvo stabilesnės už emulsijas, kurių tarpfazį sudarė tik kazeinas. Baltymų adsorbcija tarpfazyje buvo skatinama pieno baltymų produktus sumaišius su lieso pieno milteliais.
2. Ištyrus micelinio kazeino demineralizacijos laipsnio įtaką jo funkcinėms savybėms, nustatyta, kad didesnis kazeino micelės struktūros suardymas skirtingai pakeitė kazeino funkcinės savybes: kazeino dalelės iš pradžių didėjo, po to mažėjo; termostabilumas didėjo; putojimo geba ir emulsavimo aktyvumas didėjo, o putų bei emulsijų stabilumas mažėjo; taip pat didėjo aliejus vandenyje tipo emulsijų tarpfazyje adsorbuotų baltymų kiekis.
3. Atlikus pieno baltymų vandens tirpaluose ir emulsijų tarpfazyje virškinamumo *in vitro* tyrimus, nustatyta, kad lieso pieno miltelių baltymų ir demineralizuoto kazeino hidrolizė greičiau vyko aliejus vandenyje tipo emulsijų tarpfazyje nei vandens tirpaluose, o micelinis kazeinas buvo virškinamas greičiau vandens tirpale nei aliejus vandenyje tipo emulsijų tarpfazyje.
4. Nustatyta, kad demineralizuoto micelinio kazeino virškinamumui įtaką darė jo demineralizacijos laipsnis, kuriam didėjant kazeino virškinamumas vandens tirpale lėtėjo, o aliejus vandenyje tipo emulsijų tarpfazyje – greitėjo.



### Bibliografinių nuorodų sąrašas

1. O'MAHONY, J. A.; FOX, P. F. Milk: an overview. In: *Milk Proteins (Second Edition)*. 2014. p. 19–73. Doi: 10.1016/B978-0-12-405171-3.00002-7.
2. HORNE, D. S. Casein micelle structure: models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2006, 11.2–3: 148–153. Doi: 10.1016/j.cocis.2005.11.004.
3. PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2005, 27.1: 201–212.
4. O'CONNELL, J. E., et al. Properties of casein micelles reformed from heated mixtures of milk and ethanol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2003, 213.2–3: 265–273. Doi: 10.1016/S0927-7757(02)00519-8.
5. HUPPERTZ, Th; KELLY, A. L.; FOX, P. F. High pressure-induced changes in ovine milk. 2. Effects on casein micelles and whey proteins. *Milchwissenschaft–Milk Science International*, 2006, 61.4: 394–397. ISSN: 0026–3788.
6. USTUNOL, Z. *Applied Food Protein Chemistry*. 2014. p. 435–439. ISBN: 978–1–119–94449–2.
7. GUDONIS, A. *Pieno gaminių technologija*. 2012. p. 276–278. Doi: 10.5755/e01.9786090207031.
8. SIKAND, V., et al. Solubility of commercial milk protein concentrates and milk protein isolates. *Journal of dairy science*, 2011, 94.12: 6194–6202. Doi: 10.3168/jds.2011-4477.
9. KINSELLA, J. E.; FOX, P. F.; ROCKLAND, L. B. Water sorption by proteins: milk and whey proteins. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 1986, 24.2: 91–139. Doi: 10.1080/10408398609527434.
10. BHASKAR, G. V.; SINGH, H.; BLAZEY, N. D. Milk protein products and processes. U.S. Patent No 7,157,108, 2007.
11. GUALCO, S. J. Effect of sodium chloride addition during diafiltration on the solubility of milk protein concentrate. 2010. Doi: 10.15368/theses.2010.190.
12. BALDWIN, A. J.; TRUONG, G. N. T. Development of insolubility in dehydration of dairy milk powders. *Food and Bioproducts Processing*, 2007, 85.3: 202–208. Doi: 10.1205/fbp07008.
13. ANEMA, S. G., et al. Effects of storage temperature on the solubility of milk protein concentrate (MPC85). *Food Hydrocolloids*, 2006, 20.2–3: 386–393. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2005.03.015.

14. FANG, Y., et al. Functionality of milk protein concentrate: Effect of spray drying temperature. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 62: 101–105. Doi: 10.1016/j.bej.2011.05.007.
15. GAIANI, C., et al. How surface composition of high milk proteins powders is influenced by spray-drying temperature. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 75.1: 377–384. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.016.
16. NAIR, P. K.; CORREDIG, M. Rennet-induced gelation of concentrated milk in the presence of sodium caseinate: Differences between milk concentration using ultrafiltration and osmotic stressing. *Journal of dairy science*, 2015, 98.1: 27–36. Doi: 10.3168/jds.2014–8356.
17. SANDRA, S.; CORREDIG, M. Rennet induced gelation of reconstituted milk protein concentrates: the role of calcium and soluble proteins during reconstitution. *International dairy journal*, 2013, 29.2: 68–74. Doi: 10.1016/j.idairyj.2012.10.011.
18. GAYGADZHIEV, Z., et al. Addition of sodium caseinate to skim milk inhibits rennet-induced aggregation of casein micelles. *Food hydrocolloids*, 2012, 26.2: 405–411. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.015.
19. XIONG, Y. L. *Dairy proteins*. In: *Ingredients in meat products*. Springer, New York, NY, 2009. p. 131–144.
20. CHEN, Y. C., et al. Proteomic profiling of the coagulation of milk proteins induced by glucono-delta-lactone. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52: 137–143. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.06.005.
21. WIJAYANTI, H. B.; BANSAL, N.; DEETH, H. C. Stability of whey proteins during thermal processing: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2014, 13.6: 1235–1251. Doi: 10.1111/1541–4337.12105.
22. KINSELLA, J. E.; MORR, C. V. Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 1984, 21.3: 197–262. Doi: 10.1080/10408398409527401.
23. KRISTO, E.; M. CORREDIG. Functional Properties of Food Proteins. In: *Applied food protein chemistry*. John Wiley & Sons, 2014. Doi: 10.1002/9781118860588.ch5.
24. HUPPERTZ, T. Foaming properties of milk: A review of the influence of composition and processing. *International Journal of Dairy Technology*, 2010, 63.4: 477–488. Doi: 10.1111/j.1471–0307.2010.00629.x.

25. WEBB, B. H. The production and use of concentrated skim milk foam. *Journal of Dairy Science*, 1941, 24.10: 829–834. Doi: 10.3168/jds.S0022–0302(41)95465–6.
26. PANFIL–KUNCEWICZ, H.; KUNCEWICZ, A. Emulsifying and foaming properties of milk concentrates. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 1995, 1.04: 62–69. ISSN: 1230–0322.
27. AUGUSTIN, M. A.; CLARKE, P. T. Skim milk powders with enhanced foaming and steam–frothing properties. *Dairy Science and Technology*, 2008, 88.1: 149–161. Doi: 10.1051/dst:2007012.
28. ZHANG, Z.; DALGLEISH, D. G.; GOFF, H. D. Effect of pH and ionic strength on competitive protein adsorption to air/water interfaces in aqueous foams made with mixed milk proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2004, 34.2: 113–121. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2003.11.009.
29. KAMATH, S., et al. The influence of temperature on the foaming of milk. *International dairy journal*, 2008, 18.10–11: 994–1002. Doi: 10.1016/j.idairyj.2008.05.001.
30. VASBINDER, A. J.; DE KRUIF, C. G. Casein–whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. *International dairy journal*, 2003, 13.8: 669–677. Doi: 10.1016/S0958–6946(03)00120–1.
31. DEWETTINCK, K., et al. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International dairy journal*, 2008, 18.5: 436–457. Doi: 10.1016/j.idairyj.2007.10.014.
32. SINGH, H.; YE, A. Interactions and functionality of milk proteins in food emulsions. In: *Milk Proteins (Second Edition)*. 2014. p. 359–386. Doi: 10.1016/B978–0–12–405171–3.00012–X.
33. DICKINSON, E.; MCCLEMENTS, D. J. *Advances in food colloids*. Springer Science & Business Media, 1995. ISBN: 978–0–7514–0203–2.
34. THOMAS, M. EC, et al. Milk powders ageing: Effect on physical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004, 44.5: 297–322. Doi: 10.1080/10408690490464041.
35. MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 2000, 65.8: 1270–1282. Doi: 10.1111/j.1365–2621.2000.tb10596.x.

36. GILL, H. S., et al. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 2000, 84.S1: 111–117. Doi: 10.1017/S0007114500002336.
37. MARTÍNEZ–MAQUEDA, D., et al. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food & function*, 2012, 3.4: 350–361. Doi: 10.1039/C2FO10192K.
38. PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 2006, 16.11: 1306–1314. Doi: 10.1016/j.idairyj.2006.06.005.
39. BRODY, T. Digestion and absorption. In: *Nutritional Biochemistry (Second Edition)*. 1999. p. 57–132. Doi: 10.1016/B978–012134836–6/50005–6.
40. MORATO, A. F., et al. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *Journal of food composition and analysis*, 2000, 13.5: 843–857. Doi: 10.1006/jfca.2000.0912.
41. SARKAR, A.; GOH, K. K. T.; SINGH, H. Properties of oil–in–water emulsions stabilized by  $\beta$ –lactoglobulin in simulated gastric fluid as influenced by ionic strength and presence of mucin. *Food Hydrocolloids*, 2010, 24.5: 534–541. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.12.005.
42. DUPONT, D., et al. Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion. *Molecular nutrition & food research*, 2010, 54.11: 1677–1689. Doi: 10.1002/mnfr.200900582.
43. AGUDELO, R. A., et al. Kinetics of peptide fraction release during in vitro digestion of casein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, 84.4: 325–332. Doi: 10.1002/jsfa.1662.
44. MANDALARI, G., et al. In vitro digestibility of  $\beta$ –casein and  $\beta$ –lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: a multi–laboratory evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2009, 55.3: 372–381. Doi: 10.1016/j.yrtph.2009.08.010.
45. HOWARD, P.; MAHONEY, R. R. Effect of dietary fibers on the enzymatic digestion of casein. *Food chemistry*, 1989, 34.2: 141–146. Doi: 10.1016/0308–8146(89)90082–4.
46. LAZZARO, F., et al. Gradual disaggregation of the casein micelle improves its emulsifying capacity and decreases the stability of dairy emulsions. *Food Hydrocolloids*, 2017, 63: 189–200. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.08.037.
47. MINEKUS, M., et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 2014, 5.6: 1113–1124. Doi: 10.1039/C3FO60702J.

48. CHURCH, F. C., et al. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 1983, 66.6: 1219–1227. Doi: 10.3168/jds.S0022–0302(83)81926–2.
49. BORDIN, G., et al. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 2001, 928.1: 63–76. Doi: 10.1016/S0021–9673(01)01097–4.
50. BERNABUCCI, U., et al. Effects of the hot season on milk protein fractions in Holstein cows. *Animal Research*, 2002, 51.1: 25–33. Doi: 10.1051/animres:2002006.
51. MIMOUNI, A., et al. Rehydration process of milk protein concentrate powder monitored by static light scattering. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23.7: 1958–1965. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.01.010.
52. MOUGHAL, K. I.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Suspension stability and size distribution of particles in reconstituted, commercial calcium caseinates. *International Dairy Journal*, 2000, 10.10: 683–690. Doi: 10.1016/S0958–6946(00)00104–7.
53. CROWLEY, S. V., et al. Rehydration characteristics of milk protein concentrate powders. *Journal of Food Engineering*, 2015, 149: 105–113. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.09.033.
54. SINGH, H. Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 2004, 57.2-3: 111–119. Doi: 10.1111/j.1471–0307.2004.00143.x.
55. ANEMA, S. G.; LI, Y. Effect of pH on the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51.6: 1640–1646. Doi: 10.1021/jf025673a.
56. MARTÍNEZ–PADILLA, L. P., et al. Foaming properties of skim milk powder fortified with milk proteins. *International Dairy Journal*, 2014, 36.1: 21–28. Doi: 10.1016/j.idairyj.2013.11.011.
57. BORCHERDING, K., et al. Effect of protein content, casein–whey protein ratio and pH value on the foaming properties of skimmed milk. *International journal of dairy technology*, 2009, 62.2: 161–169. Doi: 10.1111/j.1471–0307.2009.00472.x.
58. YE, A. Functional properties of milk protein concentrates: Emulsifying properties, adsorption and stability of emulsions. *International Dairy Journal*, 2011, 21.1: 14–20. Doi: 10.1016/j.idairyj.2010.07.005.

59. DICKINSON, E. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2001, 20.3: 197–210. Doi: 10.1016/S0927-7765(00)00204-6.
60. HAYNES, C. A.; NORDE, W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1994, 2.6: 517–566. Doi: 10.1016/0927-7765(94)80066-9.
61. DICKINSON, E. Structure formation in casein-based gels, foams, and emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, 288.1–3: 3–11. Doi: 10.1016/j.colsurfa.2006.01.012.
62. GAZI, I.; VILALVA, I. C.; HUPPERTZ, T. Plasmin activity and proteolysis in milk protein ingredients. *International Dairy Journal*, 2014, 38.2: 208–212. Doi: 10.1016/j.idairyj.2013.11.012.
63. FOX, P. F.; HOYNES, M. C. T. Heat stability of milk: influence of colloidal calcium phosphate and  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Dairy Research*, 1975, 42.3: 427–435. Doi: 10.1017/S0022029900015466.
64. AOKI, T.; UMEDA, T.; KAKO, Y. Cleavage of the linkage between colloidal calcium phosphate and casein on heating milk at high temperature. *Journal of dairy research*, 1990, 57.3: 349–354. Doi: 10.1017/S002202990002700X.
65. AUGUSTIN, M. A.; CLARKE, P. T. Skim milk powders with enhanced foaming and steam-frothing properties. *Dairy Science and Technology*, 2008, 88.1: 149–161. Doi: 10.1051/dst:2007012.
66. SINGH, H. Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25.8: 1938–1944. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.022.
67. DICKINSON, E. Mixed biopolymers at interfaces: competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25.8: 1966–1983. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.12.001.
68. INGLINGSTAD, R. A., et al. Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy science & technology*, 2010, 90.5: 549–563. Doi: 10.1051/dst/2010018.
69. JOVANOVIC, S., et al. SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. *Sensors*, 2007, 7.3: 371–383. Doi: 10.3390/s7030371.

70. THOMAS, K., et al. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2004, 39.2: 87–98. Doi: 10.1016/j.yrtph.2003.11.003.
71. DUNN, B. M. Overview of pepsin-like aspartic peptidases. *Current protocols in protein science*, 2001, 21.3. 1–21.3. 6. Doi: 10.1002/0471140864.ps2103s25.
72. HAUG, A.; HØSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids in health and disease*, 2007, 6.1: 25. Doi: 10.1186/1476-511X-6-25.
73. HECK, J. M. L., et al. Estimation of variation in concentration, phosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal*, 2008, 18.5: 548–555. Doi: 10.1016/j.idairyj.2007.11.004.
74. BASTIAN, E. D.; BROWN, R. J. Plasmin in milk and dairy products: an update. *International Dairy Journal*, 1996, 6.5: 435–457. Doi: 10.1016/0958-6946(95)00021-6.
75. GARCIA-RISCO, M. R., et al. Plasmin activity in pressurized milk. *Journal of dairy science*, 2003, 86.3: 728–734. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73653-4.
76. POLITIS, I., et al. Environmental factors affecting plasmin activity in milk. *Journal of Dairy Science*, 1989, 72.7: 1713–1718. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79286-9.
77. EIGEL, W. N. Effect of Bovine Plasmin on  $\alpha_{s1}$ -B and  $\kappa$ -A Caseins. *Journal of Dairy Science*, 1977, 60.9: 1399–1403. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(77)84043-5.
78. KORYCHA-DAHL, M., et al. Plasmin activity in milk. *Journal of Dairy Science*, 1983, 66.4: 704–711. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(83)81848-7.
79. MACIERZANKA, A., et al. Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of  $\beta$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin. *Soft Matter*, 2009, 5.3: 538–550. Doi: 10.1039/B811233A.