

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Paulina Štreimikytė

**BALTYMŲ HIDROLIZĖS TYRIMAI, IMITUOJANT IN VITRO
SĄLYGAS VIRŠKINMAJAME TRAKTE**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovė

Doc. dr. Milda Keršienė

KAUNAS, 2018

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

BALTYMŲ HIDROLIZĖS TYRIMAI, IMITUOJANT *IN VITRO*
SĄLYGAS VIRŠKINAMAJAME TRAKTE

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

Vadovė

(parašas) Doc. dr. Milda Keršienė

(data)

Recenzentė

(parašas) Doc. dr. Rimgailė Degutytė

(data)

Projektą atliko

(parašas) Paulina Štreimikytė

(data)

KAUNAS, 2018



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Paulina Štreimikytė

(Studento vardas, pavardė)

Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Baltymų hidrolizės tyrimai, imituojant *in vitro* sąlygas virškinamajame trakte“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 18 m. Birželio 4 d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Paulinos Štreimikytės**, baigiamasis projektas tema „Baltymų hidrolizės tyrimai, imituojant *in vitro* sąlygas virškinamajame trakte“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Turinys

1.	Literatūros apžvalga.....	14
1.1.	<i>Baltymų funkcinės savybės.....</i>	14
1.2.	<i>Baltymų mitybinės savybės</i>	16
1.3.	<i>Baltymų fermentinė hidrolizė virškinamajame trakte.....</i>	20
2.	Medžiagos.....	23
2.1.	<i>Reagentai ir tyrimo medžiagos</i>	23
2.2.	<i>Tyrimo objektų paruošimas</i>	24
3.	Tyrimo metodai.....	25
3.1.1.	<i>Tyrimo objektų tirpumo nustatymas</i>	25
3.1.2.	<i>Tyrimo objektų reologinių savybių nustatymas.....</i>	26
3.2.	<i>Virškinimas in vitro</i>	26
3.2.1.	<i>Fermentinis pepsino aktyvumo nustatymas</i>	26
3.2.2.	<i>Virškinimo sulčių paruošimas.....</i>	27
3.2.3.	<i>Virškinimo in vitro modelis</i>	28
3.3.	<i>Baltymų hidrolizės vertinimo metodai</i>	30
3.3.1.	<i>Analizuojamųjų mėginių praskiedimo faktoriaus skaičiavimas</i>	31
3.3.2.	<i>Analizuojamųjų mėginių frakcionavimas.....</i>	31
3.3.3.	<i>Atpalaiduoto azoto nustatymas</i>	32
3.3.4.	<i>Peptidų koncentracijos nustatymas.....</i>	32
3.3.5.	<i>Laisvų amino grupių pagal leuciną nustatymas.....</i>	33
3.3.6.	<i>Atlaisvintų peptidų kinetika</i>	33
4.	Rezultatai	35
4.1.	<i>Tyrimo objektų savybės.....</i>	35
4.2.	<i>Baltymų hidrolizės įvertinimai in vitro virškinimo metu</i>	39
4.2.1.	<i>Skirtingos kilmės baltymų hidrolizės vertinimas</i>	39
4.2.2.	<i>Skirtingos koncentracijos baltymų hidrolizės vertinimas.....</i>	54
4.2.3.	<i>Polisacharido Konjac Glucomannan įtaka baltymų hidrolizei</i>	61
5.	Išvados	69
6.	Literatūros šaltiniai	71

Lentelių sąrašas

Lentelė 1. Baltymų technologinių-funkcinių savybių pritaikymas maisto sistemose	14
Lentelė 2. Kiaušinių, pieno ir žirnių baltymų nepakeičiamų amino rūgščių (NAR) kompozicija	17
Lentelė 3. Pieno baltymų peptidai identifikuoti po <i>in vitro</i> virškinimo	19
Lentelė 4. Baltyminių tirpalų paruošimas	26
Lentelė 5. Darbinių ir bazinių virškinimo sulčių paruošimas	28
Lentelė 6. Bendras aminorūgščių kiekis vandeniniuose 10 % baltymų tirpaluose.	35
Lentelė 7. Skirtingų baltymų tirpumo (%) priklausomybė nuo skirtingo pH	36
Lentelė 8. Skirtingų baltymų koncentracijų ir jų mišinių klampos nustatymas ir klasifikacija (Pieno baltymai –PB; Žirnių baltymai – ŽB, Kiaušinių baltymai KB).....	38
Lentelė 9. Skirtingos kilmės 2% TCA tirpių peptidų kiekis (%) analizuojamuose mėginiuose (PB-pieno baltymai, KB- kiaušinių baltymai, ŽB – žirnių baltymai).	41
Lentelė 10. Skirtingos koncentracijos 2% TCA tirpių peptidų kiekis pagal hidrolizės laipsnį analizuojamuose mėginiuose kiekviename virškinimo taške laiku (G – skrandžio fazėje, D – žarnyno fazėje).	56
Lentelė 11. 10% Kiaušinių ir pieno baltymų su tirškliu <i>Konjac Glucomannan</i> įtaka klampai (Pa·s)	61

Paveikslų sąrašas

Paveikslas 1. Tyrimo objektų paruošimo ir tyrimų eksperimento schema	25
Paveikslas 3. Simuliuojamojo <i>in vitro</i> virškinimo schema	29
Paveikslas 4. Analizuojamųjų mėginių paruošimas analizei. G – skrandžio fazės tiriamieji mėginiai; D – žarnyno fazės tiriamieji mėginiai.	30
Paveikslas 5. 2%TCA tirpių peptidų analizuojamųjų mėginių paruošimo schema	31
Paveikslas 6. Skirtingų baltymų tirpumo priklausomybė nuo skirtingo pH	37
Paveikslas 7. Pieno (PB), žirnių (ŽB) ir kiaušinių (KB) baltymų analizuojamųjų mėginių (tamsioji ir šviesioji dalys stulpelyje) ir 2% TCA tirpių peptidų analizuojamųjų mėginių (stulpelio šviesioji talis) atlaisvinto azoto kiekis (%) kiekviename virškinimo taške skirtingu laiku (G – skrandžio fazėje, D – žarnyno fazėje)	40
Paveikslas 8. Skirtingos kilmės peptidų ir baltymų koncentracija virškinimo <i>in vitro</i> metu.....	42
Paveikslas 9. Skirtingos kilmės peptidų intensyvumas (%) pagal 2%TCA tirpių peptidų koncentraciją, skirtinguose virškinimo <i>in vitro</i> taškuose	42
Paveikslas 10. Skirtingos kilmės baltymų mišinio (10% pieno ir žirnių) peptidų koncentracija (mg/ml) skirtinguose virškinimo <i>in vitro</i> taškuose	43
Paveikslas 11. Skirtingos kilmės baltymų mišinio (10% pieno ir žirnių) peptidų intensyvumas (%) skirtinguose virškinimo <i>in vitro</i> taškuose.....	43
Paveikslas 12. Skirtingos kilmės analizuojamų mėginių amino grupių pagal leuciną pokytis <i>in vitro</i> virškinimo taškuose	44
Paveikslas 13. Skirtingos kilmės analizuojamų mėginių pakeičiamų aminorūgščių profilis skirtinguose <i>in vitro</i> virškinimo taškuose.....	45
Paveikslas 14. Skirtingos kilmės analizuojamų mėginių pakeičiamų aminorūgščių profilis skirtinguose <i>in vitro</i> virškinimo taškuose.....	46
Paveikslas 15. Skirtingos kilmės baltymų mišinio (10%pieno ir žirnių) analizuojamų mėginių amino grupių pagal leuciną pokytis <i>in vitro</i> virškinimo taškuose.....	47
Paveikslas 16. 10% kiaušinių baltymų tirpios(A) ir netirpios(B) frakcijų neredukuojančiomis sąlygomis SDS-PAGE rezultatai skirtinguose <i>in vitro</i> virškinimo taškuose skrandyje (GU, G0, G10, G30, G60, G120) ir žarnyne (DU, D5, D60, D120). C- kiaušinių baltymų ekstraktas (kontrolė).....	48
Paveikslas 17. 10% kiaušinio baltymo tirpios frakcijos densinometrijos analizės virškinimo metu. A – virškinimas skrandyje, B – virškinimas žarnyne.....	49
Paveikslas 18. 10% pieno baltymų tirpios (A) ir netirpios (B) frakcijų neredukuojančiomis sąlygomis SDS-PAGE rezultatai skirtinguose <i>in vitro</i> virškinimo taškuose skrandyje (GU, G0,	

G10, G30,G60,G120) ir žarnyne (DU, D5, D60, D120). C- kiaušinių balmybų ekstraktas (kontrolė).....	50
Paveikslas 19. 10% žirnių baltymų tirpios(A) ir netirpios(B) frakcijų neredukuojančiomis sąlygomis SDS-PAGE rezultatai skirtinguose <i>in vitro</i> virškinimo taškuose skrandyje (GU, G0, G10, G30,G60,G120) ir žarnyne (DU, D5, D60, D120). C- kiaušinių balmybų ekstraktas (kontrolė).....	51
Paveikslas 20. 10% žirnių baltymų tirpios frakcijos densinometrijos analizė virškinimo skrandyje metu.....	52
Paveikslas 21. 10% pieno ir žirnių baltymų mišinio tirpios(A) ir netirpios(B) frakcijų neredukuojančiomis sąlygomis SDS-PAGE rezultatai skirtinguose <i>in vitro</i> virškinimo taškuose skrandyje (GU, G0, G10, G30,G60,G120) ir žarnyne (DU, D5, D60, D120). C- kiaušinių baltymų ekstraktas (kontrolė).....	53
Paveikslas 22. 10% pieno ir žirnių baltymų mišinio tirpios frakcijos densinometrijos analizės virškinimo metu.....	54
Paveikslas 23. Pieno baltymų ir jų 2%TCA tirpių peptidų hidrolizės laipsnis kiekviename virškinimo taške skirtingu laiku (G – skrandžio fazėje, D – žarnyno fazėje)	55
Paveikslas 24. 10% ir 15% žirnių baltymų ir jų 2%TCA tirpių peptidų hidrolizės laipsnis kiekviename virškinimo taške skirtingu laiku (G – skrandžio fazėje, D – žarnyno fazėje)	55
Paveikslas 25. Kiaušinių baltymų ir jų 2%TCA tirpių peptidų hidrolizės laipsnis kiekviename virškinimo taške skirtingu laiku (G – skrandžio fazėje, D – žarnyno fazėje)	56
Paveikslas 26. Gyvūninės kilmės skirtingos koncentracijos analizuojamųjų mėginių peptidų koncentracija virškinimo <i>in vitro</i> metu.	57
Paveikslas 27. Augalinės kilmės skirtingos koncentracijos analizuojamųjų mėginių peptidų koncentracija virškinimo <i>in vitro</i> metu.	58
Paveikslas 28. Skirtingos koncentracijos analizuojamųjų mėginių peptidų intensyvumas (%) pagal 2%TCA tirpių peptidų koncentraciją, skirtinguose virškinimo <i>in vitro</i> taškuose	58
Paveikslas 29. Skirtingos koncentracijos pieno baltymų analizuojamųjų mėginių amino grupių pagal leuciną pokytis <i>in vitro</i> virškinimo taškuose	59
Paveikslas 30. Skirtingos koncentracijos žirnių baltymų analizuojamųjų mėginių amino grupių pagal leuciną pokytis <i>in vitro</i> virškinimo taškuose	60
Paveikslas 31. Skirtingos koncentracijos kiaušinių baltymų analizuojamųjų mėginių amino grupių pagal leuciną pokytis <i>in vitro</i> virškinimo taškuose	60
Paveikslas 32. 10% pieno baltymų su ir be <i>Konjac Gliukomannan</i> baltymų ir peptidų koncentracijos kitimas virškinimo metu.	62

Paveikslas 33. 10% pieno baltymų su ir be <i>Konjac Gliukomannan</i> baltymų ir peptidų intensyvumas (%) pagal 2%TCA tirpių peptidų koncentraciją, skirtinguose virškinimo <i>in vitro</i> taškuose	62
Paveikslas 34. 10% kiaušinių baltymų su ir be <i>Konjac Gliukomannan</i> baltymų ir peptidų koncentracijos kitimas virškinimo metu	63
Paveikslas 35. 10% kiaušinių baltymų su ir be <i>Konjac Gliukomannan</i> baltymų ir peptidų intensyvumo kitimas virškinimo metu	63
Paveikslas 36. 10% pieno baltymų be ir su <i>Konjac Gliukomannan</i> amino grupių pokytis kiekvieno virškinimo metu skrandžio ir mažojo žarnyno fazėse.	64
Paveikslas 37. 10% pieno baltymų be ir su <i>Konjac Glucomannan</i> amino grupių pokytis kiekvieno virškinimo metu skrandžio ir mažojo žarnyno fazėse.	64
Paveikslas 38. 10% kiaušinių baltymų su 0.3% <i>Konjac Glucomannan</i> tirpios(A) ir netirpios(B) frakcijų neredukuojančiomis sąlygomis SDS-PAGE rezultatai skirtinguose <i>in vitro</i> virškinimo taškuose skrandyje (GU, G0, G10, G30, G60, G120) ir žarnyne (DU, D5, D60, D120). C-kiaušinių baltymų ekstraktas (kontrolė).	65
Paveikslas 39. 10% kiaušinių baltymų su 0.3% <i>Konjac Glucomannan</i> tirpios frakcijos densinometrijos analizės virškinimo metu.	66
Paveikslas 40. 10% pieno baltymų su 0.07% <i>Konjac Glucomannan</i> tirpios(A) ir netirpios(B) frakcijų neredukuojančiomis sąlygomis SDS-PAGE rezultatai skirtinguose <i>in vitro</i> virškinimo taškuose skrandyje (GU, G0, G10, G30, G60, G120) ir žarnyne (DU, D5, D60, D120). C-kiaušinių baltymų ekstraktas (kontrolė).	67
Paveikslas 41. 10% pieno baltymų su 0.07% <i>Konjac Glucomannan</i> tirpios frakcijos densinometrijos analizės virškinimo metu.	68

Štreimikytė, Paulina. BALTYMŲ HIDROLIZĖS TYRIMAI, IMITUOJANT *IN VITRO* VIRŠKINIMO SĄLYGAS: *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas doc. dr. Milda Keršienė; Kauno technologijos universitetas, cheminės technologijos fakultetas.

Mokslų kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: *kiaušinių baltymai, pieno baltymai, žirnių baltymai, in vitro virškinimas, hidrolizė.*

Kaunas, 2018. 80 p.

SANTRAUKA

Baltymų hidrolizės tyrimai, imituojant *in vitro* virškinimą, gali apibūdinti hidrolizės produktus, kurie svarbūs žmogaus organizmui, ypač kai jis yra specialių poreikių ar turi mitybos sutrikimą pvz.: disfagiją. Disfagija yra apibrėžiama kaip negalėjimas ar sunkumas praryti tirštą ir tankų maitinimo produktą. Šis sutrikimas gali įtakoti mitybos nepakankamumą. Vienas iš efektyviausių būdų gydyti disfagiją yra modifikuotos tekstūros maitinimo produktai. Užtikrinti nepakankamos mitybos prevenciją galima baltyminiu pagrindu paruoštais maitinimo produktais. Naujausi moksliniai straipsniai pasiūlė naują konceptą, kaip „greiti“ ir „lėti“ baltymai. Šis konceptas, paremtas baltymų fermentinės hidrolizės greičiu virškinamajame trakte, yra prevencija raumenų masės, energijos ir fizinės jėgos sumažėjimui.

Tyrimo tikslas buvo įvertinti baltymų hidrolizę, imituojant *in vitro* virškinimo sistemą pagal INFOGEST COST protokolą (Minekus et.al, 2014) skirtingos kilmės (kiaušinių, pieno ir žirnių) ir koncentracijos (10 ir 15%) baltymų pagrindu paruoštuose gėrimuose. Reikėjo įvertinti ir tirštiklio *Konjac Glucomannan* įtaką baltymų fermentinei hidrolizei. Fermentinė baltymų hidrolizė buvo įvertinta Kjeldalio, Lowry, Fluorescemininiu metodu. Taip pat, bendradarbiaujant su Manchesterio Universitetu, atlikta SDS-PAGE elektroforezė ir densitometrijos analizė. Rezultatai parodė, kad, palyginus žirnių baltymus su kiaušinių ir pieno baltymais, greičiausiai hidrolizuojami yra žirnių baltymai. Skirtingų koncentracijų baltymų hidrolizė buvo panašių tendencijų. Tirštiklis *Konjac Glucomannan* baltymų fermentinę hidrolizę nežymiai sulėtino.

Streimikyte, Paulina. EVALUATION OF PROTEIN HYDROLYSIS DURING SIMULATED *IN VITRO* DIGESTION: *Masters's* thesis. Supervisor assoc. prof. Milda Kersiene. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Technological Sciences, Food Technology

Key words: egg proteins, milk proteins, pea proteins, *in vitro* digestion, konjac glucomannan, hydrolysis.

Kaunas, 2018. 80 p.

SUMMARY

Evaluation of protein hydrolysis during *in vitro* digestion is important as ability to understand products of hydrolysis. They might be important to people, in particular with special needs or disorders of eating. In example, dysphagia is a symptom, commonly found in the elderly and defined as a difficulty or inability to swallow thin fluid foods. Such physical disorder may contribute to malnutrition due to limited food and liquid intake. The effective treatment of dysphagia requires that fluid foods are consistently prepared with the correct viscosity. On the other hand, increasing the protein content in food is an effective way for the prevalence of malnutrition. Recent studies have proposed new concepts such as the “slow vs. fast” protein concept based on the speed of protein digestion which is a limiting factor for the loss of muscle mass long with lowered strength and physical endurance.

The purpose of this study was to investigate the digestibility of protein based beverages containing proteins from different sources (egg, pea and milk) and characterized by different viscosity. The viscosity of protein based beverages was designed by changing protein concentration (10 and 15 %) and/or adding polysaccharide *Konjac Glucomannan*. The digestibility of proteins was defined by the content of peptides and free amino acids that is released from beverages in the gastrointestinal tract and thus becomes available for intestinal absorption. *In vitro* digestion method proposed by INFOGEST was used to simulate the conditions in gastrointestinal tract. Kjeldal, Lowry, Fluorescamine assay where used to determine the nitrogen, peptides, free amino groups and amino acids content in the gastrointestinal fluids. As well as SDS-PAGE and densitometry was performed in the University of Manchester. Results of nitrogen and free amino groups content released during digestion showed that the rate of hydrolysis varied depending on the origin of proteins in the beverages. The pea proteins have been digested faster than milk and egg proteins. The free amino acids profiles obtained after digestion of pea, egg and milk proteins are in agreement with the results about nitrogen content in the gastrointestinal fluids.

It was found that the addition of thickener – *Konjac Glucomannan*, to the protein based beverages may effect proteolysis during gastrointestinal digestion.

Santrumpos

DBT – druskų darbiniai tirpalai

DTT - 1,4-Dithiothreitol

DU - analizuojamasis mėginys su simuliuojamomis žarnyno sultimis be ferment

D5...120 - analizuojamasis mėginys su simuliuojamomis žarnyno sultimis ir fermentais, inhibituotais virškinimo eigoje, tam tikru metu nuo 5min iki 120min

GU – analizuojamasis mėginys su simuliuojamomis skrandžio sultimis be fermento

G0.3...120 - analizuojamasis mėginys su simuliuojamomis skrandžio sultimis ir fermentu, inhibituotu virškinimo eigoje, tam tikru metu nuo 30sec iki 120min

KB – kiaušinių baltymai

KJG –polisacharidas *Konjac Glucomannan*

PB – pieno baltymai

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Polyacrilamide Gel Electrophoresis

SGF – simuliuojamosios skrandžio sultys

SIF – simuliuojamosios žarnyno sultys

SSF – simuliuojamosios seilių sultys

TCA – trichloracto rūgštis

ŽB – žirnių baltymai

Ivadas

Baltymų hidrolizės tyrimai, imituojant *in vitro* virškinimą, gali apibūdinti hidrolizės produktus, kurie svarbūs žmogaus organizmui, ypač, kai jie yra specialių poreikių ar turi mitybos sutrikimą pvz.: disfagiją. Disfagija yra apibrėžiama, kaip negalėjimas ar sunkumas praryti tirštą ir tankų maitinimo produktą. Literatūros šaltinių duomenimis, visame pasaulyje kiekvienais metais 15 milijonų žmonių kenčia nuo užspringimo, iš kurių daugiau nei pusė turi disfagijos sutrikimą [1]. Pagrindinės rizikos, sukeltos disfagijos yra užspringimas ir nepakankama mityba. Tokiems pacientams užspringimo prevencija vykdoma, modifikuojant maitinimo produkto tekstūrą pagal Amerikos Dietikos Asociacijos rekomendacijas[2]. O nepakankamai žmonių mitybai išspręsti, viena iš efektyvių priemonių yra baltymų pagrindu pagamintas maitinimo produktas [3].

Baltymų maistinė vertė yra apibūdinama jų virškinamumu. Naujausių mokslinių tyrimų duomenimis virškinamumas apibūdinamas ne tik amino rūgščių sudėtimi ir kiekiu prieš ir po virškinimo, tačiau ir kaip bei koku greičiu jos yra atlaisvinamos virškinamajame trakte [4]. Boirie Y.1997, pasiūlė baltymų virškinamumo konceptą, kaip „lėti“ ir „greiti“ baltymai, kuris yra paremtas baltymų hidrolizės greičio kinetika virškinamajame trakte.

Baltymai yra svarbiausias ir kiekybiškai dominuojantis komponentas visuose organizmuose [5]. Žmogaus organizmo struktūriniuose audiniuose, tokiuose, kaip oda ir kraujas, baltymai sudaro 15% visos masės. Jie įeina ir į kitų, mums gyvybiškai svarbių organų: smegenų, širdies, kepenų, inkstų sudėtį [6].

Baltymų nepakankamumas mityboje gali sukelti ligas, tokias, kaip *marasmus*, *kwashiorkor*, įvairaus laipsnio išsekimą, stabdyti augimą bei lemti svorio sumažėjimą. Tai įrodo baltymų svarbą raumenų masei [7]. Chroniškas baltymų deficitas organizme skatina naudoti raumenų ląstelėse esančias amino rūgštis gyvybiškai svarbioms komponentų sintezėms, kurių metu susidaro hemoglobinas ar insulinas [8]. Esant psichologiniam stresui, badavimui, nėštumui, nudegimams, valgymo sutrikimams yra reikalingas padidintas nepakeičiamų amino rūgščių kiekis organizme. Šios amino rūgštys papildomai sintetina imuninius ir kitus baltymus, reikalingus greitinti gijimo procesams [9].

Maitinimo produktai vieni nuo kitų skiriasi savo sudėtimi, jusliniais parametrais bei technologinėmis savybėmis. Esant kietai maisto būsenai, virškinamajame trakte svarbūs veiksniai yra pradinėje virškinimo fazėje t.y. kramtyme, kashnio formavime. Maistas, suvilgytas seilių sekretu, suformuoja kohesyvų kashnį, kuris turi būti praryjamas. Tuo tarpu skysto maisto virškinimas vyksta tolimesniuose etapuose t.y. skrandžio ir žarnyno fazėse. Tačiau žmogaus seilių sekretas yra vandeningas kompleksas [10]. Jis keičia skysčio parametrus: pH vertę, paviršiaus įtempį, klampą. Mokslinių straipsnių duomenimis, vienas iš varijuojamų veiksnių,

kuris lemia maisto matricos transformavimo laipsnį, įtakojantį virškinamumą, yra vandens kiekis. Tai turi įtakos tirpumui ir fermentinių reakcijų jautrumui virškinamajame trakte [11, 12].

Skirtingos kilmės baltymai pasižymi varijuojamomis technologinėmis savybėmis. Todėl, priklausomai nuo baltymų tirpumo ir dispersiškumo vandenyje, tirpalai yra skirtingos konsistencijos. Jos modifikacija galima, keičiant baltymo koncentraciją ir/ar parenkant tirštiklius [13]. Parenkant tirštinimo medžiagą, reikia įvertinti daugelį cheminių ir technologinių tirštiklio savybių. Minėtų produktų tirštinimui gali būti naudojamios tokios medžiagos: ksantano, keragenano, guaro gumos, pektinas ir kt. Literatūroje randama, kad polisacharidas *Konjac Glucomanann* yra linijinis polimeras iš (1→4)-β-D-gliukopiranozės β-D-manopiranozės, turintis gliukozės ir manozės santykį 1:1:6 ir mažą kiekį C-6 pozicijoje esančių acetilinių grupių (5-10%) [14]. Polisacharidas pasižymi gelio sudarymo ar tirštinimo agento savybėmis, kurios yra termiškai atsparios ir efektyvios modifikuojant klampą [15, 16]. Šio polisacharido naudojimas produktų tirštinimui yra palankus ir vartotojo sveikatai. Tyrimų duomenys parodė įvairius biologinius aktyvumus, tarp jų anti-tumorinius, imonoreguliacinius, teigiamus rezultatus žaizdų gijimui [17, 18]. Įrodytas jo poveikis glikemijos indekso mažinimui, sergant diabetu ar širdies kraujagyslių ligoms [19, 20]. Dėl gerų tirštinimo savybių polisacharidas plačiai naudojamas maisto matricos formavimui maisto pramonėje [21, 22].

Žmogaus organizme virškinimo metu vyksta fermentinė baltymų hidrolizė. Baltymai hidrolizuojami iki mažesnės molekulinės masės peptidų ir amino rūgščių. Baltymus skaidantys proteolitiniai fermentai veikia specifiskai, todėl skirtingos kilmės baltymai atlaisvina skirtingą kiekį peptidų ir amino rūgščių, kurie gali būti pasisavinami per storą žarnyno epitelį [23, 24].

Fermentinės baltymų hidrolizės produktai turi teigiamos įtakos ne tik žmogaus fiziologiniams procesams, bet ir maisto pramonėje, pagerinant maitinimo produkto skonines ar tekstūras savybes, virškinamumą bei sumažinant alergenų kiekį [9].

Norint įvertinti makrokomponentų kinetiką virškinimo metu, yra plačiai naudojami simuliuojantys *in vitro* virškinamumo metodai [25]. Tiriamajame darbe statinis žmogaus virškinamumo modelis yra naudojamas baltymų hidrolizei įvertinti. Virškinimo metu svarbūs kriterijai yra elektrolitų koncentracija fiziologinėse virškinimo sultyse, fermentų aktyvumas, substrato koncentracija, pH. Baltymų fermentinė hidrolizė yra vertinama pagal azoto kiekio pokytį (bendro baltymų kiekio indikatorius) ir nepakeičiamų amino rūgščių kiekio pokytį (baltymų kokybės indikatorius) virškinimo metu [10].

Tiriamąo darbo suformuluota hipotezė. Skirtingos kilmės baltymų fermentinė hidrolizė virškinimo metu į tirpiąją virškinimo sulčių frakciją išskiria skirtingą kiekį ir skirtingos molekulinės masės hidrolizės produktus.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Baltymų funkcinės savybės

Baltymų funkcinės savybės priklauso nuo daugybės faktorių, kurie gali būti klasifikuojami pagal dvi grupes: vidinius ir išorinius faktorius. Vidiniai faktoriai yra amino rūgščių seka ir kompozicija, dydis, forma, santykis tarp hidrofobiškumo/hidrofiliškumo, konformacija ir reaktyvumas. Išoriniai faktoriai, kurie gali įtakoti funkcinės gryno baltymo savybes, yra pH, joninė jėga, temperatūra, konformacija, santykis tarp hidrofobiškumo/hidrofiliškumo, ekstrakcijos metodas. Be šių faktorių, naudojant baltymų produktus kaip miltus, koncentratas ar izoliatus reikėtų įtraukti keletą papildomų faktorių tokių, kaip pagrindinių baltymų santykis ir gamybos procesas. Šie parametrai gali turėti didelį poveikį funkcinėms, o taip pat panaudojimą maisto sistemoms [26].

Priklausomai nuo funkcinės savybės baltymai gali būti pritaikomi įvairiose maisto sistemose (žr. lentelė 1).

Lentelė 1. Baltymų technologinių-funkcinių savybių pritaikymas maisto sistemose [26]

Technologinė-funkcinė savybė	Veikimo principas	Maisto sistema
Tirpumas	Baltymų solvacija	Gėrimai
Vandens absorbcija ir surišimas	Vandens molekulių surišimas, vandens molekulių apsupimas	Mėsa, dešrelės, duona, tortai
Klampa	Tirštumas, vandens surišimas	Sriubos
Gelio formavimas	Baltymo matricos formavimas	Sūris, varškė
Kohezija-Adhezija	Baltymas elgiasi kaip adhezivi medžiaga	Pasta, mėsa, kepiniai
Elastingumas	Hidrofobinis gluteno surišimas, dusulfidiniai ryšiai gelyje	Kepiniai, mėsa
Emulsifikacija	Formavimas ir stabilizavimas riebalinės emulcijos	Dešrelės, sriubos, tortai
Riebalų absorbcija	Surišimas laisvų riebalų rūgščių	Dešrelės, mėsa
Skonio – surišėjas	Adsorbicija, atlaisvinimas, apsupimas	Simuliuojamos mėsos, kepiniai
Putojimas	Formuoja stabilią plėvelę ir apsupa dujas	Plakta grietinėlė

Baltymai yra atsakingi už skirtingas fizikines struktūras maisto produktuose - tekstūrą. pvz.: fibrilinė struktūra - mėsoje, žuvyje; porinė struktūra - sojoje ir duonoje; gelinė – įvairuose pieno ir sojos produktuose. Tekstūros formavimui yra svarbus baltymų dydis (10-50kDa). Mažesnio nei 10 kDa dydžio baltymų molekulės pasižymi silpnomis struktūrinėmis funkcijomis, tuo tarpu didesni nei 50kDa baltymai turi trūkumą dėl savo didelio klampumo ir tendencijos sudaryti gelį šarminėse terpėse [27, 28].

Skirtingos kilmės baltymai pasižymi skirtingomis technologinėmis savybėmis dėl vidinių ir išorinių faktorių. Amino rūgščių seka ir kompozicija pirminėje baltymo molekulėje įtakoja jo antrinę, tretinę ir ketvirtinę struktūrą, kaip ir specifines technologines savybes. Taigi, baltymų izoliato technologinės savybės tokios, kaip grynumas ir konformacija įtakoja fermentinę baltymų hidrolizę, todėl skirtingų baltymų ar gamintojų baltymų izoliatai pasižymi skirtingomis technologinėmis savybėmis [83]. Literatūros šaltinių duomenimis, žirnių baltymų izoliatai, priklausomai nuo gamintojo, gali būti netirpūs ir tirpūs. Tačiau, nepriklausomai nuo gamintojo, pasižymi geru dispersiškumu ir naudojami gėrimų pramonėje [29]. Skirtingos funkcijos tarp skirtingų tos pačios kilmės baltymų izoliatų pagal mokslininkus Maninder et al., 2007 ir Barac et. al., 2010 yra dėl pagrindinių juose esančių baltymų santykio, kurie gali būti įtakojami skirtingų genotipų charakteristikų, aplinkos ir gamybos sąlygų. Barac et.al., 2015 tyrimas, tos pačios kilmės bet skirtingų gamintojų baltymų izoliatų lyginimas tarp skirtingų technologinių ir funkcinių savybių parodė, kad pagrinde jos priklauso nuo pasirinktos izoliato rūšies, gamybos sąlygų ir pH, prie kurio yra analizuojama technologinė ir funkcinė savybė [26]. Bendru atveju, baltymų ekstrakcija gali būti vykdoma šarminėmis arba rūgštinėmis sąlygomis, atitinkamai ekstrakto nusodinimas gali būti izoelektriniu nusodinimu arba, kaip alternatyva – ultrafiltracija. Gueguen, J. et al., 1994 tyrimas parodė, kad ultrafiltracijos našumas yra apie 90-94%, tuo tarpu izoelektrinio nusodinimo našumas yra apie 85%. Tačiau ultrafiltracijos metodu, gali pasikeisti izoliatų kompozicija. Be globulinių izoliatų gali būti kitų frakcijų baltymų ir polisacharidų [26]. Wang, J. et. al., 2017 tyrimai įrodė, jog, kuo ilgesnis kiaušinių baltymų džiovavimo laikas esant 75°C, tuo didesnis yra jų hidrolizės laipsnis virškinimo metu [27]. Baltymų funkcionalumas kaip technologinės savybės gali būti panaudojamos stebėti elgesį virškinimo metu. Jų sąveika su skirtingais komponentais maisto matricoje yra dažnai naudojama formuojant maitinimo produkto struktūrą ir maisto tekstūrą [28].

Apskritai, kiaušinių, žirnių ir pieno baltymai pasižymi geromis putojimo ir gelio formavimo savybėmis [28, 30]. Pieno baltymai reprezentuoja stabilų maisto matricos kompleksą, dažnai naudojamą virškinimo eksperimentuose [31]. Taip pat žirnių, kiaušinių ir pieno baltymai pasižymi emulsifikacijos ir stabilumo savybėmis. Žirnių baltymai yra mažo tirpumo, didelio paviršiaus hidrofobiškumo ir žemo paviršinio krūvio, palyginus juos su kiaušinių ar pieno baltymais [32].

Baltymų tirpumas yra viena iš pagrindinių technologinių savybių maisto pramonėje, įtakojančių fermentinę baltymų hidrolizę. Tai yra rezultatas vandens sąveikos su paviršiuje esančiomis hidrofilinėmis grupėmis. Pagrindinis kriterijus, nustatant baltymų tirpumą, yra pH. Tirpumas mažėja, pasiekus baltymų izoelektrinį tašką. Bendru atveju, baltymai yra mažiausiai tirpūs prie pH 4-6, tačiau pakyla iki 80-90% pakeitus pH į rūgštinę ar bazinę puses [33]. Tyrimų

duomenimis, įvairios baltymų sąveikos su kitais komponentais turi įtakos baltymų tirpumui, pvz.: aukštas termininis apdorojimas sumažina žirnių baltymų tirpumą, tačiau, esant komplekse su *arabic* guma, tirpumas pH 4,2 taške yra didesnis [34]. Pieno ir žirnių baltymuose didžiąją dalį baltymų sudaro globulinai, kurie brinksta vandenyje ir, didėjant jų koncentracijai, sudaro gelį. Kiaušinių baltymuose didžiąją dalį sudaro albuminai, kurie pasižymi tirpumu vandenyje, tačiau klampumui jo koncentracijos kiekis įtakos neturi [35].

1.2. Baltymų mitybinės savybės

Baltymų mitybinė reikšmė yra apibūdinama jų virškinamumu, kuris paremtas baltymų rodikliu pagal amino rūgštis PDCAAS (ang.k. *Protein digestibility Corrected Amino Acid Score*). Pagal pasaulio sveikatos organizaciją 1989m. šis rodiklis įvertinamas azoto kiekio nustatymo metodu prieš ir po virškinimo, bandymuose su žmonėmis ir gyvūnais. Tačiau, FAO Ekspertų konsultacijoje apie baltymų kokybės įvertinimus, 2011m. nuspręsta šį balą pakeisti nauju – virškinamų nepakeičiamų amino rūgščių rodikliu – DIAAS, (ang.k. *Digestible Indispensable Amino Acid Score*). Moughan J. Paul et. al, 2012 aprašė, kad baltymai, pirmiausia, turi būti apibūdinami teorija, nusakančia jų amino rūgščių virškinamumą, – t.y. ar baltymai yra atlaisvinami iki absorbuojamų amino rūgščių ir peptidų virškinimo metu [36, 37].

Baltymų virškinimo kinetika yra sutapatinta su tam tikrais fizikocheminiais rezultatais, kaip „greitai“ ir „lėtai“ pasisavinantys baltymai [38]. „Greitieji“ baltymai padidina stimuliaciją, sintetinat naujus baltymus, ir amino rūgščių oksidaciją, lyginant su „lėtaisiais“. Kita vertus, „lėtieji“ baltymai skatina ilgesnį jų skaidymą virškinamajame trakte ir sotumo jausmą [39]. Maisto virškinamumas, pasisavinamumas, specifiniai suvirškintų komponentų fiziologiniai atsakai priklauso nuo daugelio faktorių: žmogaus amžiaus, laiko, per kiek maitinimo produktas yra suvartojamas, nuo mikro ir makroelementų kompozicijos, tarpusavio sąveikos, produktų gamybos proceso [10, 23]. Baltymų hidrolizei virškinimo metu įtakos turi ir baltymų izoliatų gamybos procesai, tokie, kaip terminis apdorojimas, džiovinimas, dalelių dydis. Priklausomai nuo baltymų pagaminimo technologijos, skiriasi jų technologinės savybės. O taip pat ir žmogaus organizmo fiziologija yra kompleksinė ir dinaminė [27].

Baltymai yra polimerai sudaryti iš L-amino rūgščių, sujungtų α -peptidiniais ryšiais. Baltymų maistinė kokybė priklauso nuo baltymų hidrolizės virškinimo metu ir amino rūgščių kompozicijos [40]. Virškinimo metu baltymai yra hidrolizuojami skrandyje ir žarnyne iki mažesnių peptidų ir amino rūgščių, toliau di- ir tri-peptidai, amino rūgštys yra absorbuojami per žarnyno epitelį į kraują. Pagrindė jie dalyvauja baltymų ir peptidų darinių sintezėje. Kai kurios amino rūgštys dalyvauja ir specifinėse reakcijose, sintetinant ir nebaltyminius darinius, kaip pvz: poliaminus, nukleotidus, gliukozaminus, hormonus ir kt. Identifikavimo metodai yra nustatomi

pagal amino rūgščių kokybines ir kiekybines analizes. Idealiu atveju, šie rezultatai turėtų būti kartu su biologiškai paremtais testais, nustatančiais amino rūgščių aktyvumą [41].

Amino rūgštys, atsižvelgiant į mitybinę/fiziologinę funkcijas, yra skirstomos į nepakeičiamas amino rūgštis: valinas, leucinas, izoleucinas, fenilalaninas, triptofanas, treoninas, metioninas, histidinas, lizinas ir argininas, kurios žmogaus organizme yra nesintetinos ir pakeičiamas aminorūgštis: prolinas, glicinas, alaninas, serinas, asparaginas, glutaminas, asparto ir gliutamo rūgštys [30].

Literatūros šaltinių duomenimis, nepakeičiamų amino rūgščių kiekis yra panašus gyvūninės ir augalinės kilmės baltymuose (žr. Lentelė 2). Tačiau metionino ir tirozino žirnių baltymuose yra sąlyginai mažiausiai. Žirnių baltymuose randamos visos nepakeičiamos amino rūgštys. Lizino kiekis žirnių baltymuose (7280mg/l) yra didesnis nei kiaušinių baltymuose (5337mg/l). Jis svarbus grūdais peremtose dietose [21]. Kiaušinių vartojimas yra seniai žinomas dėl savo vertingos mitybinės vertės. Kiaušinių baltymai yra pripažinti kaip vertingas baltymų šaltinis, turintis visas nepakeičiamas amino rūgštis, kurios reikalingos žmogaus mityboje [28]. Taip pat kiaušinių, pieno ir žirnių baltymuose atitinkamai yra didžiausias leucino kiekis 5997mg/l, 8700mg/l, 8280mg/l, palyginti su kitomis nepakeičiamomis amino rūgštimis. Jis yra svarbus aktyvatorius mTOR (ang.k. *mammalian target of rapamycin*) signalizavimui. mTOR aktyvumas yra tiesiogiai susijęs su širdies skilvelio hipertrofija ir baltymų sintezės reguliavimu širdies raumenyje [42].

Lentelė 2. Kiaušinių, pieno ir žirnių baltymų nepakeičiamų amino rūgščių (NAR) kompozicija [43]*[44] ** [45]***

	Kiaušinių baltymai *	Pieno baltymai**	Žirnių baltymai ***
	mg/l		
Treoninas	3236	4500	4920
Valinas	5021	4800	5200
Metioninas	4587	1800	690
Izoleucinas	3817	4200	4040
Leucinas	5997	8700	8280
Tirozinas	3305	4500	2290
Fenilalaninas	4489	4800	5400
Histidinas	2410	3000	2630
Lizinas	5337	8100	7280
Argininas	4807	3300	-
Iš viso NAR	43006	47700	40730

Žirniuose nepakeičiamų amino rūgščių hidrolizė virškinimo metu yra 63-87% [46]. Arginino hidrolizė yra 87%, lizino – 82%, triptofano – 63%. Tačiau žirnių baltymų nepakeičiamų amino rūgščių santykis su bendru amino rūgščių kiekiu po virškinimo yra 41,75% . Pieno NAR hidrolizė yra didesnė – 91-99%. Intensyviausia hidrolizė yra tirozino – 99%, mažiausia glicino – 91% [47, 48]. Kiaušinių baltymų izoliato virškinamumas yra 86-88%, o

hidrolizės laipsnis skrandyje yra 6-8%, iš kurių daugiausia atlaisvinama triptofano, leuzino, fenilalanino, lizino [28].

Baltymai, skaldomi proteolitinų fermentų, atskelia peptidus, kurie gali pasižymėti bioaktyvumu. Bioaktyvūs peptidai – tai peptidai, pasižymintys savybėmis, kurie sąveikomis ar ryšiais susijungia su specifiniais receptoriais pagrindinėse ląstelėse ir pagerina tam tikrą organizmo fiziologinę funkciją. Šie atitinkamai yra nustatomi pvz.: angiotenzino-pokyčio fermento inhibicijos (ACE) metodu. Tyrimo metu teigiamas fermento inhibicijos rezultatas patvirtina peptido funkciją prieš hipertenziją [49].

Pastaraisiais metais padidėjo susidomėjimas maisto poveikio biologiniams atsakams žmogaus organizmui, kintant jo cheminei ir fizinei struktūrai virškinimo metu. Stebima, kad produkto kompozicija ir struktūra turi poveikį juslinėms savybėms – tekstūrai, skoniui, aromatui. Maistinių elementų absorbcija per storą žarnyno epitelį priklauso nuo substrato koncentracijos ir fiziologinių savybių [50]. Absorbuoti elementai patenka į specifinį audinį per cirkuliuojamą organizmo sistemą [23]. Modeliuojant skirtingas fizikochemines maisto savybes, galima pagerinti žmogaus organizmo funkcijas [51].

Pieno, žirnių ir kiaušinių baltymai (PB, ŽB, KB) turi potencialią reikšmę sveikatai dėl biologiškai aktyvių peptidų. Priklausomai nuo fiziologinės funkcijos pagerinimo, bioaktyvūs peptidai gali būti skirstomi į antimikrobinius, antiuždegiminius, mineralus surišančius, antioksidacinius [52]. Palyginti su kitais maisto baltymais, pieno baltymai yra pagrindinis šaltinis biologiškai aktyvių peptidų [53]. Pieno baltymai ir peptidai padidina mineralų ir keletos elementų, tokių kaip kalcis, magnis, cinkas, selenas ar geležis bioaktyvumą [31, 54].

Pieno baltymų bioaktyvūs peptidai. Pieno baltymuose susidarę bioaktyvūs peptidai dalyvauja insulino gamyboje ir, reguliuodami gliukozės kiekį kraujyje [55], sumažina kraujo spaudimą [56]. Literatūros šaltiniuose yra randama ir daugiau identifikuotų pieno baltymų peptidų, pagerinančių įvairias funkcijas organizme (žr. Lentelė 3) Tačiau baltymų kitimas virškinamajame trakte gali būti siejamas ir su žalingais žmogaus organizmo dariniais, kaip pvz., alergenais [59].

Lentelė 3. Pieno baltymų peptidai identifikuoti po in vitro virškinimo [57]

Peptidas	Identifikuota seka	Funkcija organizme	Šaltinis
b-CN	HLPLP	Antihipertenzinės savybės (ACE)	Chabance et al., 1998[60]
as1-CN	AYFYPEL1	Antihipertenzija veikia ląsteles HT29-MT, kurios stimuliuoja išorinis žarnyno muciną, pasižymi opioidiniu aktyvumu	Contreras, Carrón, Montero, Ramos, & Recio, 2009 [61, 62] Martínez-Maqueda, Miralles, Cruz-Huerta, & Recio, 2013 Fernández-Tomé et al., 2016. [56]
b-Ig	IIAEK	Hipochlesteroleminės savybės	Nagaoka et al., 2001 [63]
b-Ig	GLDIQK		
b-Ig	IPAVF	Dipeptidalpeptitazės inhibitorius	Silveira, Martínez-Maqueda, Recio, & Hernández-Ledesma, 2013 [64]

Žirnių baltymų bioaktyvūs peptidai. Žirnių bioaktyvūs peptidai pasižymi opiatiniu, imunoreguliaciniu, antihipertenziniu, antitrombotiniu, antioksidaciniu ir antimikrobiniu aktyvumu. Taip pat turi ir biologiškai aktyvių komponentų, tokių kaip antigrybelinių bioaktyvių peptidų ar sveikatą gerinančių maistinių lektinų [65, 66]. Kartu su angliavandeniais žirnių baltymų izoliatai sumažina gliukozės kiekį kraujyje [67].

Žirnių baltymai fermentinės hidrolizės metu yra suskaldomi iki peptidų, kurie pasižymi bioaktyviomis antioksidacinėmis savybėmis laisvųjų radikalų sumažinimui [68]. Vicilinas virškinimui skrandyje yra atsparus, tačiau žarnyne, veikiamas fermento tripsino, atlaisvina peptidus, kurie pasižymi ACE inhibitoriniu aktyvumu ir antioksidacinėmis savybėmis [69].

Kiaušinių baltymų bioaktyvūs peptidai. Kiaušinių baltymų atlaisvinti peptidai, gaunami fermentinės hidrolizės metu iš ovalbumino, yra aktyvūs prieš *Bacillus subtilis*, *Escherichia Coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas auringenosa*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans* [70]. 92-amino rūgščių ovotransferino peptidas OTAP-92 yra pajėgus sunaikinti gram-neigiamas bakterijas, pažeisdamas citoplazminę membraną. Taip pat buvo pademonstruotas jo antivirusinis aktyvumas prieš Mareko ligos virusus kiaušinių emrionų fibroplaste [70].

Kiaušinio baltymų peptidai, gaunami virškinimo metu, pasižymi ir anti-adhezinėmis savybėmis. Adhezija yra pirmas žingsnis mikroorganizmui prisitvirtinti prie audinio ir galimai sukelti infekciją. Po fermentinio kiaušinio virškinimo ovomucinas yra glikoziduojamas taip, kad sudarytų ovomucino glikopeptidų (OGP), kurie turi *Escherichia Coli* O157:H7, specifinius prisitvirtinimo ryšius, sudarytus iš sialiko rūgšties. Šių ryšių atradimas patvirtina, kad OGP gali

būti apsauga *E.Coli* O157:H7 *in vivo* infekcijai, o taip pat potencialiai naudojamas *E. Coli* O157:H7 aptikimui [71].

Keletas kiaušinio baltymų ir peptidų pasižymi imunoreguliacinio aktyvumu. Ovalbumino peptidai yra naudojami pagerinti imuninį atsaką vėžio imunoterapijai [72]. Fagocitinis mikroorganizmų aktyvumas buvo pagerintas su ovalbumino peptidais OA 77-84 ir OA 126-136, gautais iš ovalbumino virškinimo žarnyne metu [71].

Kiaušinio baltymai taip pat pasižymi ir antihipertenziniu aktyvumu. Ovalbumino peptidas ovokininas (OA 358-365, OA 2-7), gaunamas po chemotripsino reakcijos su ovalbuminu, pasižymi vazorelaksaciniu aktyvumu [73, 74]. Abu peptidai pasižymi sistolinio kraujo spaudimo sumažinimu hipertenziją turinčiomis žiurkėms [73]. Keturi ACE-inhibitoriniai peptidai (ACE - Angiotensin I Converting Enzyme) identifikuoti po virškinimo fermentų tripsino ir tripsino ovalbumino proteolizės: OA 183-184, OA 200-218, Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu, Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile- Leu [75]. Devalos et.al. (2004) teigia, kad kiaušinių baltymų fermentinė hidrolizė atlaisvina peptidus, pasižymintčius dideliu antioksidaciniu aktyvumu. Kombinacijoje su ACE-inhibitorinėmis savybėmis peptidai pasižymėtų multifunkcinėmis savybėmis, kurios apsaugotų nuo širdies kraujagyslių ligų ir dalinai nuo hipertenzijos [76].

1.3. Baltymų fermentinė hidrolizė virškinamajame trakte

Baltymų fermentinę hidrolizę atlieka proteoliniai fermentai. Jie hidrolizuoja peptidinius ryšius tarp amino rūgščių, sudarydami įvairaus molekulinio dydžio peptidus ir laisvas amino rūgštis. Fermentinė hidrolizė baltymų substratui yra labai selektyvi. Fermentų selektyvumas yra kiekybinis parametras, apibūdinantis specifinį fermentinės hidrolizės skilimą ir mechanizmą. Taip pat dažnas parametras, apibūdinantis substrato skilimą, yra hidrolizės laipsnis. Jis proporciškai apibūdina hidrolizuotus peptidinius ryšius substrate, tačiau nenusako fermentų specifinio veikimo mechanizmo – selektyvumo [77].

Pagal hidrolizuojamąjį mechanizmą fermentai yra skirstomi į endopepsidazes ir egzoproteazes. Endopepsidazės hidrolizuoja peptidinius ryšius baltymo molekulėje, sudarydamos didelės molekulinės masės peptidus, tuo tarpu egzoproteazės sistematiškai pašalina N ar C terminalines amino rūgštis hidrolizuodama terminalinius peptidinius ryšius [78].

Fermentai yra specifiški. Jie hidrolizuoja substratą specifinėse vietose priklausomai nuo esamos aminorūgšties molekulėje. Pvz. Tripsinas skelia baltymo peptidinį ryšį esant Lys-X ar Arg-X amino rūgštims, kai X yra bet kuri amino rūgštis išskyrus proliną [79]. Fermentų selektyvumas pagrįste priklauso nuo keturių pagrindinių faktorių. Pirmiausia nuo amino rūgšties krūvio subtrate. Tripsinas yra aktyvus pH 7-10 ir skeliant β -kazeiną didinant pH vertę,

aktyvumas skiriasi. Skaldant substratą esant įkrautai Lys amino rūgščiai, mažėja, tuo tarpu, esant įkrautai Arg amino rūgščiai substrate, tripsino aktyvumas išlieka pastovus [80]. Antras parametras - temperatūra. Literatūros šaltinių duomenimis, lyginant β -kazeino skilimą su glutamyl-endopepsidaze 37°C ir 50°C susidaro skirtingas glutamo rūgšties radikalų kiekis. Trečias parametras, įtakojantis fermentų selektyvumą hidrolizei, yra produktų susidarymas hidrolizės metu. Po glutamo rūgšties atskėlimo subtrate jis trukdo atkelti metioniną ir proliną esant P1' pozicijoje [81]. Ketvirtas parametras – substrato prieinamumas. Hidrolizės kinetika yra greitesnė baltymų agregatų ar neišsivyniojusių baltymų, nei linijinės formos substratų [82, 83].

Pagrindinė fermentinė hidrolizė žmogaus organizme vyksta virškinimo metu. Skirtingų substratų hidrolizė yra stebima *in vitro* ir *in vivo* virškinimo metu. Baltymų fermentinė hidrolizė yra vykdoma naudojant pepsiną, chymotripsiną ir tripsiną bei kitus proteolitinius fermentus. Atliekant virškinimo tyrimus, fermentų aktyvumas ir fiziologinė druskų koncentracija yra parenkama remdamasi hormonizuotas protokolais, paremtais *in vivo* žmogaus studijomis. Tačiau vis dar nėra tikslaus patvirtinimo, kuris protokolas būtų fiziologiškai priimtinas [84].

Pagrindiniai faktoriai, įtakoiantys varijuojant vertinimus įvairiose studijose baltymų hidrolizę *in vitro* virškinimo metu, yra pH, fermento grynumas ir aktyvumas, fermento ir substrato santykis, baltyminio substrato grynumas ir konformacijos, inkubacijos laikas. Šie varijuojami parametrai yra pagrindiniai veiksniai, trukdantys gauti tikslius duomenis apie fermentinės baltymų hidrolizės produktus [85, 86].

Fermentų aktyvumas hidrolizės metu. Mokslinių tyrimų duomenimis, skirtingas fermentų aktyvumas tam pačiam substrato kiekiui turi įtakos produktų susidarymui. Endopepsidazės (pvz.: pepsinas), esant aukštam aktyvumui, gali save hidrolizuoti ir sudaryti laisvas amino rūgštis ir peptidus, prarasti savo aktyvumą [87]. Wang R. et al., 2017 tyrimo metu parinko tris fermento pepsino ir substrato santykius. Rezultatai parodė, kad, didėjant pH (nuo 1,2 iki 2,5) ir mažėjant pepsino substrato santykiui (nuo 10U:1 μ g iki 0.1U:1 μ g) padidėja hidrolizės produktų kiekis ir prailgėja pepsino aktyvumas, skaldant substratą [88]. Taip pat, naudojant mažesnio aktyvumo fermentus tyrimamas, yra didesnis atsikartojamumas, nei naudojant didesnio aktyvumo fermentus baltymų hidrolizei [87].

Terpės pH įtaka baltymų fermentinei hidrolizei. Terpės pH yra vienas svarbiausių kriterijų, atliekant fermentinę baltymų hidrolizę. Priklausomai nuo terpės ir temperatūros, atlaisvinama reaktyvi zona, kuri skaldo substratą tam tikrose vietose. Skrandžio sekrecijoje yra pepsino pirmtakas pepsinogenazė, kuri, esant rūgštinei terpei, vykdo autokatalizę ir aktyvuojasi į pepsiną [89]. Įrodyta, jog aspartinė proteazė ir pepsino aktyvumas tiesiogiai priklauso nuo pH ir tirpale esančių druskų [90]. Esant mažesniau pH nei 2,5, yra pastebėtas pepsino aktyvumo

nuosmukis ir nepilna galimų substratų hidrolizė, gauta iš riešutų, ryžių ir išrūgų [88, 91, 92]. Šiam fermento pokyčiui gali turėti įtakos ir unikalios substrato fizikocheminės savybės, esant skirtingam pH. Pvz.: HRP (alergenai - horseradish peroxidaze) yra stabilus neutraliose sąlygose, bet praranda stabilumą sumažėjus pH iki 4,5 ir pilnai išsivynioja esant pH 3. Šios konformacijos turi įtakos fermento jautrumumo sumažėjimui hidrolizuojant HRP [93]. Organizme pH kinetika yra dinaminė. Mokslinių tyrimų duomenimis, skrandžio pH kitimas yra stebėtas bandymuose su gyvūnais: jei pradinis skrandžio pH yra 2, tai, suvartojus maitinimo produktą, jis per 30min pakyla iki 5 ir stabilizuojasi iki pradinio per keletą valandų. Panašus tyrimas, Chen, E.P., 2008, vaizduojantis pH kinetiką virškinamajame trakte, atliktas ir su žmonėmis [94, 95].

Skirtinga substrato koncentracijos įtaka fermentinei baltymų hidrolizei.

Skirtinga substrato koncentracija įtakoja fermentinės hidrolizės produktų susidarymą. Zhang S., 2013 tyrimų duomenimis, *in vitro* virškinimo metu stebėti skirtingos koncentracijos išrūgų baltymai. Virškinimo metu suformuoti agregatai mažesnės koncentracijos baltymuose (3% ir 5%) pilnai suhidrolizuojami iki mažesnių produktų po 30min., tuo tarpu didesnės koncentracijos (7% ir 9%) agregatai yra matomi ir po 2val. imituojamojo virškinimo skrandžio fazėje. Didesnė substrato koncentracija produkte virškinimo metu padidina laisvų radikalų kiekį fiziologinėse sultyse, todėl peptidų ir aminorūgščių sąveika su kitais joniniais komponentais padidėja, formuodama agregatus. Literatūros šaltinių duomenimis, palyginus 3% ir 9% išrūgų baltymų disociaciją į agregatus, virškinimo metu buvo identifikuotas didesnis disulfidiniai ryšiais sujungtų peptidų kiekis didesnės koncentracijos baltymuose [96].

Baltymų kilmės ir maisto matricos įtaka fermentinei baltymų hidrolizei.

Literatūros šaltiniuose randama, kad pilnavertį maistinių medžiagų gavimą įtakoja ne tik nepakeičiamų amino rūgščių sudėtis, bet ir specifiniai spiraliniai išsidėstymai molekulėje, kurie ir sukuria unikalią molekulės struktūrą, krūvio pasiskirstymą, paviršiaus hidrofobiškumą ir prieinamumą hidrolizuojamiems fermentams. Virškinimo metu šie specifiniai fizikocheminiai dariniai įtakoja baltymo elgesį skirtingose aplinkose ir reguliuoja virškinimo kinetiką [21]

Nors baltymų kiekis ir amino rūgščių seka maitinimo produktuose skiriasi, tačiau mokslininkų buvo įrodyta, jog gyvūninės kilmės baltymai yra geresnis nepakeičiamų amino rūgščių šaltinis palyginti su augalinės kilmės baltymais. Tačiau subalansuotas augalinės ir gyvūninės kilmės baltymų virškinamumas eksperimentuose su gyvūnais yra panašus [97].

Apibendrinimas. Taigi, prilausomai nuo baltymų izoliatų pagaminimo proceso, terminio apdorojimo, amino rūgščių kompozicijos ir konformacijos t.y. išorinių ir vidinių veiksnių fermentinės hidrolizės metu atlaisvina skirtingą kiekį peptidų ir amino rūgščių, kurie pasižymi funkcinėmis ir bioaktyviomis savybėmis.

Tyrimų tikslas: ištirti skirtingos kilmės baltymų vandeninių tirpalų hidrolizės produktų dinamiką modelinėje *in vitro* sistemoje

Tyrimų uždaviniai:

1. Nustatyti skirtingos kilmės baltymų tirpumo ir klampos pokyčius priklausomai nuo pH, baltymų koncentracijos ir panaudoto polisacharido priedo.
2. Palyginti skirtingos kilmės ir klampos baltymų virškinamumą *in vitro* skrandžio ir žarnyno fazių modelyje, sudarytame pagal COST INFOGEST patvirtintą protokolą, panaudojant kiekybinį baltymų hidrolizės produktų vertinimą

2. Medžiagos

2.1. Reagentai ir tyrimo medžiagos

Tyrimo metu pasirinkti žirnių (pea protein, “Pulsin”, LOT17045), kiaušinių (egg protein “Myprotein”, L701602064) ir pieno baltymai (milk protein “Myprotein”), naudojamas tirštiklis yra *Konjac Glucomannan* (“Bulk” Batch No: KDT-1613) polisacharidas.

Tirpumo nustatymui naudojami reagentai: druskos rūgštis (HCl), natrio hidroksidas (NaOH).

Pepsino aktyvumo nustatymui naudoti reagentai: jaučio kraujo Haemoglobinas (Sigma-Aldrich, H2500), druskos rūgštis (6081, J.T.Baker) NaCl (6404, Merck), NaOH (9141, Merck), trichloracto rūgštis (TCA) 99,5 % (Panreac, 131067), ultra grynas vanduo, generuotas Milli-Q sistemos (tekste minimas, kaip grynas vanduo).

Virškinimo metu naudoti reagentai: kiaulių pepsinas (P7012), pankreatinas iš kiaulių tulžies (P7545, Sigma), kiaulių tulžies druskų ekstraktas (B631), tripsinas (T4799-5, Sigma), α -Chymotripsinas (C4129, Sigma), tulžies α -amilazė (10080, Sigma) kalio chloridas (Fisher, P/4280/53/, KCl), kalio dihidrofosfatas (Fisher, P/4800/53, KH_2PO_4), natrio hidrokarbonatas (Fisher, S/0600/53) NaHCO_3), natrio chloridas (Fisher, H/1200/PB17, NaCl), vandeninis magnio chloridas (Fisher, M/0600/53, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$), amonio karbonatas ($\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$), kalcio chloridas (Fisher, S/4920/53, CaCl_2), druskos rūgštis (HCl), natrio hidroksidas (NaOH), PMSF (Sigma, CAS Number 329-98-6, phenylmethanesulfonyl fluoride).

Kjeldalio metodo reagentai: boro rūgštis, H_2SO_4 konc., natrio hidroksidas (NaOH), taširo indikatorius, katalizatoriaus tabletė.

Lowry metodo reagentai: Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, folin reagentas, natrio hidroksidas (NaOH).

Fluorescencijos metodui naudojami reagentai: TCA (Merck 807, Merck Germany, CAS no.: 76-03-9. Mw:163.39), HCl: Sigma H1758, (Sigma Aldrich Germany, CAS no.: 7647-01-0, Mw: 36.46 g/mol), sodium tetraborat (Na₂B₄O₇, 10H₂O): Merck 6308, (Merck Germany, CAS no.:1303-96-4, Mw: 381.37 g/mol), acetone (dried) Merck 299 (Merck Germany, CAS no.: 67-64-01. Mw: 58.08 g/mol);, fluorescamin (4-phenylspiro furan-2(3H), 1'-phthalan -3.3'dione): Fluka 47614 (Sigma Aldrich, Germany, CAS no.:38183-12-09, Mw.: 278.3 g/mol), L-Leucine: Sigma L-8000 (Sigma Aldrich, Germany, CAS no.: 61-90-5, Mw: 131.17 g/mol).

Ekstrakcijos reagentai: Tris-HCl (T5941, Sigma), Urea (U5378, Sigma), Thiourea (T8656, Sigma), 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS) (C9426, Sigma), 1,4-Dithiothreitol (DTT) (D0632, Sigma).

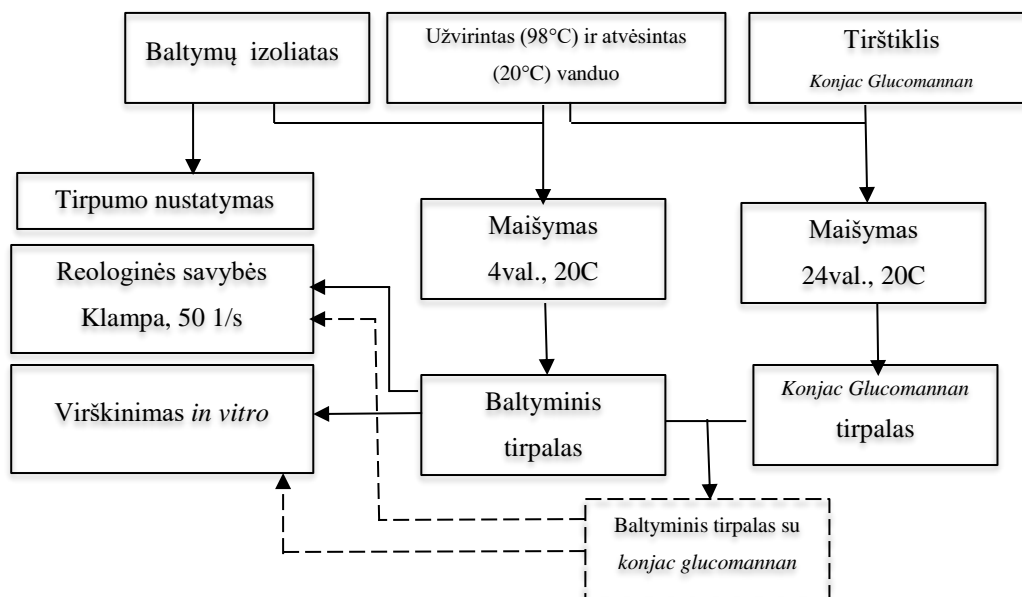
Elektroforezės SDS-PAGE reagentai: poliakrilamido gelis (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel), Running buffer (NuPAGE), LDS (NuPAGE sample buffer(4x), NP000), Comassie G-250 (SimplyBlue™ SafeStain LC6060, Novex).

2.2. Tyrimo objektų paruošimas

Tyrimuose naudojami kiaušinių, pieno ir žirnių baltyminiai tirpalai paruošti iš baltymų miltelių su ir be tirštikliu *Konjac Glucomannan*. Prieš nustatant tyrimo objektų reologines savybes, atliekamas baltymų miltelių tirpumo nustatymas.

Baltymų vandeniniai tirpalai ruošiami pagal 2 lentelę. Vanduo užvirintas ir atvėsintas iki kambario temperatūros. Tirpalai palikti brinkintis ne mažiau 4h 4°C temperatūroje. Kiekvieno baltyminio tirpalo koncentracija yra 10% ir 15%.

Mišiniai su tirštikliu *Konjac Glucomannan* yra ruošiami ne anksčiau nei 24h prieš tyrimus. *Konjac Glucomannan* reikiamos koncentracijos yra 0,3% kiaušinių baltymų ir 0,07% pieno baltymų vandeniniuose tirpaluose. Polisacharido milteliai yra 1val. laikomi UV spinduliuotėje ir pasveriami 1g (0,0001g tikslumu ADAM PW 184). Tirštiklis yra palaipsniui maišomas su virintu ir atšaldytu iki +20°C temperatūros vandeniu. Tirpalas maišomas ant magnetinės maišyklės (magnetic stirrer MSH 300) 24 valandas 20 °C temperatūroje. Gautos koncentracijos tirpalas yra įmaišomas į baltymų vandeninį tirpalą taip, kad bendra tirpalo koncentracija būtų kiaušinio baltyminiame tirpale 0,3%, o pieno baltyminiame tirpale 0,07%. Sumaišytas baltymo ir polisacharido tirpalas yra laikomas 4 valandas 4°C ir naudojamas tolimesniems tyrimams [98]. Baltymų mišiniai yra maišomi santykiu 1:1. Bendra mišinio koncentracija yra 10%. Paruošiamas pieno ir žirnių mišinio baltyminis tirpalas (žr. Paveikslas 1).



Paveikslas 1. Tyrimo objektų paruošimo ir tyrimų eksperimento schema

3. Tyrimo metodai

3.1. Tyrimo objektų funkcinių savybių vertinimas

Priklausomai nuo gamybos proceso, tyrimo objektai pasižymi skirtingomis technologinėmis savybėmis. Tyrimo metu nustatytas jų tirpumas prie skirtingo pH. Skirtingas pH tirpale gali pakeisti prigimtinę krūvį, esantį baltymų tinkle. Jie gali denatūruotis, pakeisti savo konformaciją. Baltymams skirtingas pH turi poveikį druskų tilteliams ir vandeniliniams ryšiams.

Druskų tilteliai yra sujungti joniniu ryšiu tarp teigiamą ir neigiamą krūvį turinčių šoninių amino rūgščių. Pvz: lizino jono $-COO^-$ ir asparto rūgšties $-NH^+$ jono. Padidinus pH baziniu tirpalu $-NH^+$, jonas virsta neutralia $-NH_2$ grupe. Sumažinus pH rūgštiniu tirpalu $-COO^-$, jonas virsta neutralia $-COOH$ grupe. Bet kuriuo atveju, joninė jėga yra pašalinama ir proteino struktūra išsivynioja.

Vandenilniais ryšiais yra susijungusios įvairios šoninės amino rūgštys pvz.: du alkoholiai: serinas, triptofanas ir tirozinas; alkoholis ir aminos: Ser ir Lys; alkoholis ir amidas: Ser ir Asn; alkoholis ir rūgštis: asparto rūgštis ir tirozinas; dvi rūgštys: asparto ir glutamo. Keičiantis pH yra suardomi vandeniliniai ryšiai, kurie pakeičia baltymo formą [30].

Kitos technologinės tyrimo objektų savybės tokios, kaip emulsijos sudarymas, stabilumas, dispersiškumas nebuvo įvertintos tyrimo metu.

3.1.1. Tyrimo objektų tirpumo nustatymas

Baltymų tirpumas buvo tiriamas žirnių kiaušinių, ir pieno baltyminiuose tirpaluose pagal metodiką Liang Han-Ni, 2013 [90], pH įtakai baltymų tirpumui buvo naudojamas distiliuotas vanduo, kurio pH koreguotas nuo 2 iki 8 su 1M NaOH ir 1M HCl tirpalais (GMH 3530 Digital pH-/mV-/Thermometer). Baltymai ištirpinti skirtingo pH vandenyje. Galutinė

baltymų koncentracija yra 1mg/ml (žr. Lentelė 3). Tirpalai purtomi purtykle (Thermo Scientific 415220Q Tube Shaker/Rotator) 2 val. kambario temperatūroje. Kiekvienas mėginys buvo nucentrifuguotas (Labofuge 200, Thermo Fisher) 5300rpm 20min. Tolimesniems tyrimams naudoti nupilti supernatantai. Baltymų kiekis bandiniuose nustatytas Lowry metodu [99], pagal kiaušinio albumino kalibracinę kreivę. Baltymų tirpumas apskaičiuotas santykiu su pradine įdėta baltymų koncentracija (1mg/ml) ir gauta koncentracija supernatante:

$$P_s = \frac{C_s}{C_p} \cdot 100 \quad (1)$$

P_s – Baltymų tirpumas, %; C_s – baltymų koncentracija supernatante, mg/ml; C_p – baltymų koncentracija baltyminiame tirpale, mg/ml.

100% tirpumas yra nustatytas, kai nepastebėta jokių nuosėdų paruoštuose tirpaluose po maišymo. Nustatymas buvo pakartotas du kartus ir apskaičiuotas standartinis nuokrypis.

Lentelė 4. Baltyminių tirpalų paruošimas

Baltymų izoliatas	Baltymų izoliato grynumas, %	Baltymo izoliato koeficientas 1g/baltymo	Tiriamasis tirpalas	
			Skirting pH vandens kiekis, ml	Baltymo koncentracija tirpale, mg/ml
Pieno	80	1,25	10	1
Žirnių	82	1,22	10	1
Kiaušinių	78	1,28	10	1

3.1.2. Tyrimo objektų reologinių savybių nustatymas

Klampa įvertinta reometru „MCR - 301“ (Anton Paar, GmbH), naudojant matavimo sistemą CC-24, kurios vidinis skersmuo yra 0,02 mm. Klampa nustatyta: $T = 20^{\circ}\text{C}$; poslinkio sparta viso matavimo metu buvo pastovi 50 (1/s). Atlikti 29 matavimai ir apskaičiuotas standartinis nuokrypis [13].

3.2. Virškinimas *in vitro*

Imituojamas statinis *in vitro* virškinimas atliekamas pagal INFOGEST protokolą Minekus et.al, 2014.

3.2.1. Fermentinis pepsino aktyvumo nustatymas

Pepsino aktyvumo nustatymas atliktas pagal metodiką (EC 3.4.23.1), kurio esmė yra TCA tirpių peptidų atlaisvinimas iš hemoglobino ir aptikimas spektrofotometrijos tyrimu 280 nm ($\text{pH } 2, 37^{\circ}\text{C}$).



Paruošiamas substratas 2 % (w/v) hemoglobinas. Pasveriamas 0,5 g hemoglobino ir ištirpinama 20 ml gryname vandenyje, pH=2 koreguojamas su HCl 300 mM ir praskiedžiamas iki 25 ml grynu vandeniu. Paruošiamas skirtingos koncentracijos kiaulių pepsinas (fermentas): 15, 20, 25, 30, 35, 40 µg/ml. Tyrimo metu išmatuojami atlaisvinti peptidai kiekviename mėginyje su skirtinga fermentų koncentracija po reakcijos (testiniai mėginiai) ir atitinkamai peptidų kiekis kiekviename mėginyje su skirtinga fermentų koncentracija be reakcijos (tušti mėginiai). Į kiekvieną 2ml epindorfo tūbelę įpilama 500 µL hemoglobino tirpalo, įskaitant ir tuščius mėginius. Mėginiai inkubuojami 37° C 3-4min, kad susivienodintų temperatūra. Pridedama po 100 µL kiekvienos fermento koncentracijos į atitinkamą mėginį (išskyrus tuščią mėginį). Inkubuojama tiksliai 10min. Reakcija sustabdoma įpylus 1ml 5% TCA tirpalo į kiekvieną mėginį. Į kiekvieną tuščią mėginį atitinkamai įpilamas 100 µL kiekvienos fermento koncentracijos. Mėginiai nucentrifuguoti 5300rpm 30 minutes 20°C, kad atsiskirtų dvi frakcijos: supernatantas ir netirpi frakcija. Supernatantas įpilamas į kvarcinę kiuvetę ir išmatuojama absorbcija, esant 280nm bangos ilgiui. Apskaičiuoti skirtingų koncentracijų fermentų aktyvumą galima formule:

$$\text{Units/mg} = \frac{[A280 \text{ Test} - A280 \text{ Blank}] \times 1000}{(\Delta t \times X)} \quad (2)$$

Kur, Units/mg – fermento aktyvumas 1mg

A280 Test – analizuojamo mėginio optinis tankis

A280 Blank – tuščio mėginio su fermentu optinis tankis

Δt: reakcijos laikas, *i.e.* 10 minutes

X: koncentracija, testuoto fermento mėginio (mg/ml)

Ištirtas fermentinis pepsino aktyvumas - 200U/mg.

3.2.2. Virškinimo sulčių paruošimas

Virškinimo sulčių ruošimas. Statinio virškinimo metu simuliuojamųjų sulčių paskirtis yra užtikrinti nekintamą pH ir terpę fermentams veikti. Simuliuojamosios žarnyno sultys buvo ruošiamos pagal lentelė 5 duomenis (SSF: simuliuojamos seilių sultys; SGF: simuliuojamos skrandžio sultys, SIF: simuliuojamos žarnyno sultys). Paruošti darbiniai tirpalai yra pašildomi iki 37°C prieš imituojamą virškinimą. Jie taip pat gali būti paruošti iš anksto ir laikomi –20°C.

Lentelė 5. Darbinių ir baziųjų virškinimo sulčių paruošimas

		Darbiniai Virškinimo tirpalai					
		SSF (pH 7)		SGF (pH 3)		SIF (pH 7)	
Druskų baziniai tirpalai (DBT)	Druskų tirpalų koncentracija	DBT kiekis paruošti 0.4 L (mL)	Galutinė druskų konc. tirpale (mmol L ⁻¹)	DBT kiekis paruošti 0.4 L (mL)	Galutinė druskų konc. tir-le (mmol L ⁻¹)	DBT kiekis paruošti 0.4 L (mL)	Galutinė druskų konc. tir-le (mmol L ⁻¹)
SSF(simuliuojamos seilių sultys), SGF(simuliuojamos skrandžio sultys), SIF(simuliuojamos žarnyno sultys). Koncentracijos yra paskaičiuotos 400ml tūrio tirpalui. Praskiedimas iki 500ml bus po fermento, tužies druskų ir CaCl ₂ (H ₂ O) pridėjimo in vitro virškinimo metu. Reikiamas CaCl ₂ (H ₂ O)pridedamas į galutinį tirplalą, kad būtų išvengta nuosėdų.							
KCl	0.5	15.1	15.1	6.9	6.9	6.8	6.8
KH ₂ PO ₄	0.5	3.7	1.35	0.9	0.9	0.8	0.8
NaHCO ₃	1	6.8	13.68	12.5	25	42.5	85
NaCl	2	—	—	11.8	47.2	9.6	38.4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.15	0.5	0.15	0.4	0.12	1.1	0.33
NH ₄ (CO ₃) ₂	0.5	0.06	0.06	0.5	0.5	—	—
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ *	0.3	—	1.5	—	0.15	—	0.6
pH koregavimui paruošiami 6M HCl ir 1M NaOH tirpalai.							

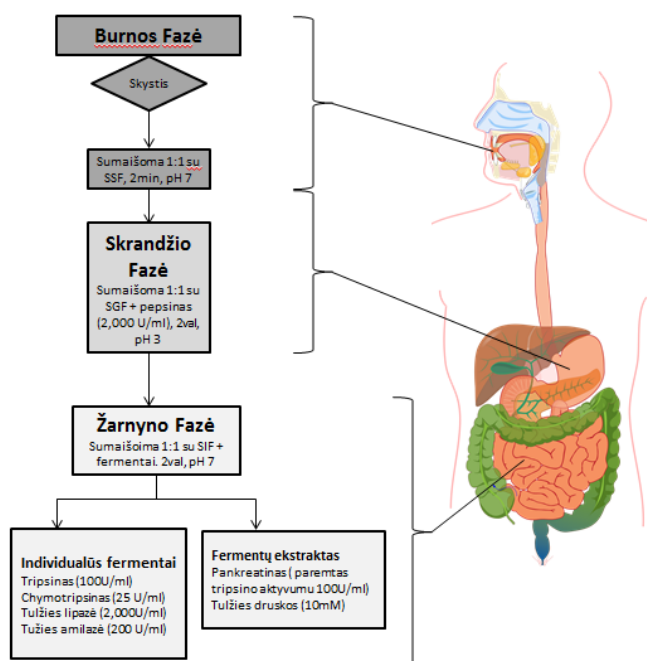
3.2.3. Virškinimo *in vitro* modelis

Simuojamasis *in vitro* virškinimo modelis yra vykdomas trimis etapais: burnos, skrandžio ir žarnyno fazėse. Naudojamas fiksuotas fermentų kiekis, pH, simuliuojamųjų fiziologinių sulčių kiekis ir virškinimo laikas (žr. Paveiklas 2).

Burnos fazė (galutinis maisto ir SSF santykis yra 50:50). 5g baltyminio tirpalo buvo sumaišyta su 4ml pašildytu darbiniu SSF darbiniu virškinimo tirpalu. Tiriamajame darbe α-amilazė nebuvo naudota dėl mažo angliavandenių kiekio tiriamuosiuose mėginiuose. Į mėginį buvo įpilta 25μl 0.3M CaCl₂ (H₂O)₂. ir 975μl vandens. Mėginys sumaišomas ir dedamas į termostatą su purtykle, kurioje palaikoma 37°C. Inkubuojama 2min.

Skrandžio fazė (galutinis burnos fazės mėginio ir SGF santykis 50:50). Po 2min mėginys sumaišomas su 8ml SGF darbinio tirpalu, įpilama 5μl 0.3M CaCl₂(H₂O)₂. Koreguojamas pH iki 3.0 su 6M HCl. Įpilamas 1ml kiaulių pepsino tirpalas (paruoštas vandenyje, galutiniame mėginyje pepsino aktyvumas yra 2000 U ml⁻¹) ir vandeniu pasiekamas

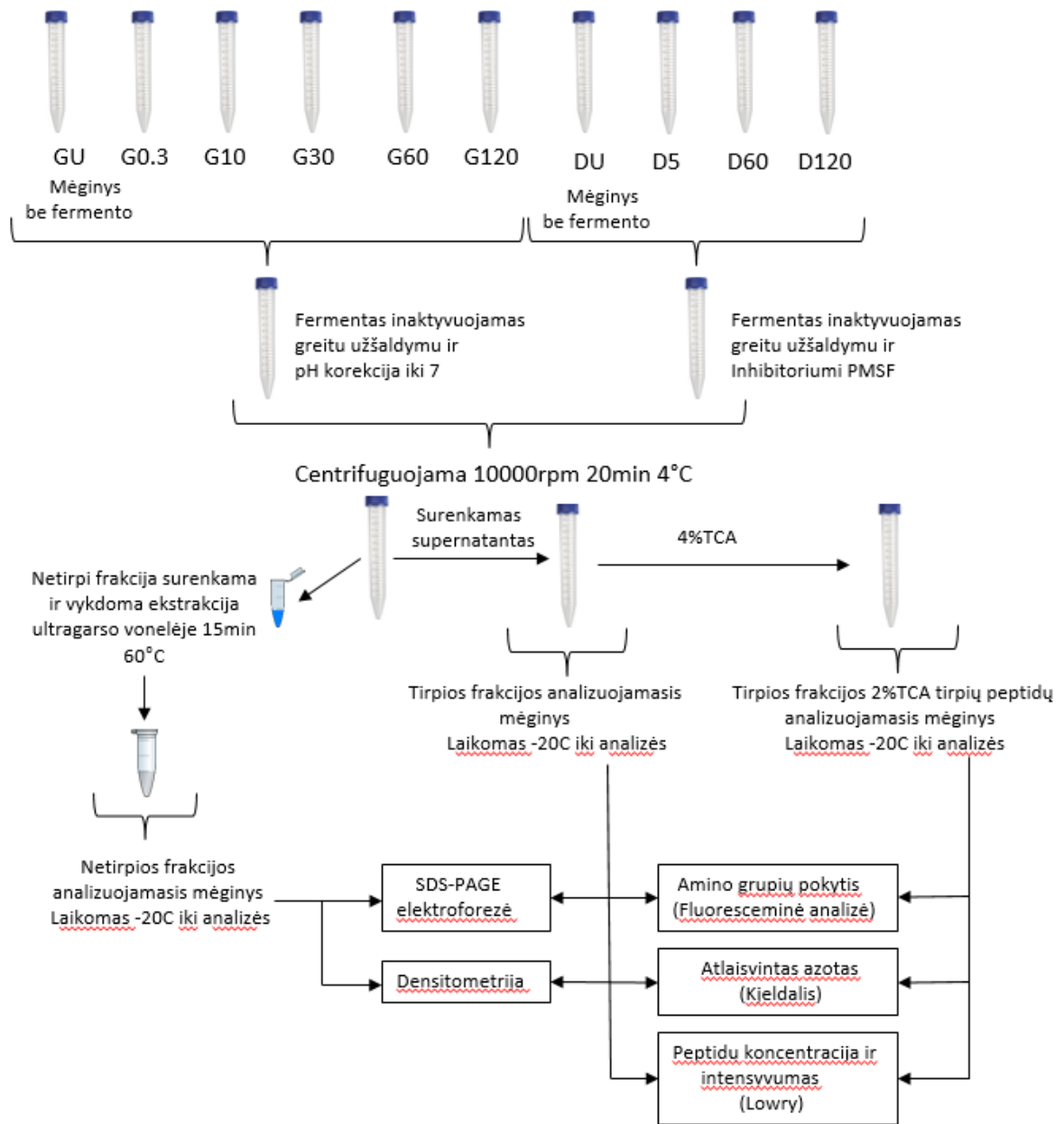
bendras mėginio tūris 20ml. Mėginys įdedamas į purtyklę ir inkubuojamas 2val, 37°C. Įvertinti virškinamumo eigą skrandžio fazėje mėginiai buvo išimami po 0,3min, 5min, 10min, 30min, 60min ir 120min. Mėginiuose esantys fermentai inhibuojami šaldymu ir pH koregavimu iki 7 su 1M NaOH.



Paveikslas 2. Simuliuojamojo *in vitro* virškinimo schema [10]

Žarnyno fazė (galutinis skrandžio fazės ir SIF santykis mėginyje 50:50). Į skrandžio fazės mėginį įpilama 11ml pašildyto darbinio SIF darbinio virškinimo tirpalo. Koreguojamas pH iki 7.0 su NaOH/HCl tirpalu. Į mėginį įpilama 40μl 0.3M CaCl₂(H₂O)₂. Įpilamas 1ml tulžies druskų (100ml -1,08g tulžies druskų paruoštame vandeniniame tirpale, kad druskos pilnai ištirtų, 30 min maišoma ant magnetinės maišyklės). Pagal paveikslą 2 galimi du variantai simuliuoti žarnyno fazę. Tyrimo metu, kiekybinėms analizėms naudojami mėginiai paruošti su fermentų ekstraktu: į mėginį įpilamas 1ml pankreatino mišinys (paruoštas SIF baziniame tirpale). Kokybinei analizei simuliuojamajam virškinimui naudojami individualūs fermentai: atskirai paruošti skirtingo aktyvumo tulžies lipazės, amilazės, tripsino ir chymotripsino mėginiai SIF elektrolitų tirpaluose, sumaišomi ir įleidžiami į mėginius. Pasiekiamas mėginio tūris iki 40ml vandeniu ir dedamas į purtyklę 2val, 37°C. Įvertinti virškinamumo eigą žarnyno fazėje mėginiai buvo išimami po 5min, 60min ir 120min. Žarnyno fazėje proteazių fermentai tripsinas ir chymotripsinas inhibuojamas PMSF. Kiekvienas mėginys nucentrifuguotas („HERAEUS LABOFUGE 200“ 10000 rpm, 20min, 4°C) surinktas supernatantas, į atskirą mėgintuvėlį

surenkama netirpi frakcija, vykdoma ekstrakcija ultragarasu. Analizuojamieji mėginiai užšaldyti skystu azotu, laikomi -20°C iki analizės (žr. Paveikslas 3).



Paveikslas 3. Analizuojamųjų mėginių paruošimas analizei. G – skrandžio fazės tiriamieji mėginiai; D – žarnyno fazės tiriamieji mėginiai.

3.3. Baltymų hidrolizės vertinimo metodai

Tiriamajame darbe tiriamieji mėginiai po *in vitro* virškinimo vadinami tirpios ir netirpios frakcijos analizuojamaisiais mėginiais. Virškinimo metu naudojamos fiziologinės sultys praskiedžia tiriamuosius objektus, todėl skaičiavimuose yra įvertinamas praskiedimo faktorius (žr. 3.3.1. skyrių). Vertinant baltymų hidrolizės kitimą skirtinguose virškinimo *in vitro* etapuose, Kjeldalio ir Lowry metodais analizuojamieji mėginiai yra frakcionuojami su 2% TCA. Atskiriami skirtingo molekulinio dydžio peptidai (žr. 3.3.2. skyrių). Taip pat baltymų fermentinė

hidrolizė kiekybiškai nustatoma fluoresciminiu ir kokybiniu elektroforezės SDS-PAGE metodais, išmatuojama densitometrija.

3.3.1 Analizuojamųjų mėginių praskiedimo faktoriaus skaičiavimas

Kai koncentruotas mėginys yra praskiedžiamas, tai galima įvertinti praskiedimo faktoriumi. Jis išreiškiamas santykiu:

$$DF = \frac{C_1}{C_2} = \frac{V_2}{V_1} \quad (3)$$

Kur, DF- praskiedimo faktorius – tai faktorius pagal kurį tirpalas yra praskiedžiamas. Jis gali būti išreiškiamas tūrio santykiu su pradiniu ir praskiedžiamu tūriu ir koncentracija.

V_1 (arba C_1) – tiriamosios medžiagos tūris

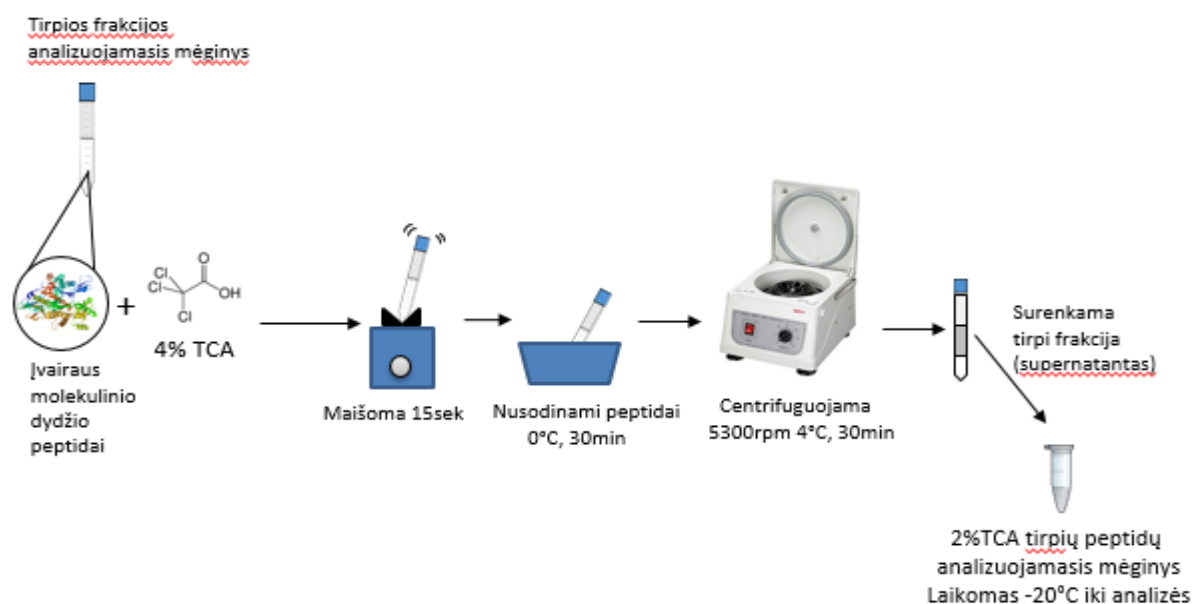
V_2 (arba C_1) – tūris su tiriamąja medžiaga

Virškinimo metu mėginių skrandžio virškinimo fazėje praskiedimo faktorius yra 4, o žarnyno fazėje 8. Šis faktorius yra įvertintas kiekvieno metodo skaičiavimuose ir galutinėse išraiškose.

Papildomai praskiedimo faktorius įvertintas, jeigu analizuojamąjį mėginį reikia neutralizuoti šarmu, rūgštinti ar frakcionuoti su trichloracto rūgštimi (TCA).

3.3.2. Analizuojamųjų mėginių frakcionavimas

Peptidų frakcionavimas pagal grandinės ilgį atliktas naudojant skirtingos koncentracijos TCA: tirpios frakcijos analizuojamieji mėginiai sumaišyti su 4% TCA tirpalu. santykiu 1:1. Maišoma vorteksu (“Laboratory equipment” VV 3 S40) 15sek. ir patalpinama į ledo vonelę 30min 0°C. Mėginiai centrifuguojami 5300rpm 20min. Surinktas supernatantas ir gautas 2%TCA tirpių peptidų analizuojamasis mėginys (žr. Paveikslas 4).



Paveikslas 4. 2%TCA tirpių peptidų analizuojamųjų mėginių paruošimo schema

3.3.3. Atpalaiduoto azoto nustatymas

Iš tiriamo produkto virškinimo metu atlaisvintas azotas nustatytas Kjeldalio metodu tirpios frakcijos analizuojamuose mėginiuose ir 2% TCA tirpių peptidų analizuojamuose mėginiuose. 1ml tiriamojo mėginio, užpiltas 20ml konc. sieros rūgštimi. Tyrimas kartotas 2-3 kartus, įvertintas praskiedimo faktorius ir apskaičiuotas azoto atlaisvinimas (%), pagal formulę [100, 101] :

$$N_I = \left(\frac{N_t - N_f}{N_{total}} \right) \cdot 100, \% \quad (4)$$

N_I – atpalaiduotas azotas kiekviename virškinimo taške skrandžio ar žarnyno fazėse, %

N_t – azoto kiekis kiekviename virškinimo taške skrandžio ar žarnyno fazėse (mg)

$N_{bendras}$ – azoto kiekis prieš virškinimą, mg

N_f – azoto kiekis virškinimo sultryse, mg

Kjeldalio metodu nustatytas azoto kiekis analizuojamuose mėginiuose yra bendras kiekis mažesnės ir didesnės molekulinės masės polipeptidinių grandinių. Frakcionuodami analizuojamuosius mėginius su TCA, priklausomai nuo koncentracijos, yra nusodinami didesnės molekulinės masės peptidai. TCA tirpūs yra 7-ias ir mažiau amino rūgštis turintys peptidai esant 2-12% TCA. [102]. Įvertinant mažesnės molekulinės masės baltymų hidrolizės produktų susidarymą virškinimo metu, yra apskaičiuojamas 2% TCA tirpių peptidų kiekis 2% TCA tirpių analizuojamuose mėginiuose pagal formulę [103]:

$$2\%TCA_{tirpūs\ peptidai} = \frac{NIn_{TCA}}{NIn} \cdot 100, \% \quad (5)$$

Kur, NIn_{TCA} – atpalaiduotas azotas kiekviename virškinimo taške 2% TCA tirpių peptidų analizuojamuose mėginiuose, %

NIn – atpalaiduotas azotas kiekviename virškinimo taške analizuojamuose mėginiuose, %

3.3.4. Peptidų koncentracijos nustatymas

Lowry metodo esmė yra joninio divalenčio vario sąveika su peptidiniais ryšiais, kurie paverčia jį vienvalenčiu jonu šarminėmis sąlygomis. Jis sąveikaudamas su tirozino, triptofano ir cisteino radikalais ir Folin reagentu sudaro nestabilų produktą, kuris redukuojasi į molibleno/ tungsteno mėlį. Analizuojamas mėginys yra šarminamas 1M NaOH iki pH 9.5-10.5. Tyrimui paimtas 0,2ml šarminas analizuojamasis mėginys, užpiltas $CuSO_4$ tirpalu, palaikytas 10min ir užpiltas folino reagentu. Po 20min išmatuotas kiekvieno mėginio optinis tankis prie 660nm bangos ilgio. Pagal kiaušinio albumino kalibracinę kreivę apskaičiuota peptidų koncentracija mg/ml [99].

Pagal peptidų koncentraciją apskaičiuojamas peptidų intensyvumas, kuris parodo 2% TCA tirpių peptidų analizuojamuose mėginiuose kitimą skirtinguose virškinimo taškuose.

Peptidų intensyvumas (Y_{sp} – ang.k. *soluble peptide yield*) apskaičiuotas pagal formulę [104]:

$$Y_{sp} = \frac{C_t}{C_{total}} \cdot 100, \% \quad (6)$$

kur, C_t –peptidų koncentracija 2% TCA tirpių peptidų analizuojamajame mėginyje virškinimo taške skrandžio ir žarnyno fazėse, mg/ml

C_{total} - peptidų koncentracija analizuojamojo mėginio paskutiniame virškinimo taške žarnyno fazėje, mg/ml.

3.3.5. Laisvų amino grupių pagal leuciną nustatymas

Laisvų amino grupių pagal leuciną pokytis apskaičiuojamas pagal fluoresceminio metodo gautus rezultatus. Fluoresceminio metodo esmė yra, kad fermentinės baltymų hidrolizės metu susidaro įvairaus molekulinio dydžio peptidai ir jie iš bandinio nusodinami su 12% TCA. Fluorescaminas (fluramas) dedamas į supernantą, kuriame yra hidrolizės produktai – laisvos amino rūgštys ir peptidai. Fluramas jungiasi su išorinėmis amino rūgštimis, junginys tampa fluorescencinis ir gali būti identifikuotas.

75µl analizuojamojo mėginio arba standartinio tirpalo ir 75µl 24% TCA sumaišoma ependorfo mėgintuvėlyje vorteksu 15sekundžių. Mėginyje esantis 12% TCA nusodina visus esančius baltymus ir peptidus [30]. Ependorfai talpinami į ledo vonelę 30min, nusodinami baltymai. Bandiniai centrifuguojami 13000rpm/20min/4°C. Atliekami skiedimai su 1mM HCl. Bandinių ir standartų po 30µl pilama į 2ml talpos ependorfo mėgintuvėlį. Pridedama 900µl 0,1M Na-Borat buferio. Įpilamas 300µl fluramo tirpalas, mėgintuvėlis gerai sumaišomas. Bandiniai matuojami pagal Gene5 protocol: STNY Fluorescamine assay. Programoje yra nurodomi šie parametrai: temperatūra 25 °C, purtymas : 1sec. excitation wl: 400/30 , emission wl: 485/20.

Amino rūgščių pokytis (leu/mmol) yra apskaičiuojamas pagal leucino kalibracinę kreivę.

3.3.6. Atlaisvintų peptidų kinetika

Elektroforezė – tai makromolekulių atskyrimas elektrolauke. Tyrimo metu nustatoma SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) tirpios ir netirpios frakcijos analizuojamuose mėginiuose. SDS yra anijoninis detergentas, kurio ištirpusios molekulės įgauna neigiamą krūvį plačiame pH diapazone. SDS sutrikdo beveik visą kompleksinę proteino struktūrą ir prisijungia prie teigiamų peptiduose esančių elektrodų elektros lauke. Poliakrilamido gelio koncentracija nusprendžia proteinų pasiskirstymą elektros lauke. Tyrimo metu naudojamas 4-12% poliakrilamido gelis.

Elektroforezė atliekama neredukuojančiomis sąlygomis, nes mėginiai yra analizuojami virškinimo metu ir stebima fermentinė baltymų hidrolizė. Didesnės molekulinės

masės baltymai natūraliai yra sujungti disulfidiniais ryšiais, tačiau juos nutraukus redukuojančiu agentu molekulinė proteinų masė gali pasikeisti į mažesnę ir būti neaptikta elektroforezės tyrimo metu. Tai gali būti netikslu vėliau analizuojant baltymus *in vivo*, nes virškinimo skrandyje fazėje disulfidiniai ryšiai gali būti ir nenutraukti [105].

Skirtingo virškinimo metu išimti mėginiai yra centrifuguojami 13000g 20min 4°C – atskiriamos dvi frakcijos – tirpi ir netirpi. Ruošiamas netirpios dalies kiekvieno virškinimo metu ir tiriamosios medžiagos ekstraktas su chaotropiniu buferiu, kuriame yra redukuojančių (DTT) ir ekstrahuojančių medžiagų (Urea, Thiourea), kad nustatytume visus tiriamuosiuose ir analizuojamuosiuose mėginiuose esančius baltymus.

Tiriamąjį mėginį ir virškinimo taškuose susidariusios netirpios frakcijos ekstrakcija. 20mg netirpios frakcijos ir tiriamosios medžiagos yra užpilama 0,5ml chaotropiniu buferiu. Ekstrakcija vykdoma ultragarso vonelėje 15min 60°C. Kas 5min mėginiai yra vartomi 2-3 kartus. Po ekstrakcijos mėginiai yra centrifuguojami 16000g 20min 4°C. Atskiriama tirpi ir netirpi frakcijos. Elektroforezei naudojama tirpi frakcija.

Analizuojamųjų mėginių elektroforezė ir densitometrija. 60μl analizuojamas mėginys sumaišomas su 30 μl LDS. Šildomas 70°C 5min ir centrifuguojamas 16000g 5min 20°C, kad elektroforezės metu proteinų pasiskirstymas gelyje vyktų linijinėje tiesėje.

Mėginiai yra įleidžiami į poliakrilamidinio gelio šulinėlį, užpilama leidžiamuoju buferiu ir vykdoma elektroforezė parametrais: 200V, 350mA, 35min.

Gelis išimamas iš plokštelės, nuplaunamas 3 kartus po 5min distiliuotu vandeniu ir užpilamas dažais Comassie G-250. Dažoma 24val ir plaunama distiliuotu vandeniu 5val.

Geliai skanuojami (Typhoon TRIO, GE healthcare, Laser Red (633), PMT 300V) ir išmatuojamas linijų intensyvumas densitometrijos analize, naudojant kompiuterinę programą ImageQuant TL. Reliatyvus gautų baltymų linijų intensyvumas, pagal kurią galima matyti peptido virškinimo kitimą skirtinguose taškuose, apskaičiuojamas normalizuojant gautus intensyvumus pagal kontrolinę tiriamojo baltymo ekstakto densitometriją.

$$\text{Reliatyvus intensyvumas, \%} = \frac{\text{Linijos intensyvumas virškinimo taške}}{\text{Kontrolinis linijos intensyvumas}} \cdot 100 \quad (7)$$

Statistinis apdorojimas. Bandymai buvo atlikti 2-3 kartus, gauti duomenys apskaičiuoti ir išvedamas vidurkis ir įvertinamas standartinis nuokrypis.

4. Rezultatai

4.1. Tyrimo objektų savybės

Viena iš pagrindinių analizių, nusakanti baltymų kokybę yra amino rūgščių profilio kiekybinė identifikacija. Kiti svarbūs parametrai yra baltymų virškinamumas (ang.k. *digestibility*) ir bio-priemumas (ang.k. *bio-availability*) prie amino rūgščių baltymo molekulėje t.y. baltymų hidrolizavimas ir galimybė absorbuoti susidariusius mažesnės molekulinės masės peptidus ar amino rūgštis [106]. Baltymų virškinamumas - tai procentinė išraiška baltymų absorbcijos po virškinimo, lyginant su bendru žmogaus ar gyvūno suvartotu baltymo kiekiu. Šis parametras yra pagrindinis baltymų kokybės indeksas, nes tam tikras amino rūgščių kiekis randamas maiste nebūtinai gali būti prieinamas ir absorbuojamas virškinamajame trakte. Taigi baltymų virškinamumas yra parametras, glaudžiai susijęs su aminorūgščių prieinamumu.

Tiriamųjų objektų amino rūgščių profilis vandeniniame tirpale. Tiriamųjų mėginių amino rūgščių profilis vandeniniuose tirpaluose (vandens pH 6) ir bendras azoto kiekis nustatytas Kjeldalio metodu yra parodytas lentelėje 6

Lentelė 6. Bendras aminorūgščių kiekis vandeniniuose 10 % baltymų tirpaluose, kai pH 6

	Kiaušinių baltymai	Pieno baltymai	Žirnių baltymai
	mg/l		
Asparto r.	7878	1437	4808
Serinas	5215	886	2133
Glutamo r.	10676	3637	8558
Prolinas	2632	1546	1845
Glicinas	2820	486	1859
Alaninas	5825	2457	3316
Iš viso PAR	35046	10449	22518
Treoninas	3236	757	1268
Valinas	5021	998	1926
Metioninas	4587	0	0
Izoleucinas	3817	729	1661
Leucinas	5997	1542	2877
Tirozinas	3305	674	1432
Fenilalaninas	4489	723	2021
Histidinas	2410	644	1551
Lizinas	5337	1281	3010
Iš viso NAR	43005	8263	19621

Vandeniniuose baltymų tirpaluose buvo rastos kiaušinių baltymuose 35046mg/l pakeičiamos aminorūgštys (PAR), iš kurių daugiausia buvo glutamo (10676 mg/l) ir asparto rūgšties (7878 mg/l). Žirnių baltymų amino rūgščių profilyje nustatytos 22518 mg/l pakeičiamos amino rūgštys iš kurių daugiausia buvo glutamo (8558mg/l) ir asparto rūgšties (4808 mg/l). Pieno baltymuose rasta mažiausiai PAR – 10449mg/l iš kurių daugiausia glutamo r. (3637mg/l) ir alanino (2457mg/l).

Vandeniniuose baltymų tirpaluose buvo rastos kiaušinių baltymuose 43005 mg/l nepakeičiamos aminorūgštys (NAR), iš kurių daugiausia buvo leucino (5997 mg/l), lizino (5337 mg/l), valino (5021 mg/l). Hossain M.A. et. al., 2011 tyrimuose nurodyta, kad kiaušinių baltymuose yra apie 48550g/ml NAR, iš kurių daugiausia, kaip ir tiriamuosuose objektuose, rasta leucino ir lizino. Arginino rasta dvigubai daugiau nei tiriamojoje medžiagoje, tačiau santykis tarp PAR ir NAR yra panašus [43]. Pieno baltymuose rastos 8263 mg/l aminorūgštys, iš kurių daugiausia buvo leucino (1542 mg/l), lizino (1281 mg/l), o žirnių - 19621 mg/l NAR, iš kurių daugiausia buvo leucino (2877mg/l), lizino(3010 mg/l). Pieno ir žirnių vandeniniuose ekstraktuose nebuvo rasta metionino, tuo tarpu kiaušinio vandeniniame ekstrakto buvo rasta 4587mg/l metionino. Kiaušinyje buvo rastos visos nepakeičiamos ir pakeičimos amino rūgštys, tuo tarpu pieno ir žirnių baltymuose nebuvo rasta nepakeičiamos amino rūgšties metionino. Gyvūniniuose baltymuose metionino yra randama 2-4%, o augaliniuose 1-2%. Tačiau, jis yra jautrus oksidacijai ir karščiui, todėl dažnai prarandamas gamybos procese, džiovinimo metu [30].

Tiriamųjų objektų tirpumo nustatymas. Baltymų prienamumas ir jautrumas fermentui priklauso nuo jo struktūros (pirminės, antrinės, tretinės, ketvirtinės) [81]. Vienas iš technologinių baltymų parametrų įtakojančių baltymo denatūraciją ir konformaciją yra baltymų tirpumas. Baltymų tirpumas kinta keičiantis pH ir temperatūrai. Temperatūra tyrimo metu nebuvo įvertinta, tačiau ji galėjo pakeisti tyrimo objektų baltymų konformaciją ir įtakoti fermentinę baltymų hidrolizę. Nustatytas tiriamųjų objektų tirpumas prie skirtingo pH parodytas lentelėje 7.

Lentelė 7. Skirtingų baltymų tirpumo (%) priklausomybė nuo skirtingo pH

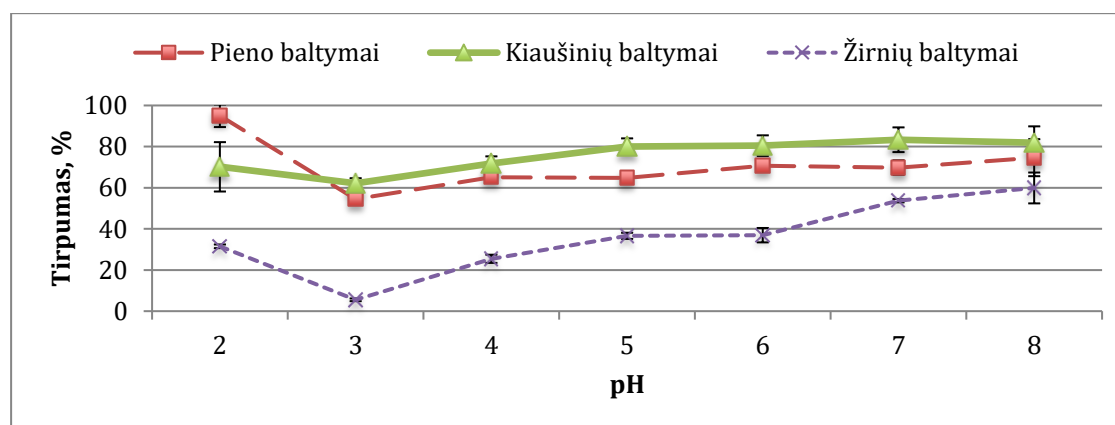
pH	Pieno baltymai,%	Kiaušinių baltymai,%	Žirnių baltymai, %
2	95±11,3	70±24,3	32±0,9
3	54±1,7	62±4,7	6±0,7
4	65±3,1	72±7,3	25±3,6
5	65±2,5	80±8,0	37±2,8
6	71±3,7	80±9,9	37±6,7
7	70±6,6	83±11,3	54±0,8
8	75±17,6	82±15,9	60±14,6

Pieno baltymų tirpumas yra didžiausias, kai pH 2. Tai galima buvo pamatyti ir baltyminiame tirpale, jame nebuvo matyti nuosėdų po centrifūgavimo [90]. Baltymai yra daugiau tirpūs arba žemame (rūgštiniame), arba aukštame (šarminiame) pH tirpale, nes tame pačiame lygmenyje yra daugiau krūvių, kurie sukelia molekulių atstūmimą, taip padidindami jų tirpumą. Didėjant pH tirpumas sumažėjo nuo 95% iki 55%. Literatūros šaltinių duomenimis, baltymų tirpumas yra mažiausias pasiekus jų izoelektrinį tašką. Kazeino izoelektrinis taškas yra 4,6. Tyrimo metu mažiausias pieno baltymų tirpumas buvo kai pH yra 3-4 (55%) [26, 107, 108].

Kiaušinio baltymų tirpumas didžiausias taškuose pH 5-8: jis siekia 82%. Kiaušinių tirpumas didėja kylant pH. Literatūros šaltinių duomenimis, kiaušinių tirpumas didėja 34 - 80% nuo pH 3 iki 9 [109]. Kiaušinių baltymo ovalbumino ir ovomucino izoelektrinis taškas – 4,5. Izelektriniame taške elektrosatinės jėgos molekulėje yra mažiausios ir vandenyje silpnai sąveikauja su baltymais [108, 110].

Žirnių baltymų tirpumas iš trijų skirtingų kilmės baltymų santykinai buvo mažiausias 6-60%. Mažiausias tirpumas, kai pH 3 – 6%. Literatūros šaltinių duomenimis žirnių baltymų izoelektrinis taškas yra 4,5, tačiau tyrimo metu naudot baltymų izoliato tirpumas šiame taške yra 35% - didesnis nei prie pH 3 [26]. Didžiausias tirpumas, kai pH 8 – 60%. Teoriškai žirnių baltymų izoliato tirpumas yra 60-80%, kai pH 2-3, netirpus, kai pH 5 ir didėjant pH didėja tirpumas iki 80%. Distiliuotame vandenyje, kai pH 6, žirnių baltymų izoliato tirpumas paprastai yra 70% [32].

Vandens, naudojamo tiriamojo objekto paruošimui (pH 6) kiaušinių baltymų tirpumas yra apie 80%, pieno baltymų 71%, žirnių baltymų – 40%.



Paveikslas 5. Skirtingų baltymų tirpumo priklausomybė nuo skirtingo pH

Tiriamųjų objektų reologinės savybės. Tos pačios koncentracijos baltymų tirpalai pasižymi labai skirtingomis klampomis. Baltymų tirpalai pagal klampą buvo susikirstyti pagal Amerikos dietologijos asociacijos rekomenduojamą klasifikaciją, kuria remiasi rijimo sutrikimą turintys vartotojai: I. Skystas (ang. k. *thi*) (0,001-0,050 Pa·s); II. Nektaro klampumo (ang. k. *nectar-like*) (0,051-0,350 Pa·s); III. Medaus klampumo (ang. k. *honey-like*) (0,351-1,750 Pa·s); IV. Prie šaukšto prilimpantis (ang. k. *spoon-thick*) (1,750 Pa·s). 10% ir 15% baltymų vandeninių tirpalų klampa nustatyta skirtinga (lentelė 8).

Lentelė 8. Skirtingų baltymų koncentracijų ir jų mišinių klampos nustatymas ir klasifikacija (Pieno baltymai –PB; Žirnių baltymai – ŽB, Kiaušinių baltymai KB)

	Pieno baltymai (PB)	Kiaušinių baltymai (KB)	Žirnių Baltymai (ŽB)	PB:ŽB (1:1)
Koncentracija (%)	10			
Klampa (Pa·s)	0,312±0,028	0,009±0,006	1,423±0,012	1,143±0,001
Kategorija	II	I	III	III
Koncentracija (%)	15			
Klampa (Pa·s)	2,311±0,02	0,010±0,004	7,640±0,073	
Kategorija	IV	I	IV	

Lentelėje 8 matoma, kad 10% pieno baltymų vandeninis tirpalas pasiekė II kategoriją pagal Amerikos Dietologų Asociacijos rekomenduojamas klampumo kategorijas t.y. – 0,312 Pa·s, tuo tarpu žirnių pasiekė III kategoriją (1,423 Pa·s), padidinus baltymų koncentraciją iki 15%, pieno tirpalo klampa padidėjo iki 2,311 Pa·s, o žirnių iki 7,640 Pa·s.

Skirtingos koncentracijos 10% pieno ir žirnių baltyminiai tirpalai priklauso II-III klampos kategorijai, o 15% pieno ir žirnių baltyminiai tirpalai priklauso IV kategorijai pagal klampą. Tiriamųjų objektų baltyminių tirpalų pH buvo skirtingas. 10% kiaušinių baltyminio tirpalo pH – 6,7; 10% pieno baltyminio tirpalo toks pat kaip ir kiaušinių pH – 6,7; o žirnių pH – 7,5.

15% pieno baltyminio tirpalo klampa yra 3 kartus mažesnė nei 15% žirnių baltyminio tirpalo. Tuo tarpu 10 % pieno baltyminio tirpalo klampa yra 2 kartus mažesnė nei 10% žirnių baltyminio tirpalo. Žirnių baltymų milteliuose pagal sudėtį yra 1,4g/100g skaidulų, kurios turi įtakos tekstūros susidarymui ir stabilumui. Šių skaidulų neturi gyvūninės kilmės baltymų milteliai.

Baltymų vandeninių tirpalų klampą apsprendžia baltymų tirpumas. Žirnių baltymuose 65-80% sudaro globulinai: leguminas ir vicilinas. Legumino dydis yra apie 40-21kDa, o vicilinas yra apie 50kDa. Subvienetai gali susijungti ir sudaryti didesnius oligomerus iki 150kDa, todėl jie pasižymi didesniu klampumu [26]. Apskritai, žirnių ir pieno baltymuose yra globulinų, kurie vandenyje susijungia vandenilniais ryšiais į ketvirtinę baltymų struktūrą, sudarydami stambesnius darinius. Todėl, didėjant baltymų koncentracijai, formuojama tekstūra. Globuliniai baltymai išsivynioja nutraukdami intramolekulinių jėgų jungtis. Taip suformuojamos prailgintos proteinų grandinės, kurios sąveikoje su kitomis, šalia esančiomis grandinėmis, stabilizuojasi. Didėjant baltymų koncentracijai, didėja stabilumas, vandens surišimas ir didėja klampa [111, 112].

Tuo tarpu kiaušinio baltymo pagrindas yra albuminas – fibrilinis linijinis baltymas [30]. Didėjant koncentracijai, jie nesudaro stabilaus komplekso ir klampa išlieka nepakitusi

(0,009-0,010 Pa·s) Bendrai vandenyje vyksta baltymų hidrolizė, skyla jų peptidiniai ryšiai, prisijundami vandens molekulės. Vanduo yra polinis junginys turintis dvi teigiamas polines ir dvi neigiamas polines grandines. Susidaro tarpmolekuliniai vandeniliniai ryšiai tarp peptidų ir vandens [113].

Taigi, atlikus tirpumo ir reologijos matavimus, pastebėta tendencija, kad, kuo didesnės molekulinės masės globulinai yra baltymuose, tuo baltymai mažiau tirpūs ir yra klampesni vandeniniuose tirpaluose. Taip pat pastebėta skaidulų įtaka klampai ir stabilumui.

4.2. Baltymų hidrolizės įvertinimai *in vitro* virškinimo metu

Baltymų prognozuojamas pasisavinumas *in vitro* virškinimo metu yra nagrinėjamas baltymų hidrolizės įvertinimo metodais: atpalaiduoto azoto įvertinimu, 2% TCA tirpių baltymų (pagal azotą) nustatymu, peptidų koncentracijos nustatymu, aminorūgščių kiekio pagal leuciną analize, elektroforeze skirtinguose virškinimo etapuose skrandžio ir žarnyno fazėse. Virškinimo eigoje organizmas absorbuoja trumpas peptidines grandines ir amino rūgštis [58]. Gautų rezultatų duomenimis galima prognozuoti baltymų pasisavinamumą ir virškinamumą, fermentų prieigą prie peptidinių grandinių, esant skirtingai maisto tekstūros matricai.

Tyrimo metu buvo analizuojami skirtingos koncentracijos (10% ir 15%) gyvūninės ir augalinės kilmės baltymai, taip pat 10% pieno ir kiaušinių baltyminiai tirpalai mišinyje su tirštikliu *Konjac Glucomannan*, bei 10% pieno ir žirnių mišinio baltyminis tirpalas. Lyginimo ir aptarimo rezultatai yra pateikti pagal tris kategorijas :

1. Skirtingos kilmės įtaka baltymų hidrolizei *in vitro* virškinimo metu.
2. Skirtingos koncentracijos įtaka baltymų hidrolizei *in vitro* virškinimo metu.
3. Polisacharido *Konjac Glucomannan* įtaka baltymų hidrolizei *in vitro* virškinimo metu.

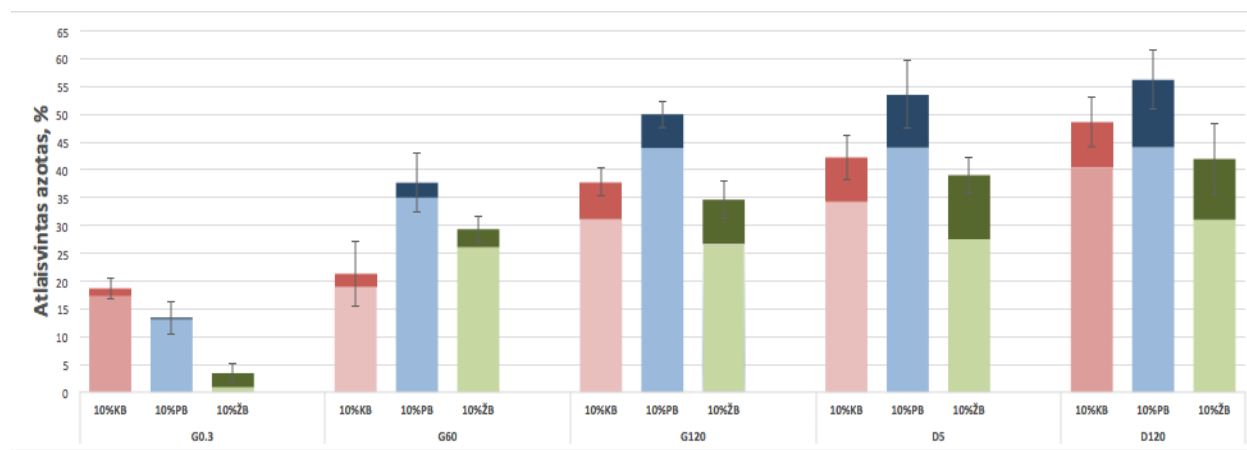
4.2.1. Skirtingos kilmės baltymų hidrolizės vertinimas

Simuliuojamojo *in vitro* virškinimo metu hidrolizuojami skirtingos kilmės tiriamieji objektai. Skirtinga amino rūgščių seka ir baltymo struktūra turi įtakos hidrolizės produktų susidarymui. Kiekybinės ir kokybinės analizės leidžia prognozuoti hidrolizės produktų susidarymo tendencijas skirtingos kilmės baltymuose.

Atlaisvinto azoto įvertinimas pagal Kjeldalio metodą. Paveiksle 6 matomi analizuojami mėginiai hidrolizės *in vitro* metu skrandžio ir žarnyno fazėse. Atlaisvinto azoto kiekis galutiniame tirtame žarnyno fazės virškinimo taške D120 yra gyvūninės kilmės baltymuose: kiaušinių (48%) ir pieno (56%). Žirnių baltymų analizuojamuose mėginiuose atlaisvinto azoto yra mažiau (41%) (žr. Paveikslas 6). Tai gali įtakoti augalinės kilmės žaliavose esančios skaidulos ir proteazių inhibitoriai – lipoksigenazė [26]. Tačiau pradiniame virškinimo

taške skrandyje G0.3 atlaisvinto azoto kiekis analizuojamuose mėginiuose mažiausias yra žirnių baltymuose – iki 5%, pieno 13%, o kiaušinių 18%. Virškinimo skrandyje pabaigoje G120 taške atlaisvinto azoto kiekis didžiausias buvo pieno baltymų analizuojamuose mėginiuose – 50%, kiaušinių – 42%, žirnių - 38%. Viso virškinimo metu atlaisvinto azoto kiekis analizuojamuose mėginiuose didėjo. Žirnių analizuojamuose mėginiuose didžiausias atlaisvinto azoto pokytis buvo tarp G0.3 ir G60 etapo. Jis padidėjo 5 kartus. Pieno baltymų analizuojamuose mėginiuose atlaisvinto azoto kiekis, taip pat kaip ir žirnių, padidėjo nuo G0.3 iki G60 etapo. Tuo tarpu kiaušinių baltymų atlaisvinto azoto kiekis padidėjo vėlesniame virškinimo skrandyje etapo metu (nuo G60 iki G120). Virškinimo žarnyne metu visų baltymų analizuojamųjų mėginių atlaisvinto azoto kiekis tolygiai didėjo.

Analizuojamieji mėginiai sumaišyti su 4% TCA tirpalu, bendrame mėginio tūryje TCA koncentracija - 2%. Šioje koncentracijoje yra tirpūs peptidai, kuriuos sudaro 1-7 aminorūgštys. Priklausomai nuo baltymų kilmės – didesni peptidai, kuriuos sudaro 7-30 aminorūgštys, gali būti tirpūs, netirpūs arba dalinai tirpūs. Peptidai, kurie sudaryti iš daugiau nei 30 aminorūgščių yra nusodinami [114]. Tyrimo metu vidutiniškai kiekviename virškinimo taške buvo nusodinti apie 2-30% 2% TCA netirpių peptidų. Iš paveikslėlio 6 matoma, kad pieno baltymų 2% TCA tirpių peptidų susidarymas buvo didžiausias (44% G120), lyginant su kiaušinių (40.2% - D120) ir žirnių baltymais (31,03% – D120).



Paveikslas 6. Pieno (PB), žirnių (ŽB) ir kiaušinių (KB) baltymų analizuojamųjų mėginių (tamsioji ir šviesioji dalys stulpelyje) ir 2% TCA tirpių peptidų analizuojamųjų mėginių (stulpelio šviesioji talis) atlaisvinto azoto kiekis (%) kiekviename virškinimo taške skirtingu laiku (G – skrandžio fazėje, D – žarnyno fazėje).

2%TCA tirpūs peptidai yra apskaičiuoti proporcingai kiekviename virškinimo taške esančio atlaisvinto azoto (%) be 2%TCA (žr. Lentelė 9) Virškinimo pradiniam taške G0.3 gyvūninės kilmės analizuojamuose mėginiuose yra 82-97% 2% TCA tirpių peptidų, o augalinės kilmės baltymuose - 26% 2% TCA tirpių baltymų. Didesnis gyvūninės kilmės tirpių peptidų skaičius rodo, kad gyvūninės kilmės analizuojamuose mėginiuose yra didesnis kiekis mažesnės molekulinės masės peptidų ir amino rūgščių, nei augalinės.

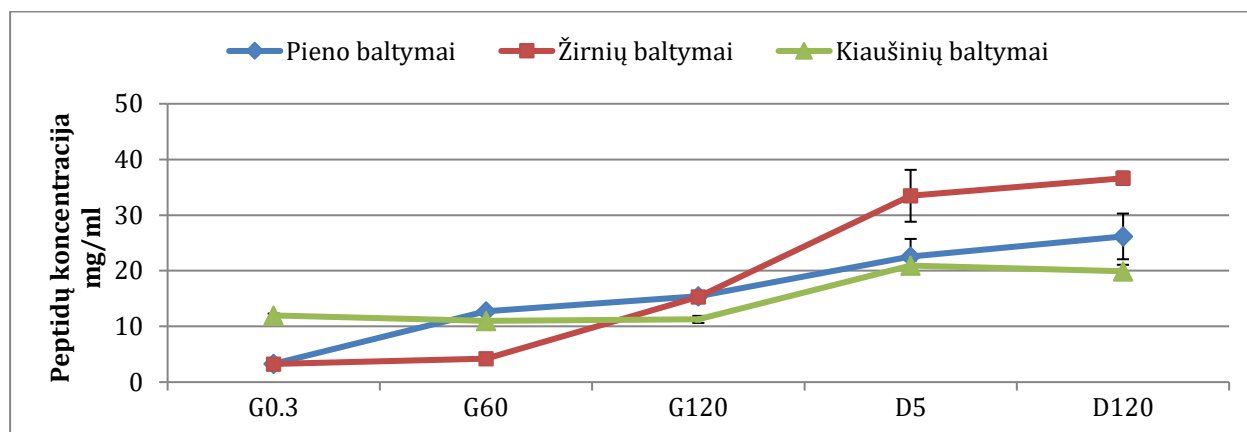
Lentelė 9. Skirtingos kilmės 2% TCA tirpių peptidų kiekis (%) analizuojamuose mėginiuose (PB-pieno baltymai, KB- kiaušinių baltymai, ŽB – žirnių baltymai).

Simuojamojo <i>in vitro</i> virškinimo etapas	10%PB	10%ŽB	10%KB
G0.3	97,94±6,21	26,14±7,18	93,60±0,00
G60	92,86±5,64	88,94±2,60	88,80±0,00
G120	87,85±2,25	76,99±7,31	82,38±9,12
D5	82,26±5,58	70,52±9,44	81,58±0,00
D120	78,42±4,85	73,97±5,60	82,86±9,51

TCA peptidų tirpumas priklauso nuo skirtingų baltymų charakteristikų. Pagrindiniai parametrai yra peptidų molekulinis dydis (aminorūgščių skaičius molekulėje), hidrofobiškumas ir krūvis esant rūgštiniam pH. Kuo didesnis peptidų dydis, tuo mažiau jie yra tirpūs pvz.: β -kazeino peptidai 193-209, 192-209, 191-209 ir 190-209 2% TCA tirpale yra tirpūs 95%, 77%, 44%, ir 0%. Tačiau hidrofobiškumas nekoreliuoja su TCA tirpumu dėl skirtingų peptidų konformacijų, baltymo struktūros. Taip pat TCA peptidų tirpumas gali sumažėti dėl padidėjusios peptidų [114]. Tyrimo metu, pastebėta, kad virškinimo eigoje G60 augaliniai baltymai pasiekė 89% peptidų tirpumą, tolimesniame virškinimo etape G120 sumažėjo iki 77% ir žarnyno fazėje buvo apie 70-74% 2% TCA tirpių peptidų analizuojamuose mėginiuose. Gyvūninės kilmės tirpumas kiekvieno virškinimo etapo metu mažėjo. Pieno baltymų analizuojamuose mėginiuose sumažėjo nuo G0.3 taške esančių 97,94% tirpių peptidų iki D120 taške esančių 78% tirpių peptidų. Kiaušinių baltymų analizuojamuose mėginiuose nuo G0.3 taške esančių 93% tirpių peptidų sumažėjo iki 82% tirpių peptidų D120 taške. Pagrindinės sąveikos tarp TCA ir peptidų yra prigimtinės elektrostatinės sąveikos, dažniausiai su paprastomis amino rūgštimis (valinas, alaninas ir kt.), vandenilinių ryšių sąveikos su šoninėmis polinėmis amino rūgštimis [114]. Ir, nors chloro atomai (TCA molekulėje) turi hidrofobiškumo charakteristikų, šie ryšiai gali atsirasti tarp TCA ir peptidų [114]. Taigi analizuojamajame mėginyje atsiranda vandens ir TCA konkurencija, kuri įtakoja sumažėjusį peptidų nusodinimą virškinimo metu.

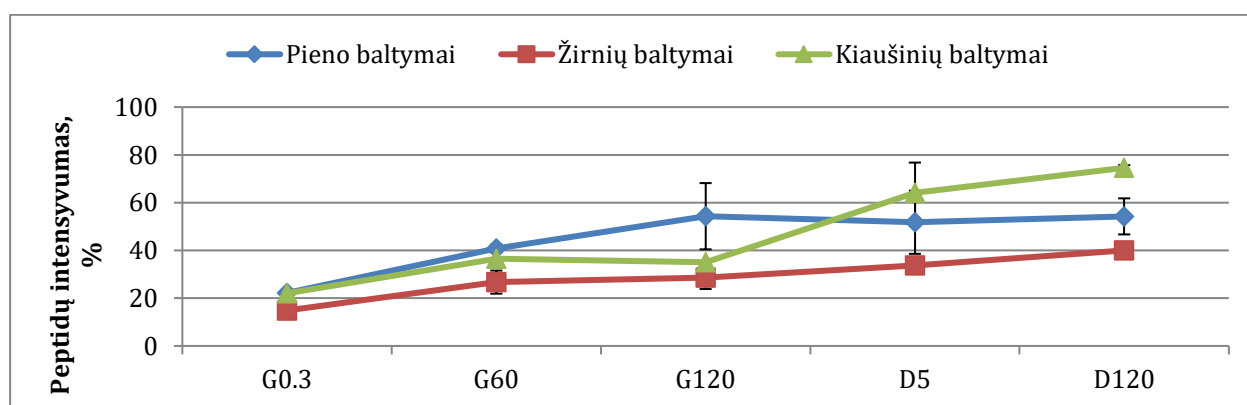
Peptidų koncentracijos nustatymas pagal Lowry metodą. Analizuojamuose mėginiuose buvo įvertinta peptidų koncentracija skirtinguose virškinimo taškuose (žr. Paveikslas 7). Augalinės kilmės peptidų koncentracija buvo mažiausia pradiniam virškinimo taške G0.3 - 4mg/ml, tačiau G120 taške padidėjo iki 14 mg/ml. Pasikeitus virškinimo terpės pH, elektrolitų kiekiui ir pradėjus veikti proteazėms tripsinui ir chymotripsinui analizuojamame mėginyje padidėjo iki 32mg/ml. Tuo tarpu pieno baltymų analizuojamuose mėginiuose peptidų koncentracija tolygiai didėjo kiekvieno virškinimo etapo metu. G0.3 taške koncentracija buvo 4mg/ml, G60 padidėjo iki 12mg/ml, vėliau susistovėjo ir pasiekė 15mg/ml G120 taške. Peptidų

koncentracija padidėjo virškinimo žarnyne metu ir D120 taške pasiekė 26mg/ml. Kiaušinių baltymų analizuojamuose mėginiuose pradiniam virškinimo taške G0.3 buvo didžiausia koncentracija – 12mg/ml, palyginus su žirnių ir pieno analizuojamųjų mėginių peptidų koncentracija. Tačiau vėlesniuose virškinimo etapuose skrandyje peptidų koncentracija nepakito ir pagrindinė fermentinė hidrolizė prasidėjo virškinimo žarnyne metu, kur D120 taške pasiekė 20mg/ml.



Paveikslas 7. Skirtingos kilmės peptidų ir baltymų koncentracija virškinimo *in vitro* metu

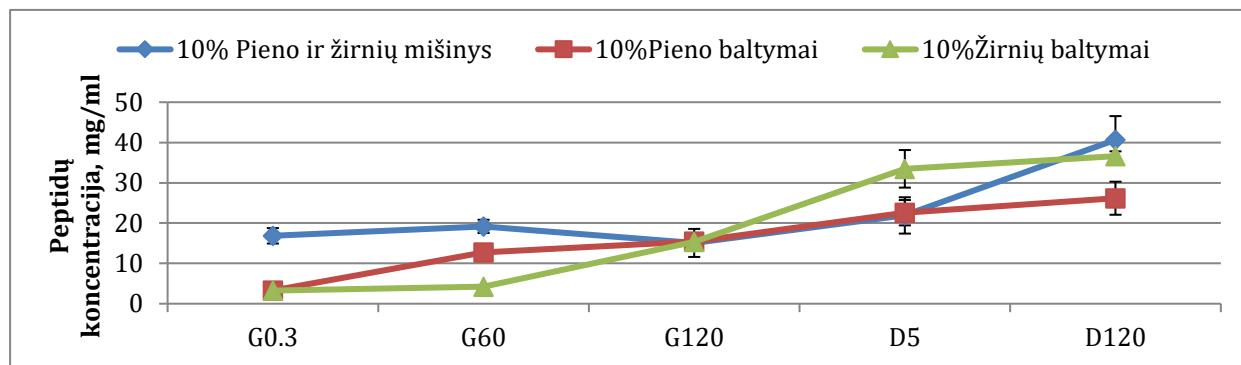
Nors peptidų koncentracija augalinės kilmės analizuojamuose mėginiuose buvo didesnė, tačiau 2% TCA tirpių peptidų susidarymo intensyvumas buvo didesnis gyvūninės kilmės baltymuose. Augalinės kilmės analizuojamuose mėginiuose didžiausias intensyvumas buvo paskutiniame virškinimo taške D120 ir siekė 40%, tuo tarpu gyvūninės kilmės analizuojamieji mėginiai šį intensyvumą pasiekė jau G60 taške (žr. Paveikslas 8). Tai rodo, jog gyvūniniuose baltymuose susidaro daugiau mažesnių peptidų, kurie gali būti greičiau ir lengviau pasisavinami virškinimo metu.



Paveikslas 8. Skirtingos kilmės peptidų intensyvumas (%) pagal 2% TCA tirpių peptidų koncentraciją, skirtinguose virškinimo *in vitro* taškuose

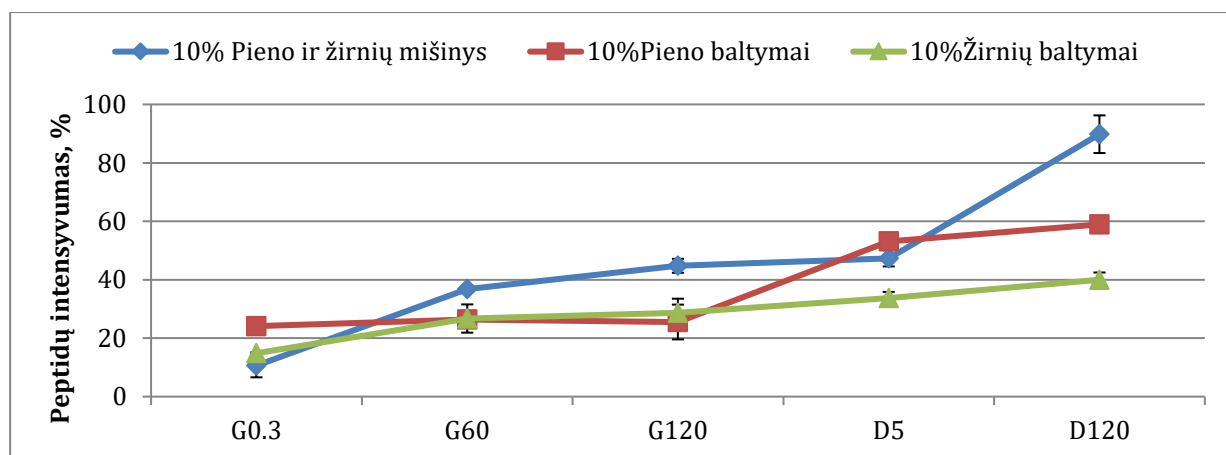
Peptidų koncentracijos nustatymas pagal Lowry metodą skirtingos kilmės baltymų mišinyje. Tyrimo metu analizuojamas 10% pieno ir žirnių baltymų mišinys. Peptidų koncentracija pradiniam virškinimo G0.3 taške skrandžio fazėje yra didžiausia pieno ir žirnių

baltymų mišinio 17mg/ml, tuo tarpu žirnių ir pieno baltymų analizuojamuose mėginiuose buvo 4mg/ml. Iki virškinimo skrandžio pabaigos pieno ir žirnių baltymų mišinio peptidų koncentracija buvo didesnė, nei kiekvieno baltymo atskirai ir G120 taške visų analizuojamųjų mėginių koncentracija buvo 15mg/ml. Prasidėjus fermentinei hidrolizei žarnyno fazėje, žirnių baltymų peptidų koncentracija padidėjo D5 taške iki 33mg/ml ir stabilizavosi iki D120. Pieno baltymų peptidų koncentracija padidėjo iki 26mg/ml D120 taške. Didžiausias kiekis paskutiniame virškinimo žarnyno taške buvo pieno ir žirnių baltymų mišinio – 40mg/ml.



Paveikslas 9. Skirtingos kilmės baltymų mišinio (10% pieno ir žirnių) peptidų koncentracija (mg/ml) skirtinguose virškinimo *in vitro* taškuose

Apskaičiavus peptidų intensyvumą pastebėta (žr. Paveikslas 10), kad pieno ir žirnių mišinio analizuojamuose mėginiuose peptidų intensyvumas yra didesnis, nei kiekvieno baltymo atskirai. Iš visų susidariusių peptidų simuliuojamojo *in vitro* virškinimo metu pieno ir žirnių mišinyje apskaičiuotas 90% peptidų intensyvumas D120 taške, tuo tarpu pieno baltymų peptidų intensyvumas D120 taške siekia 60%, o žirnių 30%.

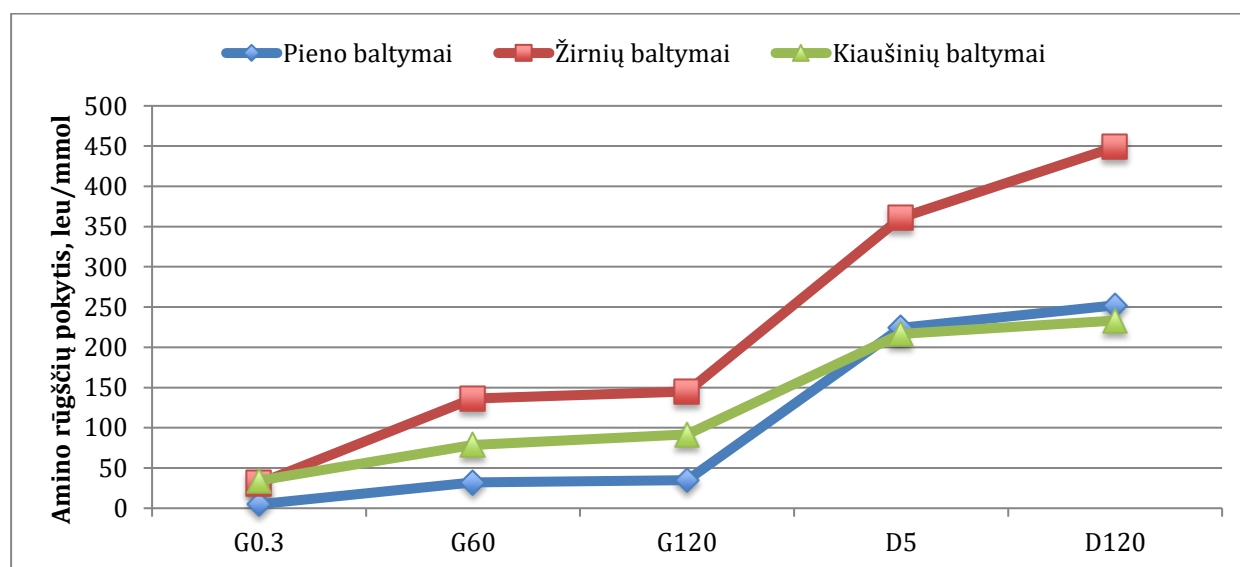


Paveikslas 10. Skirtingos kilmės baltymų mišinio (10% pieno ir žirnių) peptidų intensyvumas (%) skirtinguose virškinimo *in vitro* taškuose

Taigi pieno ir žirnių baltymai turi sinergistinį poveikį ir fermentinės hidrolizės metu susidaro daugiau hidrolizės produktų, kurie pagal apskaičiuotą peptidų intensyvumą galėtų būti absorbuojami virškinimo metu.

Amino grupių pokytis *in vitro* virškinimo sistemoje. Baltymų hidrolizė gali būti įvertinta laisvų amino grupių pagal leuciną pokyčiu fluoresceminine analize (žr. Paveikslą 11). Simuliuojamojo virškinimo metu, visuose virškinimo etapuose skrandyje ir žarnyne, augalinės kilmės baltymuose amino grupių pokytis didesnis (nuo 30,92 leu/mmol iki 448,84leu/mmol), nei gyvūninės kilmės (pieno baltymų amino grupių pokytis yra nuo 4,96leu/mmol iki 252,18leu/mmol, o kiaušinių baltymų nuo 34,44leu/mmol iki 252,18leu/mmol). Nepriklausomai nuo kilmės didžiausias pokytis yra nuo G120 iki D5 t.y. virškinimo fazės skrandyje keičia virškinimo žarnyno fazės. Žirnių baltymų amino grupių pokytis buvo didžiausias - nuo 145,01leu/mmol iki 361,21 leu/mmol, pieno baltymų amino grupių pokytis nuo 35,01leu/mmol iki 224leu/mmol, o kiaušinių baltymų amino grupių pokytis panašus kaip pieno baltymų- nuo 91,91leu/mmol iki 216leu/mmol.

Galima pamatyti pieno ir kiaušinių baltymų tendenciją, kad juos sudarantys baltymai yra atsparūs pepsino hidrolizei ir yra pagrinde hidrolizuojami žarnyno fazės pradžioje. Literatūros šaltinių duomenimis, ovalbunas yra atsparus pepsino hidrolizei skrandžio fazėje kaip ir pieno baltymuose esantys kazeinai [71, 100].



Paveikslas 11. Skirtingos kilmės analizuojamų mėginių amino grupių pagal leuciną pokytis *in vitro* virškinimo taškuose

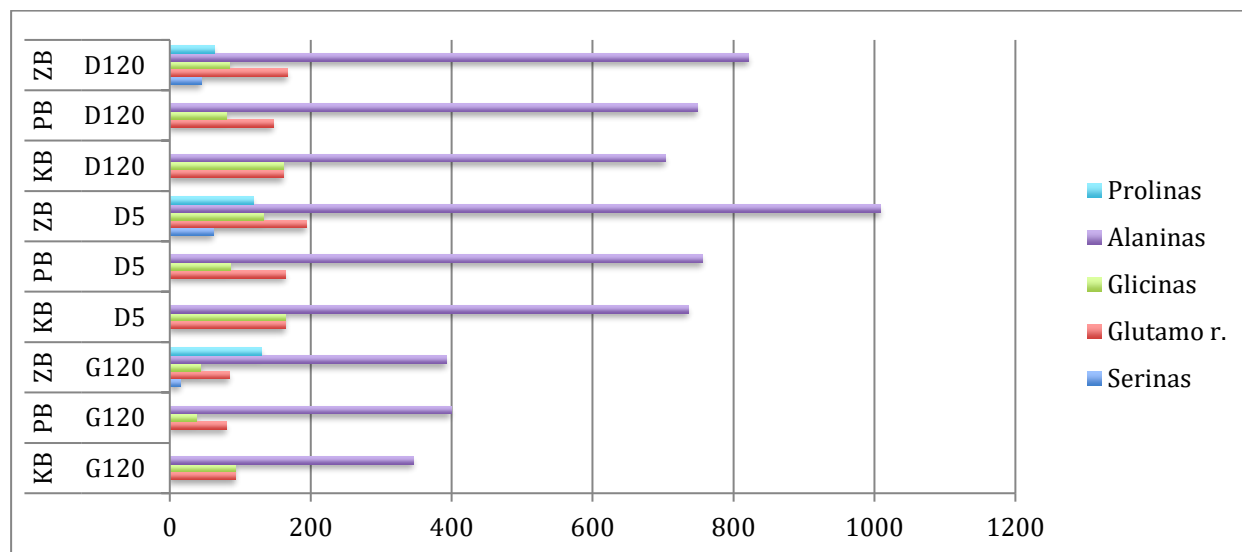
Virškinimo metu pagrindinę baltymų hidrolizę skrandyje atlieka endopepsidazė pepsinas. Jis yra virškinimo sistemos fermentas, kuris yra išskiriamas skrandyje. Jo funkcija yra suskaidyti baltymus iki peptidų ir aminorūgščių. Pepsinas atlieka proteolizę specifiskai skaldydamas proteiną į mažesnes grandines. Priklausomai nuo aminorūgšties pozicijos polipeptidinėje grandinėje pepsinas skaldo peptidinius ryšius baltymo molekulėje. Literatūros šaltinių duomenimis, aminorūgščių pozicijos polipeptidinėje grandinė žymimos Pn – kai amino rūgštis yra į kairę nuo galimo peptidinio ryšio skilimo (pvz.: link N-terminalinės galūnės) ir Pn’,

kuomet amino rūgštis yra į kairę nuo galimo peptidinio ryšio skilimo vietos (pvz. link C-terminalinės). Didžiausias pepsino aktyvumas, nutraukiant peptidinius ryšius, yra apie 14% iš visų galimų peptidinių ryšių. Fermentas aktyviausias yra skaidymo pradžioje. P1-P1 pozicijoje, tai yra baltymo viduryje, jo aktyvumas siekia (40-30%), nutraukiant peptidinius ryšius į dešinę (link C-terminalinės pusės) kai pozicijoje yra leucino, fenilalanino, metionino radikalai.

Pepsino aktyvumas mažėja atsiradus joninių histidino, lizino, prolino, arginino radikalų pepsinas tampa mažiau aktyvus. Taip pat, jis tampa imobilizuotu ir po alifatinių β -šakotų amino rūgščių, tokių kaip izoleuzinas, valinas, susidarymo. Skaldydamas peptidines grandines pepsinas atlaisvina įvairios molekulinės peptidus ir amino rūgštis.

Pepsino aktyvumui turi įtakos ir polipeptidinės grandinės dydis. Kuo didesnis polipeptido amino rūgščių skaičius (400 ir daugiau amino rūgščių), tuo žemesnis pepsino aktyvumas (10-15%), lyginant su mažesnėmis polipeptidinėmis grandinėmis (100-400 amino rūgščių), kurio aktyvumas siekia 15-25% [115, 116].

Vykstant fermentinei baltymų hidrolizei, skirtingos kilmės baltymai yra sudaryti iš skirtingos aminorūgščių sekos, todėl fermentinės hidrolizės produktai yra skirtingi. Tyrimo metu analizuojamas aminorūgščių profilis skirtingos kilmės baltymuose(žr. Paveikslus 12,13) .

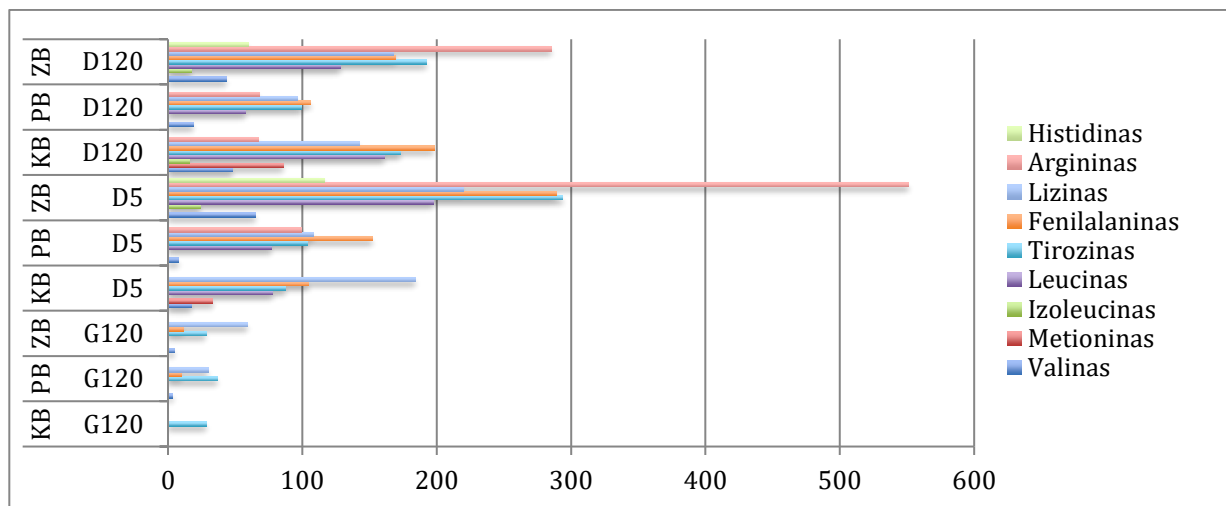


Paveikslas 12. Skirtingos kilmės analizuojamų mėginių pakeičiamų aminorūgščių profilis skirtinguose *in vitro* virškinimo taškuose

Pakeičiamų aminorūgščių profilis G120, D5 ir D120 simuliuojamojo *in vitro* virškinimo etapuose parodytas paveiksle 12. Žirnių baltymų analizuojamuose mėginiuose yra pastebėtas serino padidėjimas virškinimo skrandyje žarnyne metu nuo G120 iki D120. Didžiausias kiekis tiek gyvūninės tiek augalinės kilmės baltymų analizuojamuose mėginiuose yra alanino, jo žirnių baltymų analizuojamame mėginyje D5 taške yra 1000mg/l, tuo tarpu pieno

– 760mg/l, kiaušinių – 710mg/l. Taip pat žirnių baltymuose randamas prolinas, kuris pieno ir kiaušinio baltymų analizuojamuose mėginiuose nėra pastebimas.

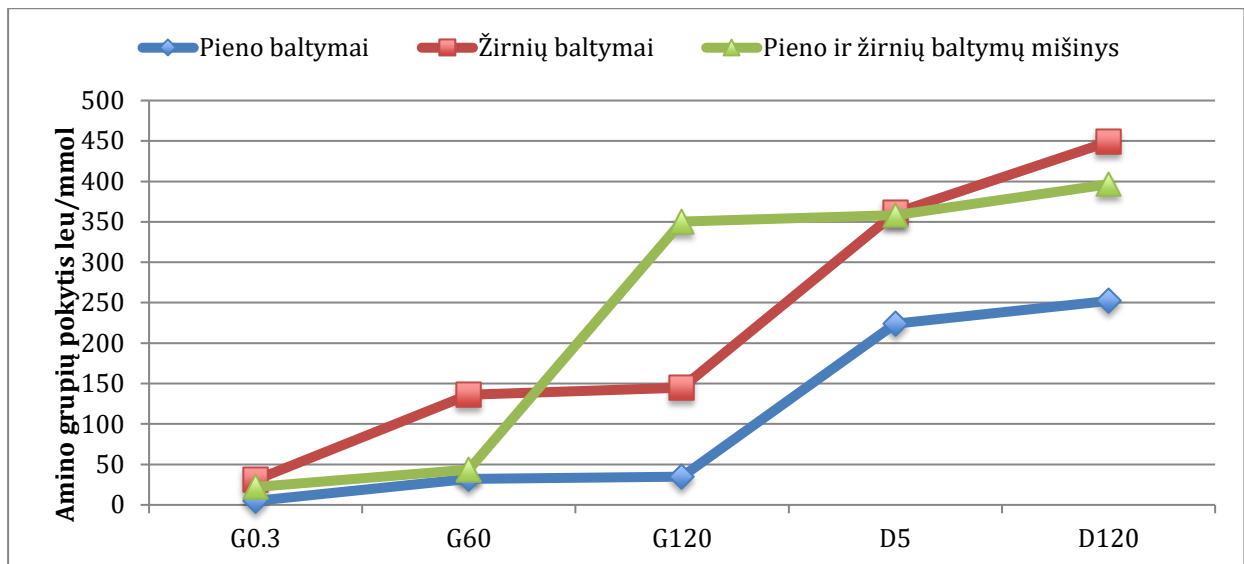
Paveiksle 13 matomas nepakeičiamų aminorūgščių profilis G120, D5 ir D120 simuliuojamojo *in vitro* virškinimo etapais. Grafike 13 matomos pakeičiamų aminorūgščių kiekis yra didesnis augalinės kilmės baltymuose. Tačiau metioninas yra randamas tik kiaušinio baltymuose, kaip ir vandeniniame tirpale, o histidinas tik žirnių baltymuose. Vandeniniuose tirpaluose histidinas buvo randamas visuose baltymuose, tačiau virškinimo skrandyje metu jis yra randamas tik augalinės kilmės baltymuose skrandžio fazėje.



Paveikslas 13. Skirtingos kilmės analizuojamų mėginių pakeičiamų aminorūgščių profilis skirtinguose *in vitro* virškinimo taškuose

Kitos edopeptidazės kaip tripsinas ir chemotripsinas veikia labai specifiskai. Tripsinas skaldo peptidines grandines esant teigiamai įkrautam radikalui R_{n-1} argininui ar lizinui, tačiau R_n esant Prolinui skaidymas nevyksta. Chymotripsinas skaldo esant hidrofobiniams radikalams R_{n-1} fenilalaninui, triptofanui, tirozinui tačiau R_n esant prolinui skaidymas nevyksta [79]. Žirnių baltymuose amino rūgščių nustatymo metu gautas didžiausias arginino kiekis (551,28mg/ml), būtent ties šiuo radikalų amino rūgščių grandinėje yra aktyviausias chymotripsinas žarnyno fazėje.

Fermentinė hidrolizė kiekvienam baltymui vyksta skirtingai ir priklausomai nuo baltymų amino rūgščių sekos gali susidaryti įvairaus dydžio peptidų ir amino rūgščių.



Paveikslas 14. Skirtingos kilmės baltymų mišinio (10% pieno ir žirnių) analizuojamų mėginių amino grupių pagal leuciną pokytis in vitro virškinimo taškuose

Amino grupių pokytis žirnių ir pieno mišinyje virškinimo pradžioje buvo tolygus pieno baltymų virškinimui nuo G0-G60 (amino grupių pokytis ŽB:PB buvo 22,14 leu/mmol – 43,51 leu/mmol, o PB – 4,96 leu/mmol – 31,11 leu/mmol. Nuo G60 iki G120 amino grupių pokytis buvo didesnis (nuo 43,51 leu/mmol iki 350,39 leu/mmol) nei pieno (nuo 32,11 leu/mmol iki 35,01 leu/mmol) ar žirnių (nuo 136,35 leu/mmol iki 145,01 leu/mmol) baltymų atskirai. Nuo virškinimo žarnyne pradžios pieno ir žirnių baltymų mišinio analizuojamojo mėginio amino grupių pokytis D5 taške stabilizavosi ir kito nežymiai (nuo 350 leu/mmol iki 400 leu/mmol). Tuo tarpu žirnių baltymų amino grupių pokytis padidėjo iki 396,45 leu/mmol, o pieno baltymų amino grupių pokytis iki 252,18 leu/mmol virškinimo žarnyne pabaigoje D120. Stabilizavimasis pieno ir žirnių baltymų mišinio žarnyno fazėje gali būti dėl augalinės kilmės baltymuose esančių proteazių inhibitorių ir/ar fermentų kinetikos, nes fermentai aktyvūs tam tikram kiekiui substrato ir vėliau stabilizuojasi [29].

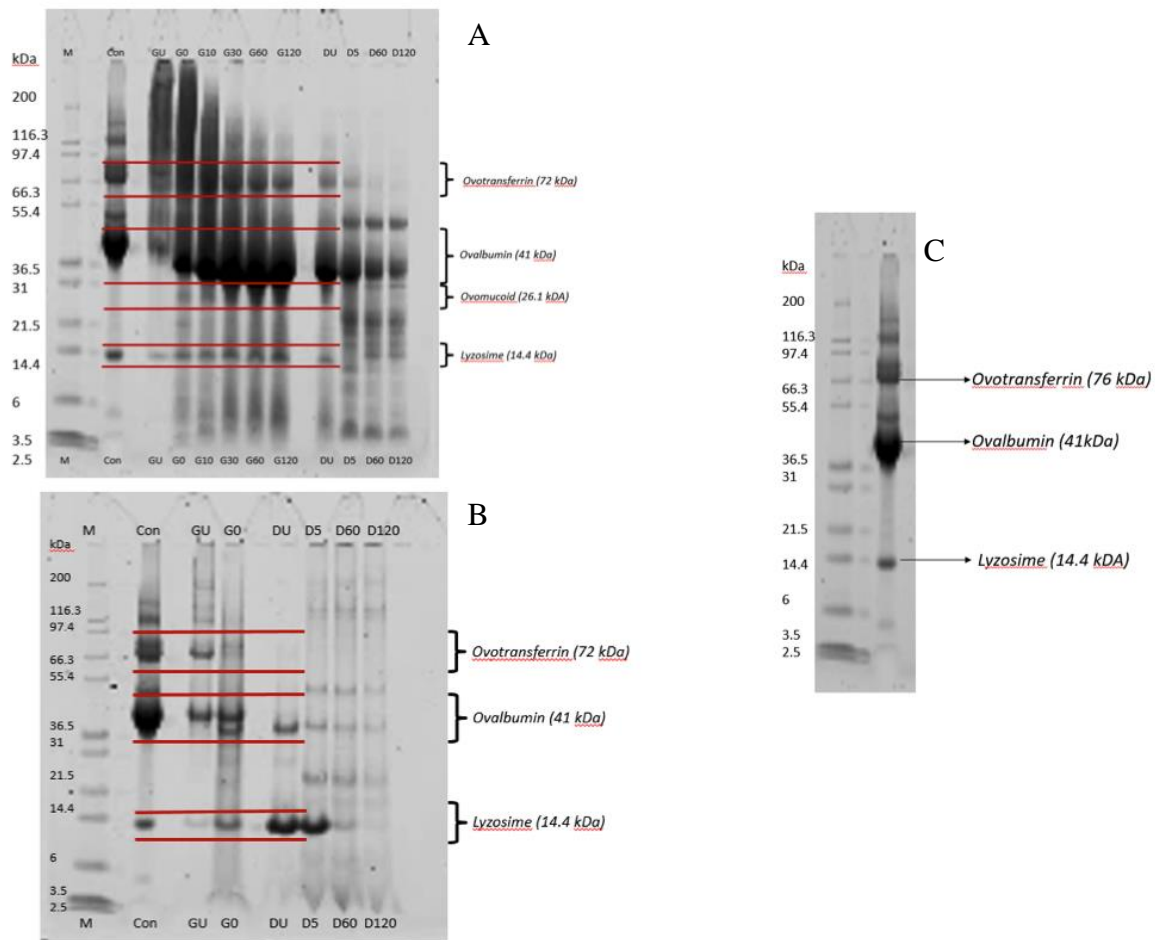
Atlaisvintų peptidų kinetika pagal elektroforezę SDS-PAGE ir densitometrijos analizę¹. Skirtingos kilmės ir mišinio kokybinė baltymų analizė kiekvieno virškinimo etapo metu atlikta SDS-PAGE elektroforeze ir įvertintas baltymų kitimas densitometrijos analize. Kontrolinis baltymų dydis pasirinktas pagal tiriamojo objekto ekstraktą. Simuliuojamojo virškinimo metu surinktos dvi frakcijos: tirpi ir netirpi. Virškinimo metu skrandžio fazėje fermentinės hidrolizės sustabdymui naudojamas NaOH. Terpės pokytis iš 3 iki 7 pakeičia elektrolitų kiekį analizuojamuose mėginiuose. Tyrimo metu pastebėta, kad gyvūninės kilmės baltymuose, ilgėjant fermentinės hidrolizės laikui ir keičiantis terpės pH, netirpios frakcijos

¹ Tyrimas atliktas Mančesterio Universitete, Jungtinė Karalystė

nelieka, tuo tarpu augalinės kilmės baltymuose netirpi frakcija yra matoma ir gali būti surinkta ir išekstrahuoti baltymai tolimesnei analizei.

SDS-PAGE nustatytas molekulinis baltymų dydis (kDa). Tyrimo metu naudotas standartas Mark 12 Unstained standart (NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel).

Elektroforezės geliuose yra matomi fermentų molekuliniai dydžiai. Pepsino molekulinis dydis yra 36 kDa, tripsino – 23,3kDa, chymotripsino – 25kDa, kasos amilazės – 51-53kDa, prigimtinės lipazės molekulinis dydis yra 41,7kDa [105].

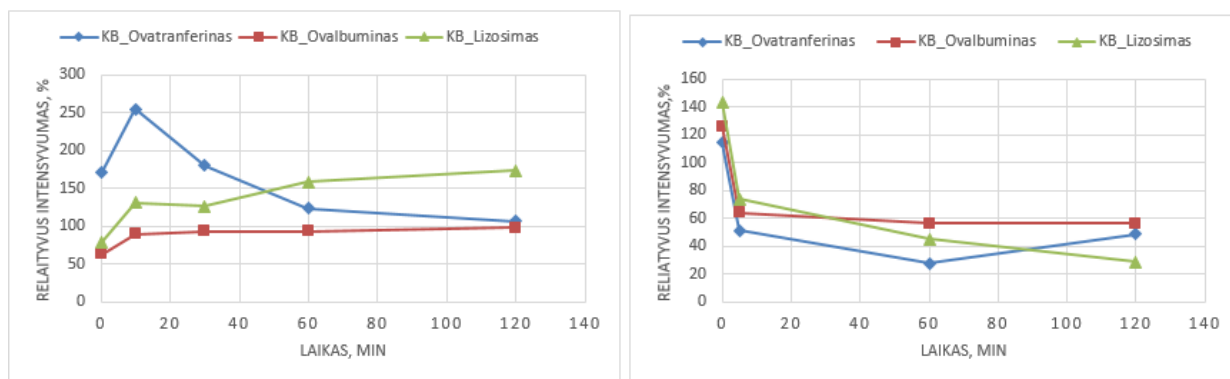


Paveikslas 15. 10% kiaušinių baltymų tirpios(A) ir netirpios(B) frakcijų neredukuojančiomis sąlygomis SDS-PAGE rezultatai skirtinguose *in vitro* virškinimo taškuose skrandyje (GU, G0, G10, G30,G60,G120) ir žarnyne (DU, D5, D60, D120). C- kiaušinių baltymų ekstraktas (kontrolė)

10% kiaušinių baltymų virškinimo metu matomas pagrindinis kiaušinio baltymas – ovalbuminas (~41kDa) ir jo kitimas virškinimo metu. Ovalbuminas gelyje yra persidengęs su pepsinu, tačiau jo kitimas skrandžio fazėje yra nežymus, kiekvieno virškinimo etapo metu jo molekulinis dydis didėja, tai gali rodyti jo atsipalaidavimą ir išsivyniojimą (ang.k. *solubilization*). Kad ovalbumino reliatyvus linijos intensyvumas didėja tirpioje frakcijoje nustatyta densitometrijos analize (žr. Paveikslas 16). Densitometrijos analizės tikslas nustatyti proporcingą molekulinio dydžio kitimą analizuojamuose mėginiuose virškinimo metu [106]. Iš

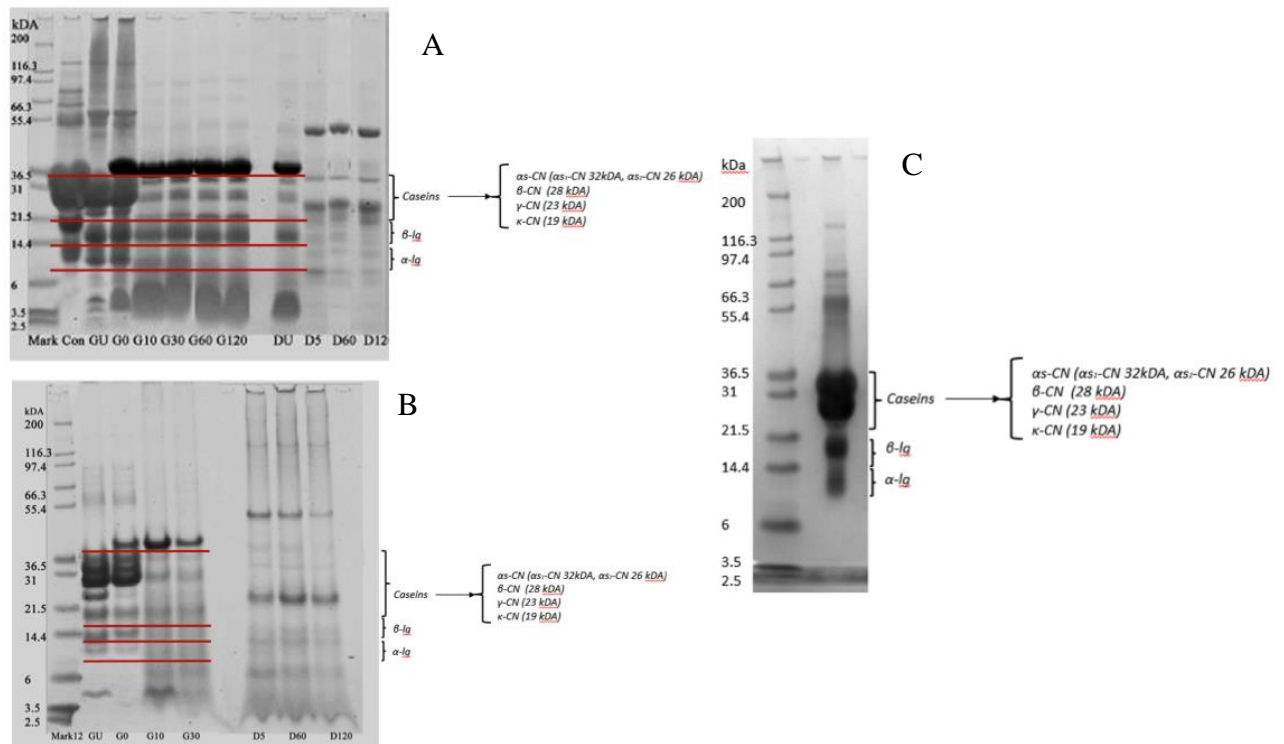
elektroforezės rezultatų galima matyti, kad pagrindinė ovalbumino hidrolizė vyksta žarnyno fazėje ir yra atspari pepsino hidrolizei. Pradiniame virškinimo žarnyne D5 taške jis yra ryškiausias, tačiau vėlesniuose virškinimo taškuose D60 ir D120 matoma daugiau mažesnių molekulinio dydžio fragmentų. Netirpioje analizuojamųjų mėginių frakcijoje DU ir D5 virškinimo taškuose ryškiai matomi ~14kDa dydžio fragmentai, kurie gali būti ovalbumino peptidas arba lizosimas [104]. DU yra skrandžio fazės mėginys be fermentų, todėl skirtinga elektrolitų koncentracija taip pat gali turėti įtakos baltymų hidrolizei ir denatūracijai [24]. Tačiau taip pat gali būti, jog ovalbumino peptidai susidarė ir skrandžio fazėje, todėl matomi ir DU virškinimo taške. Literatūros šaltinių duomenimis, vieno iš kiaušinio baltymo ovalbumino nustatymas redukuojančiomis ir neredukuojančiomis sąlygomis skiriasi nežymiai, nes ovalbuminas turi 1 sufidinį ryšį [104].

Taip pat tirpioje analizuojamųjų mėginių frakcijoje nuo virškinimo skrandyje pradžios G0.3 yra pastebimas ovomukoido fragmentas – 26.1kDa. Jis yra nepastebimas kiaušinio baltymų ekstraktoje. Tai gali būti, nes jis yra glikoproteinas ir savo sudėtyje turi sacharidų [30]. Sacharidai trukdo proteinų elektrolitinei pernašai elektroforezės gelyje, tačiau ovomukoido fragmentas matomas kiekvieno virškinimo etapo metu ir tai rodo jo atsparumą pepsino hidrolizei. Taip pat virškinimo metu matomi ovatransferino ir lizosimo atsparumas pepsino hidrolizei. Tačiau jie visi yra hidrolizuojami žarnyno fazėje, esant tripsino ir chymotripsino hidrolizei.



Paveikslas 16. 10% kiaušinio baltymo tirpios frakcijos densinometrijos analizės virškinimo metu. A – virškinimas skrandyje, B – virškinimas žarnyne.

Grafikas 16 vaizduoja trijų pagrindinių kiaušinio baltymų kitimą virškinimo metu: ovotransferino (72kDa), ovalbumino (41kDa) ir lizosimo (14,4kDa). Ovalbuminas ir ovatransferinas yra atplaiduojamas iki 10min virškinimo skrandyje, lizosimas iki 60min. Ovalbuminas nuo 10min išlieka stabilus iki 120min. Ovatranferinas yra hidrolizuojamas pepsin iki 120min, o lizosimas nuo 60 minutės iki 120min išlieka stabilus. Pagrindinis jų hidrolizavimas fermento tripsino ir chymotripsino yra žarnyno fazėje per pirmąsias 5min.

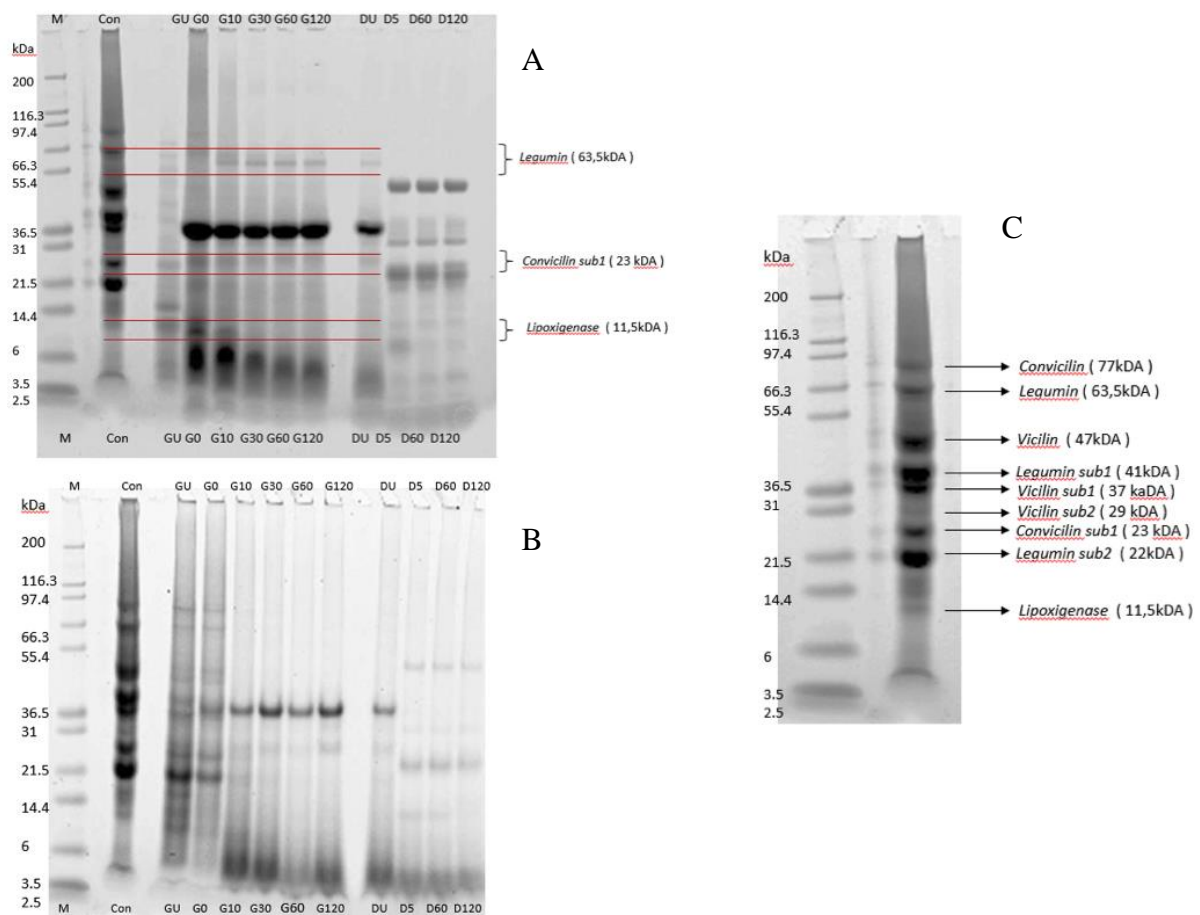


Paveikslas 17. 10% pieno baltymų tirpios(A) ir netirpios(B) frakcijų neredukuojančiomis sąlygomis SDS-PAGE rezultatai skirtinguose *in vitro* virškinimo taškuose skrandyje (GU, G0, G10, G30,G60,G120) ir žarnyne (DU, D5, D60, D120). C- kiaušinių balmybų ekstraktas (kontrolė)

10% pieno baltymuose virškinimo *in vitro* metu (žr. paveiklas 17) matomas kazeinų ir išrūgų baltymų kitimas. Kazeinų kitimas virškinime skrandyje yra stabilus nuo G10 virškinimo taško. G0 taške matomi didesnio molekulinio dydžio linijos, o jau G10 minutę matomas jų padaugėjimas – mažesnė koncentracija didesnio molekulinio dydžio peptidų analizuojamuose mėginiuose. Išrūgų baltymo α -Ig sumažėjimas matomas G10 taške, β -Ig išlieka stabilus virškinimo skrandyje fazėje. Mandalari, G et.al , 2009, taip pat patvirtina, kad β -Ig yra atsparus simuliuojamoje *in vitro* virškinimo sistemoje. Literatūros šaltinių duomenimis, β -Ig yra ~15kDa, α -Ig – 12kDa, κ -kazeino ~20kDa, α s1-kazeino ~27kDa ir β –kazeinas yra tarp jų [107,108]. Nustatyti iš elektroforezės gelio molekuliniai dydžiai yra panašūs: α s1-kazeino ~32kDa α s2-kazeino ~26kDa , β –kazeinas – 28kDa, κ -kazeino ~20– 19kDa ir γ -kazeinas – 19kDa. Densitometrijos analizė iš gelio nustatyta, kad pagrindinis kazeinų ir dalies išrūgų baltymų virškinimas iki mažesnės molekulinės masės prasideda virškinimo žarnyne metu. D5-D120 virškinimo taškuose matomas didesnis kiekis mažesnio molekulinio dydžio peptidų.

Kad išrūgų baltymai yra greičiau suskaidomi fermento pepsino skrandžio fazėje, įrodoma ir netirpios frakcijos elektroforezės gelyje. Išrūgų baltymų molekulinio dydžio fragmentai pranyksta G10 taške. Tuo tarpu, GU virškinimo taške be fermento ir G0 taške su fermentu matomi kazeinai, kurie netirpioje frakcijoje proporcingai blankėja G30 ir G60 taškuose sudarydami daugiau įvairaus molekulinio dydžio peptidus. Išrūgų baltymai yra priskiriami

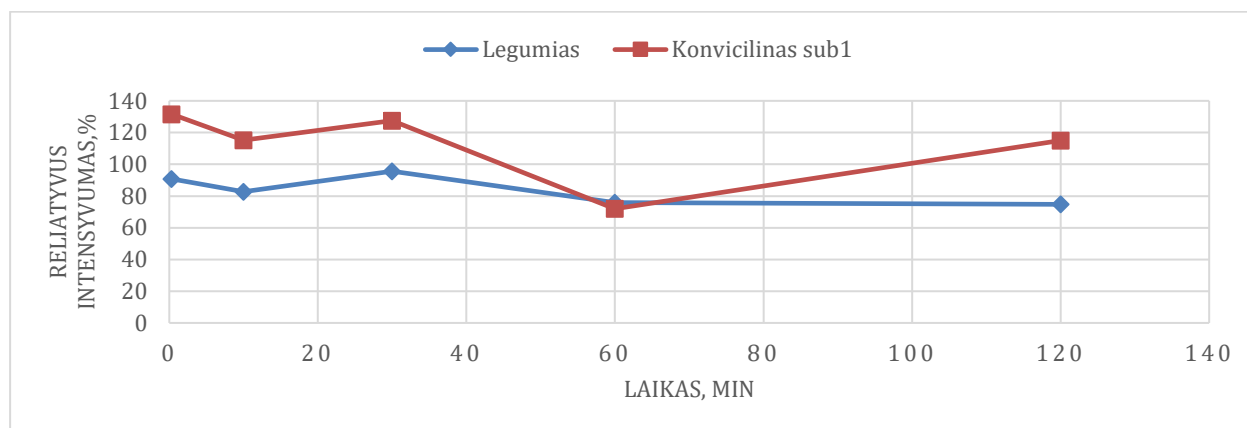
“greitiesiems baltymams”, o kazeinai “lėtiesiems baltymams” [76]. Netirpioje 10% pieno baltymų frakcijoje α - Ig kiekis tirpioje frakcijoje virškinimo skrandyje metu mažėjo G0, G10 fazėse ir G30 virškinimo metu jis nėra aptinkamas. Netirpioje frakcijoje jis jau nėra aptinkamas G10 virškinimo fazėje. Taip pat pradinėje virškinimo fazėje be ir su [117]fermentu GU ir G0 yra matomi kazeinai. Galimai α s1-kazeinas, β -kazeinas yra tirpioje frakcijoje (žiūrėti paveiklą 9), o dalis κ -kazeinas yra matoma G10 ir G30 virškinimo skrandyje metu. Tačiau lyginant su tirpia frakcija galimai κ -kazeinas yra nematomas G30 taške, bet randamas netirpioje frakcijoje. Tai rodo jo vėlesnę fermentinę hidrolizę virškinimo metu. Literatūros šaltinių duomenimis, kazeinai yra skaidomi skrandžio fazėje, tačiau fiksuotas pH ir aukštas pepsino:substrato santykis gali turėti įtakos pepsino atsparumui substratui [83]. Taip pat pieno baltymų gamintojų aprašyme yra akcentuota, kad šis produktas yra lėtai virškinamas ir kazeinai jame sudaro 78% .



Paveikslas 18. 10% žirnių baltymų tirpios(A) ir netirpios(B) frakcijų neredukuojančiomis sąlygomis SDS-PAGE rezultatai skirtinguose *in vitro* virškinimo taškuose skrandyje (GU, G0, G10, G30,G60,G120) ir žarnyne (DU, D5, D60, D120). C- kiaušinių balmybų ekstraktas (kontrolė)

10% Žirnių baltymų ekstrakto matomi įvairaus molekulinio dydžio baltymai, kurie skrandžio fazėje yra suskaldomi. Pepsinui atsparūs viso virškinimo skrandyje fazėje yra tik Convicilino subvientetas ir legumas. Tai rodo žirnių baltymų greitesnę baltymų hidrolizę palyginti su pieno ir

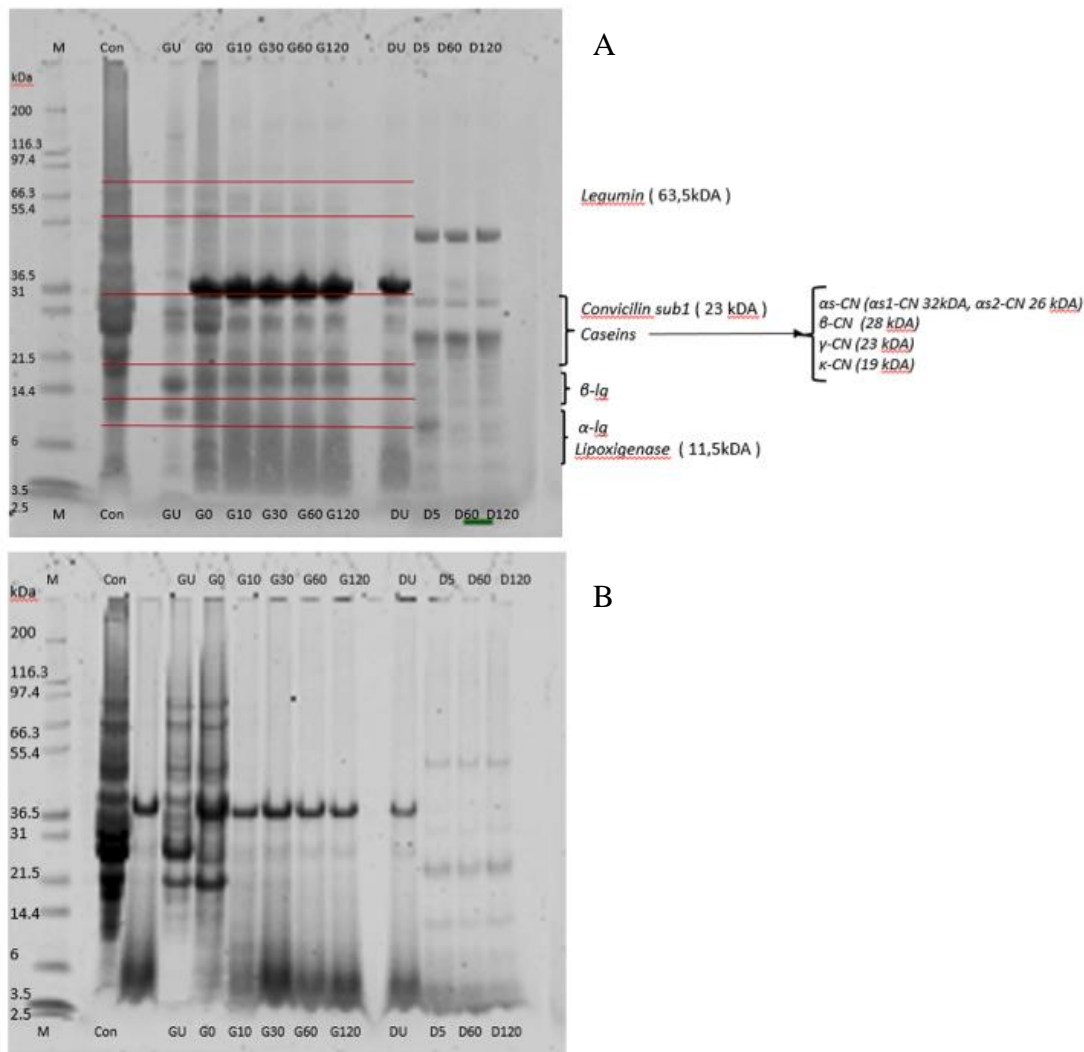
kiaušinių baltymais skrandžio fazėje. Žarnyno fazėje vykstanti tolimesnė baltymų hidrolizė suskaldo visus didelio molekulinio dydžio peptidus.



Paveikslas 19. 10% žirnių baltymų tirpios frakcijos densinometrijos analizė virškinimo skrandyje metu.

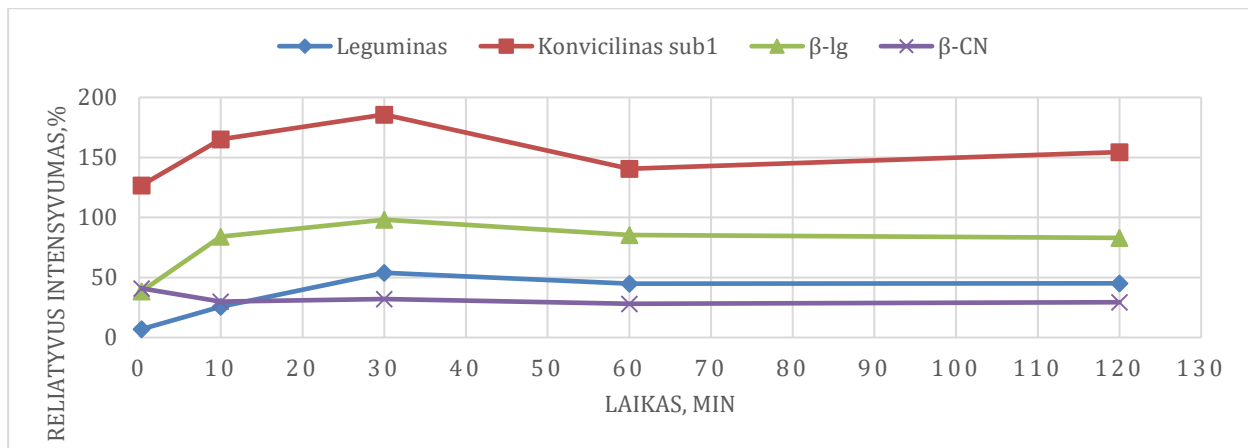
Žirnių baltymų densinometrijos analizėje matomas legumino ir konvicilino subvieneto atsparumas pepsin hidrolizei viso virškinimo skrandyje metu (120min). Jų kitimas yra nepastovus. Iki 10min legumino ir konvicilino reliatyvus intensyvumas sumažėjo atitinkamai 15% ir 5%, iki 30min atitinkamai padidėjo 15% ir 12% ir atsipalaidavo. Iki 60 minutės leguminas ir konvicilino subvientas sumažėjo – vyko fermentinė hidrolizė. Nuo 60min leguminas stabilizavosi, o konvicilino subvieneto reliatyvus intensyvumas padidėjo.

Leguminas yra karščiui atsparus, ketvirtinės struktūros baltymas. Nors jis yra stabilus esant 90C, jo ketvirtinė struktūra yra jautresnė pH ir druskų koncentracijai. Žirnių leguminas yra heksameras, kai pH yra 7 (žarnyno fazėje), bet disocijuoja kai pH yra apie 3 – 2,4 (skrandžio fazėje) [25]. Panaši pepsino reakcija buvo aprašyta su baltymu HRP (žr. skyrelį 1.3). Elektroferezės gelio (žr. Paveikslas 18) skrandžio fazės mėginiuose fragmentų nėra. Tai rodo jų hidrolizę veikiant tripsinui ir chymotripsinui.



Paveikslas 20. 10% pieno ir žirnių baltymų mišinio tirpios(A) ir netirpios(B) frakcijų neredukuojančiomis sąlygomis SDS-PAGE rezultatai skirtinguose *in vitro* virškinimo taškuose skrandyje (GU, G0, G10, G30,G60,G120) ir žarnyne (DU, D5, D60, D120). C- kiaušinių baltymų ekstraktas (kontrolė)

10% pieno ir žirnių baltymuose matomi kazeinai, β - laktoglobulino atsparumas pepsino hidrolizei skrandžio fazėje. Tačiau pieno baltymų fragmentų intensyvumas nėra toks intensyvus kaip atskirai hidrolizuojamų pieno baltymų skrandžio fazėje, todėl gali būti, kad jie atlaisvinami intensyviau skrandžio fazėje. Tačiau analizuojamame mėginyje yra naudota mažesnė koncentracija pieno ir kiaušinių baltymų – 5% kiekvieno, todėl ir yra matomi mažiau intensyvūs fragmentai.



Paveikslas 21. 10% pieno ir žirnių baltymų mišinio tirpios frakcijos densinometrijos analizės virškinimo metu.

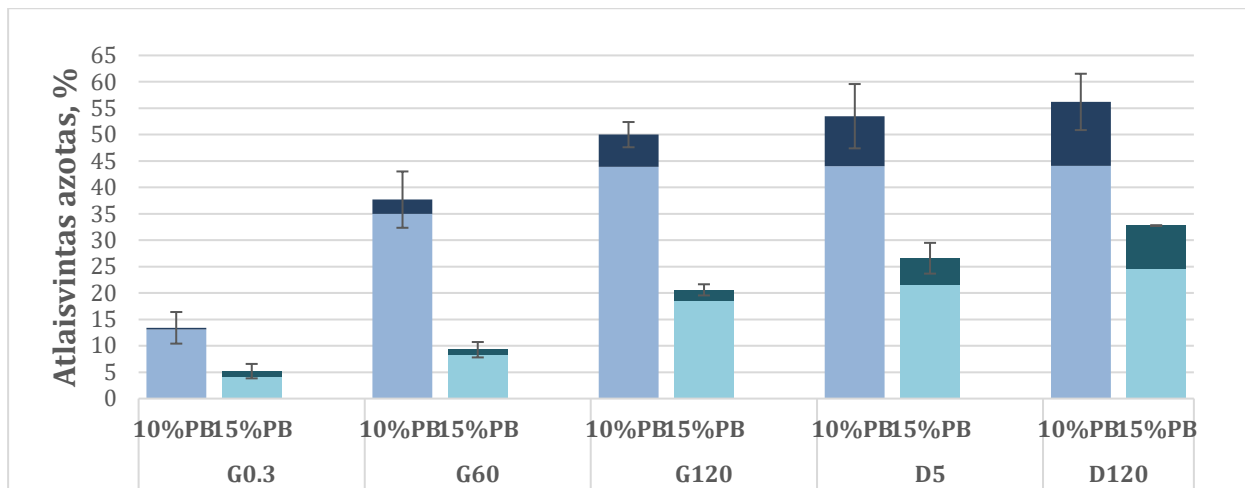
Legumino ir konvicilino subvienetas yra panašus į atskirai hidrolizuotų žirnių baltymų (žr. Paveikslas 19). Konvicilinas, leguminas ir β-Ig yra atpalaiduojami iki 30min virškinimo skrandyje metu ir jų reliatyvus intensyvumas mažėja iki 60min. Nuo 60min iki 120min stabilizuojasi. B-kazeino intensyvumas sumažėjo iki 10min 11% ir stabilizavosi iki virškinimo skrandyje pabaigos.

Pieno ir žirnių mišinio baltymų hidrolizė yra panaši kaip ir kiekvieno baltymo atskirai. Pieno baltymai pagrinde yra hidrolizuojami virškinimo žarnyne metu, o žirnių – skrandyje, todėl tai yra „lėtų“ ir „greitų“ baltymų šaltinis.

4.2.2. Skirtingos koncentracijos baltymų hidrolizės vertinimas

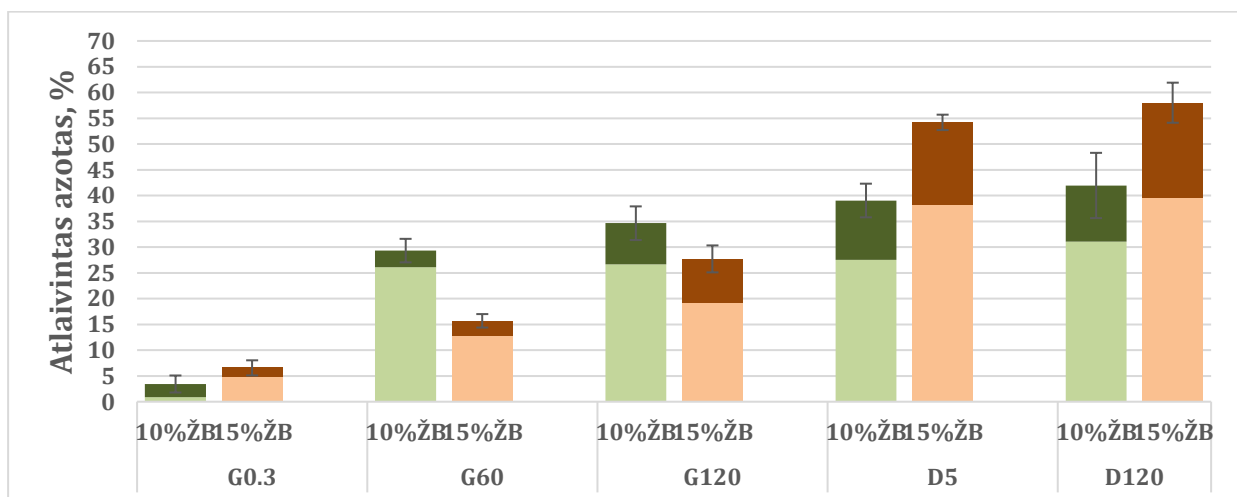
Stimuliuojamojo *in vitro* virškinimo metu pasirinktos skirtingos baltymų koncentracijos (10% ir 15%). Tai yra skirtingas substrato kiekis fermentinei baltymų hidrolizei vykti. Pagal Michaelis-Mentel fermentų kinetiką nustatoma kaip substrato koncentracija įtakoja fermentinės reakcijos greitį. Bendru atveju, fermentas, turintis tam tikrą kiekį substrato jį veikia tam tikrą laiką ir vėliau stabilizuojasi [65].

Atlaisvinto azoto įvertinimas pagal Kjeldalio metodą. Analizuojami mėginiai buvo augalinės ir gyvūninės kilmės 10% ir 15% baltymų koncentracijos (žr. Paveikslus 22,23,24). Apskaičiuotas atlaisvinto azoto kiekis pagal Kjeldalį tirpios frakcijos analizuojamuose mėginiuose ir 2%TCA tirpių peptidų analizuojamuose mėginiuose. Taip pat porporciškai įvertintas 2% TCA tirpių peptidų kiekis kiekviename virškinimo etape skrandžio ir žarnyno fazėse. Atlaisvinto azoto grafikuose matomas stulpelis su šviesesne spalva ir tamsesne spalva. Šviesesnė spalva yra 2%TCA tirpių peptidų atlaisvinto azoto kiekis analizuojamame mėginyje. Šviesesnės ir tamsesnės spalvos suma stulpelyje parodo bendrą atlaisvintą kiekį analizuojamame mėginyje kiekvieno virškinimo etapo metu.



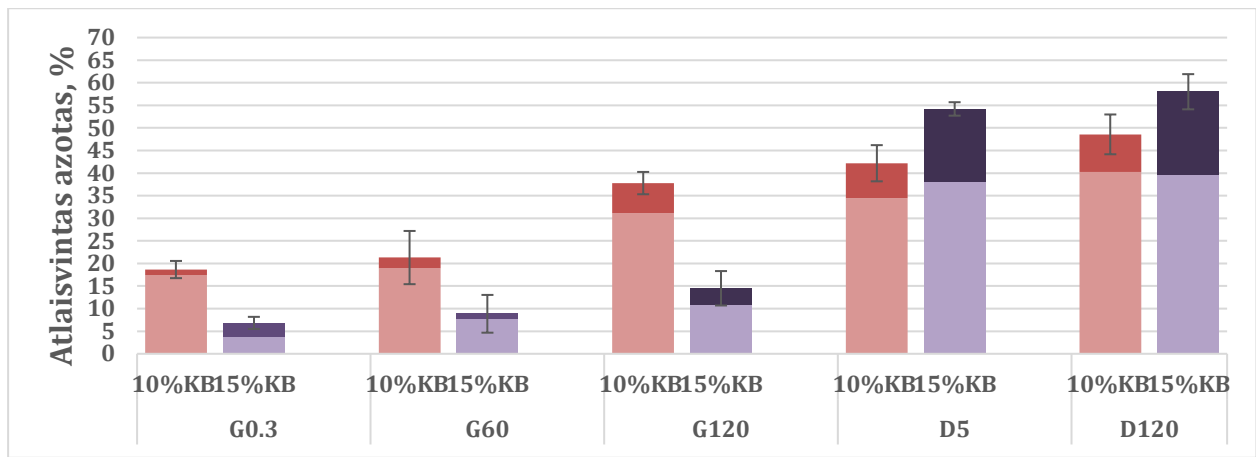
Paveikslas 22. Pieno baltymų ir jų 2%TCA tirpių peptidų hidrolizės laipsnis kiekviename virškinimo taške skirtingu laiku (G – skrandžio fazėje, D – žarnyno fazėje)

10% ir 15% pieno baltymų analizuojamuose mėginiuose pagal atlaisvintą azotą tendencija matoma panaši skrandžio ir žarnyno fazėse. Tai paaiškina Michael-Mentel fermentų kinetikos teoriją, kad fermentas yra aktyvus tam tikram substrato kiekiui ir pasiekia stabilumą - *plateu*.



Paveikslas 23. 10% ir 15% žirnių baltymų ir jų 2%TCA tirpių peptidų hidrolizės laipsnis kiekviename virškinimo taške skirtingu laiku (G – skrandžio fazėje, D – žarnyno fazėje).

G0,3 virškinimo skrandyje etape atlaisvinto kiekis(%), didesnis yra 15% žirnių baltymuose (6,2%), nei 10% žirnių baltymuose (4,56%). Tačiau G60 ir G120 virškinimo skrandyje taškuose atlaisvinto azoto tendencija išlieka – proporcingai atsilaisvina azotas. Žarnyno fazėje 15% žirnių baltymų atlaisvinto azoto kiekis D5 etape yra didesnis (54%), nei 10% žirnių baltymų (39%). Tai rodo, kad veikiant endopepsidazėms, tripsinui ir chymotripsinui, žarnyno fazėje substrato kiekis 10% žirnių baltymuose yra nepakankamas palyginti su 15% žirnių baltymais.



Paveikslas 24. Kiaušinių baltymų ir jų 2%TCA tirpių peptidų hidrolizės laipsnis kiekviename virškinimo taške skirtingu laiku (G – skrandžio fazėje, D – žarnyno fazėje).

Kiaušinių baltymų atlaisvinoto azoto kiekis yra proporcingai didesnis mažesnės koncentracijos analizuojamuose mėginiuose skrandžio fazėje nuo G0,3 iki G120 etapo. Virškinimo žarnyne tendencija panaši į žirnių baltymų. Didelis atlaisvinto azoto kiekis yra didesnės koncentracijos kiaušinių baltymuose. D120 virškinimo etape 10% analizuojamuose mėginiuose atlaisvinto azoto kiekis siekė 49%, tuo tarpu 15% analizuojamuose mėginiuose - 21%. Įvertinus atlaisvinto azoto analizuojamuosius mėginius, patvirtinama fermentų kinetikos teorija, kad substrato koncentracija turi įtakos fermentų aktyvumui ir produktų sudarymui [65].

	10%PB,%	15%PB,%	10%ŽB,%	15%ŽB,%	10%KB,%	15%KB,%
G0.3	97,94±6,21	81,65±9,53	26,14±7,18	72,74±8,66	93,60±0,00	56,01±5,55
G60	92,86±5,64	89,60±7,14	88,94±2,60	82,14±5,21	88,80±0,00	86,92±0,00
G120	87,85±2,25	90,11±2,49	76,99±7,31	69,35±8,57	82,38±9,12	74,61±1,94
D5	82,26±5,58	80,95±4,46	70,52±9,44	70,32±1,94	81,58±0,00	79,58±5,15
D120	78,42±4,85	74,96±0,00	73,97±5,60	68,31±7,31	82,86±9,51	72,28±7,31

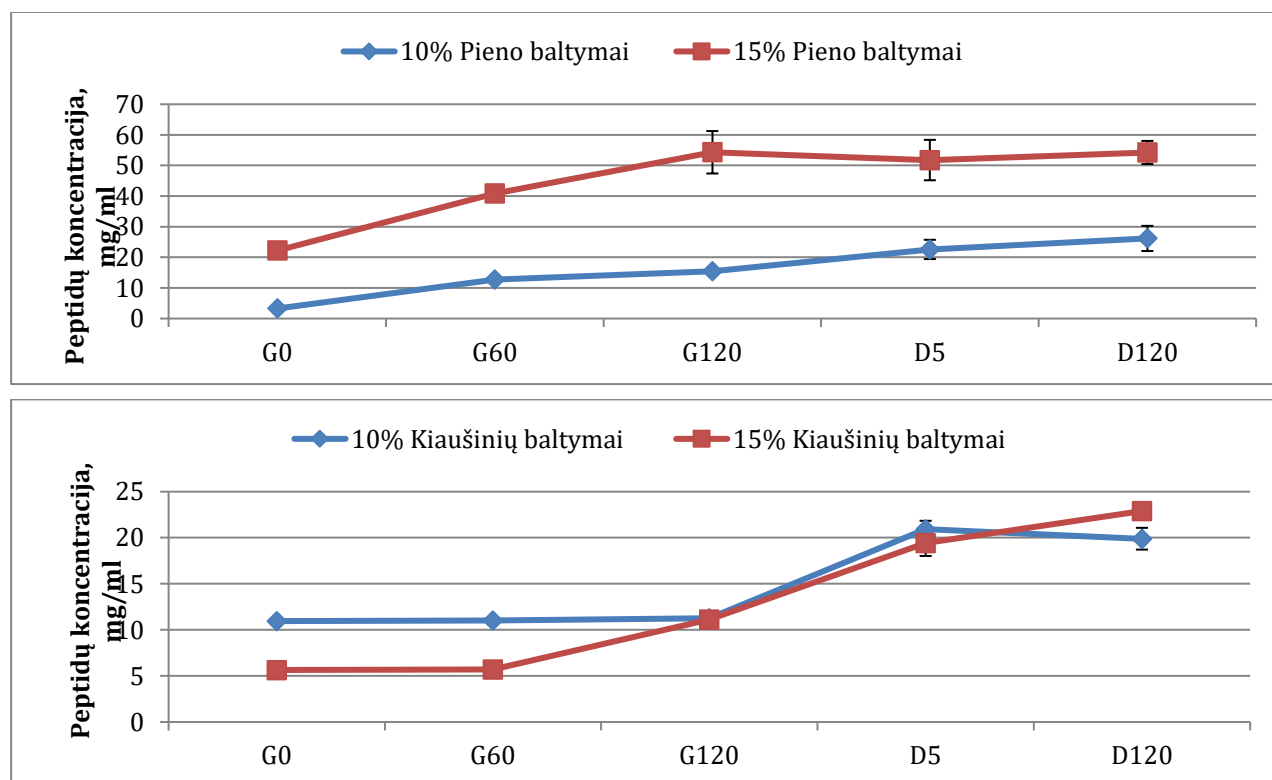
Lentelė 10. Skirtingos koncentracijos 2% TCA tirpių peptidų kiekis pagal hidrolizės laipsnį analizuojamuose mėginiuose kiekviename virškinimo taške laiku (G – skrandžio fazėje, D – žarnyno fazėje).

Skirtingos koncentracijos augalinės ir gyvūninės kilmės analizuojamose medžiagose buvo įvertintas proporcingas 2% TCA tirpių peptidų kiekis procentais pagal atlaisvintą azotą kiekviename virškinimo etape. Gyvūninės kilmės skirtingos koncentracijos (10% ir 15%) analizuojamuose mėginiuose matomas didesnis 2%TCA tirpių peptidų kiekis, nei skirtingos koncentracijos augalinės kilmės analizuojamuose mėginiuose. Gyvūninės kilmės analizuojamuose mėginiuose 2% TCA tirpių peptidų kiekis didžiausias buvo G0,3 etape ir mažėjo kiekvieno etapo metu iki D120 taško (72-78% nepriklausomai nuo koncentracijos). Augalinės kilmės 10% ir 15% analizuojamuose mėginiuose 2% TCA peptidų kiekis didėjo iki G60 taško skrandyje ir sumažėjo virškinimo žarnyno fazėje iki 68-74%.

Atlaisvintas azotas parodo skirtingos koncentracijos pieno, kiaušinių ir žirnių baltymuose, kad to paties aktyvumo fermentas (2000U/ml) proporcingai skaido substratą iki

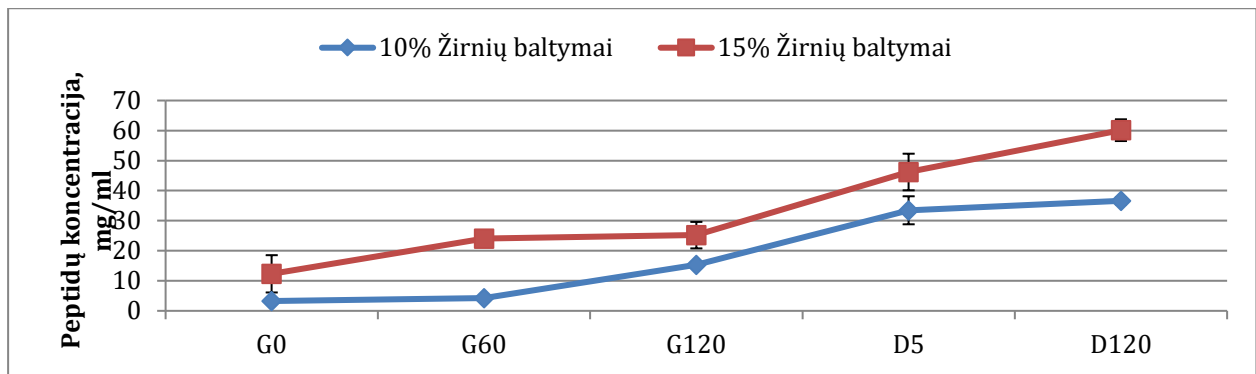
produkto skrandžio fazėje. Todėl gaunamas proporcingai mažesnis atlaisvintas azotas didesnės koncentracijos analizuojamuose baltyminiuose mėginiuose. Žarnyno fazėje ta pati tendencija galioja pieno baltymuose, tačiau skirtingos koncentracijos žirnių ir kiaušinių baltymuose gaunamas didesnis atlaisvinto azoto kiekis didesnės koncentracijos analizuojamuose mėginiuose. 2% TCA tirpių peptidų kiekio susidarymas nepriklausomai nuo koncentracijos didėjo kiekvieno virškinimo metu tomis pačiomis tendencijomis. Taigi, koncentracijos įtaka virškinimo metu atlaisvinto azoto kiekiui turėjo žirnių ir kiaušinių žarnyno fazėse ir susidariusių 2% TCA tirpių peptidų kiekis buvo nežymiai didesnis 15% procentų analizuojamuose mėginiuose D120 virškinimo etape: 10% PB- 78, 15%PB – 74%; 10%ŽB – 73%, 15%ŽB – 68%; 10% KB – 82%, 15%KB – 72%.

Peptidų koncentracijos nustatymas pagal Lowry metodą. Skirtingos koncentracijos analizuojamuose mėginiuose buvo nustatyta peptidų koncentracija ir įvertintas jų peptidų intensyvumas pagal 2% TCA tirpius peptidus.



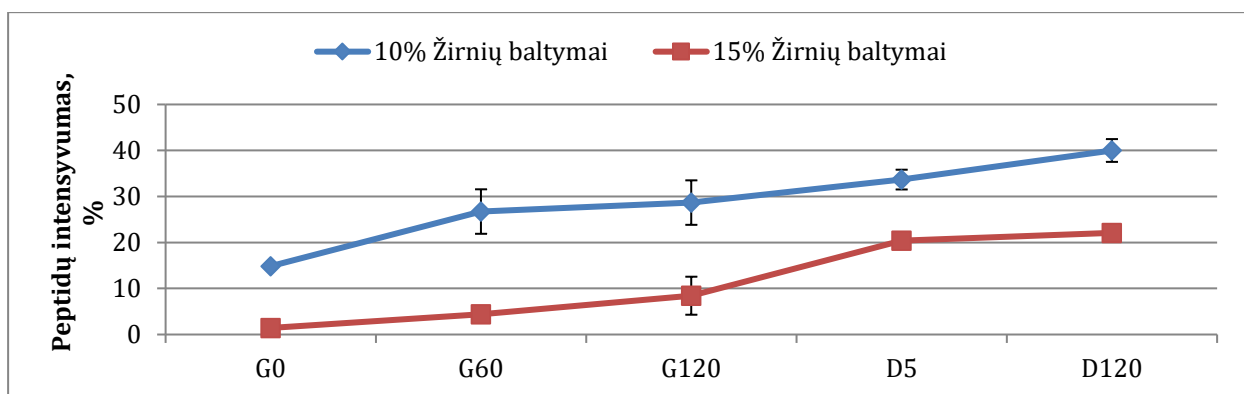
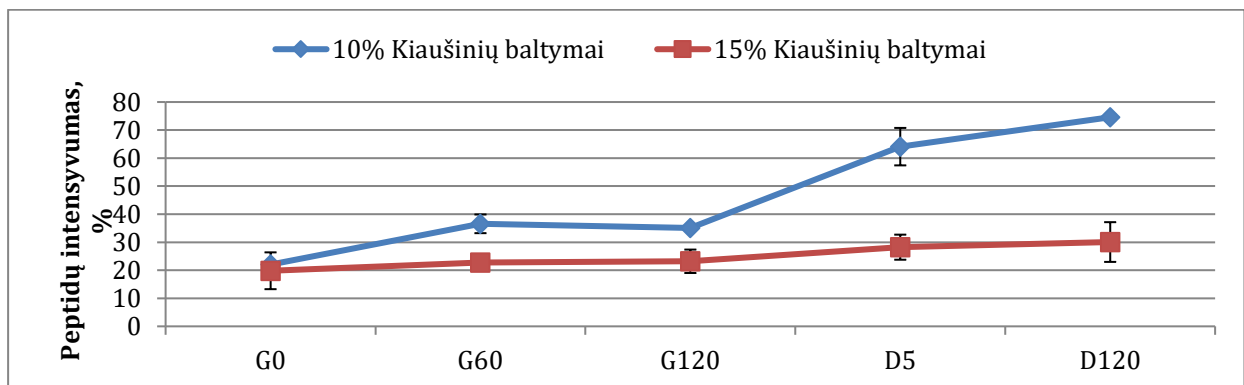
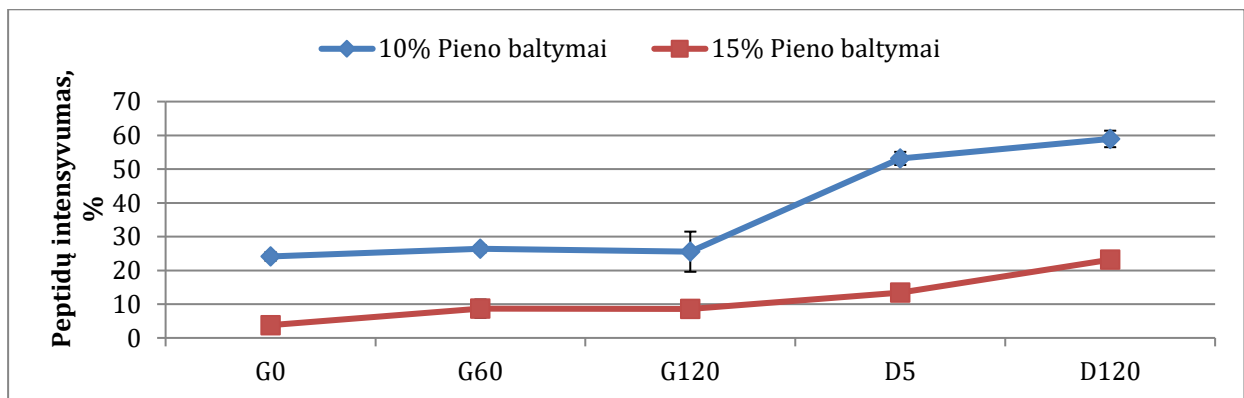
Paveikslas 25. Gyvūninės kilmės skirtingos koncentracijos analizuojamųjų mėginių peptidų koncentracija virškinimo *in vitro* metu.

15% ir 10% pieno ir kiaušinių baltymų tendencija peptidų koncentracijos atžvilgiu yra panaši kaip ir atlaisvinto azoto kiekio analizuojamuose mėginiuose. Pieno baltymų skirtingos koncentracijos analizuojamuose mėginiuose skrandžio ir žarnyno fazėse tendencija panaši, o kiaušinių baltymų 15% analizuojamuose mėginiuose peptidų koncentracija padidėjo žarnyno fazėje. Tai rodo, kad peptidų susidarė daugiau nei 10% kiaušinių baltymų analizuojamuose mėginiuose (žr. Paveikslas 25).



Paveikslas 26. Augalinės kilmės skirtingos koncentracijos analizuojamųjų mėginių peptidų koncentracija virškinimo *in vitro* metu.

15% ir 10% žirnių baltymų peptidų koncentracijos tendencija yra panaši skrandžio ir žarnyno fazėje, tačiau skrandžio G120 ir žarnyno D5 etape skirtumas tarp 15% ir 10% sumažėja, todėl tendencija panaši kaip ir atlaisvinto azoto kiekio žirnių baltymuose.

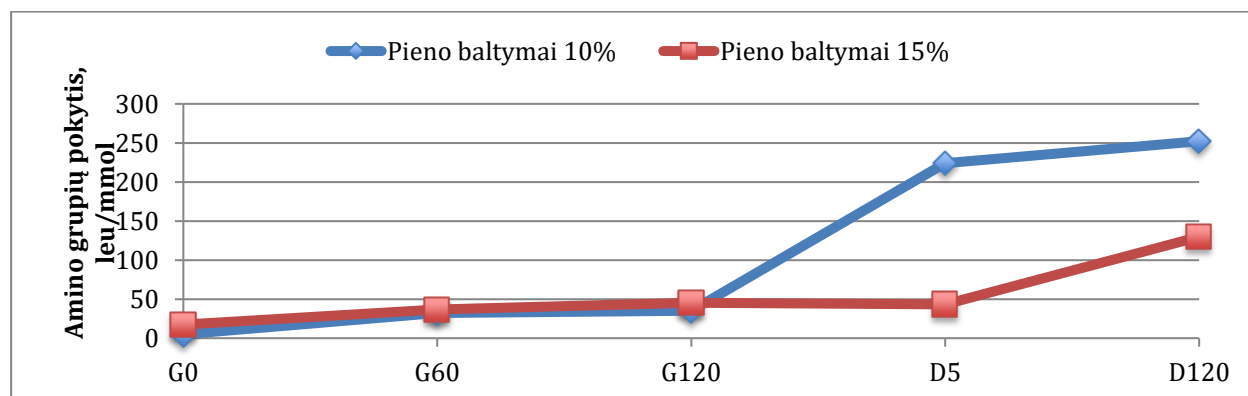


Paveikslas 27. Skirtingos koncentracijos analizuojamųjų mėginių peptidų intensyvumas (%) pagal 2%TCA tirpių peptidų koncentraciją, skirtinguose virškinimo *in vitro* taškuose

Proporcingai 2% TCA tirpių peptidų susidarė 10% ir 15% koncentracijos analizuojamuose mėginiuose. Tai įvertinama peptidų intensyvumu (žr. Grafikas 28). 10% pieno ir kiaušinių analizuojamuose mėginiuose peptidų intensyvumas paskutiniame virškinimo etape (D120) yra 50-53%. Tai yra 1,7-2,1 karto daugiau, nei 15% pieno ir kiaušinių analizuojamuose mėginiuose, kurių peptidų intensyvumas yra 23-30%. Taip pat ir žirnių baltymų analizuojamuose mėginiuose mažesnės koncentracijos mėginiuose paskutiniame virškinimo taške (D120) peptidų intensyvumas 1,8 karto didesnis, nei 15% žirnių baltymų analizuojamuose mėginiuose. Kadangi fermento aktyvumas buvo toks pat, analizuojamuose mėginiuose yra apskaičiuotas proporcingas peptidų intensyvumas skirtingos koncentracijos mėginiuose.

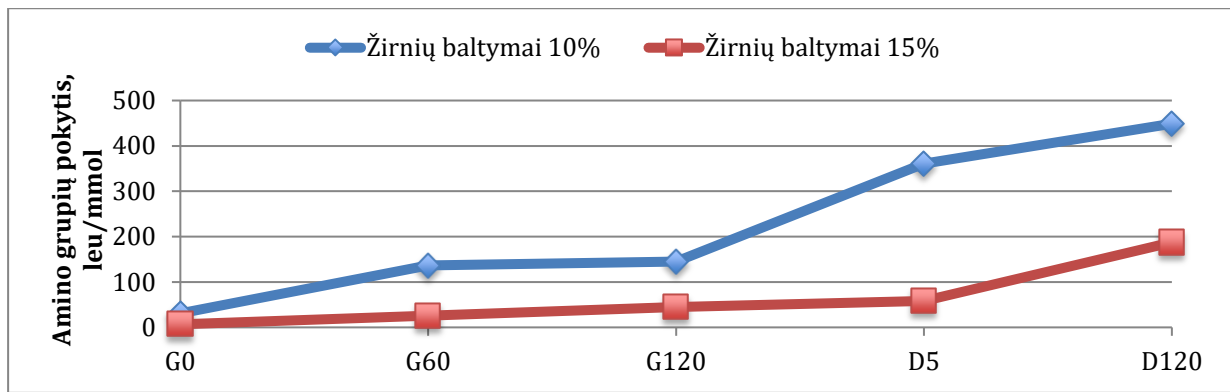
Gauti rezultatai patvirtina ir atlaisvinto kiekio pagal Kjeldalį išvadas, kad fermentas yra aktyvus tam tikram substrato kiekiui.

Amino grupių pokytis *in vitro* virškinimo sistemoje. Amino grupių pokytis pagal leuciną buvo nustatytas fluorescemininiu metodu skirtingos koncentracijos analizuojamuose mėginiuose (žr. Paveikslas 28, 29, 30). Analizuojamuose mėginiuose didesnio molekulinio dydžio peptidai nusodinami 12% TCA ir surinktas supernatantas, kuriame yra peptidai, pagrinde sudaryti iš 1-7 amino rūgščių.



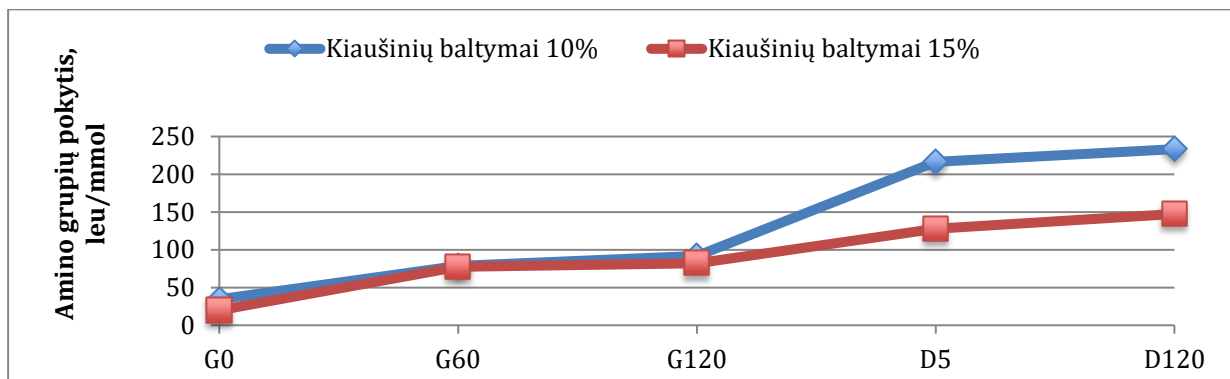
Paveikslas 28. Skirtingos koncentracijos pieno baltymų analizuojamų mėginių amino grupių pagal leuciną pokytis *in vitro* virškinimo taškuose

Pieno baltymų amino grupių pokytis skirtingos koncentracijos baltymuose skrandžio fazėje buvo nežymiai didėjantis. Tačiau proporcingai atližvelgiant į susidariusių amino grupių skaičių pagal substrato ir fermento santykį yra pastebimas didesnės koncentracijos baltymuose. Žarnyno fazėje mažesnės koncentracijos baltymuose amino grupių pokytis proporciškai panašus kaip ir didesnės koncentracijos baltymų analizuojamuose mėginiuose.



Paveikslas 29. Skirtingos koncentracijos žirnių baltymų analizuojamų mėginių amino grupių pagal leuciną pokytis in vitro virškinimo taškuose

Žirnių baltymų skirtingos koncentracijos analizuojamuose mėginiuose amino grupių pokytis skrandžio fazėje yra panašios tendencijos. Susidariusiu amino grupių pokyris nėra didelis (10% ŽB - 145 mmol/leu ir 15% ŽB - 44mmol/leu), nes pepsinas skaldo baltymo molekulę jo viduryje ir sudaro didesnius nei 7 aminorūgščių peptidus, kurie nėra nusodinami su 12% TCA. Žarnyno fazėje, veikiant tripsinui ir chymotripsinui, sudaro didesnis amino grupių pokytis ir skirtingos koncentracijos amino grupių pokytis yra panašus.



Paveikslas 30. Skirtingos koncentracijos kiaušinių baltymų analizuojamų mėginių amino grupių pagal leuciną pokytis in vitro virškinimo taškuose

Kiaušinių baltymų amino grupių pokytis skrandžio fazėje yra panašus, tačiau atsižvelgiant į substarto ir fermento santykį analizuojamuose mėginiuose galima teigti, kad didesnis amino grupių pokytis proporcingai susidarė daugiau didesnės koncentracijos baltymuose skrandžio fazėje iki G120 etapo. Nuo virškinimo žarnyne pradžios amino grupių pokytis išsiskyrė, ir tendencija fermentų skaidymo yra panaši.

Aminorūgščių pokytis mažesnės koncentracijos analizuojamuose mėginiuose yra didesnis virškinimo žarnyno fazėje, nei didesnės koncentracijos analizuojamuose mėginiuose. Tačiau gyvūninės kilmės skirtumas tarp koncentracijų išryškėjo paskutiniame virškinimo skrandyje etape (G120), o žirnių baltymų aminorūgščių pokytis jau išsiskyrė nuo G60.

Skrandžio fazėje aktyvus fermentas pepsinas skaldo peptidinę grandinę įvairiose vietose, jis priklauso endopeptidazėms ir kaip minėta anksčiau (žr. skyrelį 4.2.1.3.), proteino

galimas peptidines jungtis skaido apie 14%, todėl susidaro mažesnis kiekis amino rūgščių ir daugiau įvairaus dydžio peptidų. Žarnyno fazėje veikiančios endopeptidazės tripsinas ir chymotripsinas skaido susidariusius peptidus iki mažesnių, todėl matomas didesnis amino grupių pokytis analizuojamuose mėginiuose.

4.2.3. Polisacharido *Konjac Glucomannan* įtaka baltymų hidrolizei

Priimtinausia klamos kategorija gėrimams, disfalgijos sutrikimą turintiems vartotojams yra II-III pagal Amerikos Dietikų Asociacijos rekomendacijas (ADA). Baltymų pagrindu paruoštiems gėrimams sutirštinti buvo naudojamas polisacharidas *Konjac Glucomannan* ir išmatuota klampa.

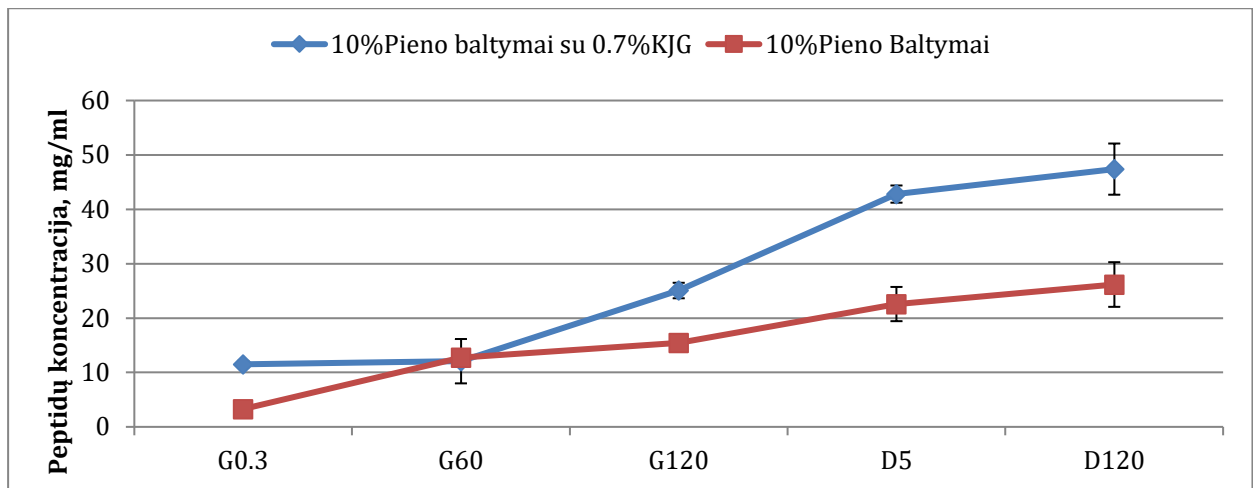
Lentelė 11. 10% Kiaušinių ir pieno baltymų su tirškliu *Konjac Glucomannan* įtaka klampai (Pa·s)

Baltymai	Kiaušinių baltymai		Pieno baltymai	
Koncentracija (%)	10	10	10	10
Konjako gliukomananas (%)		0,3		0,07
Klampa (Pa·s)	0,009+-0,006	0,101+-0,002	0,312+-0,028	0,687+-0,03
Kategorija	I	II	II	III

Kiaušinių baltymams sutirštinti naudojamas 0,3% *Konjac Glucomannan* tirpalas. Tirpalo klampa padidėjo 10 kartų: nuo 0,009 Pa·s iki 0,101 Pa·s. Pagal ADA rekomendacijas nuo I kategorijos pasiekė II kategoriją pagal rekomenduojamą klampą disfalgijos sutrikimą turintiems pacientams. Tuo tarpu pieno baltymams naudota koncentracija buvo 0,07%. Pieno baltymų tirpalo koncentracija padidėjo 2 kartus: nuo 0,312 Pa·s iki 0,687 Pa·s. Pagal ADA rekomendacijas nuo II kategorijos pasiekė III kategoriją. Taigi iš rezultatų, galima pamatyti, kad polisacharidas *Konjac Glucomannan* pasižymi geromis tirštinimo savybėmis [15].

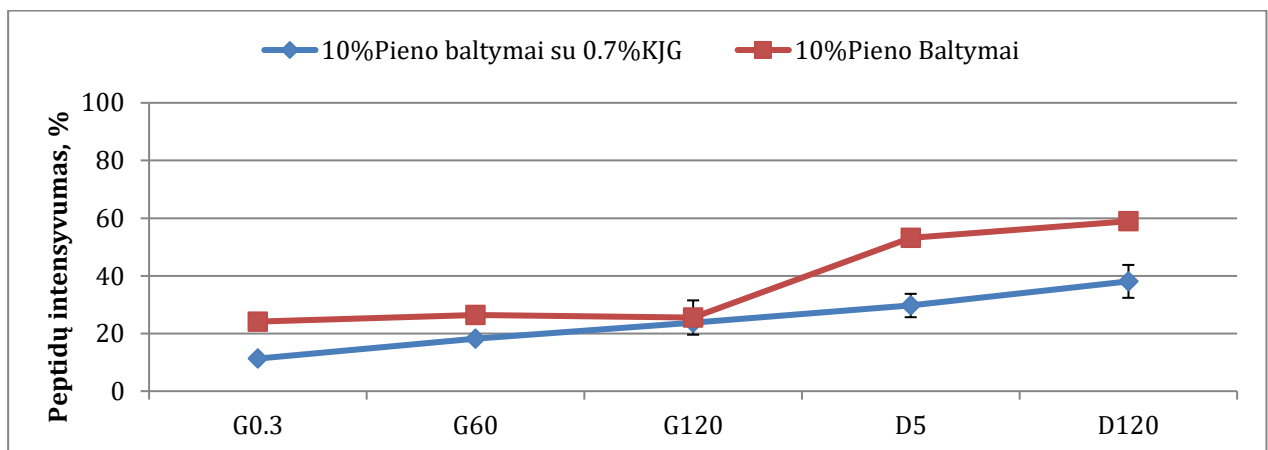
Pasiekus reikiamą gėrimo klampą yra keičiama maitinimo produkto tekstūra, o kartu ir maisto matrica. Keičiantis šiems parametrams keičiasi ir virškinimo kinetika. Šaltinių duomenimis polisacharido ir proteino tarpusavio sąveika sulėtina virškinimą ir proteinų fermentinę hidrolizę, tačiau *Konjac Glucomannan* yra joninis polisacharidas ir jis sąveikos su baltymais nesudaro ir pasižymi tik tirštinimo savybėmis [85].

Peptidų koncentracijos nustatymas pagal Lowry metodą. 10% pieno baltymų gėrimas priklauso II klamos kategorijai. Naudojama polisacharido koncentracija sutirštinti maitinimo produktą iki III kategorijos yra 0,07%. Atliktas peptidų koncentracijos nustatymas pagal Lowry ir apskaičiuotas peptidų intensyvumas pagal 2% TCA tirpius peptidus (žr. Paveikslus 31,32).



Paveikslas 31. 10% pieno baltymų su ir be *Konjac Gliukomannan* baltymų ir peptidų koncentracijos kitimas virškinimo metu.

Peptidų koncentracija yra didesnė pieno baltymų su tirštikliu *Konjac Glukomannan*. G60 virškinimo skrandyje etape peptidų koncentracija yra vienoda (12,75mg/ml), tačiau G120 taške ir žarnyno virškinimo etapuose D5 ir D120 peptidų koncentracija yra didesnė analizuojamuose mėginiuose su tirštikliu.

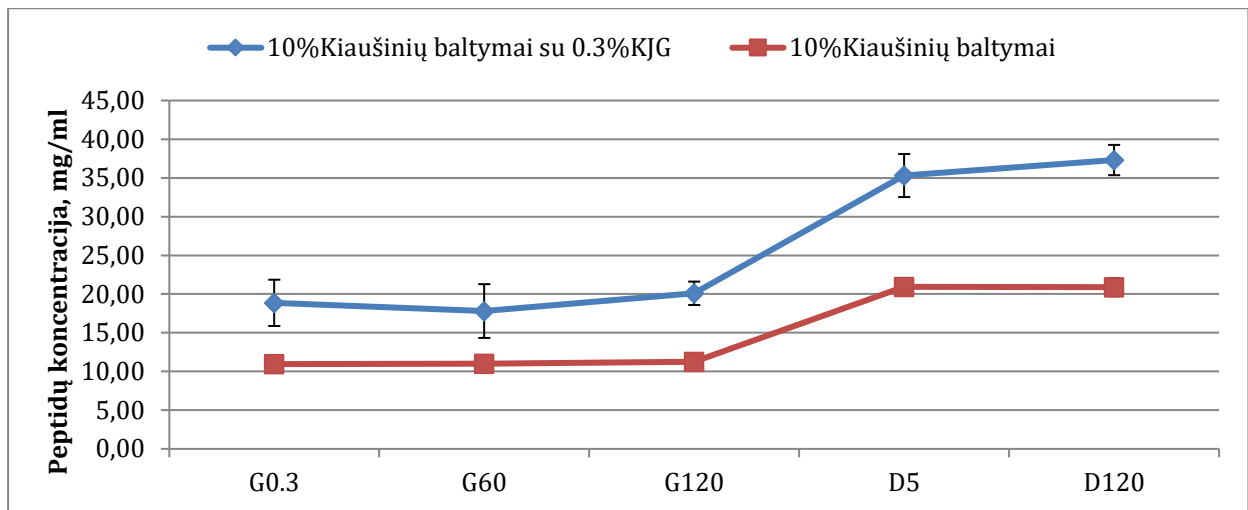


Paveikslas 32. 10% pieno baltymų su ir be *Konjac Gliukomannan* baltymų ir peptidų intensyvumas (%) pagal 2% TCA tirpių peptidų koncentraciją, skirtinguose virškinimo *in vitro* taškuose

Grafikų pavadinimai vienodi? Kuo skiriasi 31 ir 32 grafikų rodikliai – visur peptidų intensyvumas? Gal yra ir mažos molekulinės masės peptidų intensyvumas?

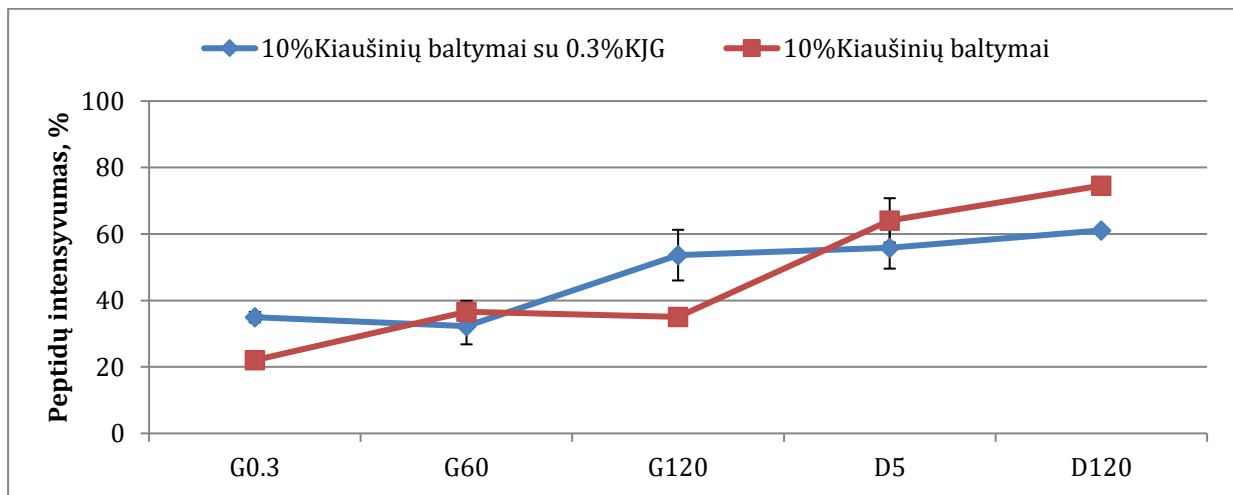
Pieno baltymų peptidų intensyvumas kiekviename virškinimo taške yra didesnis be tirštiklio. G120 taške peptidų intensyvumas analizuojamuose mėginiuose su ir be tirštiklio yra apie 25mg/ml ir nuo virškinimo žarnyne pradžios D5 iki pabaigos D120 didesnė peptidų koncentracija yra mėginiuose be polisacharido.

Taigi, pagal gautus duomenis tirštiklio įtaka sulėtina mažesnio molekulinio dydžio peptidų susidarymą pieno baltymuose, simuliuojamojo *in vitro* virškinimo metu skrandžio ir žarnyno fazėse.



Paveikslas 33. 10% kiaušinių baltymų su ir be *Konjac Gliukomannan* baltymų ir peptidų koncentracijos kitimas virškinimo metu

Kiaušinio baltymų analizuojamuose mėginiuose matoma panaši tendencija kaip ir pieno baltymų. Peptidų koncentracija su tirštikliu yra didesnė (nuo 18mg/ml iki 37 mg/ml) nei mėginiuose be tirštiklio (10mg/ml – 20mg/ml) kiekvieno virškinimo etapo metu. Skrandyje peptidų koncentracija yra nekintama ir didėja virškinimo žarnyne etape iki D120 taško (10%PB+KJG – nuo 20mg/ml iki 37mg/ml, 10%PB – 11mg/ml – 20mg/ml).

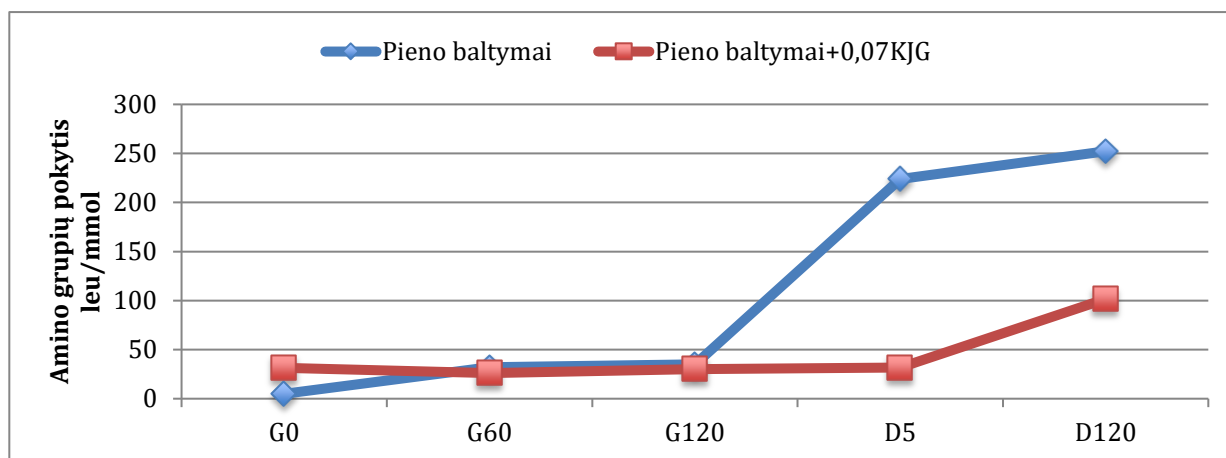


Paveikslas 34. 10% kiaušinių baltymų su ir be *Konjac Gliukomannan* baltymų ir peptidų intensyvumo kitimas virškinimo metu

Peptidų intensyvumas kiaušinių baltymuose su ir be tirštiklio analizuojamuose mėginiuose yra panašus, tačiau kiaušinių analizuojamuose baltymuose peptidų intensyvumas didesnis yra virškinimo pradžioje G0,3 – 34mg/ml, o su tirštikliu – 22,04mg/ml, taip pat G120 etape – be tirštiklio – 54mg/ml, o su tirštikliu – 35mg/ml.

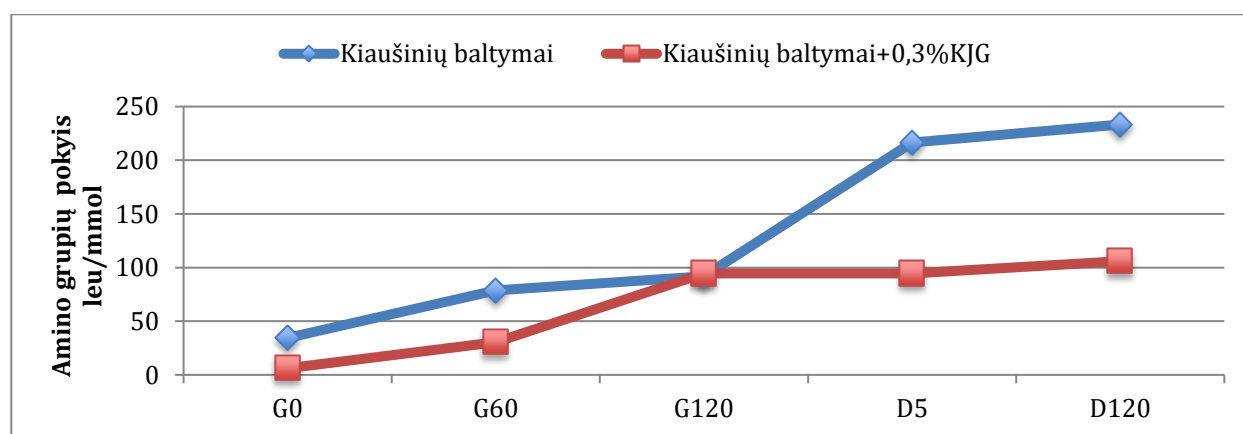
Kiaušinio ir pieno baltymams tirštiklio įtaka gali būti geresnė, atlaisvinant didesnio molekulinio dydžio peptidus ir sulėtinant mažesnių peptidų susidarymą. Tačiau Lowry metodo rezultatų iškrypimams gali turėti įtakos glikoproteinai, kurių yra pieno ir kiaušinio baltymuose pvz.: ovomucinas, ovomukoidas, imunoglobulinai [71, 99].

Amino grupių pokytis in vitro virškinimo sistemoje. Amino grupių pokytis pagal leuciną buvo atliktas fluorescemininiu metodu. Tos pačios koncentracijos analizuojamieji mėginiai su tirštinimo agentu keičia produkto tekstūrą ir maisto matricą. Fermentinė hidrolizės skirtumas, esant skirtingai maisto matricai pateikiami paveiksluose 35, 36.



Paveikslas 35. 10% pieno baltymų be ir su Konjac Gliukomannan amino grupių pokytis kiekvieno virškinimo metu skrandžio ir mažojo žarnyno fazėse.

Pagal amino grupių pokytį pieno baltymų analizuojamuose mėginiuose galima matyti, kad baltymų hidrolizė skrandžio fazėje kito nežymiai. Pieno baltymuose be tirštinimo nuo 4,46 leu/mmol G0,3 etape iki 35,08 leu/mmol G120, o su tirštinimo nuo G0,3 etapo iki G120 taško išliko pastovus 31,00 leu/mmol amino grupių pagal leuciną kiekis. Pieno baltymuose be tirštinimo amino grupių atlaisvinimas prasideda *in vitro* žarnyno fazėje ir D120 pasiekė 252,18 leu/mmol, tuo tarpu pieno baltymų su tirštinimo amino grupių pokytis pasiekė 101,01 leu/mmol. Taigi polisacharido įtaka matoma virškinimo žarnyne metu. Suformuota maisto matrica slopina fermentinę hidrolizę [57,60].

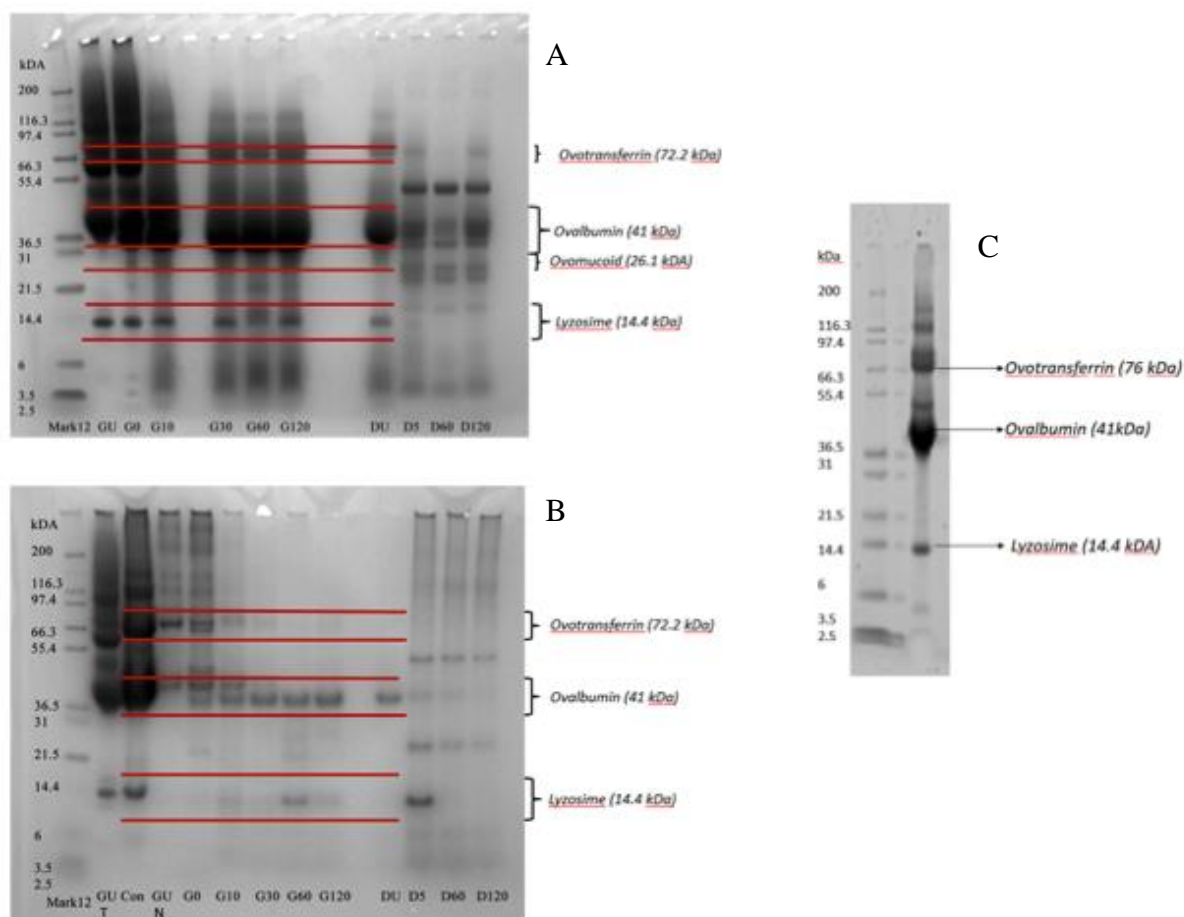


Paveikslas 36. 10% pieno baltymų be ir su Konjac Glucomannan amino grupių pokytis kiekvieno virškinimo metu skrandžio ir mažojo žarnyno fazėse.

Kiaušinių baltymų su tirštinimo amino grupių pokytis buvo mažesnis virškinimo skrandyje metu iki G120 taško, kuriame amino grupių kiekis pagal leuciną susilygino – 94,41 leu/mmol. Virškinimo žarnyne etapuose matoma ta pati tendencija kiaušinių baltymų

analizuojamųjų mėginių kaip ir su pieno baltymų analizuojamuose mėginiuose. Nuo virškinimo žarnyne pradžios (D5) kiaušinio baltymų virškinimas buvo intensyvesnis, nei fermentinės hidrolizės su polisacharidu. Kiaušinio baltymų amino gupių pokytis pagal leuciną pasiekė 233,27leu/mmol, o su tirštikliu – 105,93 leu/mmol. Tai gali būti dėl maisto matricos pokyčio, klampos įtakos ir polisacharido *Konjac Glucomannan*, kuris slopina baltymų hidrolizę [57-60].

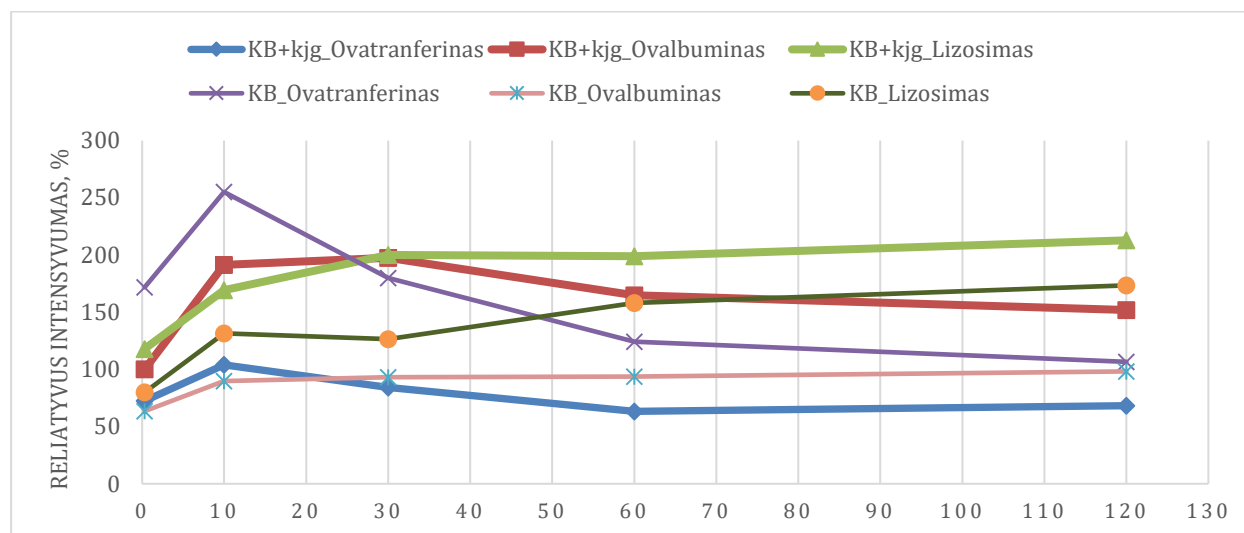
Atlaisvintų peptidų kinetika pagal elektroforezę SDS-PAGE ir densitometrijos analizę². Polisacharido *Konjac Glucomannan* įtaka fermentinei baltymų hidrolizei nustatyta kokybinė elektroforezės analizė kiekvieno virškinimo etapo metu ir įvertintas baltymų kitimas densitometrijos analize. Kontrolinis baltymų dydis pasirinktas pagal tiriamojo objekto ekstraktą. Simuliuojamojo virškinimo metu surinktos dvi frakcijos: tirpi ir netirpi. Virškinimo metu skrandžio fazėje fermentės hidrolizės sustabdymui naudojamas NaOH. Terpės pH pokytis iš 3 iki 7 pakeičia elektrolitų kiekį analizuojamuose mėginiuose. Skirtingai nei baltymų be polisacharido, simuliuojamojo *in vitro* virškinimo metu netirpi frakcija buvo matoma kiekvieno virškinimo etapo metu skrandyje ir žarnyne.



Paveikslas 37. 10% kiaušinių baltymų su 0.3% *Konjac Glucomannan* tirpios(A) ir netirpios(B) frakcijų neredukuojančiomis sąlygomis SDS-PAGE rezultatai skirtinguose *in vitro* virškinimo taškuose skrandyje (GU, G0, G10, G30,G60,G120) ir žarnyne (DU, D5, D60, D120). C- kiaušinių baltymų ekstraktas (kontrolė).

² Tyrimas atliktas Mančesterio Universitete, Jungtinė Karalystė

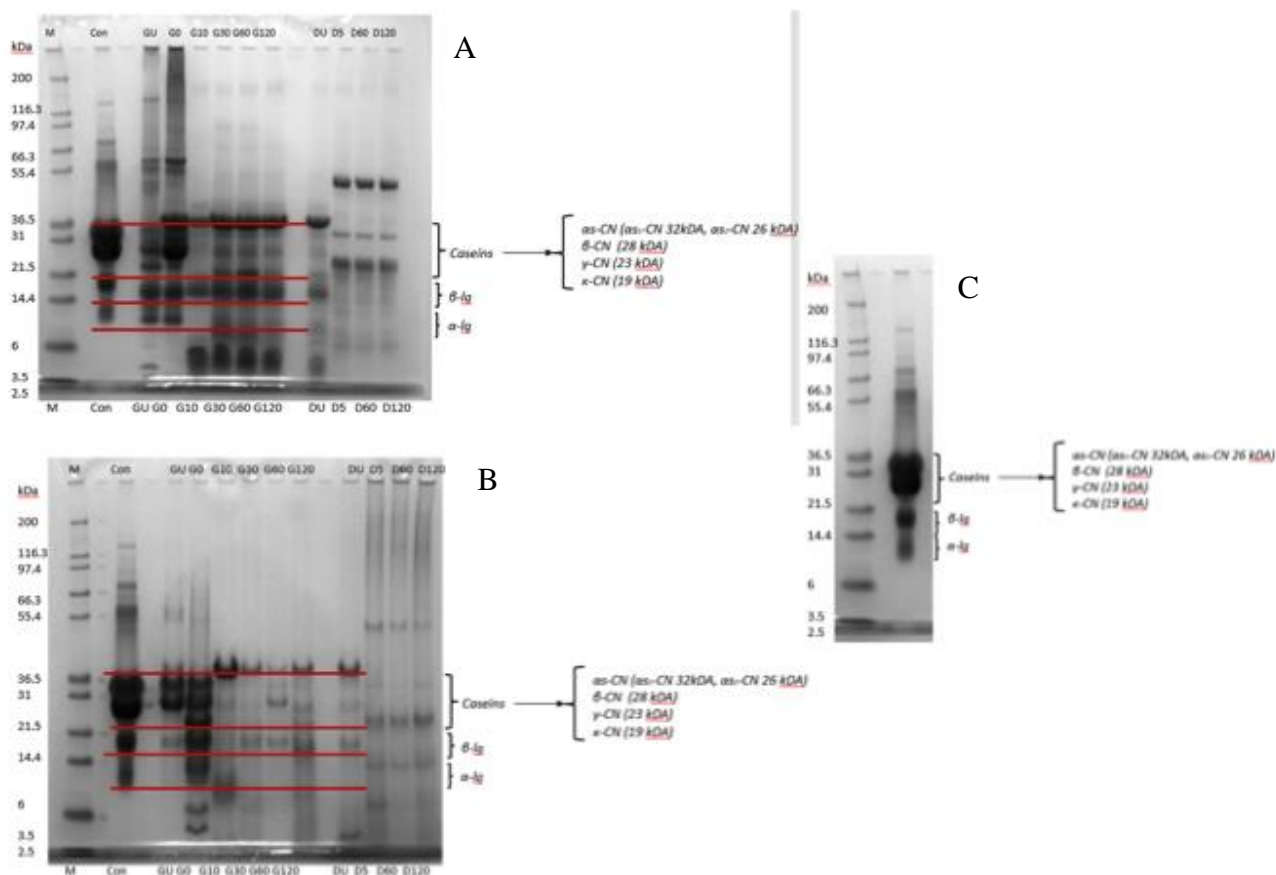
10% kiaušinių baltymų su polisacharidu yra panašus į 10% kiaušinių baltymų elektroforezės rezultatus. Ovotranferinas (72,2kDA), ovalbuminas (41kDA), ovomukoidas (26,1kDA) ir lizosimas yra atsparūs pepsino hidrolizei skrandyje ir hidrolizuojami tripsino ir chymotripsino žarnyno metu. Ovalbuminas tirpioje frakcijoje yra persidengęs su pepsinu, tačiau netirpioje frakcijoje matomas jo kitimas ir stabilumas. Literatūros šaltinių duomenimis ovalbuminas yra atsparus pepsino hidrolizei [118].



Paveikslas 38. 10% kiaušinių baltymų su 0.3% *Konjac Glucomannan* tirpios frakcijos densitometrijos analizės virškinimo metu.

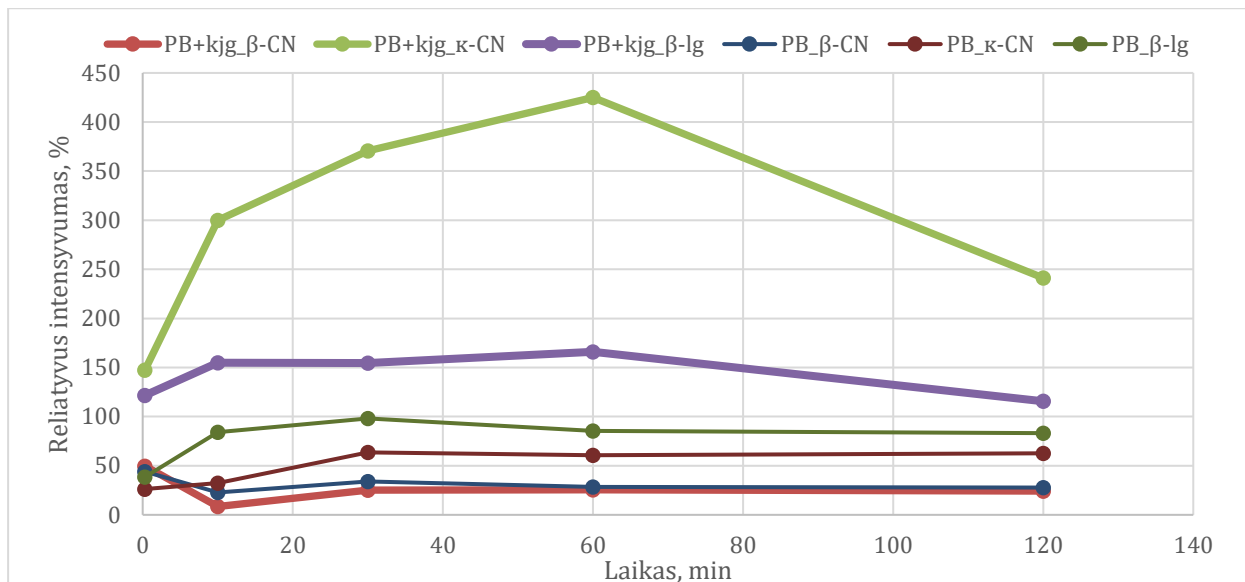
Densitometrijos analizė parodo ovotranferino, ovalbumino lizosimo kitimą virškinimo skrandyje metu. Ovotranferinas yra atpalaiduojamas (ang.k. *solubilised*) iki 10 virškinimo skrandyje minutės ir jo intensyvumas mažėja iki 60-tos virškinimo skrandyje minutės. Nuo 120 minutės ovotranferinas mėginiuose su ir be tirštiklio kinta nežymiai ir išlieka stabilus. Mėginyje su tirštikliu ovotranferino reliatyvus intensyvumas yra mažesnis, todėl jis yra hidrolizuojamas intensyviau. Ovalbuminas be tirštiklio yra atpalaiduojamas iki 10 virškinimo skrandyje minutės ir išlieka stabilus iki 120 virškinimo skrandyje minutės. Ovalbuminas mėginyje su tirštikliu atpalaiduojamas iki 30 virškinimo minutės skrandyje ir hidrolizuojamas pepsino iki 60minutės. Iki 120 minutės išlieka stabilus. Didesnis reliatyvus intensyvumas yra mėginyje su tirštikliu, tai rodo, kad tirštiklis lėtina fermentinę hidrolizę skrandyje, tačiau yra hidrolizuojamas fermento pepsino nuo 30 iki 60 minutės. Lizosimas taip pat yra atpalaiduojamas ilgiau mėginyje su tirštikliu – iki 60minutės, o mėginyje be tirštiklio iki 10minutės, sumažėja reliatyvus intensyvumas 5% iki 30-tos minutės ir padidėja 32% ties 60-ta virškinimo skrandyje minute. Iki virškinimo skrandyje pabaigos išlieka stabilus. Tuo tarpu lizosimas mėginyje su tirštikliu išlieka stabilus nuo 30-tos virškinimo minutės iki pabaigos.

Taigi mėginiuose su tirštikliu ovalbumino ir lizosimo reliatyvus intensyvumas buvo didesnis, išskyrus ovatranferiną. Fermentinė hidrolizė ovalbumino intensyvesnė su tirštikliu, tačiau gelyje jis yra persidengęs su pepsinu.



Paveikslas 39. 10% pieno baltymų su 0.07% *Konjac Glucomannan* tirpios(A) ir netirpios(B) frakcijų neredukuojančiomis sąlygomis SDS-PAGE rezultatai skirtinguose *in vitro* virškinimo taškuose skrandyje (GU, G0, G10, G30,G60,G120) ir žarnyne (DU, D5, D60, D120). C- kiaušinių baltymų ekstraktas (kontrolė).

Pieno baltymų su *Konjac Glucomannan* gelyje (žr. Paveikslas 39) yra matomas kazeinų – α , β ir κ stabilumas virškinimo skrandyje metu. Tačiau jų fragmentų intensyvumas kiekvieno virškinimo etapo metu palyginti kontroliniu, GU ir G0.3 etapais mažėja, tai rodo jų peptidų atpalaidavimą. Taip pat išlieka β - laktoglobulino stabilumas virškinimo skrandyje metu. Literatūros šaltinių duomenimis, β -Lg yra aukštos maistinės vertės ir yra stabilus esant žemam pH. Taip pat yra labai atsparus proteolitiniam skilimui skrandžio fazėje ir gali pasižymėti enkapsuliacijos savybėmis [119].



Paveikslas 40. 10% pieno baltymų su 0.07% *Konjac Glucomannan* tirpios frakcijos densitometrijos analizės virškinimo metu.

Pieno baltymuose realiatyvus intensyvumas didesnis yra β -Ig, κ -kazeino mėginiuose su tirštikliu. β -kazeino skirtumas yra nežymus. K-kazeinas mėginyje su tirštikliu yra atpalaiduojamas iki 60 minutės ir hidrolizuojamas iki virškinimo skrandyje pabaigos. Tuo tarpu κ -kazeino mėginyje be tirštiklio atpalaidavimas yra iki 30-tos virškinimo minutės skrandyje ir išlieka stabilus iki virškinimo skrandyje pabaigos. Ta pati tendencija matoma ir β -Ilg mėginyje be tirštiklio.

Iš elektroforezės ir densitometrijos analizės pieno ir kiaušinių baltymų analizuojamųjų mėginių galima pamatyti, kad β -Ilg, κ -kazeinas yra didesnio realiatyvaus intensyvumo. Tačiau, ar *Konjac Glucomannan* lėtina virškinimą skrandžio fazėje, sunku pasakyti.

5. Išvados

1. Įvertinus tiriamų žirnių, pieno ir kiaušinių baltymų funkcines savybes nustatyta, kad rūgštinėje terpėje pH=3 mažiausias baltymų tirpumas 6 % buvo žirnių baltymų, pieno baltymų - 54%, o kiaušinių baltymų tirpumas - 62%. Neutralioje terpėje pH=7 žirnių baltymų tirpumas išliko mažiausias - 60%, pieno baltymų – 70%, o kiaušinių baltymų - 83%.
2. Atlikti reologiniai analizuojamųjų mėginių matavimai parodė, kad 10% skirtingos kilmės vandeninių tirpalų klampa yra skirtinga: mažiausia klampa nustatyta kiaušinių baltymų (KB) tirpalo - $0,009 \pm 0,006$ Pa·s; pieno baltymų (PB) - $0,31 \pm 0,03$ Pa·s; žirnių baltymų (ŽB) – $1,42 \pm 0,012$ Pa·s. Padidinus baltymų koncentraciją iki 15% baltymų vandeniniai tirpalai sutirštėjo skirtingai: PB klampa padidėjo iki $2,311 \pm 0,02$ Pa·s; labai ženkliai padidėjo ŽB klampa iki $7,640 \pm 0,073$ Pa·s, o kiaušinių baltymų tirpalo klampa išliko nepakitusi $0,010 \pm 0,004$ Pa·s. Nustatyta, kad nedideli polisacharido gliukomanano priedai tirština baltymų vandeninius tirpalus. Įdėjus į 10% PB vandeninį tirpalą 0,07 % polisacharido gliukomanano priedą tirpalo klampa nustatyta $0,687 \pm 0,03$ Pa·s; o į 10% KB vandeninį tirpalą 0,3% polisacharido tirpalo klampa $0,101 \pm 0,002$ Pa·s.
3. Atlikus skirtingos kilmės baltymų hidrolizę virškinimo *in vitro* skrandžio (G) ir žarnyno (D) fazių modelyje pagal COST INFOGEST patvirtintą protokolą, tirpioje virškinimo sulčių frakcijoje nustatyta skirtinga tirtų baltymų hidrolizės produktų susidarymo dinamika:
 - 3.1. Atlaisvinto azoto pirmomis skrandžio fazės minutėmis (G0.3), skrandžio fazės pabaigoje (G120) ir žarnyno fazės pabaigoje (D120) virškinant 10 % kiaušinių baltymus nustatyta 18%, 20% ir 48%, atitinkamai; 10 % pieno baltymus 14%, 36% ir 55%, atitinkamai; žirnių baltymus (ŽB) - 3%, 28% ir 42%, atitinkamai.
 - 3.2. 2% TCA tirpių mažos molekulinės masės di-, tripeptidų pirmomis skrandžio fazės minutėmis (G0.3) virškinant 10 % baltymų tirpalus nustatyta ŽB - 26,1%; KB – 93,6 %; PB - 97,9%.
 - 3.3. Peptidų koncentracija skrandžio fazės pirmomis minutėmis (G0.3), skrandžio fazės pabaigoje (G120) ir žarnyno fazės pabaigoje (D120) virškinant 10% žirnių baltymus 4mg/ml, 14 mg/ml ir 32mg/ml, atitinkamai; 10% pieno baltymus 4mg/ml, 12mg/ml, ir 26mg/ml, atitinkamai; 10% kiaušinių baltymus G0.3- 12mg/ml, o D120 - 20mg/ml.

- 3.4. Amino grupių pagal leucino ekvivalentą (Leu eq) pokytis pirmomis skrandžio fazės minutėmis (G0.3) ir žarnyno fazės pabaigoje (D120) virškinant 10 % baltymų tirpalus nustatytas ŽB - 30,92 Leu eq/mmol ir 448,84 Leu eq/mmol; PB - 4,96 Leu eq/mmol ir 252,18 Leu eq/mmol, o KB - 34,44 Leu eq/mmol ir 252,18 Leu eq/mmol.
- 3.5. Elektroforezės ir densitometrijos analizė parodė, kad kiaušinių baltymuose ovalbuminas, ovatransferinas ir lizosimas, pieno baltymuose – β – lg, žirnių baltymuose leguminas ir konvicilino subvientas yra atsparūs pepsino hidrolizei skrandžio fazėje, bet yra hidrolizuojami žarnyno fazėje veikiant fermentams tripsinui ir chymotripsinui.
- 3.6. Atlikus 10% ir 15% koncentracijos žirnių, pieno ir kiaušinių baltymų vandeninių tirpalų hidrolizę nustatyta, kad substrato koncentracija turi įtakos fermentų aktyvumui ir hidrolizės produktų susidarymui, išliekant tai pačiai produktų susidarymo kinetikai. 10% baltymų vandeninio tirpalo sutirštinimas polisacharidu gliukomananu hidrolizės produktų dinamiką mažina di-, tripeptidų susidarymą tirpioje virškinimo sulčių frakcijoje.

6. Literatūros šaltiniai

1. PAIK, N., et al. *Categorization of Dysphagia Diets with the Line Spread test*11No Commercial Party having a Direct Financial Interest in the Results of the Research Supporting this Article has Or Will Confer a Benefit on the Author(s) Or on any Organization with which the Author(s) is/are Associated. , May 2004, ISBN 0003-9993. DOI <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2003.08.079>.
2. National Dysphagia Diet Task Force. and American Dietetic Association. *National Dysphagia Diet Task Force.; American Dietetic Association*. American Dietetic Association, ©2002., 2002 ISBN 0880913150 9780880913157.
3. LIESHOUT Van, Pascal H. H. M., Goff, Douglas H. The Rheology of Liquids: A Comparison of Cliniciansâ€™ Subjective Impressions and Objective Measurement. *Dysphagia*, 2003, vol. 18, no. 3. pp. 182-195.
4. EGGER, L., et al. *Digestion of Milk Proteins: Comparing Static and Dynamic in Vitro Digestion Systems with in Vivo Data*. , Available online 18 December 2017, ISBN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.049>.
5. Protein, Population, Politics. how Protein can be Supplied Sustainably in the 21st Century. Edited by Hubert Wennemer, Gerhard Flachowsky and Volker Hoffmann. Degussa AG, German Federal Agriculture Research Center (FAL), Council for Tropical and Subtropical Agriculture (ATSAF). Published in 2006, 160 Pp. *Animal Genetic Resources/Ressources Génétiques Animales/Recursos Genéticos Animales*, 2011/06/01, 2011, vol. 48 [viewed 2018/05/08]. pp. 126-126. Cambridge Core. ISSN 2078-6336. DOI 10.1017/S2078633611000208.
6. HENLEY, E.C., TAYLOR, J.R.N. and OBUKOSIA, S.D. *Chapter 2 - the Importance of Dietary Protein in Human Health: Combating Protein Deficiency in Sub-Saharan Africa through Transgenic Biofortified Sorghum*. TAYLOR, Steve L. ed., Academic Press, 2010, ISBN 1043-4526. DOI [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(10\)60002-2](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(10)60002-2).
7. TORUN B., C.F. Modern Nutrition in Health and disease M.E. Shils, J.A. Olson, M. Shike ed., 8th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994 *Protein-Energy Malnutrition*, pp. 950-976.
8. HOFFER L. John . Article Navigation Protein and Energy Provision in Critical Illness. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2003, vol. 78, no. 5. pp. 906-911.
9. TAVANO, O.L. *Protein Hydrolysis using Proteases: An Important Tool for Food Biotechnology*. , June 2013, 2013 ISBN 1381-1177. DOI <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>.
10. MINEKUS. M., M. Alminger, P. Alvito, et.al. *A Standardised Static in Vitro digestion Method Suitable for Food – an International Consensus*. *Food and Function*, 2014, vol. 5. pp. 1113-1124.
11. CHABANCE, B., et al. *Casein Peptide Release and Passage to the Blood in Humans during Digestion of Milk Or Yogurt*. , February 1998, ISBN 0300-9084. DOI [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(98\)80022-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(98)80022-9).

12. KARKLE, E.L., KELLER, L., DOGAN, H. and ALAVI, S. *Matrix Transformation in Fiber-Added Extruded Products: Impact of Different Hydration Regimens on Texture, Microstructure and Digestibility.* , January 2012, ISBN 0260-8774. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.020>.
13. ADELEYE, B. and RACHAL, C. *Comparison of the Rheological Properties of Ready-to-Serve and Powdered Instant Food-Thickened Beverages at Different Temperatures for Dysphagic Patients.* , July 2007, ISBN 0002-8223. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jada.2007.04.011>.
14. Mei T., et al. Synergistic Interaction of Konjac Glucomannan and Gellan Gum Investigated by Rheology and Texture Analysis. *Journal of Applied Polymer Science*, 07/15; 2018/05, 2012, vol. 125, no. 2. pp. 1363-1370 ISSN 0021-8995.
15. HERRANZ, B., et al. *Thermostability Analyses of Glucomannan Gels. Concentration Influence.* , October 2012, ISBN 0268-005X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.011>.
16. BRENNER, T., et al. *Rheology and Synergy of K-Carrageenan/Locust Bean Gum/Konjac Glucomannan Gels.* , 15 October 2013, ISBN 0144-8617. DOI <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.020>.
17. AL-GHAZZEWI, F., ELAMIR, A., TESTER, R. and ELZAGOZE, A. *Effect of Depolymerised Konjac Glucomannan on Wound Healing.* , April 2015, ISBN 2212-6198. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2015.03.003>.
18. ZHANG, C., CHEN, J. and YANG, F. *Konjac Glucomannan, a Promising Polysaccharide for OCDDS.* , 15 April 2014, ISBN 0144-8617. DOI <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.081>.
19. SHAH, B.R., et al. *Health Benefits of Konjac Glucomannan with Special Focus on Diabetes.* , April 2015, ISBN 2212-6198. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2015.03.007>.
20. VUKSAN V1, Sievenpiper JL, Owen R, Swilley JA, Spadafora P, Jenkins DJ, Vidgen E, Brighenti F, Josse RG, Leiter LA, Xu Z, Novokmet R. *Beneficial Effects of Viscous Dietary Fiber from Konjac-Mannan in Subjects with the Insulin Resistance Syndrome: Results of a Controlled Metabolic Trial.* *Diabetes Care.*, 2000, vol. 23. pp. 9-14 ISSN 01495992.
21. ADEBIYI, A.P. and ALUKO, R.E. *Functional Properties of Protein Fractions obtained from Commercial Yellow Field Pea (Pisum Sativum L.) Seed Protein Isolate.* , 15 October 2011, ISBN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.116>.
22. LUO, Y., TENG, Z., WANG, X. and WANG, Q. *Development of Carboxymethyl Chitosan Hydrogel Beads in Alcohol-Aqueous Binary Solvent for Nutrient Delivery Applications.* , June 2013, ISBN 0268-005X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.011>.
23. DONATO-CAPEL, L., et al. *Food Structures, Digestion and Health M. BOLAND, et al ed., San Diego: Academic Press, 2014 Chapter 14 - Technological Means to Modulate Food Digestion and Physiological Response*, pp. 389-422 ISBN 9780124046108.
24. NICOLETTI, M. *Nutraceuticals and Botanicals: Overview and Perspectives.* *International Journal of Food Science and Nutrition*, 2012, vol. 63.

25. DUPONT, D. and TOME, D. Milk Proteins (Second edition) H. SINGH, et al ed., San Diego: Academic Press, 2014 *Chapter 20 - Milk Proteins: Digestion and Absorption in the Gastrointestinal Tract*, pp. 557-569 ISBN 9780124051713.
26. BARAC Mirosljub B., Pešić Mirjana B., Stanojević Slađana P., Kostić Aleksandar Ž., Čabrilo Slavica B. *Techno-Functional Properties of Pea (Pisum Sativum) Protein Isolates: A Review. Acta Periodica Technologica*, 2015, vol. 46. pp. 1-18.
27. WANG, J., CHI, Y., CHENG, Y. and ZHAO, Y. *Physicochemical Properties, in Vitro Digestibility and Antioxidant Activity of Dry-Heated Egg White Protein.* , 25 April 2018, ISBN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.128>.
28. JE., K. *Milk Proteins: Physicochemical and Functional Properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1998, vol. 21.
29. ARNTFIELD, S.D. and MASKUS, H.D. Handbook of Food Proteins G.O. PHILLIPS, , and P.A. WILLIAMS eds., Woodhead Publishing, 2011 9 - *Peas and Other Legume Proteins*, pp. 233-266 ISBN 9781845697587.
30. BELITZ H.-D., W.Grosch, and P.Schieberl. *Food Chemistry* 4th ed. , 2009 *Amino Acids, Peptides, Proteins*.
31. AKIN, Z. and OZCAN, T. *Functional Properties of Fermented Milk Produced with Plant Proteins.* , December 2017, 2017 ISBN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.025>.
32. KARACA, A.C., LOW, N. and NICKERSON, M. *Emulsifying Properties of Chickpea, Faba Bean, Lentil and Pea Proteins Produced by Isoelectric Precipitation and Salt Extraction.* , November 2011, ISBN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>.
33. BOYE, J., ZARE, F. and PLETCH, A. *Pulse Proteins: Processing, Characterization, Functional Properties and Applications in Food and Feed.* , March 2010, ISBN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>.
34. LIU, S., ELMER, C., LOW, N.H. and NICKERSON, M.T. *Effect of pH on the Functional Behaviour of Pea Protein Isolate–gum Arabic Complexes.* , March 2010, ISBN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.022>.
35. PARK, S.J., KIM, T.W. and Baik Byung-Kee. Relationship between Proportion and Composition of Albumins, and in Vitro Protein Digestibility of Raw and Cooked Pea Seeds (*Pisum Sativum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 08/15; 2018/05, 2010, vol. 90, no. 10. pp. 1719-1725 ISSN 0022-5142.
36. SCHAAFSMA, G. Advantages and Limitations of the Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) as a Method for Evaluating Protein Quality in Human Diets. *British Journal of Nutrition*, 2012/08/01, 2012, vol. 108, no. S2 [viewed 2018/05/21]. pp. S333-S336. Cambridge Core. ISSN 0007-1145. DOI 10.1017/S0007114512002541.
37. MOUGHAN Paul J , Sarwar Gilani , Shane M Rutherford and Daniel Tomé. True Ileal Amino Acid Digestibility Coefficients for Application in the Calculation of Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) in Human Nutrition. *Report of a Sub-Committee of the 2011 FAO Consultation on “Protein Quality Evaluation in Human Nutrition”*, 2011.

38. BOIRIE Y., Dangin M., Gachon P, Vasson MP et. al. *Slow and Fast Dietary Proteins Differently Modulate Postprandial Protein Accretion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, vol. 94.
39. DANGIN, M., et al. The Digestion Rate of Protein is an Independent Regulating Factor of Postprandial Protein Retention. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 02/01; 2018/05, 2001, vol. 280, no. 2. pp. E340-E348 ISSN 0193-1849.
40. WOODWARD AD, Nielsen BD, Liesman J, Lavin T, Trottier NL. *Protein Quality and Utilization of Timothy, Oat-Supplemented Timothy, and Alfalfa at Differing Harvest Maturities in Exercised Arabian Horses. Journal of Animal Science*, 2011, vol. 89. pp. 4081-4092.
41. WATFORD M. Proteins. *Advances in Nutrition*, 2011, vol. 2. pp. 62-63 ISSN 2156-5376.
42. EL-GHARBAWY, A. and VOCKLEY, J. *Cardioskeletal Myopathies in Children and Young Adults* J.L. JEFFERIES, B.C. BLAXALL, J. ROBBINS and J.A. TOWBIN eds., Boston: Academic Press, 2017 *Chapter 14 - Nonmitochondrial Metabolic Cardioskeletal Myopathies*, pp. 265-303 ISBN 9780128000403.
43. HOSSAIN, M.A., ALMATAR, S.M. and JAMES, C.M. Whole Body and Egg Amino Acid Composition of Silver Pomfret, *Pampus Argenteus* (Euphrasen, 1788) and Prediction of Dietary Requirements for Essential Amino Acids. *Journal of Applied Ichthyology*, 08/01; 2018/05, 2011, vol. 27, no. 4. pp. 1067-1071 ISSN 0175-8659.
44. CSAPO J., Sz Salamon, K. Loki et.al. *Composition of Mare's Colostrum and Milk II. Protein Content, Amino Acid Composition and Contents of Macro- and Micro-Elements. . Alimentaria, Sapientia–Hungarian University of Transylvania*, 2009, vol. 2. pp. 133-148.
45. PASTOR-CAVADA, E., et al. *Protein and Amino Acid Composition of Select Wild Legume Species of Tribe Fabae. , 15 November 2014, ISBN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.078>.*
46. NATHALIE TROTTIER, R.W. *Applied Food Protein Chemistry*. Zeynep Ustonol. ed., , 2015 *8- Nutritional Aspects of Proteins. .*
47. EVENEPOEL P, Geypens B, Luypaerts A, Hiele M, Ghoois Y, Rutgeerts P. *Digestibility of Cooked and Raw Egg Protein in Humans as Assessed by Stable Isotope Techniques. Journal of Nutrition*, 1998, vol. 128, no. 10. pp. 1716-1722.
48. MAJUMDER K. and JianPing, Wu. *A New Approach for Identification of Novel Antihypertensive Peptides from Egg Proteins by QSAR and Bioinformatics. Food Research Internatonal*, 2010, vol. 45 ISSN 0963-9969.
49. VERMEIRSSSEN, V., VAN CAMP, J. and VERSTRAETE, W. *Optimisation and Validation of an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Assay for the Screening of Bioactive Peptides. , 4 March 2002, ISBN 0165-022X. DOI [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00006-4).*
50. LENTLE RG, J.P. *Manipulating Digestion with Foods Designed to Change the Physical Characteristics of Digesta. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2010, vol. 50. pp. 135-145.

51. NORTON I., Moore S. and Fryer P. Understanding Food Structuring and Breakdown: Engineering Approaches to Obesity. *Obesity Reviews*, 03/01; 2018/05, 2007, vol. 8. pp. 83-88 ISSN 1467-7881.
52. FITZGERALD RICHARD, J. and MURRAY BRIAN, A. Bioactive Peptides and Lactic Fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 05/01; 2018/05, 2006, vol. 59, no. 2. pp. 118-125 ISSN 1364-727X.
53. HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., et al. *Dairy Protein Hydrolysates: Peptides for Health Benefits.* , October 2014, ISBN 0958-6946. DOI <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.11.004>.
54. SIRTORI, C.R., GALLI, C., ANDERSON, J.W. and ARNOLDI, A. *Nutritional and Nutraceutical Approaches to Dyslipidemia and Atherosclerosis Prevention: Focus on Dietary Proteins.* , March 2009, ISBN 0021-9150. DOI <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.019>.
55. SAITO T., *Antihypertensive Peptides Derived from Bovine Casein and Whey Proteins. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, vol. 606. pp. 295-317.
56. TREMBLAY F., Lavigne C et.al. *Role of Dietary Proteins and Amino Acids in the Pathogenesis of Insulin Resistanc.* *Annual Review of Nutrition*, 2007, vol. 27. pp. 293-310.
57. SANCHÓN, J., et al. *Protein Degradation and Peptide Release from Milk Proteins in Human Jejunum. Comparison with in Vitro Gastrointestinal Simulation.* , 15 January 2018, ISBN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.134>.
58. PICARIELLO, G., et al. *Protein Digestomics: Integrated Platforms to Study Food-Protein Digestion and Derived Functional and Active Peptides.* , December 2013, 2013 ISBN 0165-9936. DOI <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.08.001>.
59. DICKINSON, E. Food Structures, Digestion and Health M. BOLAND, et al ed., San Diego: Academic Press, 2014 *Chapter 1 - Understanding Food Structures: The Colloid Science Approach*, pp. 3-49 ISBN 9780124046108.
60. CONTRERAS, M.d.M., et al. *Novel Casein-Derived Peptides with Antihypertensive Activity.* , October 2009, ISBN 0958-6946. DOI <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.05.004>.
61. MARTÍNEZ-MAQUEDA, D., MIRALLES, B., CRUZ-HUERTA, E. and RECIO, I. *Casein Hydrolysate and Derived Peptides Stimulate Mucin Secretion and Gene Expression in Human Intestinal Cells.* , September 2013, ISBN 0958-6946. DOI <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.03.010>.
62. FERNÁNDEZ-TOMÉ, S., et al. *Novel Peptides Derived from As1-Casein with Opioid Activity and Mucin Stimulatory Effect on HT29-MTX Cells.* , August 2016, ISBN 1756-4646. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.023>.
63. WAKASA Y., Tamakoshi C, Ohno T, Hirose S, Goto T, Nagaoka S, Takaiwa F. *the Hypocholesterolemic Activity of Transgenic Rice Seed Accumulating Lactostatin, a Bioactive Peptide Derived from Bovine Milk B-Lactoglobulin.* *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2011, vol. 59, no. 8. pp. 3845-3850.

64. SILVEIRA, S.T., MARTÍNEZ-MAQUEDA, D., RECIO, I. and HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. *Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Peptides Generated by Tryptic Hydrolysis of a Whey Protein Concentrate Rich in B-Lactoglobulin.* , 15 November 2013, ISBN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.056>.
65. NGUYEN, G.T., GIDLEY, M.J. and SOPADE, P.A. *Dependence of in-Vitro Starch and Protein Digestions on Particle Size of Field Peas (Pisum Sativum L.).* , September 2015, ISBN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.037>.
66. YOU, S., UDENIGWE, C.C., ALUKO, R.E. and WU, J. *Multifunctional Peptides from Egg White Lysozyme.* , April 2010, ISBN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.12.004>.
67. SMITH, C.E., MOLLARD, R.C., LUHOVYY, B.L. and ANDERSON, G.H. *The Effect of Yellow Pea Protein and Fibre on Short-Term Food Intake, Subjective Appetite and Glycaemic Response in Healthy Young Men. British Journal of Nutrition*, 2012/08/23, 2012, vol. 108, no. S1 [viewed 2018/05/08]. pp. S74-S80. Cambridge Core. ISSN 0007-1145. DOI 10.1017/S0007114512000700.
68. MINE Yoshinori, Eunice Li-Chan, Bo Jiang. *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals.* Wiley Blackwell, 2010 ISBN ISBN: 978-0-813-81311-0.
69. NEHA G., Nidhi Srivastava, Sameer S. Bhagyawant. *Vicilin—A Major Storage Protein of Mungbean Exhibits Antioxidative Potential, Antiproliferative Effects and ACE Inhibitory Activity. Plos One*, 2018.
70. PELLEGRINI, A., et al. Identification and Isolation of a Bactericidal Domain in Chicken Egg White Lysozyme. *Journal of Applied Microbiology*, 03/01; 2018/05, 1997, vol. 82, no. 3. pp. 372-378 ISSN 1364-5072.
71. MINE, Y. and KOVACS-NOLAN, J. New Insights in Biologically Active Proteins and Peptides Derived from Hen Egg. *World's Poultry Science Journal*, 2007/09/01, 2006, vol. 62, no. 1 [viewed 2018/05/08]. pp. 87-96. Cambridge Core. ISSN 0043-9339. DOI 10.1079/WPS200586.
72. HE Xianghui, Tom C Tsang, Phoebe Luo, Tong Zhang & David T Harris. s.l. *Enhanced Tumor Immunogenicity through Coupling Cytokine Expression with Antigen Presentation. Nature Cancer Gene Therapy*, 2003, vol. 10.
73. FUJITA H1, Sasaki R, Yoshikawa M. *Potential of the Antihypertensive Activity of Orally Administered Ovokinin, a Vasorelaxing Peptide Derived from Ovalbumin, by Emulsification in Egg Phosphatidylcholine. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1995, vol. 59, no. 12. pp. 2334-2335.
74. MATOBA N, Usui H, Fujita H, Yoshikawa M. *A Novel Anti-Hypertensive Peptide Derived from Ovalbumin Induces Nitric Oxide-Mediated Vasorelaxation in an Isolated SHR Mesenteric Artery. FEBS Letters*, 1999, vol. 452 PMID: 10386586.
75. IWANIAK A, Darewicz M, Minkiewicz P, Protasiewicz M, Borawska J. *Biologically Active Peptides Derived from Food Proteins as the Food Components with Cardioprotective Properties]. Pol Merkur Lekarsk*, 2014, vol. 36 PMID: 25095642.

76. A. DAVALOS, M. MIGUEL, B. BARTOLOME', AND R. LO' PEZ-FANDIN~ O*. Antioxidant Activity of Peptides Derived from Egg White Proteins by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 2004, vol. 69, no. 7. pp. 1939–1944.
77. UTRE Claire I., Stefano Sforza, Harry Gruppen, Peter A. Wierenga. *Introducing Enzyme Selectivity: A Quantitative Parameter. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, vol. 406, no. 24. pp. 5827-5841.
78. CLEMENTE, A. *Enzymatic Protein Hydrolysates in Human Nutrition.* , July 2000, ISBN 0924-2244. DOI [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00007-3).
79. Jesper V. Olsen, Shao-En Ong and Matthias Mann‡. *Trypsin Cleaves Exclusively C-Terminal to Arginine and Lysine Residues. Biopolymers*, 2000, vol. 54. pp. 355-364.
80. VOROB'EV, M.M., Dalgarrondo Michèle, Chobert Jean-Marc and Haertlé Thomas. Kinetics of B-casein Hydrolysis by Wild-type and Engineered Trypsin. *Biopolymers*, 10/15; 2018/05, 2000, vol. 54, no. 5. pp. 355-364 ISSN 0006-3525.
81. PHANINDRA K., Yishen Zhu, Gerard O'Cuinn, and Richard J. FitzGerald*. *Investigation of the Substrate Specificity of Glutamyl Endopeptidase using Purified Bovine B-Casein and Synthetic Peptides. J. Agric. Food Chem.*, 2013, vol. 61, no. 13. pp. 3193–3204.
82. CREAMER, L.K., et al. *Effect of Genetic Variation on the Tryptic Hydrolysis of Bovine B-Lactoglobulin A, B, and C.* , December 2004, ISBN 0022-0302. DOI [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73543-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73543-2).
83. O'LOUGHLIN IB, Murray BA, Kelly PM, FitzGerald RJ, Brodtkorb A. *Enzymatic Hydrolysis of Heat-Induced Aggregates of Whey. Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2012, vol. 60, no. 19. pp. 4895-4904.
84. VERHOECKX K, Paul Cotter et. al. *the Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models.* Springer, 2015 ISBN ISBN:978-3-319-15791-7.
85. EFSA. *Panel on Genetically Modified Organisms. Scientific Opinion on the Assessment of Allergenicity of GM Plants and Microorganisms and Derived Food and Feed.* . *EFSA Journal*, 2010, vol. 8. pp. 1700.
86. FOSTER, E.S., KIMBER, I. and DEARMAN, R.J. *Relationship between Protein Digestibility and Allergenicity: Comparisons of Pepsin and Cathepsin.* , 5 July 2013, 2 ISBN 0300-483X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.04.011>.
87. MANDALARI, G., et al. *In Vitro Digestibility of B-Casein and B-Lactoglobulin Under Simulated Human Gastric and Duodenal Conditions: A Multi-Laboratory Evaluation.* , December 2009, ISBN 0273-2300. DOI <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.08.010>.
88. WANG. R. , Thomas C. Edrington, S. Bradley Storrs, Kathleen S. Crowley, Jason M. Ward, Thomas C. Lee, Zi L. Liu, Bin Li, Kevin C. Glenn. *Analyzing Pepsin Degradation Assay Conditions used for Allergenicity Assessments to Ensure that Pepsin Susceptible and Pepsin Resistant Dietary Proteins are Distinguishable. PLoS One*, 2017, vol. 12.
89. ATONOV VK, Rumsh LD, Tikhodeeva AG. Kinetics of Pepsin-Catalysed Transpeptidation: Evidence for the 'amino-Enzyme' Intermediate. *FEBS Lett*, 1974, vol. 46, no. 1. pp. 29-33.

90. LIANG, H. and TANG, C. *pH-Dependent Emulsifying Properties of Pea [Pisum Sativum (L.)] Proteins.* , December 2013, 2013 ISBN 0268-005X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.005>.
91. SCHMIDT, D.G., MEIJER, R.J.G.M., SLANGEN, C.J. and BERESTEIJN, E.C.H. Raising the pH of the Pepsin-catalysed Hydrolysis of Bovine Whey Proteins Increases the Antigenicity of the Hydrolysates. *Clinical & Experimental Allergy*, 10/01; 2018/05, 1995, vol. 25, no. 10. pp. 1007-1017 ISSN 0954-7894.
92. LANG, G., KAGIYA, Y. and KITTA, K. *Multiplex Comparison of the Digestibility of Allergenic and Non-Allergenic Proteins in Rice Grains by in Vitro Digestion.* , 1 February 2015, ISBN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.089>.
93. CHATTOPADHYAY K, M.S. *Structural and Conformational Stability of Horseradish Peroxidase: Effect of Temperature and pH.* *Biochemistry*, 2000, vol. 39, no. 1. pp. 263-270.
94. MCCONNELL, E.L., FADDA, H.M. and BASIT, A.W. *Gut Instincts: Explorations in Intestinal Physiology and Drug Delivery.* , 8 December 2008, 2008 ISBN 0378-5173. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.05.012>.
95. CHEN, E.P., Mahar Doan, K.M., Portelli, S. et al. *Gastric pH and Gastric Residence Time in Fasted and Fed Conscious Cynomolgus Monkeys using the Bravo® pH System.* *Pharm Res*, 2008, vol. 25, no. 1. pp. 123-134.
96. ZHANG, S. and VARDHANABHUTI, B. *Effect of Initial Protein Concentration and pH on in Vitro Gastric Digestion of Heated Whey Proteins.* , 15 February 2014, ISBN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.076>.
97. Rowan A.M., Moughan PJ, Wilson MN, Maher K, Tasman-Jones C. *Comparison of the Ileal and Faecal Digestibility of Dietary Amino Acids in Adult Humans and Evaluation of the Pig as a Model Animal for Digestion Studies in Man.* *British Journal of Nutrition*, 1994, vol. 71. pp. 29-42.
98. LIU, J., et al. *Influence of Konjac Glucomannan on Gelling Properties and Water State in Egg White Protein Gel.* , May 2013, ISBN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.002>.
99. LOWRY O. H., Rosebrough N J, Farr A.L, Randall R.L. 1. *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.* . *Journal of Biology and Science*, 1951, vol. 191.
100. FERNÁNDEZ, A. and KELLY, P. *pH-Stat Vs. Free-Fall pH Techniques in the Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins.* , 15 May 2016, 2016 Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615303216> ISBN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.043>.
101. WANG, X., TANG, C., YANG, X. and GAO, W. *Characterization, Amino Acid Composition and in Vitro Digestibility of Hemp (Cannabis Sativa L.) Proteins.* , 1 March 2008, ISBN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.064>.
102. MIREILLE, Y., CLAIRE, C. and PÉLISSIER JEAN-PIERRE. Solubility of Peptides in Trichloroacetic Acid (TCA) Solutions Hypothesis on the Precipitation Mechanism. *International*

Journal of Peptide and Protein Research, 09/01; 2018/05, 1989, vol. 34, no. 3. pp. 166-176
ISSN 0367-8377.

103. SEDEF N. E.,*a Sibel Karakaya,a Sebnem Simsek,a Didier Dupont,b Esra Menfaatlic and Alper Tolga Ekera. *in Vitro* digestibility of Goat Milk and Kefir with a New Standardised Static Digestion Method (INFOGEST Cost Action) and Bioactivities of the Resultant Peptides. *Food Anf Function*, 2015, vol. 7. pp. 2322--2330.

104. TANG, C., WANG, X. and YANG, X. *Enzymatic Hydrolysis of Hemp (Cannabis Sativa L.) Protein Isolate by various Proteases and Antioxidant Properties of the Resulting Hydrolysates.* , 15 June 2009, ISBN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.049>.

105. PICKLES, J., RAFIQ, S., COCHRANE, S.A. and LALLJIE, A. *In Vitro Pepsin Resistance of Proteins: Effect of Non-Reduced SDS-PAGE Analysis on Fragment Observation.* , 2014, 2014 SBN 2214-7500. DOI <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.008>.

106. SARWAR GILANI, G., WU XIAO, C. and COCKELL, K.A. Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality. *British Journal of Nutrition*, 2012/08/01, 2012, vol. 108, no. S2 [viewed 2018/05/09]. pp. S315-S332. Cambridge Core. ISSN 0007-1145. DOI 10.1017/S0007114512002371.

107. EARLY, R. Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings D. BAINES, , and R. SEAL eds., Woodhead Publishing, 2012 17 - *Dairy Products and Milk-Based Food Ingredients*, pp. 417-445 ISBN 9781845698119.

108. E. D. N. S. Abeyrathne H. Y. Lee D. U. Ahn. Article Navigation *Egg White Proteins and their Potential use in Food Processing Or as Nutraceutical and Pharmaceutical agents—A Review* . *Poultry Science*, 2013, vol. 92, no. 12. pp. 3292-3299.

109. FERREIRA MACHADO, F., et al. *Solubility and Density of Egg White Proteins: Effect of pH and Saline Concentration.* , September 2007, ISBN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.08.020>.

110. ALAM, S.A., et al. *Effects of Structural and Textural Properties of Brittle Cereal Foams on Mechanisms of Oral Breakdown and in Vitro Starch Digestibility.* , June 2017, ISBN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.008>.

111. EDWARDS, P.J.B. and JAMESON, G.B. *Milk Proteins (Second edition)* H. SINGH, et al ed., San Diego: Academic Press, 2014 *Chapter 7 - Structure and Stability of Whey Proteins*, pp. 201-242 ISBN 9780124051713.

112. PARK, S.J., KIM, T.W. and Baik Byung-Kee. Relationship between Proportion and Composition of Albumins, and in Vitro Protein Digestibility of Raw and Cooked Pea Seeds (*Pisum Sativum L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 08/15; 2018/05, 2010, vol. 90, no. 10. pp. 1719-1725 ISSN 0022-5142.

113. ROY, F., BOYE, J.I. and SIMPSON, B.K. *Bioactive Proteins and Peptides in Pulse Crops: Pea, Chickpea and Lentil.* , March 2010, SBN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.002>.

114. MIREILLE, Y., CLAIRE, C. and PÉLISSIER JEAN-PIERRE. Solubility of Peptides in Trichloroacetic Acid (TCA) Solutions Hypothesis on the Precipitation Mechanism. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 09/01; 2018/05, 1989, vol. 34, no. 3. pp. 166-176 ISSN 0367-8377.
115. YOSHITOMO, H., et al. Specificity of Immobilized Porcine Pepsin in H/D Exchange Compatible Conditions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 04/15; 2018/05, 2008, vol. 22, no. 7. pp. 1041-1046 ISSN 0951-4198.
116. TONDA A., Anita Grosvenor, Stefan Clerens and Steven Le Feunteuna. *in Silico Modeling of Protein Hydrolysis by Endoproteases: A Case Study on Pepsin Digestion of Bovine Lactoferrin*. *Food Funct*, 2017, vol. 7. pp. 4404--4413.
117. MYPROTEIN. *Milk Protein Smooth.* , 2018 Available from: <https://www.myprotein.lt/sports-nutrition/milk-protein-smooth/10530835.html>.
118. MARTOS Gustavo, Patricia Contreras, Elena Molina and Rosina López-Fandiño*. *Egg White Ovalbumin Digestion Mimicking Physiological Conditions*. *J. Agric. Food Chem*, 2010, vol. 58, no. 9. pp. 5640-5648.
119. MADALENA, D.A., et al. *In vitro Digestion and Stability Assessment of B-Lactoglobulin/Riboflavin Nanostructures.* , July 2016, 2 ISBN 0268-005X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.015>.