



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Gintarė Stanaitytė

**BIOAKTYVIŲ KOMPONENTŲ IŠSKYRIMAS IŠ
KARVIŲ PRIEŠPIENIO IR JŲ SAVYBIŲ ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas
Doc. dr. Jonas Damašius

KAUNAS, 2018

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**BIOAKTYVIŲ KOMPONENTŲ IŠSKYRIMAS IŠ KARVIŲ
PRIEŠPIENIO IR JŲ SAVYBIŲ ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (kodas 621J70004)

Vadovas

Doc. dr. Jonas Damašius

Recenzentas

Lekt. dr. Dalia Čižeikienė

Projektą atliko

Gintarė Stanaitytė

KAUNAS, 2018



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Gintarė Stanaitytė

(Studento vardas, pavardė)

Pramoninė biotechnologija, 621J70004

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

Projekto „Bioaktyvių komponentų išskyrimas iš karvių priešpienio ir jų savybių įvertinimas“
AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 18 m. gegužės 29 d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Gintarės Stanaitytės**, baigiamasis projektas tema „Bioaktyvių komponentų išskyrimas iš karvių priešpienio ir jų savybių įvertinimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjusi.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

SANTRAUKA	6
SUMMARY	7
SANTRUMPOS.....	8
IŽANGA.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
1.1. Priešpienis.....	10
1.2. Įvairių žinduolių priešpienio cheminė sudėtis ir savybės	11
1.3. Karvių priešpienio bioaktyvūs komponentai.....	13
1.4. Karvių priešpienio savybės.....	16
1.4.1. Priešpienio antioksidacinės savybės.....	17
1.4.2. Priešpienio antimikrobinės savybės	18
1.5. Karvių priešpienio technologinis perdirbimas.....	19
1.6. Karvių priešpienio panaudojimas	20
1.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	22
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI.....	23
2.1 Tyrimų objektai	23
2.2. Medžiagos ir reagentai.....	25
2.3. Tyrimų metodai	25
2.3.1. Karvių priešpienio ir jo frakcijų cheminės sudėties analizės metodai	25
2.3.2. Karvių priešpienio technologinis perdirbimas	28
2.3.3. Karvių priešpienio ir jo frakcijų savybių tyrimo metodai	31
2.3.4. Rezultatų statistinė analizė	34
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	35
3.1. Karvių priešpienis, jo cheminė sudėtis ir savybės	35

3.2.	Karvių priešpienio riebalų ir lieso priešpienio frakcijų cheminė sudėtis ir savybės	38
3.3.	Karvių priešpienio išrūgų baltymai ir jų atskyrimas taikant biotechnologinius būdus	44
3.4.	Karvių priešpienio frakcijų antioksidacinės ir antimikrobinės savybės	45
3.5.	Karvių priešpienio perdirbimas taikant mažo našumo technologinę gamybos liniją.....	48
4.	REKOMENDACIJOS	53
	IŠVADOS.....	55
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	56
	PRIEDAS Nr. 1	72
	PRIEDAS Nr. 2.....	73
	PRIEDAS Nr. 3	74
	PRIEDAS Nr. 4.....	74

Stanaitytė, Gintarė. *Bioaktyvių komponentų išskyrimas iš karvių priešpienio ir jų savybių įvertinimas*. Magistro baigiamasis projektas / vadovas doc. dr. Jonas Damašius; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: technologijų mokslai, biotechnologijos

Reikšminiai žodžiai: *Priešpienis, ultrafiltracija, retantas, permeatas*

Kaunas, 2018. 74 p.

SANTRAUKA

Priešpienio atskirų bioaktyvių komponentų išskyrimas ir išgryninimas yra brangus, sudėtingas ir daug laiko reikalaujantis procesas. Manoma, jog karvių priešpienio išrūgų baltymų frakcijos, pasižyminčios antioksidacinėmis – antimikrobinėmis savybėmis, galėtų būti geresnė ekonominė alternatyva, kuri palengvintų priešpienio technologinį perdirbimą. Šiai problemai spręsti buvo siekiama įvertinti biologiškai aktyvių komponentų išskyrimo iš karvių priešpienio galimybes ir nustatyti jų savybes.

Karvių priešpienio frakcijos buvo išskiriamos, panaudojant membraninę filtraciją bei proteolitinį fermentą. Visose karvės priešpienio frakcijose esantys baltymai buvo identifikuoti, panaudojant baltymų elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje metodą. Karvės priešpienio frakcijų antioksidacinis aktyvumas nustatytas DPPH ir ABTS antiradikalinais metodais. Karvės priešpienio frakcijų antimikrobinis aktyvumas buvo tirtas agar difuziniu metodu. Priešpienio riebalų oksidacijos stabilumas vertintas oksipreso metodu. Karvių priešpienis buvo perdirbiamas naudojant mažo našumo pilotinę įrangą.

Tyrimo metu laboratorinėmis sąlygomis buvo gautos 6 frakcijos – liesas priešpienis, priešpienio riebalai, priešpienio kazeininė frakcija, priešpienio išrūgų baltymai, priešpienio išrūgų retantas ir permeatas. Visos išskirtos frakcijos mažai skyrėsi baltymų sudėtimi. Nustatyta, kad priešpienis ir jo frakcijos pasižymėjo nedideliu antioksidaciniu aktyvumu. Įvertinta, jog didžiausiu antimikrobinio poveikiu pasižymėjo priešpienio išrūgų baltymų frakcija. Priešpienio riebalų frakcija pasižymėjo didesniu oksidaciniu stabilumu lyginant su pieno riebalais. Po metų šaldymo oksidavosi didžioji dalis nesočiųjų riebalų rūgščių. Naudojant mažo našumo pilotinę įrangą, buvo sėkmingai atliktas karvių priešpienio perdirbimas.

Stanaitytė, Gintarė. *Fractionation and assessment of bioactive components and their properties from cow colostrum*. Master thesis in Industrial Biotechnology / supervisor doc. dr. Jonas Damašius; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Technological Sciences, Biotechnology

Key words: *Colostrum, ultrafiltration, retentate, permeate*

Kaunas, 2018. 74 p.

SUMMARY

The isolation and purification of the colostrum individual bioactive components is an expensive, complicated and time-consuming process. It is believed that fractions of cow colostrum with antioxidative and antimicrobial properties could be a better economic alternative to facilitate colostrum processing. This problem might be solved by evaluating the possibilities of isolating bioactive components from cow colostrum and determining their properties.

Cow colostrum fractions were separated by using membrane filtration and the proteolytic enzyme. Proteins of cow colostrum fractions were identified using polyacrylamide gel electrophoresis. The antioxidant activity of the cow colostrum fractions was determined by DPPH and ABTS assays. The antimicrobial activity of the cow colostrum fractions was investigated by the agar diffusion method. The oxidative stability of colostrum fat was measured by oxipress method. Cow colostrum was processed using low-efficiency pilot scale equipment.

It was separated 6 fractions: skim colostrum, colostrum fat, colostrum casein fraction, colostrum whey proteins, colostrum whey retentate and permeate under laboratory conditions. All isolated fractions did not differ significantly in protein composition. It was found that colostrum and its fractions have low antioxidant activity. The most important antimicrobial effect was estimated by the colostrum whey protein fraction. The colostrum fat fraction has a higher oxidative stability compared to milk fat. After a year of freezing, most of the unsaturated fatty acids were oxidised. Using a low-efficiency pilot scale equipment, cow colostrum was successfully processed.

SANTRUMPOS

ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolino-6- sulfono) rūgšties radikalo sujungimo metodas

CLA – konjuguota linolo rūgštis

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvųjų radikalų sujungimo metodas

EGF – epidermio augimo faktorius

HSV-1 – 1 tipo *herpes simplex* virusas

HSV-2 – 2 tipo *herpes simplex* virusas

IFN- γ – interferonas γ

IGF-1 – į insuliną panašus augimo faktorius 1

IGF-2 – į insuliną panašus augimo faktorius 2

IL-1 – interleukinas 1

IL-1 β – interleukinas 1 β

IL-1ra – interleukinas 1 receptoriaus antagonistas

IL-6 – interleukinas 6

NSAIDS – nesteroidiniai prieš uždegiminius preparatai

PDGF – trombocitų kilmės augimo faktorius

TGF- β – transformuojantis augimo faktorius β

TNF- α – auglio nekrozės faktorius α

U937 – žmogaus mieloidinės leukemijos ląstelės

ŽIV-1 – 1 tipo žmogaus imunodeficito virusas

IŽANGA

Šiuo metu didelį susidomėjimą tarp biotechnologinės pakraipos įmonių kelianti žaliava yra priešpienis dėl jame esančių įvairių vertingų bioaktyvių junginių. Priešpienis – tai unikalus biologinis skystis, kurį gamina žinduolių patelės savo naujagimio maitinimui ir jo apsaugojimui nuo infekcinių ligų. Priešpienyje randami svarbiausieji komponentai – imunoglobulinai, antibakterinės medžiagos, augimo faktoriai, citokinai, vitaminai, fermentai, hormonai [1].

Pagal Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) vertinimą, 80 % pasaulio gyventojų remiasi tradicine medicina ir pirmenybę teikia natūralioms medžiagoms. Vienas iš tokių natūralių medžiagų šaltinių yra karvės priešpienis. Priešpienio bioaktyvios medžiagos yra naudojamos įvairių ligų gydyme, papildų, kosmetikos, funkcionaliųjų maisto produktų gamyboje. Šių atskirų bioaktyvių medžiagų išskyrimui, gryninimui ir charakterizavimui yra naudojami sudėtingi procesai (chromatografija, branduolių magnetinis rezonansas ir kt.), reikalaujantys daug laiko ir mokslinių žinių [2].

Karvės priešpienio pavienių bioaktyvių junginių išskyrimas ir panaudojimas pramoniniu būdu yra ekonomiškai brangus ir komplikotas procesas. Vis daugėja tyrimų, įrodančių, jog priešpienio išrūgų baltymų frakcijos taip pat pasižymi biologiniu aktyvumu – antibakterinėmis, antioksidacinėmis, antihipertenzinėmis, imunoduliacinėmis savybėmis [3]. Manoma, kad priešpienio išrūgų baltymų frakcijų panaudojimas pramonėje palengvintų ir atpigintų technologinį perdirbimą. Šiuo metu trūksta mokslinės informacijos šioje tematikoje ir nėra Lietuvoje įmonių, kurios perdirbtų priešpienį į aukštesnės pridėtinės vertės produktus. Todėl **magistrinio projekto tikslas** – įvertinti biologiškai aktyvių komponentų išskyrimo iš karvių priešpienio galimybes ir nustatyti jų savybes.

Šiam tikslui pasiekti išsikelti tokie **magistrinio projekto uždaviniai**:

1. Priešpienio atskyrimas į frakcijas, panaudojant biotechnologinius ir mechaninius būdus;
2. Priešpienio frakcijų cheminės sudėties nustatymas;
3. Priešpienio riebalų frakcijos oksidacijos vertinimas laikymo metu;
4. Priešpienio frakcijų antioksidacinio bei antimikrobinio aktyvumo įvertinimas;
5. Priešpienio perdirbimas pramoniniu būdu naudojant mažo našumo technologinę gamybos liniją.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Priešpienis

Priešpienis (lot. *colostrum*) – tai pirminis pienas, kurį gamina žinduolių patelių pieno liaukos, iškart po gimdymo [1,4]. Priešpieniu laikomas pirmos paros ir iki vienos savaitės pienas [5]. Priešpienis stimuliuoja žinduolių naujagimių medžiagų apykaitą, endokrininę sistemą, stiprina pasyvų imunitetą, skatina organizmo vystymąsi ir kovoja su organizmo svetimkūniais (bakterijomis ir virusais) [6,7].

Priešpienio būna mažiau nei pagaminamo žalio pieno, tačiau priešpienyje esančių bioaktyvių komponentų koncentracija yra daug didesnė nei piene. Priešpienio cheminė sudėtis ir jo savybės priklauso nuo žinduolio rūšies, individo bei surinkimo laiko [8]. Jame gausu baltymų, riebalų, angliavandenių, mineralinių medžiagų, augimo faktorių, antikūnų, vitaminų, antibakterinių ir biologiškai aktyvių medžiagų [9]. Priešpienio sudėtyje yra mažiau laktozės, bet daugiau riebalų, baltymų, hormonų, ir kt. medžiagų nei piene [10,11]. Žalio pieno ir priešpienio vizualiniai skirtumai yra pateikti 1.1. paveiksle.

Priešpienis yra rausvai geltonas skystis, kuriam tokią spalvą suteikia jame esantys karotenoidai (*trans* β -karotenai, *cis*-13 β -karotenai ir liuteinas) [12, 13]. Karotenoidų koncentracija sumažėja, kuomet pieno liaukos pradeda gaminti subrendusį pieną. Rausvą spalvą suteikia į priešpienį patekę raudonieji kraujo kūneliai. Taip pat rausva spalva gali atsirasti dėl pieno liaukų uždegimo [14]. Priešpienis yra 2 kartus klampesnis skystis nei žalias pienas [15]. Priešpienio pH vertė yra žemesnė nei pieno [16]. Priešpienio pH pirmosiomis dienomis po gimdymo būna vidutiniškai apie 6,32, o po dviejų savaičių padidėja iki 6,5. Manoma, kad žemas pH priklauso nuo padidėjusio baltymų, anglies dioksido, citratų kiekio priešpienyje [17].



1.1. pav. Karvių pieno liaukų sekretų pavyzdys: a) natūralus pienas; b) priešpienis

1.2. Įvairių žinduolių priešpienio cheminė sudėtis ir savybės

Priešpienyje randama apie 90 skirtingų junginių [18]. Įvairių žinduolių priešpienio pagrindinių junginių: baltymų, riebalų ir angliavandenių kiekiai yra pateikti 1.1. lentelėje.

1.1. lentelė. Įvairių žinduolių priešpienio cheminė sudėtis [19]

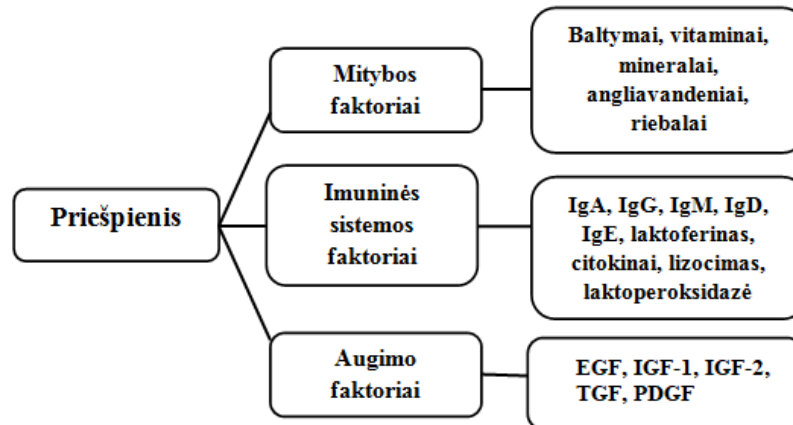
Rūšis	Matavimo vienetas	Baltymai	Riebalai	Laktozė
Žmogus	g/l	22,9	29,5	57,0
Karvė	g/kg	130,0	36,0	31,0
Kupranugaris	%	19,2	0,3	5,9
Ožka	g/kg	80,0	90,0	25,0
Arklys	g/kg	191,0	7,0	46,0
Šuo	g/kg	138,0	78,0	27,0
Katė	%	4,0	3,4	3,6
Avis	g/kg	130,0	124,0	34,0
Triušis	g/kg	135,0	147,0	16,0
Žiurkė	%	8,9	14,7	2,5
Beždžionė	g/100ml	2,3	5,1	6,8
Banginis	%	86,6	4,9	6,3
Dramblys	g/kg	21,0	56,0	61,8
Elnias	g/dl	95,2	87,0	11,1
Kiaulė	g/kg	180,0	72,0	24,0

Kupranugarės priešpienis yra ypatingas tuo, kad jo sudėtyje nėra randama β -laktoglobulino – pagrindinio baltymo, sukeliančio vaikams alergiją [20]. Taip pat kupranugarės priešpienis pasižymi didesniu antimikrobinių medžiagų kiekiu [21]. Kupranugarės priešpienyje randama 5 kartus didesnis laktoferino kiekis lyginant su karvės priešpieniu [22].

Karvių priešpienio sudėtis gerokai skiriasi nuo moters gaminamo priešpienio [23]. Moters priešpienis turi didesnę koncentraciją augimo faktorių negu galvijų priešpienis [24]. Moters priešpienyje randama 4 kartus daugiau epidermio augimo faktoriaus (EGF) bei 20 kartų daugiau transformuojančio augimo faktoriaus (TGF- β) lyginant su karvės priešpieniu [25,26]. Moters priešpienyje laktoferino randama 7 kartus daugiau lyginant su karvės priešpieniu (moters – 700

mg/ml, o karvės priešpienyje – 100 mg/ml) [27]. Karvės priešpienis turi daugiau IgG (81 %) lyginant su moters priešpieniu – IgG (2 %) [27,28].

Priešpienio bioaktyvius komponentus, pagal atliekamą funkciją organizme, galima suskirstyti į 3 kategorijas: mitybos faktoriai, imuninės sistemos faktoriai ir augimo faktoriai (žr. 1.2. pav.) [24].



1.2. pav. Priešpienio bioaktyvūs komponentai. Adaptuota pagal [22]

Mitybos faktorių grupei priskiriami priešpienyje esantys angliavandeniai, lipidai, baltymai, vitaminai ir mineralai. Gyvybiškai svarbios mitybinės medžiagos yra reikalingos audiniams augti, vystytis ir energijai gauti. Priešpienyje gausu vitaminų C, A, E, kurie pasižymi antioksidacinėmis savybėmis [29,30].

Imuninės sistemos faktorių grupei priskiriami specifiniai priešpienyje randami antikūnai, imunoglobulinai, laktoferinas, prolinu turtingi peptidai, citokinai, lizocimas, laktoperoksidazė, laktoalbuminai, glikoproteinai ir tripsino inhibitoriai. Pagrindinės imunoglobulinų klasės, esančios priešpienyje, yra IgG₁ ir IgG₂ [31]. Jie sudaro daugiau kaip 90 % visų imunoglobulinų. Tinkamos kokybės priešpienyje minimali imunoglobulinų koncentracija turėtų būti 50 g/l [32].

Augimo faktorių grupei priklauso priešpienyje esantys į insuliną panašūs augimo faktoriai (IGF-1 ir IGF-2), epidermio augimo faktorius (EGF), trombocitų kilmės augimo faktorius (PDGF) ir transformuojantys augimo faktoriai (TGF- α ir TGF- β) [33]. Augimo faktoriai stimuliuoja vystimąsi, dalyvauja raumenų, odos, kolageno, kaulų, kremzlių atsinaujinime. Daugiausiai randama IGF-1 ir IGF-2 [34].

Kadangi karvių gaminamo žalio pieno ir priešpienio kiekiai yra gaunami didžiausi lyginant su kitais žinduoliais, todėl karvių priešpienis yra laikomas vienu iš vertingiausių biologiškai aktyvių junginių šaltiniu.

1.3. Karvių priešpienio bioaktyvūs komponentai

Karvių priešpienio sudėtis priklauso nuo tam tikrų sąlygų: veislės, individo, mitybos, karvės užtrūkinimo trukmės [35]. Remiantis įvairiais šaltiniais, karvių priešpienis pagal jo gaminimo trukmę skirstomas: iškart po gimdymo [24], 2 dienų [36], nuo 3 iki 4 dienų [35], nuo 5 iki 7 dienų po gimdymo [9]. Priešpienyje, surinktam per 24 h po veršiamosi, yra didesnė imunoglobulinų ir augimo faktorių koncentracija lyginant su tos pačios karvės priešpieniu, surinktu 3-čią dieną po veršiamosi [38]. Karvės priešpienio cheminės sudėties kitimas ilgėjant laktacijos trukmei po veršiamosi pateiktas 1.2. lentelėje.

1.2. lentelė. Karvių priešpienio cheminės sudėties kitimas ilgėjant laktacijos trukmei [39]

Valandos po veršiamosi	Bendras azoto kiekis (%)	Riebalai (%)	Laktozė(%)	Bendras sausųjų medžiagų kiekis (%)
0	17,57	5,10	2,19	26,99
6	10,00	6,85	2,71	20,46
12	6,05	3,80	3,71	14,53
24	4,52	3,40	3,98	12,77
36	3,98	3,55	3,97	12,22
48	3,74	2,80	3,97	11,46

Pagaminamo karvių priešpienio kiekis yra gerokai mažesnis lyginant su pagaminamo žalio pieno kiekiu, tačiau priešpienyje randami didesni bioaktyvių junginių kiekiai. Karvės pieno ir priešpienio pagrindinių bioaktyvių junginių sudėties palyginimas pateiktas 1.3. lentelėje. Karvės priešpienyje randama daugiau imuninės sistemos faktorių – imunoglobulinų (IgG₁, IgG₂, IgA, IgM), augimo faktorių (EGF, IGF-1, IGF-2, TGF-β1), citokinių (auglio nekrozės faktorius TNF-α, interleukinas IL-1, interferonas IFN-γ), limfocitų. Taip pat priešpienyje nustatytas didesnis antibakterinių medžiagų kiekis lyginant su pienu – laktoferinas, laktoperoksidazė, lizocimas. Galvijų priešpienyje pastebimi ir didesni išrūginių baltymų (α-laktoalbuminas, β-laktoglobulinas,) hormonų (insulinas prolaktinas, kortizolis), fermentų (šarminė fosfatazė, N-acetil-β-gliukozaminidazė, gliukozės-6-fosfato izomerazė, α-manozidozė), fermentų inhibitorių (α1-antitripsinas, α-makroglobinas), mineralų (geležies, kalcio, natrio, cinko, magnio, kalio, fosforo), vitaminų (A, E, D, B grupės) kiekiai. Tačiau kazeininių baltymų randama mažiau lyginant su pienu [6,34,40,41].

1.3. lentelė. Karvių pieno ir priešpienio bioaktyvių junginių sudėtis [42]

Bioaktyvi medžiaga	Karvės pienas	Karvės priešpienis
Kazeinas (α_{s1} , α_{s2} , β , κ) (g/L)	28,0	26,0
β -laktoglobulinas (g/L)	3,3	8,0
α -laktoalbuminas (g/L)	1,2	3,0
IgG ₁ (g L ⁻¹)	0,31 – 0,40	52,0 – 87,0
IgG ₂ (g L ⁻¹)	0,03 – 0,08	1,6 – 2,1g
IgM (g L ⁻¹)	0,03 – 0,06	3,7 – 6,1
IgA (g L ⁻¹)	0,04 – 0,06	3,2 – 6,2
Glikomakropeptidas (g/L)	1,2	2,5
Laktoferinas (mgmL ⁻¹)	0,02 – 0,75	1,5 – 5,0
Laktoperoksidazė (mgL ⁻¹)	13,0 – 30,0	11,0 – 45,0
Lizocimas (mgL ⁻¹)	0,07 – 0,6	0,14 – 0,7
Serumo albuminas (g/L)	0,3	1,3
EGF (μ g.L ⁻¹)	155	324
IGF-1 (μ g.L ⁻¹)	<10	50 – 2000
IGF-2 (μ g.L ⁻¹)	<10	200 - 600
TGF- β 1 (μ g.L ⁻¹)	0,8 – 3,5	12 - 43

 α -laktoalbuminas ir β -laktoglobulinas

Pagrindiniai karvės priešpienyje esantys išrūgų baltymai, pasižymintys maistine verte. α -laktoalbuminas ir β -laktoglobulinas yra pirminės medžiagos bioaktyvių peptidų (lizino, cisteino, triptofano) sintezei [43,44]. Taip pat yra nustatyta, jog α -laktoalbuminas pasižymi priešvėžinėmis bei priešvirusinėmis savybėmis [18].

Laktoperoksidazė - pagrindinis glikoproteinas, turintis hemo grupę su Fe⁺³. Pastebėta, kad laktoperoksidazė inaktyvuoja polio virusą, karvių raupus ir 1 tipo žmogaus imunodeficito virusą (ŽIV-1) *in vitro* [45].

Lizocimas – rūgščiai atsparus hidrolazių klasei priklausantis fermentas, kuris pasižymi antibakteriniu poveikiu [18]. Jo aktyvumas karvės priešpienyje yra net 5 kartus didesnis lyginant su pienu [40].

Laktoferinas – tai geležį prijungiantis glikoproteinas (80 kDa), sudarytas iš vienos polipeptidinės grandinės. Laktoferinas pasižymi priešvėžinėmis, antibakterinėmis,

priešuždegiminėmis savybėmis, bet pagrindinį vaidmenį atlieka pieno liaukoje apsaugant ją nuo infekcijų [46,47]. Laktoferinas taip pat pasižymi priešvirusiniu poveikiu – slopina 1 tipo ir 2 tipo *herpes simplex* viruso (HSV-1 ir HSV-2) bei *citomegalo* viruso veikimą *in vitro* [45,48].

Prolinu turtingi polipeptidai: stimuliuoja užkrūčio liauką, reguliuoja imuninę sistemą [49].

Glikoproteinai ir tripsino inhibitoriai: apsaugo imuninės sistemos faktorius bei augimo faktorius nuo suirimo virškinamajame trakte [18].

Oligosacharidai: prisijungia prie patogeninių bakterijų ir neleidžia joms patekti į gleivinę [50].

Citokinai: atsakingi už imuninės sistemos reguliavimą [51]. Citokinams priklauso priešpienyje randami interleukinai, interferonas ir auglio nekrozės faktorius. Hagiwara ir bendraautoriai nustatė, kad citokinų (IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ ir IL-1ra) koncentracijos karvės priešpienyje yra gerokai didesnės lyginant su karvės pienu [52].

Bioaktyvios riebalų rūgštys: karvės priešpienyje randama sočiųjų riebalų rūgščių – sviesto (butano), kaprono (heksano), kaprilo (oktano), kaprino (dekano), lauro (dodekano), miristo (tetradekano), palmitino (heksadekano), stearino (oktadekano). Karvės priešpienyje randama ir mononesočiųjų riebalų rūgščių – palmitoleino (heksadeceno), oleino (9-oktadeceno), kurių koncentracija didesnė negu karvės piene. Taip pat randama polinesočiųjų riebalų rūgščių – linolo (9,12-oktadekadieno) bei α -linoleno (9,12,15-oktadekatrieno), kurios yra būtinos imuninei sistemai stiprinti, smegenims vystytis. Bioaktyvios riebalų rūgštys pasižymi priešvėžinėmis, prieuždegiminėmis, antihipertenzinėmis savybėmis [53,54].

Imunoglobulinai: Karvės priešpienyje imunoglobulinai sudaro 70 – 80 % visų baltymų kiekio, o piene sudaro tik 1 – 2 % visų baltymų kiekio [47,55]. Karvės priešpienyje randamos trys pagrindinės imunoglobulinų klasės – IgG, IgM ir IgA, kurios yra labai svarbios veršelio pasyviame imunitetui susidaryti [55,56]. Pagrindinis imunoglobulinas karvių priešpienyje yra IgG₁, kuris sudaro daugiau nei 75 % bendro imunoglobulinų kiekio [57].

Fermentai: Priešpienyje randama proteinazių, lipazių, esterazių, fosfatazių, ribunokleazių, γ -glutamiltransferazių, kurių koncentracija didesnė negu piene [8].

Augimo faktoriai: IGF-1 ir IGF-2 yra karščiui ir rūgščiai atsparūs augimo faktoriai, sudaryti iš vienos polipeptidinės grandinės (apie 7,6 kDa), kurių randama didžiausia koncentracija priešpienyje. Karvės priešpienio augimo faktoriai atsakingi už naujagimio organizmo vystimąsi, augimą bei palaiko normalią žarnyno sienelių gleivinę [41].

Vitaminai ir mineralai: Karvės priešpienyje randama riebaluose tirpių vitaminų (E, A, D, K) bei vandenyje tirpių vitaminų (C, B grupės – pagrinde B₆ ir B₁₂) [8]. Karvės priešpienyje taip pat gausu

mineralų – kalcio fosforo, natrio, kalio, geležies, magnio, cinko, vario, kurie dalyvauja medžiagų apykaitoje, palaiko gyvybines organizmo funkcijas [58].

1.4 Karvių priešpienio savybės

Karvės priešpienyje gausu įvairių bioaktyvių junginių, pasižyminčių skirtingomis savybėmis: antibakterinėmis, priešvirusinėmis, priešvėžinėmis, priešuždegiminėmis, imunoduliacinėmis [42]. Apibendrintas pagrindinių karvės priešpienio bioaktyvių medžiagų biologinis aktyvumas pateiktas 1.4. lentelėje.

1.4. lentelė. Karvių priešpienio bioaktyvių junginių savybės [42]

Bioaktyvi medžiaga	Biologinis aktyvumas
Kazeinas (α_{s1} , α_{s2} , β , κ)	Bioaktyvių peptidų šaltinis, pasižymi imunoduliacinėmis, antioksidacinėmis, antihipertenzinėmis savybėmis
β -laktoglobulinas	Antioksidacinės savybės
α -laktoalbuminas	Imunoduliacinės savybės, kalcio pernešimas
IgG ₁	Apsaugo nuo infekcijų, neutralizuoja toksinus
IgG ₂	Neutralizuoja toksinus
IgM	Pasižymi antibakterinėmis savybėmis
IgA	Apsaugo gleivines nuo patogenų
Glikomakropeptidas	Skrandžio hormonų reguliacija, antimikrobinės, probiotinės savybės
Laktoferinas	Slopina lipidų peroksidaciją, suriša ir perneša geležį, biologiškai aktyvių peptidų pirminis junginys, antimikrobinės, antioksidacinės, priešvėžinės savybės
Laktoperoksidazė	Sinergistinis efektas su imunoglobulinais, lizocimu ir laktoferinu, antimikrobinės savybės
Lizocimas	Antimikrobinės savybės, sinergistinis efektas su imunoglobulinais, laktoperoksidaze ir laktoferinu
Serumo albuminas	Biologiškai aktyvių peptidų pirminis junginys
EGF	Stimuliuoja odos ląstelių augimą ir atsinaujinimą
IGF-1	Stimuliuoja DNR, RNR sintezę ir atsinaujinimą.
IGF-2	Skatina ląstelių augimą
TGF- β 1	Stimuliuoja jungiamojo audinio proliferaciją

1.4.1 Priešpioenio antioksidacinės savybės

Oksidacinis stresas – tai būseną, kai organizme sutrinka pusiausvyrą tarp destruktivių laisvųjų radikalų susidarymo ir jų pašalinimo [59]. Laisvieji radikalai – tai nestabilios, reaktyvios deguonies turinčios molekulės, kurios turi vieną ar daugiau nesuporuotų elektronų. Laisvieji radikalai pažeidžia ląstelės membranos lipidus ir baltymus, fermentus, DNR struktūrą [60,61].

Antioksidantai – tai medžiagos, kurios neutralizuoja laisvuosius radikalus ir apsaugo nuo oksidacijos. Priešpioenyje gausu fermentinių ir nefermentinių antioksidantų. Fermentiniams antioksidantams priklauso laktoperoksidazė, katalazė, superoksido dismutazė ir glutationo peroksidazė. Nefermentiniams antioksidantams priklauso vitaminai E, A, C, laktoferinas, selenas, varis, cinkas, cisteinas [62,63]. Karvės priešpioenyje randamų antioksidantų funkcijos pavaizduotos 1.5. lentelėje.

1.5. lentelė. Karvių priešpioenyje randami antioksidantai ir jų funkcijos [46]

Antioksidantas	Funkcija
Fermentiniai	
Laktoperoksidazė	Katalizuoja tiocianato oksidaciją
Katalazė	Katalizuoja vandenilio peroksido skilimą
Superoksido dismutazė	Katalizuoja superoksido virsmą vandenilio peroksidu
Glutationo peroksidazė	Redukuoja vandenilio peroksidą
Nefermentiniai	
Laktoferinas	Apsaugo lipidus nuo geležies sukeltos peroksidacijos
Selenas	Apsaugo ląsteles nuo oksidacinės pažeidimo poveikio
Varis	Būtinai antioksidacinių fermentų tinkamam aktyvumui
Cinkas	Būtinai antioksidacinių fermentų tinkamam aktyvumui
Cisteinas	Reikalingas glutationo susidarymui
Vitaminas A	Mažina laisvųjų radikalų kiekį, apsaugo nuo mastito
Vitaminas E	Apsaugo ląstelių membranas nuo laisvųjų radikalų žalingo poveikio
Vitaminas C	Perduoda elektronus vitamino E radikalams

Manoma, kad kazeinas ir priešpioenio išrūgų baltymai taip pat pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, mažindami geležies jonų chelatinius gebėjimus ir lipidų peroksidaciją [64]. Pastebėta, kad

priešpienyje esantis kolostrinas (prolino turintis polipeptidų kompleksas) taip pat mažina reaktyviųjų deguonies rūšių kiekį [46]. Įrodyta, jog karvės priešpienio papildai gali būti naudingi atletams mažinant oksidacinį stresą raumenyse, dėl sukkelto intensyvaus fizinio krūvio [65]. Manoma, jog karvės priešpienis, dėl savo antioksidacinių savybių, galėtų būti naudojimas sepsio, nekrozinio enterokolito, bronchopulmoninės displazijos, retinopatijos bei periventrikulinės leukomalacijos gydyme [66].

1.4.2 Priešpienio antimikrobinės savybės

Priešpienyje esantys antimikrobiniai faktoriai suteikia naujagimiui pasyvų imunitetą ir apsaugo nuo infekcijų per pirmąsias gyvenimo savaites [67]. Antimikrobinis poveikiu pasižymi priešpienyje randamos bioaktyvios medžiagos: laktoferinas, lizocimas, laktoperoksidazė, imunoglobulinai [46].

Laktoferinas: nustatyta, jog laktoferinas slopina tokių mikroorganizmų augimą, kaip *Escherichia coli* [68,69], *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteria* [70], *Listeria monocytogenes* [71], *Streptococcus mutans* [72], *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* [73,74,75]. Manoma, kad laktoferino bakteriostatinis veikimas pagrįstas geba prijungti geležį, kuris yra svarbus patogeninių bakterijų augimui. Laktoferino bakteriocidinis aktyvumas siejamas su jo geba prisijungti prie porinų, esančių *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* išorinėje membranoje ir taip sutrikdo membranos pralaidumą [76,77]. Laktoferino receptoriai randami žarnyne, monocituose, makrofaguose, neutrofiluose, limfocituose [78]. Laktoferinas yra aktyvus neutraliame pH ir esant bikarbonatams [79,80].

Lizocimas: šio fermento substratas yra peptidoglikano sluoksnis, esantis bakterijų sienelėse. Lizocimas hidrolizuoja β -1,4 glikozidinius ryšius, kas lemia bakterinių ląstelių irimą [73,78,81]. Nustatyta, jog lizocimo antibakterinis aktyvumas priklauso ne tik nuo jo fermentinio aktyvumo, bet ir nuo jo katijoninių bei hidrofobinių savybių [82]. Laktoferinas sinergistiškai padidina lizocimo antibakterinį aktyvumą prieš *E. coli* [83].

Laktoperoksidazė: Laktoperoksidazė katalizuoja tiocianato (SCN^-) oksidaciją ir vandenilio peroksido (H_2O_2) redukciją [84]. Nustatyta, jog laktoperoksidazė apsaugo pieno liaukas nuo bakterinių infekcijų, vienas iš pavyzdžių – nuo patogeninių *Streptococcus spp* [85]. Pastebėta, kad laktoperoksidazė slopina tiek gram-teigiamas, tiek gram-neigiamas bakterijas – *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* bakterijų augimą [86,87,88].

Imunoglobulinai: galvijų patelės imunoglobulinai neperduodami per placentą vaisiui, todėl veršeliai gimsta su mažomis serumo imunoglobulinų koncentracijomis. Karvės priešpienis yra

svarbus imunoglobulinų šaltinis, todėl jų įsisavinimas naujagimiui yra būtinas siekiant užtikrinti pasyvų imunitetą po gimdymo. Šie antikūnai apsaugo veršelius nuo infekcinių žarnyno ir kvėpavimo ligų, kurios yra pagrindinės veršelių mirtingumo priežastys [89]. Priešpienio imunoglobulinai geba prisijungti ir agliutinuoti svetimkūnius, patekusius į žarnyną (tokius kaip grybai, parazitai, virusai, bakterijos) bei pašalinti juos nespėjus jiems sukelti infekcijos ar ligos [90].

1.5. Karvės priešpienio technologinis perdirbimas

Karvės priešpienio technologinis perdirbimas yra vienas iš svarbiausių veiksnių, lemiančių priešpienio sudėtį bei kokybę. Priešpennis turi būti gaunamas ekologiškas – karvės turi būti auginamos ekologiškose sąlygose be pesticidų, herbicidų, antibiotikų, anabolinių hormonų [91]. Priešpennis yra perdirbamas esant žemam slėgiui ir žemai temperatūrai tam, kad nebūtų prarastos bioaktyvios medžiagos ir nepakistų jų biologinis aktyvumas [92]. Komerciniams tikslams naudojamas priešpennis pirmiausia yra pasterizuojamas, vėliau džiovinamas ir gaunamas miltelių pavidalu. Milteliuose yra mažas vandens kiekis, todėl mikroorganizmai nesivysto. Džiovinant pailgėja priešpienio galiojimo terminas, sumažėja jo masė bei tūris, todėl yra taip sumažinamos produkto transportavimo ir laikymo išlaidos. Priešpennis džiovinimas šalčiu (liofilizacija) arba karščiu (purškiamasis džiovinimas). Karvės priešpennis komerciškai yra gaminamas tablečių, kapsulių, miltelių pavidalu [93].

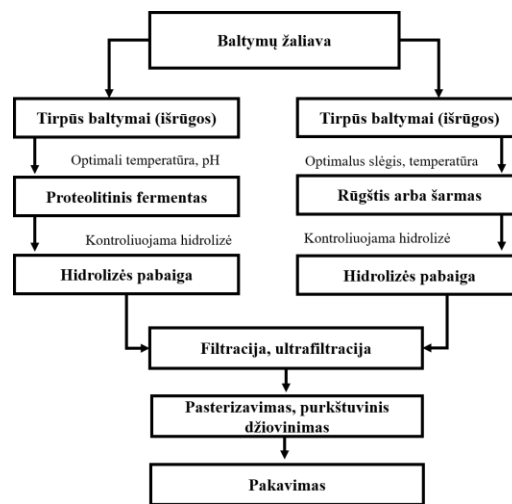
Pastaruoju metu vienas iš karvės priešpienio perdirbimo būdų yra priešpienio baltymų hidrolizatų gamyba. Dauguma augalinių ir gyvūninių baltymų hidrolizatų naudojimas plačiai pripažintas kosmetikos ir sveikatos priežiūros srityje. Karvės priešpienio baltymų hidrolizatų produktai gali būti naudingi žmonių sveikatai gerinti [94].

Karvės priešpienio baltymų hidrolizatai

Baltymų hidrolizatai gaminami iš išgryninto baltymų šaltinio, kaitinant rūgštimi arba pridodant proteolitinių fermentų. Baltymų hidrolizatų gamyba pavaizduota 1.3. paveiksle. Baltymų hidrolizatas yra trumpų peptidinių grandinių mišinys kartu su laisvosiomis aminorūgštimis [94]. Baltymų hidrolizatus sudaro proteazės, peptonai, peptidai ir laisvosios amino rūgštys. Nustatyta, jog baltymų hidrolizatai dažniausiai sudaryti iš dipeptidų, tripeptidų ir laisvųjų aminorūgščių, kurie turi aukštą maistinę bei terapeutinę vertę [95]. Priklausomai nuo fermento specifiškumo ir hidrolizės laipsnio, galima pagaminti įvairius hidrolizato produktus su sustiprintomis arba sumažintomis savybėmis [96]. Baltymų išrūgos hidrolizuojamos įvairiais fermentais – tripsinu, pepsinu, alkalaze, proteaze N.

Pastarųjų tyrimų duomenimis yra nustatyta, jog karvės priešpienio baltymų hidrolizatai turi tam tikrų savybių: antioksidacinis poveikis [64], U937 ląstelių augimo slopinimas ir imunoduliacinis

poveikis [97], slopina angiotenziną I kovertuojantį fermentą bei mažina riebalų rūgščių sintezę kepenyse [98], slopina mažo tankio lipoproteinų oksidaciją ir mažina oksidacinį stresą [99].



1.3. pav. Baltymų hidrolizatų gamyba.

1.6. Karvių priešpienio panaudojimas

Karvės priešpienio sudėtyje yra randama daug vertingų komponentų, kurie atlieka svarbų vaidmenį įvairių ligų gydyme. XX amžiuje prieš išrandant peniciliną ir kitus antibiotikus, priešpennis buvo naudojamas kovojant su bakterinėmis infekcijomis [18]. Šiuo metu yra daugiau nei 2000 straipsnių, kurie patvirtina priešpienio vartojimo saugumą ir veiksmingumą bei nėra pastebėta jokių pašalinių poveikių vartojant priešpienį. Priešpennis yra naudojamas maisto pramonėje, kosmetikos, gyvulių pašarų gamyboje, bet dažniausiai papildų gamyboje bei medicinoje. Karvių priešpienio bioaktyvių junginių klinikinis pritaikymas pavaizduotas 1.4. paveikslėlyje.

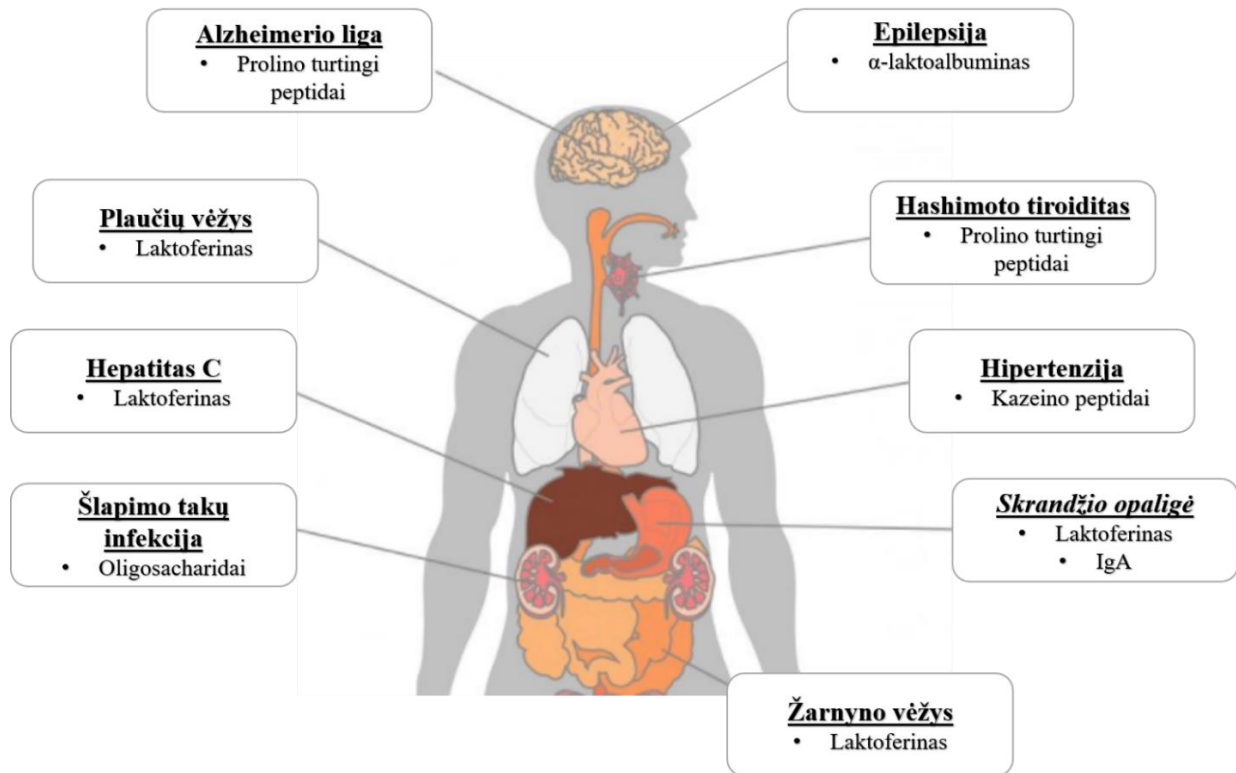
Papildų gamyboje: manoma, kad karvės priešpennis padeda sportininkams padidinti jėgą ir išstvermingumą, deginti kūno riebalus bei sutrumpinti organizmo atsistatymo laiką po fizinio krūvio. Karvės priešpienyje esantis IGF-1 skatina baltymų sintezę ir raumenis gali augti nepriklausomai, todėl priešpennis tinka atletams, kultūristams, kurie nori užsiauginti kūno masę [24]. Karvės priešpienio IgG naudojami kūdikių imuninę sistemą stiprinančių papildų gamyboje [90]. Lietuvos vaistinėse galima įsigyti skandinaviskų pastilių gerklei su antikūnais iš karvių priešpienio.

Autoimuninių ligų gydyme: priešpienyje esantys prolinu turtingi peptidai slopina per didelę limfocitų ir T ląstelių gamybą bei mažina skausmą, tinimą ir infekciją. Priešpienyje esantis laktoferinas mažina virusines ir bakterines infekcijas, palaiko žarnyno pralaidumą [100].

Vėžio gydyme: laktoferinas apsaugo nuo žarnyno, šlapimo pūslės, liežuvio, stemplės, plaučių vėžio [101]. Konjuguota linolo rūgštis (CLA), esanti priešpienyje, turi priešvėžinių savybių. Nors CLA mechanizmas dar nėra visiškai ištirtas, tačiau yra manoma, kad konjuguota linolo rūgštis stimuliuoja limfokinių ir interleukino 2 gamybą, tuo pačiu padidindama imunoglobulinų lygį. CLA dalyvauja karcinogenezėje indukuodama apoptozę, kuri slopina eikozanoidų sintezę [102].

Virškinamajam traktui: dėka priešpienyje esančių augimo faktorių ir hormonų, yra greitai atstatomas žarnyno sienelių vientisumas, kurias pažeidžia įvairūs vaistai, kaip NSAIDS. Yra atlikta tyrimų, kad priešpienis kontroliuoja skrandžio opą sukeliančios bakterijos *H. pylori* aktyvumą. Priešpienis padidina žarnyno gleivinės paviršiaus plotą, dėl to pasekoje pagerėja mitybinių medžiagų absorbcija [24].

Kita: pastebėta, kad priešpienis naudingas reumatoidinio artrito, diabeto, viršutinių kvėpavimo takų - sinusito, pneumonijos gydyme [8].



1.4. pav. Karvių priešpienio bioaktyvių junginių panaudojimas žmonių ligų gydyme [103]

1.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

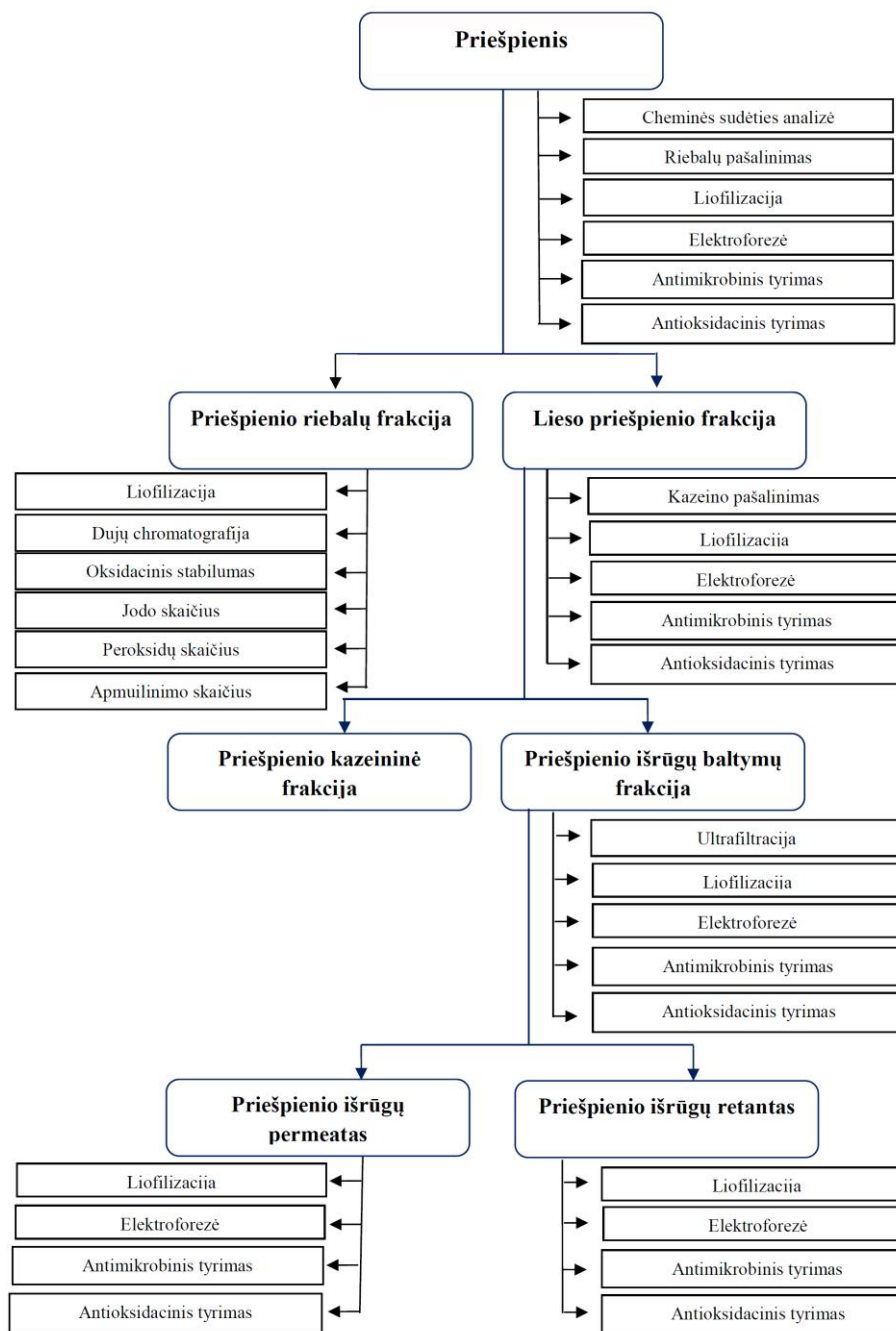
Priešpienis – unikalus savo sudėtimi biologinis skystis, kuriame gausu vertingų bioaktyvių junginių. Priešpienio atskirų bioaktyvių junginių išskyrimui, gryninimui ir charakterizavimui yra naudojami sudėtingi, brangūs, daug laiko ir mokslinių žinių reikalaujantys procesai. Manoma, jog priešpienio frakcijos taip pat pasižymi biologiniu aktyvumu – antibakterinėmis, antioksidacinėmis, antihipertenzinėmis, imunoduliacinėmis savybėmis.

Šiuo tyrimu buvo siekiama išskirti iš karvės priešpienio baltymų frakcijas, kurios pasižymėtų antioksidacinėmis – antimikrobinėmis savybėmis ir taip atpiginti bei pagreitinti priešpienio technologinį perdirbimą.

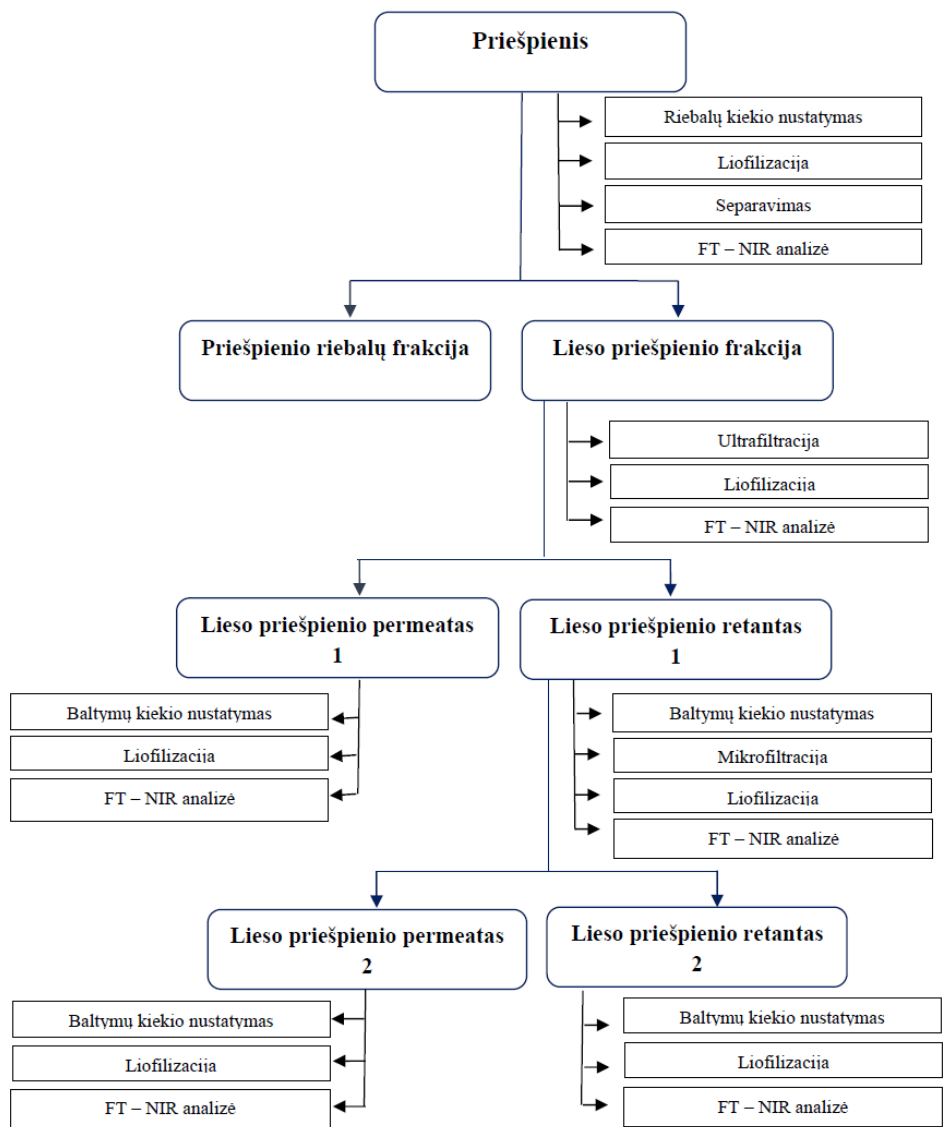
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1 Tyrimų objektai

Tiriamąo darbo objektai: 1-os dienos karvės priešpienis, lieso priešpienio frakcija, priešpienio riebalų frakcija, priešpienio išrūgų baltymų frakcija, priešpienio išrūgų retantas ir priešpienio išrūgų permeatas. Eksperimentai buvo atliekami laboratorinėmis sąlygomis (žr. 2.1. pav.) ir pramoniniu būdu, naudojant mažo našumo technologinę gamybos liniją (žr. 2.2. pav).



2.1. pav. Tiriamąo darbo metu vykdytų eksperimentų schema laboratorinėmis sąlygomis



2.2. pav. Tiriamojo darbo metu vykdytų eksperimentų schema naudojant mažo našumo technologinę gamybos liniją

2.2. Medžiagos ir reagentai

Tiriamajame darbe naudotos medžiagos yra pateiktos 2.1. lentelėje.

2.1. lentelė. Tyrimuose naudotos medžiagos ir reagentai

Medžiagos, reagentai	Tiekėjas
Bradfordo reagentas	„Sigma-Aldrich“, JAV
Natrio dodecilsulfatas (SDS)	„Carl Roth GmbH & Co“, Vokietija
1 M Tris-HCl, pH 8,0	„Sigma-Aldrich“, JAV
30% akrilamido/bis-akrilamido tirpalas)	„Carl Roth GmbH & Co“, Vokietija
Amonio persulfatas (APS)	„Carl Roth GmbH & Co“, Vokietija
Tetrametiletilendiaminas (TEMED)	„Sigma-Aldrich“, JAV
Baltymų molekulinės masės standartas „Wide Range“	„Sigma-Aldrich“, JAV
Izopropanolis	„Sigma-Aldrich“, JAV
2,2 – difenil–1-pikril-hidrazilas	„Alfa Aesar“, JAV
2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfoninė rūgštis	„Alfa Aesar“, JAV
Mielių ekstraktas	„Carl Roth GmbH & Co“, Vokietija
Triptonas	„Liofilchem“, Italija
Agaras	„Merck“, Vokietija
Natrio chloridas	„Merck“, Vokietija

2.3. Tyrimų metodai

2.3.1. Karvių priešpieno ir jo frakcijų cheminės sudėties analizės metodai

Priešpieno cheminė analizė

Baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu

Baltymų kiekis karvės priešpienyje buvo nustatytas remiantis ISO 8968 – 1:2014 „Pienas ir pieno gaminiai. Azoto kiekio nustatymas. Kjeldalio principas ir žalio baltymo skaičiavimas“ metodu [104].

Nebaltyminio azoto kiekio nustatymas

Nebaltyminio azoto kiekis frakcijose nustatytas remiantis ISO 8968 – 4:2001 „Pienas. Azoto kiekio nustatymas. Nebaltyminio azoto kiekio nustatymas“ metodu [105]

Riebalų kiekio nustatymas rūgštiniu Gerberio metodu

Riebalų kiekis karvės priešpienyje buvo nustatytas remiantis ISO 11870:2009 „Pienas ir pieno gaminiai. Riebalų kiekio nustatymas. Bendrieji butirometriniai metodai“ [106].

Laktozės kiekio nustatymas jodometriniu metodu

Šio metodo principas – angliavandeniuose esančių laisvų aldehydų grupių oksidavimas šarminiu jodo tirpalu. Išsiskyręs jodas buvo nutitruojamas 0,1 N Na₂S₂O₃. Laktozės kiekis (L) apskaičiuotas pagal 2.1 formulę:

$$L = \frac{(V_1 - V) * 18,01 * 100}{500} \quad [\%] \quad (2.1)$$

V₁ – 0,1 N Na₂S₂O₃ tūris, sunaudotas išsiskyrusiam jodui nutitruoti kontroliniame pavyzdyje, ml; V – 0,1N Na₂S₂O₃ tūris, sunaudotas bandinio tirpalui nutitruoti, ml; 18,01 – 0,1 N Na₂S₂O₃ tirpalo titras pagal laktozę, mg.

Sausųjų medžiagų kiekio nustatymas

Priešpienyje sausųjų medžiagų kiekis nustatytas remiantis ISO 6731:2010 „Pienas, grietinėlė ir sutirštintas pienas. Visuminio sausųjų medžiagų kiekio nustatymas“ metodika [107].

Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas

Priešpienis buvo deginamas porcelianiniuose tigluose mufelinėje krosnyje 825 ± 25° C temperatūroje 30 min ir atšaldomas eksikatoriuje iki kambario temperatūros. Priešpienio pelenų kiekis (P) apskaičiuotas pagal 2.2 formulę:

$$P = \frac{m_1 - m_2}{m} * 100 \quad [\%] \quad (2.2)$$

m₁ – tiglio masė su pelenais po sudeginimo, g; m₂ – tuščio tiglio masė, g; m – priešpienio masė, g.

Tankio nustatymas

Priešpienio tankis buvo nustatytas specialiu pieno areometru (padalos vertė 1,0 kg/m³).

Titruojamasis rūgštingumas

Priešpienio titruojamasis rūgštingumas, išreikštas Ternerio laipsniais, yra standartinio natrio hidroksido tirpalo mililitrų kiekis, reikalingas 100 ml priešpienyje esančioms rūgštims neutralizuoti.

pH nustatymas

Priešpienio pH nustatytas naudojant (Inolab pH 720, Vokietija) pH matuoklį.

Priešpienio frakcijų baltymų kiekybinis nustatymas

Baltymų kiekis tiriamosiose priešpienio frakcijose buvo nustatytas Bradfordo metodu. Šis metodas pagrįstas baltymų sąveika su Bradfordo reagentu, kurio metu susidariusio komplekso šviesos absorbcija nustatoma spektrofotometriškai. Baltymo kiekis yra nustatomas pagal kalibracinę kreivę,

sudarytą naudojant standartinius jaučio serumo albumino tirpalus. Imama po 120 µl pagamintų skirtingų standartinių jaučio serumo albumino tirpalų ir sumaišoma su tokiu pat kiekiu Bradfordo reagento, laikoma 5 min 20° C temperatūroje. Praėjus nustatymam laikui, spektrofotometru pamatuojama absorbcija, esant 595 nm bangos ilgiui. Gauta kalibracinė baltymų kiekio nustatymo kreivė (šviesos sugerties priklausomybė nuo baltymo koncentracijos), pateikta 1 priede. Tiriamųjų baltymų frakcijos taip pat buvo paimama po 120µl ir sumaišoma su tokiu pat kiekiu Bradfordo reagento. Po 5 minučių vėl matuota absorbcija, esant 595 nm bangos ilgiui.

Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Siekiant nustatyti baltymų molekulinės masės, buvo atlikta natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio elektroforezė (NaDS – PAGE). Elektroforezėje naudotų buferių, gelių paruošimas aprašytas 2 priede.

Mėginių paruošimas. Apskaičiuojamas frakcijos kiekis, kuriame yra 40 µg baltymo 20 µl tūryje. Tiriamasis baltymų tirpalas praskiedžiamas santykiu 1:1 su 2× denatūruojančiu buferiu ir mišinys 5 min kaitinamas verdančio vandens vonelėje .

Elektroforezės eiga. Pirmiausia, paruošiamas 12 % koncentruojamasis gelis ir 5 % skiriamasis gelis. Elektroforezė atliekama vertikaliame elektroforezės aparate („TV200“, Scie-Plas). Prieš įleidžiant mėginius į gelio šulinėlius, iš gelio ištraukiamos šukos, o viršutinis ir apatinis aparato rezervuarai užpildomi elektroforezės buferiu. Į pirmą šulinėlį buvo įleidžiama 10 µl standarto. Kaip standartas naudojami žinomų molekulinė masių baltymai (Wide Range #S8445, dalelių dydis 6,500 – 200,000 Da). Elektroforezė atliekama, esant 200 V elektrinei įtampai, per gelį tekant 25 mA stiprio elektros srovei. Tyrimas vykdomas 90 minučių, kol mėginių bromfenolio dažo frontas pasiekia gelio apatinį kraštą. Po to srovės šaltinis išjungiamas, gelio plokštelė išimama iš buferio sistemos.

Gelio dažymas. Po elektroforezės poliakrilamido gelis dedamas į plastikinę vonelę ir fiksuojamas tvirtinimo tirpalu (25 % izopropilo alkoholio, 10 % acto rūgšties ir 65 % vandens). Po 60 min išpilamas baltymų tvirtinimo tirpalas ir užpilama Coomassie mėlio dažo tirpalas (10 % acto rūgšties, 0,006 % Coomassie mėlio G-250, 90 % vandens). Gelis dažomas apie 6 val. Dažų tirpalas išpilamas ir užpilama 10 % acto rūgštimi, kol iš gelio išsiplaus dažas.

Riebalų rūgščių nustatymas dujų chromatografija

Priešpienio riebalų rūgščių kiekybinė ir kokybinė analizė buvo atliekama dujiniu chromatografu (prietaisas „HRGC 5300 Mega Series“, „Carlo Erba“, Milanai, Italija) naudojant liepsnos jonizacinį detektorių (kolonėlė Restek RT – 2560, 100 m × 0,20 mm × 0,25 µm). Krosnies temperatūra

užprogramuota nuo 80° C (išlaikant 5 min) iki 240° C, 4° C/min greičiu, su galutiniu išlaikymu 30 min. Analizės sąlygos: įleidimo kameros temperatūra 220° C, liepsnos jonizacijos detektoriaus – 240° C, dujos nešėjos – helis. Rūgščių metilo esteriai identifikuoti pagal išlaikymo laikus, o procentinė riebalų rūgščių sudėtis apskaičiuota pikų plotus lyginant su standartiniais pikų plotais. Junginiams identifikuoti naudotas etaloninis 37 riebalų rūgščių mišinys (Supelco™ 37 Component FAME Mix (Sigma – Aldrich Co)).

Furjė transformacijos – artimųjų infraraudonųjų spindulių (FT – NIR) analizė

Priešpienio sausų miltelių bandiniai analizuoti FT-NIR analize. 10 g buvo įdedami į Petri lėkšteles, pašildomi iki 20° C temperatūros, pasiekus reikiamą temperatūrą lėkštelės dedamos į FT – NIR įrenginį. Analizėje buvo naudojamas MPA 122000 Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektrometras (Vokietija, Ettlingenas) su didelio jautrumo švino sulfido (PbS) detektoriumi, esant 8 cm⁻¹ rezoliucijai. Spektrai gauti 12800-3600 cm⁻¹ intervale ir išreikšti pagal absorbciją. Gauti rezultatai lyginami su prieš tai atliktomis kalibracinėmis kreivėmis. Analizuojami bandiniai matuoti 3 kartus po 6 bandinius.

2.3.2. Karvių priešpienio technologinis perdirbimas

Karvės priešpienis buvo perdirbiamas dviem būdais – laboratorinėmis sąlygomis ir pramoniniu būdu, naudojant mažo našumo technologinę gamybos liniją.

2.3.2.1. Karvių priešpienio perdirbimas laboratorinėmis sąlygomis

Priešpienio išrūgų baltymų frakcijos gamyba

Priešpienio išrūgų baltymų frakcijos gamybą galima suskirstyti į du etapus. Pirmiausia, yra pašalinami riebalai, vėliau iš gauto lieso priešpienio pašalinama kazeininė frakcija.

Riebalų frakcijos pašalinimas

Priešpienio bandiniai buvo centrifuguojami 30 min 10,000 × g esant 4° C temperatūrai (Centrifuga „Velocity 18R“, Londonas, Didžioji Britanija). Po centrifugavimo riebalai atsargiai nuimami, o likusi frakcija be riebalų toliau naudojama tyrimams.

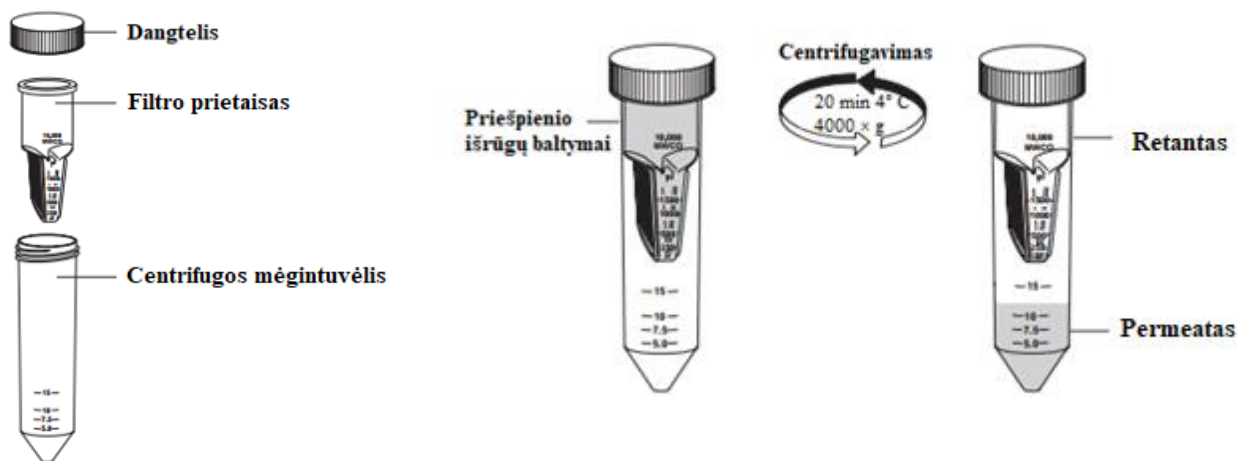
Kazeininės frakcijos pašalinimas

Kazeinas buvo pašalinamas pieno fermentinio traukinimo principu. Priešpienio fermentiniam traukinimui buvo naudojamas 1,5 % koncentracijos fermento chimozino vandeninis tirpalas. Priešpienis buvo traukinamas 33° C temperatūroje 40 min. Susidariusi fermentinė sutrauka (kazeino

frakcija) yra pjaustoma, išsiskiria išrūgos. Tirpi frakcija (išrūgos) yra atskiriamos nuo sutraukos ir toliau naudojamos tyrimams.

Priešpienio išrūgų retanto ir permeato frakcijų gavimas

Priešpienio išrūgų baltymų frakcijos buvo gautos ultrafiltravimo metodu. Ultrafiltracija buvo atliekama naudojant Amicon® Ultra-15 10K centrifugos filtro prietaisą (pavaizduotas 2.2. paveikslėlyje). Ultrafiltracijos procese buvo naudojama iš regeneruotos celiuliozės pagaminta 10 000 molekulinės masės ribinės vertės membrana (MWCO). Į centrifugos filtro prietaisą buvo įpilta 15 ml priešpienio išrūgų baltymų ir centrifuguojama 20 min $4000 \times g$ esant $4^{\circ} C$ temperatūrai. Po centrifugavimo susidarė dvi frakcijos – retantas ir permeatas. Retantas – tai baltymai, kurie nepaėjo pro membraną ir yra didesni nei 10 kDa. Permeatas – tai laktozė, mineralai, baltymai mažesni nei 10 kDa, kurie praėjo pro membraną. Abi frakcijos yra atskirai surenkamos ir užšaldomos ($-18^{\circ} C$ temperatūros) šaldiklyje.



2.3. pav. Amicon® Ultra-15 10K centrifugos filtro prietaisas: a) sudedamosios dalys; b) priešpienio išrūgų baltymų filtravimas

Liofilizacija

Sušaldyti priešpienio bandiniai buvo džiovinami liofilizuojant (sublimatorius „Zirbus sublimatos 3×4×5“, Bad Grund). Šiame procese vanduo iš priešpienio ir jo frakcijų yra išgarinamas panaudojant vakuumą. Sausi bandiniai iki analizės laikyti ($-18^{\circ}C$ temperatūroje) šaldiklyje

2.3.2.2. Karvių priešpienio perdirbimas pramoniniu būdu

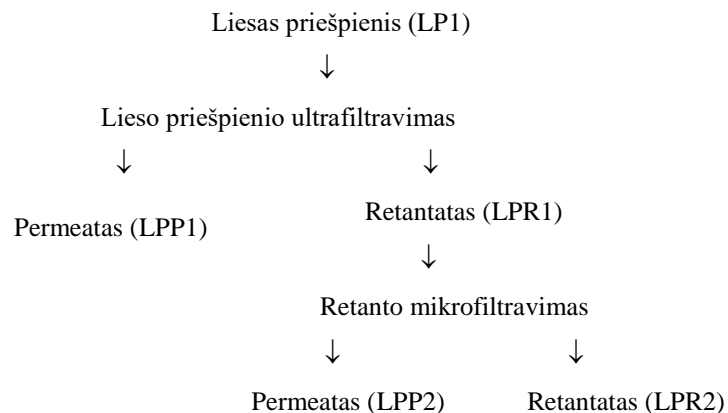
Priešpienio riebalų atskyrimas

Kaip klasikinis ir dažniausiai pieno pramonėje naudojamas metodas, taikytas riebalų atskyrimas separatoriumi (Milchzentrifuge FJ 125, MILKY, Austrija). Bandiniai prieš separavimą buvo pašildomi iki reikiamų temperatūrų gamintuve (MPV220-A BLEN, OMVE, Olandija). Priešpienis separuotas prie skirtingų temperatūrų: 35, 40, 45 ir 50 °C (įrenginio našumas: 40 l/val, o apsisukimų skaičius: 8500 min.⁻¹). Nuseparuotas priešpienis yra užšaldomas -18° C iki tolimesnio technologinio apdorojimo.

Priešpienio komponentų koncentravimo tyrimai

Naudojant mažo našumo membraninį filtravimo įrenginį (Alfa Laval Lab Unit M10, Nakskovas, Danija) vykdyti 2 procesai: ultrafiltracija ir mikrofiltracija. Membraninio filtravimo technologinio proceso schema yra pateikta 2.4. paveiksle, o mažo našumo membraninės filtracijos sistema pavaizduota 2.5. paveiksle.

Pirmiausiai liesas priešpienis (LP1) yra pašildomas gamintuve (MPV220-A BLEN, OMVE, Olandija) iki 50° C temperatūros, kad būtų nepalanki terpė daugintis mezofilinėms ir termofilinėms bakterijoms. Vėliau šioje temperatūroje vykdoma ultrafiltracija (3,5 bar slėgyje), naudojant polisulfonines 10 kDa membranas (GR81PP, Alfa Laval, Lund, Švedija). Bandinys sukonzentruojamas apie 50 %, proceso trukmė – 4 val. Po to bandiniai užšaldyti -18 °C temperatūroje iki tolimesnio technologinio apdorojimo. Po ultrafiltracijos gautas lieso priešpienio retantas (LPR1) gamintuve pašildomas iki 50 °C temperatūros ir yra mikrofiltruojamas (3 bar slėgyje), naudojant 1,4 μm polisulfonines membranas (FSMO, 45PP Alfa Laval, Lundas, Švedija).



2.4. pav. Priešpienio technologinio proceso schema.



2.5. pav. Priešpioenio frakcionavimas: a) priešpioenio ultrafiltravimas; b) ultrafiltrai; c) priešpioenio pašildymas; d) mikrofiltrai

Priešpioenio džiovinimo tyrimai

Priešpioenis bei jo skirtingos frakcijos buvo liofilizuotos sublimatoriuje. Siekiant optimizuoti bandinių džiovinimą, buvo keičiami skirtingi parametrai: slėgis nuo 50 iki 0,5 mbar; lėkštelių pašildymo temperatūra: 20 iki 40°C ir džiovinimo laikas: nuo 48 iki 24 val. Vėliau visi bandiniai buvo išdžiovinti sublimatoriuje, pagal gautus optimalius parametrus. Sausi bandiniai iki analizės laikyti (-18°C temperatūroje) šaldiklyje.

2.3.3. Karvių priešpioenio ir jo frakcijų savybių tyrimo metodai

Priešpioenio ir jo frakcijų antimikrobinio aktyvumo įvertinimas

Tiriamų priešpioenio frakcijų antibakterinis aktyvumas buvo ištirtas agaru difuziniu metodu [108]. Šiame tyrime naudotos bakterijos (*Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis*) buvo užaugintos LB (*Luria-Bertani*) terpėje. Petri lėkštelėse ant LB terpės buvo paskleidžiama po 50 µl bakterijų

suspensijos ir uždedami 6 sterilūs popieriniai diskeliai, ant kurių užlašinama po 25 µl tiriamosios frakcijos tirpalo. LB terpės paruošimas pateiktas 3 priede. Petri lėkštelės 24 val. laikomos 37° C temperatūroje, paskui matuojamas antibakterinio poveikio zonos dydis.

Priešpienio ir jo frakcijų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Karvės priešpienio frakcijų antioksidacinio aktyvumo įvertinimui buvo taikytas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) laisvųjų radikalų sujungimo metodas. DPPH laisvųjų radikalų sujungimas buvo nustatytas pagal modifikuotą Brand-Williams *ir kt.* (1995) metodą [109]. Pirmiausia tyrimui atlikti buvo paruoštas DPPH tirpalas. Tuo tikslu buvo atsverta 20 mg DPPH radikalo ir ištirpina 15 ml metanolio. Iš gauto tirpalo buvo paimta 1 ml ir dar praskiedžiama 29 ml metanolio. Tiriamasis tirpalas buvo ruošiamas mikrocentrifuginiame mėgintuvėlyje paimant 50 µl tiriamojo mėginio, įpilant ir sumaišant su 950 µl metanolinio DPPH tirpalo. Po 30 min mėginiai buvo centrifuguojami 5 min 8000 rpm. Skaidraus tirpalo absorbcija buvo išmatuota esant 515 nm bangos ilgiui. Kiekvieno bandinio matavimas pakartotas po tris kartus ir išreikšta šių verčių vidurkiu (± standartinė paklaida).

Laisvųjų radikalų sujungimas (%) apskaičiuotas pagal 2.3 formulę (%):

$$I = [1 - A_A / A_B] \times 100; \quad (2.3)$$

I – laisvųjų radikalų sujungimo aktyvumas, %;

A_A – tiriamojo tirpalo absorbcijos reikšmė

A_B – palyginamojo tirpalo absorbcijos reikšmė

Priešpienio ir jo frakcijų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

Antiradikaliniam aktyvumo įvertinimui buvo taikomas 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfono) rūgšties radikalo sujungimo metodas pagal Cosentino *ir kt.* [109]. Pirmiausia buvo pagaminamas pradinis ABTS tirpalas. Į tamsaus stiklo buteliuką suberiama 38 mg atsvertų ABTS miltelių ir jie ištirpinami 10 ml 2,45 mM natrio persulfato. Tirpalas gerai sumaišomas ir paliekamas tamsoje 16 val. Po 16 val. buvo ruošiamas darbinis tirpalas – 1 ml pradinio tirpalo praskiesta su 29 ml metanolio. Tiriamasis tirpalas buvo ruošiamas mikrocentrifuginiame mėgintuvėlyje paimant 20 µl tiriamojo mėginio, įpilant ir sumaišant su 980 µl metanolinio ABTS tirpalo. Po 2 val. mėginiai buvo centrifuguojami 5 min 8000 rpm. Skaidraus tirpalo absorbcija buvo išmatuota esant 734 nm bangos ilgiui. Laisvųjų radikalų sujungimas (%) apskaičiuotas pagal 2.3 formulę.

Riebalų oksidacinio stabilumo tyrimas oksipreso metodu

Priešpienio riebalų oksidacinis stabilumas nustatytas instrumentiniu oksipreso metodu (prietaisas „ML Oxipres“, „Mikrolab Aarhus A/S“, Hojbjerg, Danija). Šiuo metodu įvertinamas indukcinis periodas (IP, h), kuris parodo riebalų patvarumą oksidacijai, valandomis. Analizės sąlygos: 110° C temperatūroje, mėginio masė 8 g, esant 0,5 MPa deguonies slėgiui. Prietaisas automatiškai nubrėžia deguonies slėgio kitimo kreivę ir apskaičiuoja IP. Oksidacijos kinetikos kreivė ir indukcinio periodo nustatymo liestinės pateiktos 4 priede.

Priešpienio riebalų frakcijos fizikinių ir cheminių konstantų nustatymas

Peroksidų skaičiaus nustatymas

Priešpienio riebalų peroksidų skaičius nustatytas jodometrinio metodu. Peroksidų skaičius parodo riebalų oksidacijos laipsnį. Šio metodo esmė – rūgščioje aplinkoje esant peroksidų nuo kalio jodido atskykla laisvas jodas, kurio kiekis prilyginamas peroksidų kiekiui. Į 250 ml kolbą pasverta 3 g gryną riebalų. Į kolbutę su mėginiu buvo įpilta 10 ml chloroformo (CHCl₃), 15 ml ledinės acto rūgšties (CH₃COOH), 1 ml sotaus kalio jodido (50 – 60 % KJ) tirpalo. Tada kolbutė buvo užkemšama ir 5 min laikoma tamsoje (15 – 25° C.). Po to buvo įpilta 75 ml distiliuoto vandens ir keli lašai krakmolo tirpalo. Išsiskyręs jodas nutitruotas 0,01 N Na₂S₂O₃ tirpalu, kol išnyko mėlyna spalva.

Apmuilinimo skaičiaus nustatymas

Apmuilinimo skaičius apibūdina riebalų rūgščių vidutinę molekulinę masę. Kuo daugiau riebaluose mažos molekulinės masės riebalų rūgščių, tuo apmuilinimo skaičius didesnis. Į 250 ml apvaliadugnę kolbą pasverta 2 g gryną riebalų, kurie buvo užpilti 25 ml 0,5 N alkoholinio KOH. Kolba sujungta su grįžtamuju šaldytuvu buvo šildoma vandens vonelėje 1 val, kol buvo gautas homogeniškas, skaidrus tirpalas, be atskirų riebalų lašelių. Šarmo perteklius buvo nutitruotas 0,5 N HCl, kaip indikatorių naudojant fenolfaleiną.

Jodo skaičiaus nustatymas

Priešpienio riebalų jodo skaičius nustatytas greituoju metodu, naudojant spiritinį jodo tirpalą. Jodo skaičius apibūdina lipidų nesotumo laipsnį. Į 250 ml kolbą pasverta 0,4 g gryną riebalų įpilta 30 ml 96° stiprumo spirito, kolbutė užkimšta kamščiu ir šildyta iki 50° C temperatūros vandens vonelėje. Ištirpinti riebalai buvo atvėsinti iki kambario temperatūros, įpilta 25 ml 0,2 N alkoholinio jodo tirpalo bei 200 ml 20° C distiliuoto vandens, užkimšta kamščiu ir gerai suplakta. Po 5 min tirpalas buvo nutitruotas 0,1 N natrio tiosulfato, kaip indikatorių naudojant 1 % krakmolą.

2.3.4. Rezultatų statistinė analizė

Eksperimentiniai duomenys įvertinti statistiškai, naudojant Microsoft Office Excel (Microsoft, JAV). Visi eksperimentai pakartoti po tris kartus ir išreikšti aritmetiniu vidurkiu \pm standartinė paklaida.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Karvių priešpienis, jo cheminė sudėtis ir savybės

Karvių priešpienis yra žaliava, kurioje gausu įvairiausių biologiškai aktyvių komponentų [1]. Jų išskyrimas ir panaudojimas maisto pramonėje, biotechnologijose ar farmacijoje yra daug žadantis ir perspektyvus, tačiau reikalaujantis daug mokslinių tyrimų ir didelių ekonominių investicijų, skirtų tų junginių išgryninimui. Pirmiausia, tyrimuose buvo susipažinta su karvės priešpieniu, kaip pradine žaliava. Vėliau bioaktyvių komponentų paieška atlikta iš karvių priešpienio, išskiriant atskiras frakcijas ir įvertinat jų savybes. Pasirinkta keletas būdų, kurie detaliau aprašyti skyriuje 2.3. Tyrimų metodai. Šiame darbe iš karvės priešpienio laboratorinėmis sąlygomis išskirtos 6 frakcijos – liesas priešpienis (LP), priešpienio riebalai (PR), priešpienio kazeininė frakcija (PKF), priešpienio išrūgų baltymai (PIB), priešpienio išrūgų retantas (PIR) ir permeatas (PIP).

Pirmiausiai buvo įvertinti gautų priešpienio mėginių kokybės rodikliai: spalva, kvapas, konsistencija ir temperatūra. Karvių priešpienio mėginiai pavaizduoti 3.1. paveikslėlyje. Gauti priešpienio mėginių kokybės rezultatai pateikti 3.1. lentelėje.

Nustatyta, kad pristatyto priešpienio mėginiai buvo kokybiški ir tinkami tolimesniam technologiniam perdirbimui. Karvių priešpienio spalva ir konsistencija yra pirminiai kintantys rodikliai, nurodantys priešpienio kokybę [110]. Todėl, pirmiausia, būtina įvertinti karvių priešpienio vizualines savybes. Kuo priešpienis yra klampesnis bei intensyvesnės geltonos spalvos, manoma, kad tuo labiau priešpienis savo sudėtyje turi daugiau baltymų ir riebalų. Netinkamas tolimesniam naudojimui priešpienis būna balsvos spalvos bei vandeningas [111]. Priešpienio spalvą lemia jame esantys karotenoidai. Calderon ir bendraautoriai nustatė, kad karoteinodų – liuteino, trans β -karoteno ir cis-13 β -karoteno, koncentracija priešpienyje pirmosiomis dienomis randama didžiausia. Karvių priešpienyje β -karoteno randama apie 0,68 $\mu\text{g/g}$, o piene – 0,2 $\mu\text{g/g}$ [58].



3.1. pav. Karvės priešpienio mėginiai

3.1. lentelė. Priešpienio kokybės rodikliai

Rodiklio pavadinimas	Apibrėžimas
Spalva	Intensyviai geltonos spalvos
Kvapas	Savito kvapo, būdingo priešpieniui
Konsistencija	Tirštas, tąsus, vienalytis, be gleivių ir nuosėdų
Temperatūra	Priešpienio temperatūra perdavimo metu – ne aukštesnė nei 3 ± 1 °C

Karvių priešpienio cheminė sudėtis labai priklauso nuo keleta veiksnių: karvės veislės, individo, genetikos, amžiaus, mitybos, veršiavimosi sezoniškumo bei priešpienio surinkimo laiko [112, 113]. Šiame darbe karvių priešpienio cheminė sudėtis buvo nustatyta panaudojant metodus, aprašytus 2.3.1. skyrelyje. Karvės priešpienio cheminės sudėties rezultatai pateikti 3.2. lentelėje.

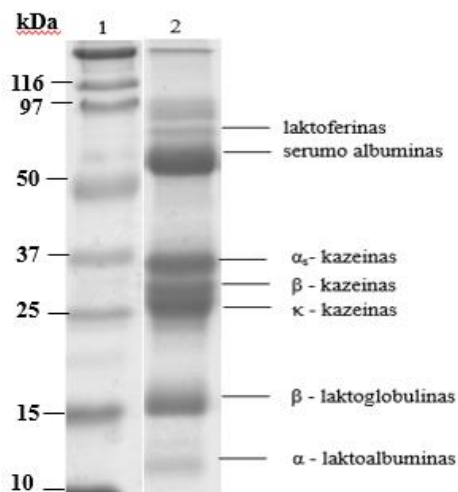
Šiame darbe analizuoti karvių priešpienio mėginiai buvo surinkti lapkričio mėn. per pirmąsias 24 valandas po veršiavimosi. Pirmos dienos karvės priešpienyje nustatytas du kartus didesnis sausųjų medžiagų kiekis, pusantro karto daugiau riebalų bei pusantro karto daugiau mineralinių medžiagų negu piene. Karvių priešpienis turi penkis kartus daugiau baltymų (21 %) lyginant su pienu. Priešpienyje nustatyta daugiau laktoglobulinų, laktoalbuminų, imunoglobulinų, fermentų, hormonų, laktoferino, augimo faktorių negu piene [34]. Karvės priešpienyje laktozės koncentracija randama du kartus mažesnė nei piene. Priešpienyje, surinktam per pirmąsias 24 valandas po veršiavimosi, laktozės koncentracija randama apie 2,77 %, o penktą dieną po veršiavimosi padidėja iki 4,27 % [113].

3.2. lentelė. Karvės priešpienio cheminė sudėtis

Rodiklis	Priešpienis
Sausosios medžiagos, %	27,43±1,61
Riebalai, %	7,05±0,19
Baltymai, %	15,10±0,56
Laktozė, %	2,96±0,21
Mineralinės medžiagos, %	1,12±0,08
Rūgštumas, °T	45±0,13
pH	6±0,07
Tankis, g/cm ³	1,061±0,1
Drėgmė, %	72,57±1,58

Karvių priešpienyje buvo nustatytas 3 % didesnis tankis nei piene. Strekozov ir bendraautoriai nustatė, kad karvių priešpienio tankis varijuoja nuo 1,054 iki 1,072 g/cm³ [114]. Titruojamasis rūgštingumas karvių priešpienyje buvo nustatytas 2,5 karto didesnis nei piene. Tai sutampa ir su kitų autorių atliktais tyrimais [16, 115]. Nardone ir bendraautoriai nustatė, jog didesnis titruojamojo rūgštingumo skaičius priešpienyje nei piene yra dėl didelio baltymų kiekio [116]. Karvės priešpienyje pH vertės varijuoja nuo 6,0 iki 6,61 [117]. Manoma, kad karvės priešpienio pH vertė yra žemesnė nei pieno (pieno pH = 6,4) dėl priešpienyje padidėjusio baltymų kiekio, citratų ir anglies dioksido [8]. Lyginant gautus karvių priešpienio cheminės analizės rezultatus su Pensilvanijos mokslininkų pateiktais duomenimis, gauti rezultatai mažai skyrėsi [58]. Pagal cheminės analizės duomenis galima nuspręsti, kurią dieną surinktas priešpienis, kadangi didžiausia pagrindinių junginių (baltymų, riebalų, mineralinių medžiagų) koncentracija nustatoma pirmos dienos priešpienyje, o mažiausia – 7-tos dienos. Mokslininkai nustatė, kad karvės priešpienyje sausųjų medžiagų, baltymų, riebalų ir mineralų kiekis didžiausias būna vasaros sezonu, o mažiausias žiemos sezonu [113]. Priešpienio cheminės sudėties analizę svarbu atlikti, kadangi tai padeda labiau įvertinti šios žaliavos biologines funkcijas.

Siekiant identifikuoti karvės priešpienyje esančius baltymus buvo atliekama elektroforezė. Rezultatai pateikti 3.2. paveikslėlyje.



3.2. pav. Karvės priešpienio elektroforezė: 1) standartas; 2) priešpienis

Karvės priešpienyje buvo identifikuoti 7 junginiai: α-laktoalbuminas (14,2 kDa), β-laktoglobulinas (18,4 kDa), α_s-kazeinas (30 kDa), β-kazeinas (27 kDa), κ-kazeinas (25 kDa), jaučio serumo albuminas (66,3 kDa) ir laktoferinas (80 kDa). Pagal juostelės ryškumą labiausiai buvo išreikšti jaučio serumo albuminas, kazeinas ir β-laktoglobulinas. Karvės priešpienio baltymų sudėtis

sutampa su kitų autorių publikuojamais straipsniais [22,118]. Ožkos priešpienyje buvo identifikuota β -galaktosidazė (116,000Da), lizocimas (14,300 Da) [119].

3.2. Karvių priešpienio riebalų ir lieso priešpienio frakcijų cheminė sudėtis ir savybės

Priešpienio riebalų (PR) ir lieso priešpienio (LP) frakcijos buvo gautos centrifugavimo būdu iš karvės priešpienio.

Pastaruoju metu mokslininkai daug dėmesio skiria PR dėl juose esančių tam tikrų biologiškai aktyvių junginių [120]. Todėl buvo nuspręsta atskirti riebalų frakciją iš karvių priešpienio ir ištirti jų sudėtį bei savybes ir įvertinti šaldymo (laikymo) įtaką riebalams po metų. Pirmiausia, buvo įvertinta PR cheminė sudėtis, kurios rezultatai pateikti 3.3. lentelėje.

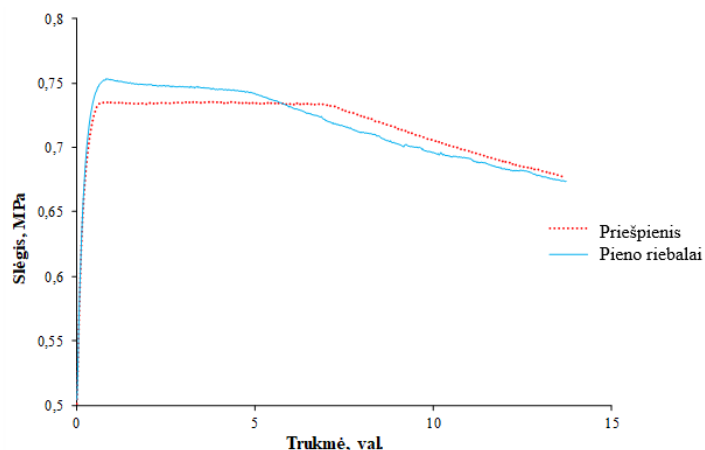
3.3. lentelė. Priešpienio riebalų cheminė sudėtis

Nr.	Rodiklis	Priešpienis
1.	Baltymų kiekis, %	5,28±0,28
2.	Riebalų kiekis, %	72,17±0,29

Analogiškos cheminės analizės su PR nebuvo atlikta, tačiau lyginant su sviestu, PR buvo randama 12 % daugiau baltymų ir 15 % mažiau riebalų [121].

Laikant ar apdorojant išskirtus riebalus, gali įvykti įvairūs pokyčiai – pakinta jų cheminė sudėtis, vyksta jų oksidacija, ko pasekoje pablogėja skonis bei kvapas [122]. Todėl pirmiausiai buvo nuspręsta įvertinti PR oksidacinį stabilumą bei palyginti su pieno riebalais. Priešpienio ir pieno riebalų patvarumas oksidacijai vertintas oksipreso metodu ekstremaliai aukštoje temperatūroje (110 ° C), aprašytu 2.3.3. skyrelyje. Tyrimų rezultatai parodyti 3.3. paveikslėlyje.

Didesniu oksidaciniu stabilumu pasižymėjo PR nei pieno riebalai, nes indukcinio periodo vertė buvo didesnė (PR indukcinis periodas – 6,42 ± 0,27 h, o pieno riebalų – 4,58 ± 0,06 h). Manoma, kad aukštas oksidacinis stabilumas priklauso nuo oleino/linolo riebalų rūgščių santykio riebaluose [123]. Tačiau kitų autorių publikuojamais straipsniais nustatyta, jog sunku sieti ryšį tarp riebalų rūgščių sudėties ir oksidacinio stabilumo [124]. Taip pat įvertinta, kad riebalai, turintys identišką riebalų rūgščių sudėtį, gali radikaliai skirtis oksidaciniu stabilumu [125].



3.3. pav. Priešpienio ir pieno riebalų oksidacinis stabilumas oksipreso metodu

Manoma, kad priešpienyje bioaktyvios medžiagos, pasižyminčios antioksidacinėmis savybėmis, didina indukcinį periodą ir apsaugo nesočiąsias riebalų rūgštis nuo oksidacijos [126]. Priešpienyje randama riebaluose tirpių biologiškai aktyvių komponentų, tokių kaip α -tokoferolių, kurių randama apie 2,92 $\mu\text{g/g}$, o piene 0,7 $\mu\text{g/g}$ [58,127]. Taip pat priešpienyje aptinkama stiprių antioksidaciniu poveikiu pasižyminčių fermentų (superoksido dismutazė, laktoperoksidazė, glutationo peroksidazė bei katalazė) bei vitamino C, kurių koncentracija didesnė negu piene [8,46]. Apžvelgus literatūrą, nebuvo rasta atliktų analogiškų tyrimų su PR.

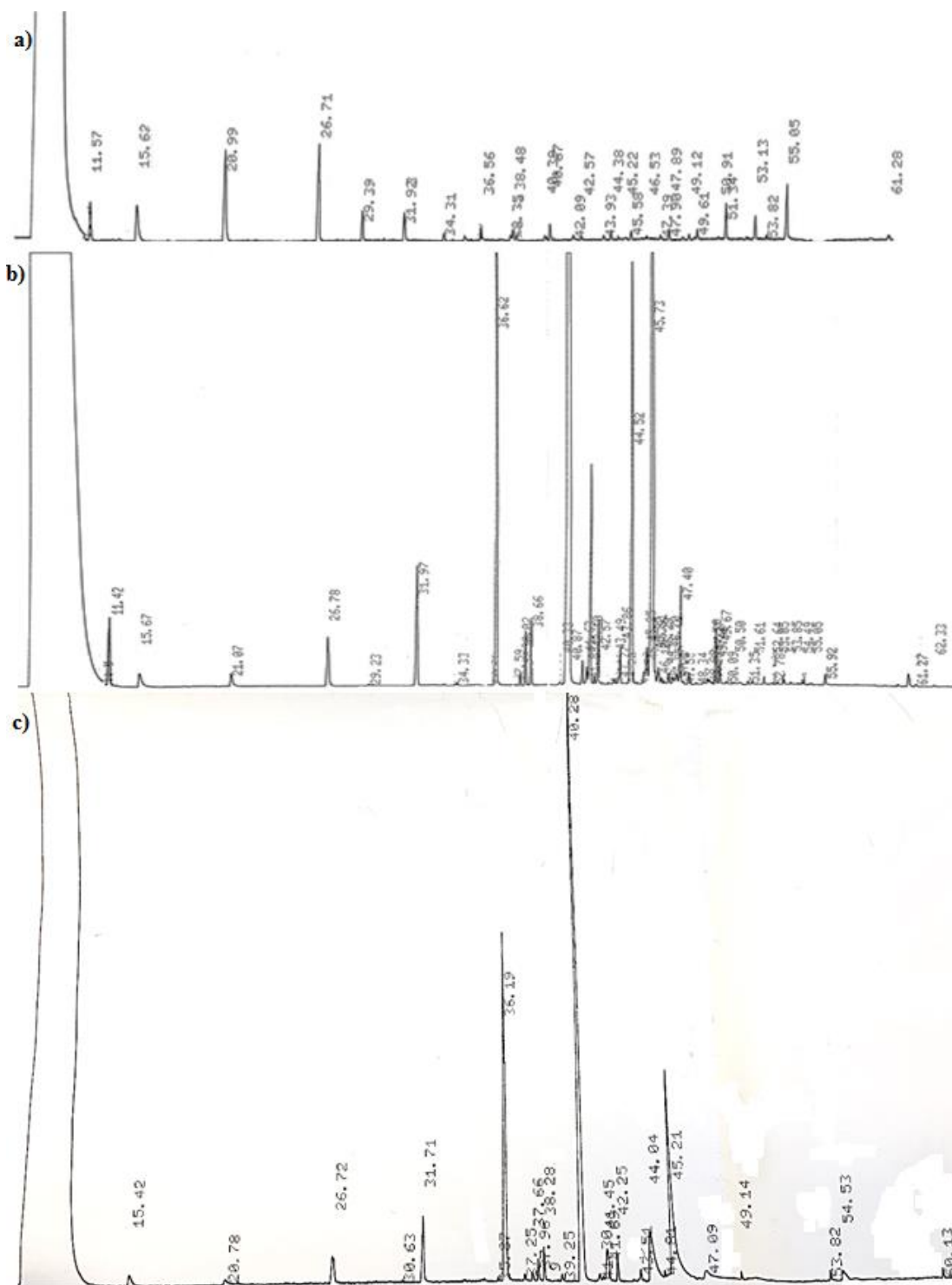
Įvertinus, jog PR pasižymi didesniu oksidaciniu stabilumu, siekėme identifikuoti PR rūgčių sudėtį ir kiekį. Riebalų rūgščių sudėtis ir kiekis priešpienyje buvo nustatytas dujų chromatografija su liepsnos jonizuojančiu detektoriumi, aprašytu 2.3.1. skyrelyje. Gautos standartinė ir šviežių PR chromatogramos pateiktos 3.4. (a ir b) paveiksle, o apskaičiuoti riebalų rūgščių kiekiai procentais pateikti 3.4. lentelėje.

Šviežiose PR nustatyta, kad daugiausiai priešpienyje randama sočiųjų riebalų rūgščių (68,21 %), iš kurių gausiausiai aptinkama palmitino (42,98 %), miristo (10,99 %), stearino (7,79 %). Nesočiųjų riebalų rūgščių buvo randama 29,12 %, iš kurių mononesočiosios riebalų rūgštys sudarė 26,44 %, o polinesočiosios 2,68 %. Iš mononesočiųjų riebalų rūgščių labiausiai dominavo oleino (20,89%) ir palmitoleino (3,39 %), iš polinesočiųjų - linolo (1,41 %) rūgštis. Taip pat PR buvo aptikta omega-3 riebalų rūgštys – eikozapentaeno ir dokozeheksaeno. Lyginant su karvės pieno riebalais, pieno riebaluose randama 6 % daugiau sočiųjų riebalų rūgščių, 8 % mažiau mononesočiųjų riebalų rūgščių ir 1,5 % mažiau polinesočiųjų riebalų rūgščių [121,128]. Iš sočiųjų riebalų rūgščių pieno riebaluose taip pat daugiausiai vyravo palmitino rūgštis, tačiau nustatyta pusantro karto mažesnė koncentracija. Pieno riebaluose rasta didesni kiekiai palmitoleino (1,6 %) bei linolo (2,1 %) rūgšties. Nustatyta, kad

riebalų cheminei sudėčiai daugiausiai įtakos daro karvės mityba bei sezoniškumas. Įvertinta, jog vasaros metu sočiųjų riebalų kiekis riebaluose būna mažesnis, kuomet karvės ganosi, o žiemą didesnis. Priešingai, nesočiųjų riebalų rūgščių vasarą aptinkama didesnėmis koncentracijomis. Karvės PR riebalų sudėtis sutampa su kitų autorių publikuojamais straipsniais [129, 130]

Laikymo sąlygos yra vienas iš pagrindinių aspektų, lemiančių lipidų kitimą. Siekiant labiau suprasti PR savybes, PR buvo užšaldyti ir po metų pakartota riebalų rūgščių sudėties analizė (žr. 3.5. pav c) chromatogramoje). Po vienerių metų šaldymo, daugiausiai iš sočiųjų riebalų rūgščių buvo aptinkama palmitino (43,94 %), miristo (14,20 %), iš mononesočiųjų – oleino (18,87 %), polinesočiųjų – linolo (0,85 %) rūgštis. Lyginat su šviežių PR, po metų nebuvo aptikta nesočiųjų riebalų rūgščių – elaido, linolelaidino, α -linoleno. Iš sočiųjų – nebuvo aptikta butano, pentadekano, eikozano. Laisvųjų riebalų rūgščių kiekis padidėjo, kas rodo lipidų hidrolizę. Nustatyta, kad lipidų hidrolizė prasideda anksčiau nei oksidacija dėl riebaluose esančio didelio kiekio vandens, hidrolizuojančių fermentų, mikrobinių faktorių. Oksidacija mažesnė, kadangi šaldant mažiau riebalai reaguoja su šviesa bei atmosferiniu deguonimi. Nesočiosios riebalų rūgštys oksiduojasi greičiau lyginant su sočiosiomis riebalų rūgštimis. Analogiški tyrimai buvo atlikti su pieno riebalais, kuriuose buvo nustatyta, jog po metų šaldymo sumažėja nesočiųjų riebalų rūgščių koncentracija, padidėja sočiųjų riebalų rūgščių kiekis ir išvis neaptinkama butano rūgštis [121].

Šaldymas yra vienas iš efektyviausių natūralių būdų, prailginančių produkto vartojimo laiką ir apsaugančių nuo bakterinio užteršimo. Tačiau šaldant dažniausiai įvyksta lipidų pokyčiai – jų oksidacija ir hidrolizė. Lipidų oksidacija šaldymo metu priklauso nuo riebalų rūgščių sotumo laipsnio, deguonies poveikio, šaldymo temperatūros bei šaldymo trukmės [131]. Šaldymo metu dažniausiai pakinta riebalų spalva, kvapas, konsistensija, prarandama mitybinė vertė (pakinta riebalų rūgščių struktūra) [132]. Ilgos grandinės polinesočiosios riebalų rūgštys, esančios priešpienyje, yra svarbios nervų sistemos bei imuninės sistemos vystimuisi [128]. Taip pat priešpienyje aptinkama konjuguotos linolo rūgštis, kuri pasižymi priešvėžinėmis ir antisklerotinėmis savybėmis [133].



3.4.pav. Standartinių riebalų rūgščių kiekio (a), šviežių priešpienio riebalų (b) ir priešpienio riebalų po metų (c) analizės chromatogramos

3.4. lentelė. Riebalų rūgščių sudėtis ir kiekis prieš ir po vienerių metų

Riebalų rūgštys	Išėjimo laikas, min	Kiekis, %	
		Prieš metus	Po metų
Sviesto (C4:0)	11,57	0,82±0,06	-
Kaprono (C6:0)	15,62	0,48±0,03	0,911±0,05
Kaprilo (C8:0)	20,99	0,33±0,02	0,311±0,06
Kaprino (C10:0)	26,71	0,89±0,007	1,841±0,04
Undekano (C11:0)	29,39	0,02±0,001	0,055±0,004
Lauro (C12:0)	31,92	1,67±0,02	2,933±0,05
Tridekano (C13:0)	34,31	0,04±0,002	0,071±0,01
Miristo (C14:0)	36,56	10,99±0,07	14,20±0,07
Miristoleino (C14:1)	38,35	0,67±0,02	1,14±0,01
Pentadekano (C15:0)	38,48	0,80±0,46	-
cis-10-pentadekeno (C15:1)	40,39	0,17±0,02	0,306±0,05
Palmitino (C16:0)	40,67	42,98±0,23	43,94±0,32
Palmitoleino (C16:1)	42,09	3,39±0,06	2,642±0,04
Heptadekano (C17:0)	42,57	0,82±0,003	0,924±0,08
cis-10-heptadekano (C17:1)	43,93	0,47±0,07	0,314±0,18
Stearino (C18:0)	44,38	7,79±0,13	7,187±0,09
Elaido (C18:1n9t)	45,22	0,84±0,16	-
Oleino rūgštis (C18:1n9c)	45,58	20,89±0,36	18,87±0,31
Linolelaidino (C18:2n6t)	46,53	0,16±0,02	-
Linolo (C18:2n6c)	47,39	1,41±0,03	0,85±0,32
Eikozano (C20:0)	47,89	0,15±0,01	-
α-linolenų (C18:3n3)	49,61	0,75±0,01	-
Heneikozano (C21:0)	49,67	0,29±0,004	0,192±0,01
Trikozano (C23:0)	53,82	0,13±0,006	0,25±0,004
cis-5,8,11,14,17-eikozapentaeno (C20:5n3)	55,66	0,15±0,006	0,651±0,14
cis-4,7,10,13,16,19-dokozeheksaeno (C22:6n3)	61,28	0,21±0,08	0,369±0,04
Sočiųjų riebalų rūgščių kiekis		68,21±0,22	72,83±0,34
Mononesočiųjų riebalų rūgščių kiekis		26,44±0,49	23,27±0,26
Polinesočiųjų riebalų rūgščių kiekis		2,68±0,07	1,87±0,05
Bendras kiekis		97,32±0,41	97,97±0,52

Siekiant įvertinti priešpienio riebalų savybes, buvo nustatytos šviežių riebalų cheminės konstantos bei PR, po metų šaldymo. Gauti tyrimų rezultatai pateikti 3.5. lentelėje.

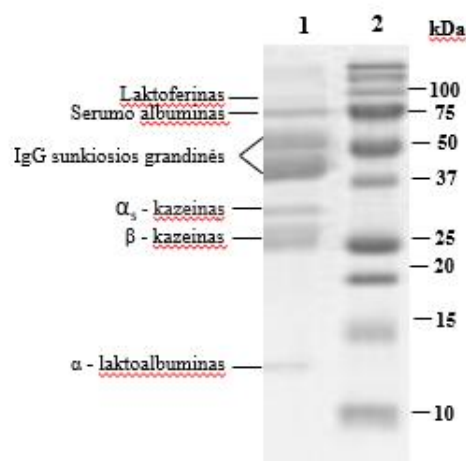
3.5. lentelė. Priešpienio riebalų savybės

Nr.	Rodiklis	Vertės	
		Prieš metus	Po metų
1.	Peroksidų skaičius, mekv/kg	-	0,126±0,13
2.	Apmuulinimo skaičius, mg/g	225,81±0,81	233,27±0,36
3.	Jodo skaičius, g/100 g	33,42±0,18	0,82±0,25

Šviežiuose PR peroksidų nebuvo aptikta, tai leidžia patvirtinti, kad riebalai buvo švieži. Nustatyta, jog ilgėjant laktacijos trukmei, jodo skaičius mažėja, o apmuulinimo skaičius didėja [92,129]. Įvertinus PR pokyčius po metų šaldymo, nustatyta, kad didžioji dalis PR esančių nesočiųjų riebalų rūgščių oksidavosi (jodo skaičius sumažėjo net 40 kartų). Padidėjęs apmuulinimo skaičius, nusako, jog PR yra prasidėjusi hidrolizė, kadangi padidėjo mažos molekulinės masės riebalų rūgščių. Peroksidų skaičius nežymiai padidėjęs, kas leidžia spręsti jog susidarė pirminiai oksidacijos produktai.

Lieso priešpienio frakcija

Siekiant įvertinti, kaip pakito lieso priešpienio (LP) baltymų sudėtis pašalinus riebalus, buvo atliekama elektroforezė. LP elektroforezės rezultatai pateikti 3.5. paveikslėlyje.



3.5. pav. Lieso priešpienio elektroforezė: 1) liesas priešpienis; 2) standartas

LP buvo identifikuoti 6 junginiai: α -laktoalbuminas, IgG sunkiosios grandinės (50 kDa), α_s -kazeinas, β -kazeinas, jaučio serumo albuminas, laktoferinas. Pagal juostelės ryškumą labiausiai buvo

išreikšta IgG sunkiosios grandinės, kurių nebuvo identifikuota karvės priešpienyje. Analogiškų tyrimų su karvės lieso priešpienio frakcija nebuvo atlikta.

3.3. Karvių priešpienio išrūgų baltymai ir jų atskyrimas taikant biotechnologinius būdus

Siekiant išgauti karvių priešpienio išrūgų baltymus (PIB), pirmiausia, buvo pašalinama priešpienio kazeininė frakcija (PKF) fermentiniu būdu, aprašytu 2.3.2. skyrelyje. PKF, kaip šalutinis produktas, pavaizduota 3.6. paveikslėlyje. Atskirti priešpienyje esančius kazeininius baltymus yra pagrįsta, kadangi serume yra daugiausia vertingų bioaktyvių junginių. Taip pat yra mažai įrodymų dėl išskirtinių PKF savybių [134].

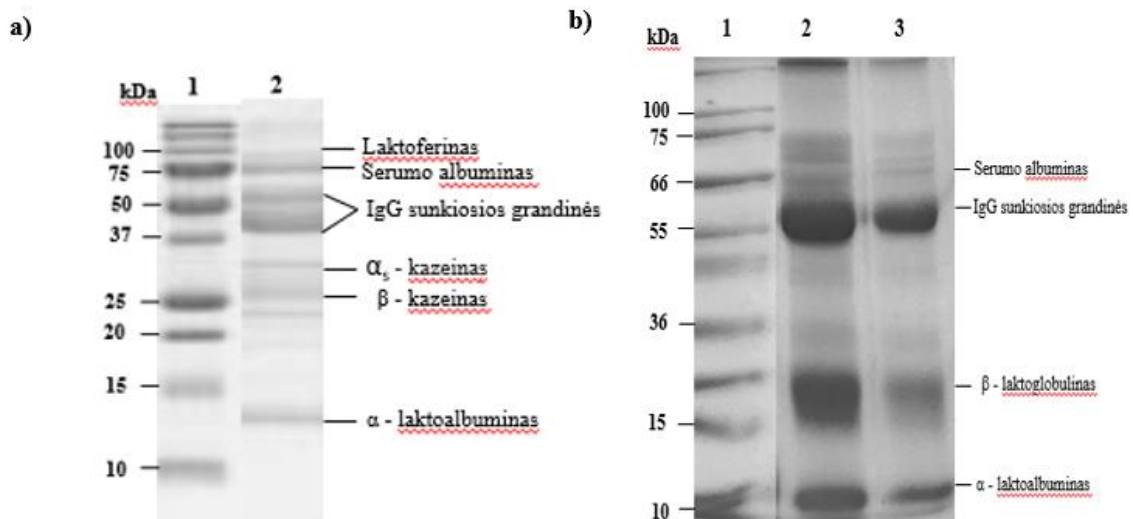


3.6. pav. Pieno (kairėje) ir priešpienio (dešinėje) kazeininė frakcija

Karvių priešpienio išrūgų baltymų frakcijos elektroforezės rezultatai pateikti 3.7. (a) paveikslėlyje. Karvių PIB sudėtis nesiskyrė nuo lieso priešpienio baltymų sudėties, tačiau juostelių ryškumas buvo mažesnio intensyvumo. Tai sutampa ir su kitų autorių publikuojamais rezultatais [3, 22,118]. Pagrindiniai karvių priešpienio išrūguose randami baltymai – α -laktoalbuminas (15-20 %) ir β -laktoglobulinas (55-65 %). Mažesniais kiekiais randami imunoglobulinai (9 %), jaučio serumo albuminas (5,5 %), laktoferinas, fermentai [98]. Nors kazeinas buvo pašalintas naudojant fermentą chimoziną, tačiau iš elektroforezės rezultatų matyti, kad kazeinas pilnai nepasišalino. Užsienio mokslininkų priešpienio elektroforezės rezultatai taip pat patvirtina, kad kazeinas visiškai pilnai neeliminuojamas, šalinant tiek rūgštiniu, tiek fermentiniu būdu [22].

Karvės PIB buvo frakcionuojami ultrafiltravimo metodu, aprašytu 2.3.2.1. skyrelyje. Po ultrafiltravimo buvo gautos dvi frakcijos - priešpienio išrūgų retantas (PIR) ir permeatas (PIP). Karvės PIR (>10 kDa) ir PIP (<10 kDa) elektroforezė pateikta 3.7. (b) paveikslėlyje. Abiejuose frakcijose buvo identifikuoti 4 junginiai: α -laktoalbuminas, β -laktoglobulinas IgG sunkiosios grandinės ir jaučio serumo albuminas. Iš gautų rezultatų matyti, kad retanto ir permeato baltymų sudėtis visiškai

nesiskiria, tačiau retante yra didesnis baltymų kiekis. Permeate teoriškai turėtų būti baltymai mažesni nei 10 kDa, tačiau rezultatai rodo, kad perėjo per membraną ir baltymai didesni nei 10 kDa. Retante turėtų būti aptinkama imunoglobulinai, serumo albuminas, α -laktoalbuminas, β -laktoglobulinas, laktoperoksidazė, laktoferinas. Tuo tarpu permeate – glikomakropeptidas (8 kDa), vitaminai, mineralai, laktozė. Vienas iš pagrindinių veiksnių, lemiančių sėkmingą ultrafiltracijos procesą, yra membranos vientisumas, integralumas. Prastos kokybės ultrafiltracinė membrana galbūt galėjo lemti baltymų, didesnių nei 10 kDa, perėjimą per membraną.



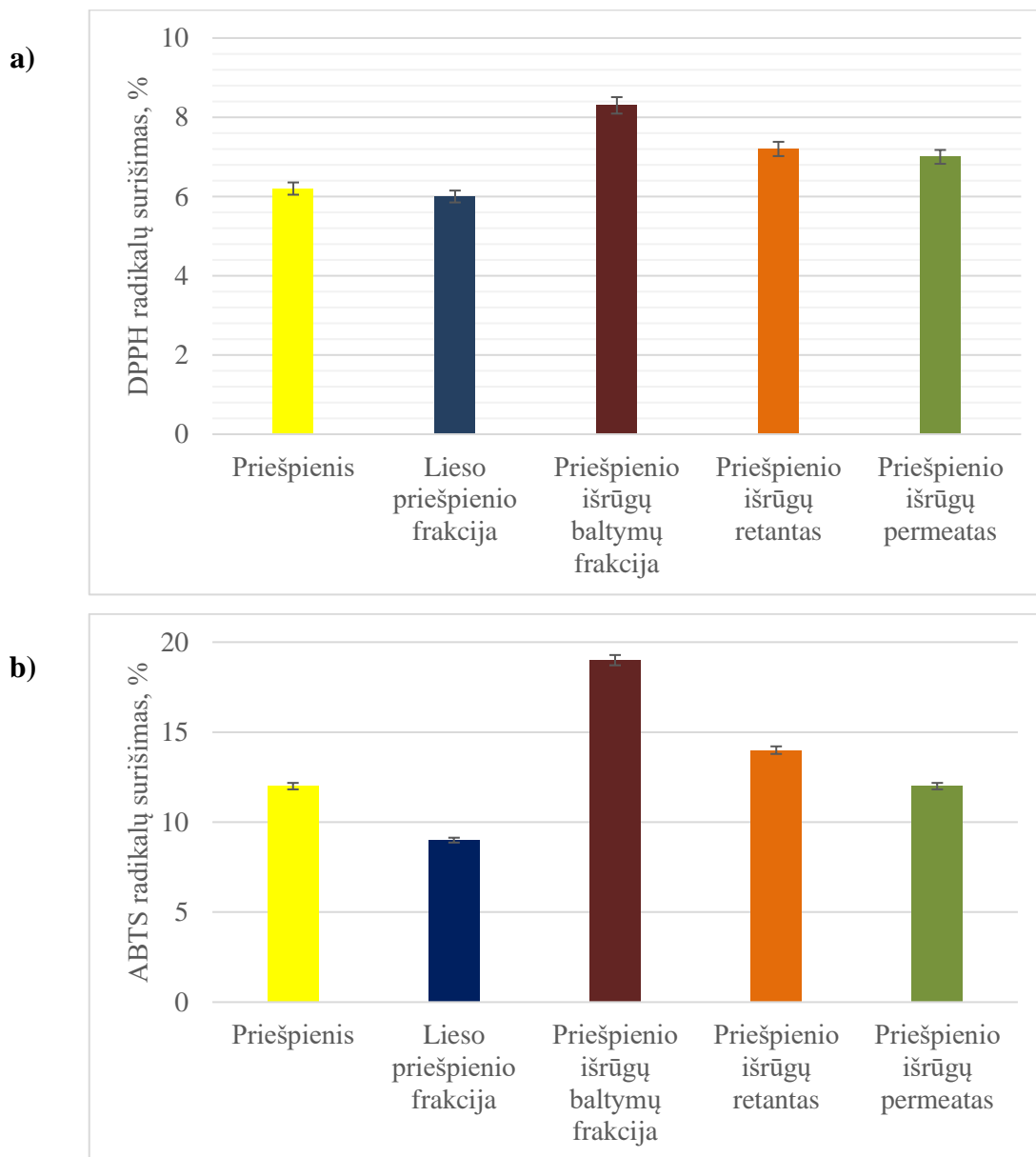
3.7. pav. Karvių priešpienio frakcijų elektroforezė: a) Priešpienio išrūgų baltymų elektroforezė: 1) standartas; 2) priešpienio išrūgų baltymų frakcija; b) Permeato ir retanto elektroforezė: 1) standartas; 2) retantas; 3) permeatas

3.4. Karvių priešpienio frakcijų antioksidacinės ir antimikrobinės savybės

Naudojant tik vieną antioksidacinio aktyvumo įvertinimo metodą būtų sunku detalai nustatyti karvės priešpienio ir jo frakcijų antioksidacinį aktyvumą. Siekiant tiksliau įvertinti priešpienio ir jo frakcijų aktyvumą, buvo pasirinkti du metodai – DPPH ir ABTS antiradikaliniai metodai, kurie vertina gebėjimą surišti laisvuosius radikalus.

Užsienio mokslininkų atlikti tyrimai patvirtina, kad priešpienis ir jo frakcijos yra svarbūs kaip antioksidacinių medžiagų šaltiniai [62,63]. DPPH laisvųjų radikalų surišimo rezultatai karvių priešpienyje ir jo frakcijose pateikti 3.8. (a) paveikslėlyje. Karvių priešpienio ir jo frakcijų laisvųjų radikalų surišimo aktyvumas varijavo labai siaurose ribose: nuo 6% iki 8,3%. Didžiausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas karvių PIB (8,3%), mažiausias – LP (6%). Lyginant su kitų mokslininkų duomenimis DPPH radikalų surišimo geba karvių priešpienyje buvo nustatyta 50 % \pm 8,2 [135], moters priešpienyje – 50,4 % \pm 19,7 [136], asilės priešpienyje – 62,76 % \pm 7,84 [109].

Išanalizavus literatūrą ir šiame darbe gautus antioksidacinio įvertinimo rezultatus, galima daryti išvadą, kad karvės priešpienis ir jo frakcijos nepasižymėjo antioksidaciniu aktyvumu, kadangi antioksidacinio aktyvumo geba buvo gauta labai maža. Karvių priešpienio sudėtis ir savybės labai priklauso nuo genetikos, mitybos, auginimo sąlygų. Kaip keliamos hipotezės, kodėl karvių priešpienis ir jo frakcijos nepasižymėjo antioksidaciniu aktyvumu – tyrimų metu, perdirbant priešpienį, buvo prarastos biologiškai aktyvios medžiagos, pasižyminčios antioksidacinėmis savybėmis.



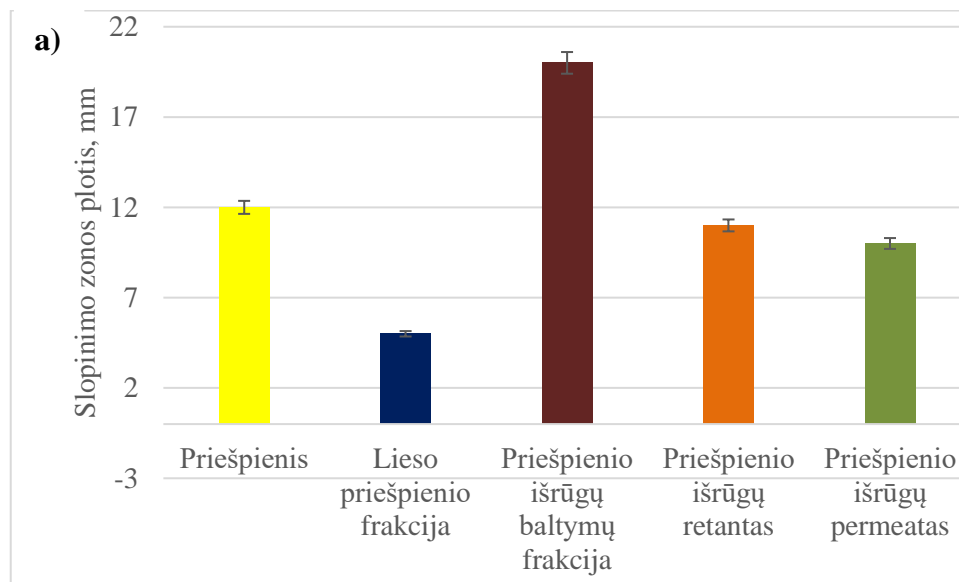
3.8.pav. Antioksidacinio poveikio nustatymas: a) DPPH metodu; b) ABTS metodu

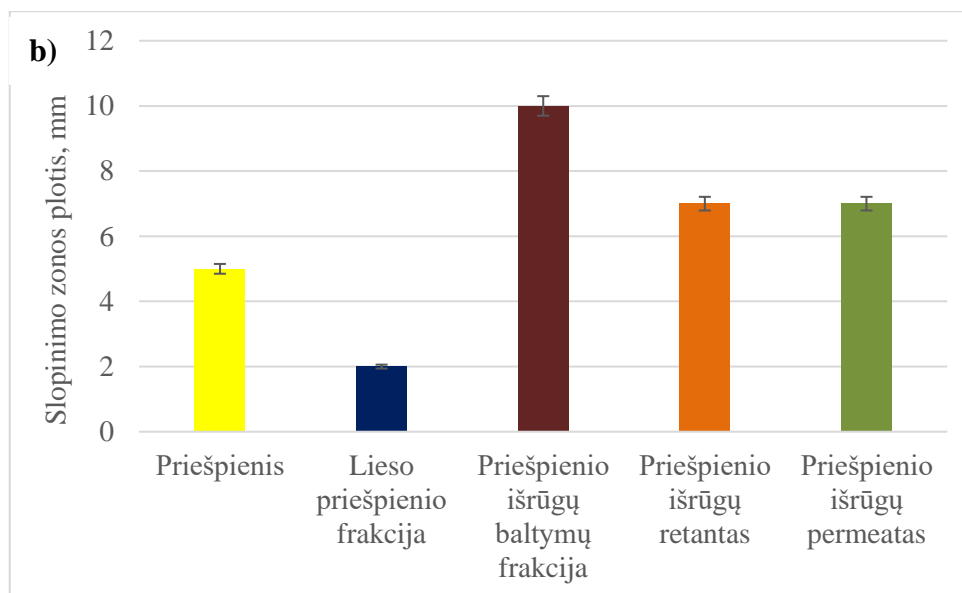
ABTS laisvųjų radikalų surišimo rezultatai karvių priešpienyje ir jo frakcijose pateikti 3.8. (b) paveikslėlyje. Didžiausias antiradikalinis aktyvumas taip pat buvo nustatytas karvių PIB (19%), o mažiausias – LP (9%). Italijos mokslininkų daryti tyrimai su asilės priešpieniu patvirtino, jog

priešpienis pasižymi antiradikaliniu aktyvumu ($93.69\% \pm 3.02$). Gauti rezultatai tiksliau patvirtina, kad šiame darbe tirtas karvių priešpienis pasižymi labai mažu antioksidaciniu poveikiu.

Karvių priešpienis ir jo frakcijos turi antimikrobinį savybių. Šiame tyrime siekėme įvertinti karvių priešpienio ir jo frakcijų antimikrobinio poveikio skirtumus testuojamoms kultūroms priklausomai nuo frakcijų cheminės sudėties. Kaip testuojama kultūra pasirinkta gram-teigiama bakterija *Bacillus subtilis* bei gram-neigiama bakterija *Escherichia coli*.

Priešpienio frakcijų antimikrobinio poveikio rezultatai prieš *Escherichia coli* pateikti 3.9. (a) paveikslėlyje, kurie rodo, kad karvių priešpienis ir jo frakcijos slopino *E. coli* kultūros augimą ir sudarė skaidrias zonas. Stipriausiai veikė priešpienio PIB, kur susidarė 20 mm slopinimo zonos Petri lėkštelėse esant 1000 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijai. *E. coli* kultūra buvo jautri ir 1000 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos priešpieniui, retentatui bei permeatui, tarp kurių reikšmingo skirtumo nebuvo nustatyta, tačiau slopinimo zonos susidarė 2 kartus mažesnės lyginant su PIB. LP frakcijai taip pat būdingas antimikrobinis poveikis, tačiau slopinimo zonos susidarė 4 kartus mažesnės lyginant su PIB bei 2 kartus mažesnės lyginant su permeatu bei retantu. Lyginant su kitų autorių duomenimis, karvių priešpienis pasižymėjo antibakteriniu poveikiu prieš *E. coli*, kur antibakterinio poveikio zona siekė iki 13 mm, kai koncentracija 100 $\mu\text{g/ml}$ [67]. Nustatyta, kad dėl priešpienyje esančių imunoglobulinų ir laktoferino, priešpienis turi antimikrobinį poveikį prieš *E. coli* [21].





3.9. pav. Priešpienio frakcijų antimikrobinis poveikis: a) prieš *Escherichia coli* kultūrą; b) prieš *Bacillus subtilis* kultūrą

Priešpienio frakcijų antimikrobinio poveikio rezultatai prieš *Bacillus subtilis* kultūrą pateikti 3.9. (b) paveikslėlyje. Karvių priešpienis ir jo frakcijos taip pat slopino gram-teigiamos bakterijos *Bacillus subtilis* kultūros augimą, tačiau jos buvo 2 kartus mažiau jautresnės priešpienio frakcijoms lyginant su *E. coli* jautrumu. Stipriausiai veikė taip pat PIB, kur susidarė 10 mm slopinimo zona esant 1000 µg/ml koncentracijai. Silpniausiais poveikis nustatytas su LP frakcija esant 1000 µg/ml koncentracijai. *Bacillus subtilis* kultūros jautrumas priešpieniui, permeatui, retentatui beveik nesiskiria.

Iki šiol nėra daug straipsnių, susijusių su karvių priešpienio frakcijų antimikrobinio poveikio tyrimu, tačiau yra keleta tyrimų atlikta su kupranugario priešpieniu. Jrad ir bendraautorai nustatė, kad kupranugario priešpienis turi didesnę antimikrobinę poveikį prieš *E. coli* kultūrą nei kupranugario priešpienio išrūgų baltymų frakcija [22].

3.5. Karvių priešpienio perdirbimas taikant mažo našumo technologinę gamybos liniją

Siekiant pritaikyti karvių priešpienį pramonėje ir palengvinti jo technologinį perdirbimą, buvo atliekamas karvių priešpienio frakcionavimas taikant mažo našumo technologinę liniją. Apie priešpienio technologinį perdirbimą, siekiant šiuos junginius atskirti, nėra pakankamai mokslinės informacijos. Todėl atlikti priešpienio kompleksiniai technologiniai tyrimai naudojant šiuolaikinę mokslinę laboratorinę įrangą. Išanalizavus atliktų tyrimų laboratorinėse sąlygose rezultatus, buvo nuspręsta šiek tiek pakoreguoti eksperimentų seką – nebuvo pašalinta kazeininė frakcija, kadangi

atskiriant kazeiną, yra prarandama didžioji dalis pradinės medžiagos. Taip pat po ultrafiltracijos, buvo nuspręsta atlikti retanto mikrofiltraciją, kas padeda labiau išgryninti, pašalinti patogeninius mikroorganizmus ir sterilizuoti frakciją.

Prieš atliekant karvių priešpienio frakcionavimą, pirmiausiai priešpennis buvo separuojamas. Separavimo proceso, iš priešpienio atskiriant riebalus, optimali temperatūra – 50° C. Kadangi, naudoto laboratorinio separatoriaus apsisukimų skaičių nebuvo galimybių reguliuoti, būtina atkreipti dėmesį į tai, kad šis parametras gali turėti įtakos, kokioje temperatūroje būtina atlikti šį procesą.

Separavimo efektyvumui ir kontrolei vykdyti svarbu nustatyti priešpienyje esančių riebalų kiekį. Šiuo atveju, priešpienyje esančių riebalų kiekiui nustatyti pasirinktas rūgštinis Gerberio metodas, aprašytas 2.3.1 skyrelyje. Nustatyta, kad priešpienio riebumas buvo 5,73 % ± 0,24. Po separavimo buvo gautos dvi frakcijos – priešpienio riebalai ir liesas priešpennis (LP1) (žr. 3.10. pav.).



3.10. pav. Priešpienio riebalų atskyrimas separavimo būdu: riebalai ir liesas priešpennis

Priešpienio komponentų koncentravimo tyrimai buvo atliekami naudojant mažo našumo pilotinę membraninės filtracijos sistemą. Lieso priešpienio filtravimas pavaizduotas 3.11. paveikslėlyje. Prieš atliekant priešpienio komponentų koncentravimą, teoriškai įvertintos frakcionavimo ir koncentravimo galimybės naudojant skirtingus technologinius procesus t.y. mikrofiltraciją, ultrafiltraciją, nanofiltraciją, reversinį osmosą bei elektrodializę. Priklausomai nuo pageidaujamų priešpienio komponentų išskyrimo ir sukcentravimo gali būti panaudoti visi šie procesai. Tačiau dažniausiai baltymų ir kitų biologiškai aktyvių junginių frakcionavimui naudojami 2 procesai tai: ultrafiltracija ir mikrofiltracija.



3.11. pav. Lieso priešpienio membraninis filtravimas

Naudojant pilotinę mažo našumo membraninės filtracijos įrangą ir skirtingų porų dydžių membranas atskirtos kelios priešpienio frakcijos. Gautos 2 frakcijos po ultrafiltravimo: lieso priešpienio retantas (LPR1) ir permeatas (LPP1), o iš LPR1 frakcijos naudojant mikrofiltravimą gautas retantas (LPR2) ir permeatas (LPP2). Nustatyta, kad šiems procesams vykdyti, kaip ir separavimo atveju, optimaliausia temperatūra yra 15° C. Prie šios temperatūros nevyksta baltymų denatūracija, išlieka nepakitusios biologiškai aktyvios medžiagos, sparčiai nesidaugina nepageidaujami mikroorganizmai bei užtikrinami našesni filtravimo procesai.

Membraninių procesų efektyvumui įvertinti t.y. kiek pro atitinkamas membranas praeina išrūginių baltymų, buvo taikomi baltyminio ir nekazeininio azoto kiekio nustatymo metodai. Gauti tyrimų rezultatai yra pateikti 3.6. lentelėje.

3.6. lentelė. Priešpienio frakcijų baltymų sudėtis, g/100g

Rodiklio pavadinimas	LPR1	LPP1	LPR2	LPP2
Nekazeininiai baltymai	10,5±1.7	-	7,1±1,6	3,2±0,8
Kazeiniai baltymai	8,5±1.3	-	8,5±1,3	-

Didžiausias nekazeininių ir kazeininių baltymų kiekis nustatytas priešpienio frakcijose LPR1 ir LPR2, tuo tarpu baltymai neaptikti frakcijoje LPP1. Nekazeininiai baltymai nustatyti LPP2 frakcijoje dėl didesnių mikrofiltrų porų. Taip pat manoma, kad didžiausias biologiškai aktyvių junginių kiekis turėtų būti šoje frakcijoje.

Siekiant užtikrinti biologiškai aktyvių junginių stabilumą, naudojant skirtingus parametrus (t.y. slėgį, temperatūrą ir laiką) buvo atlikti sublimavimo (liofilizavimo) procesai. Prieš separavimą ir po separavimo bei po membraninio filtravimo, gautų frakcijų bandiniai buvo atitinkamai sublimuoti. Priešpienio komponentų džiovinimas pateiktas 3.12. paveiksle. Nustatyta, kad priešpienio bandinių džiovinimo optimalios sąlygos, kai slėgis: 0,5 mbar, temperatūra: palaipsniui keliama nuo 20 iki 40° C, o džiovinimo trukmė: 24 val.



3.12. pav. Priešpienio komponentų džiovinimas: a) sukauptos frakcijos po membraninės filtracijos b) džiovinimo procesas sublimatoriuje; c) priešpienio milteliai prieš susmulkinimą; d) Gauti sausi priešpienio milteliai prieš ir po separavimo.

Nustatyta, kad greičiausias, pigiausias ir tinkamiausias analizės metodas priešpienio sausiems milteliams vertinti yra Furje transformacija paremta infraraudonųjų spindulių spektroskopija (FT-NIR). Šiuo metodu nustatyta visų priešpienio bandinių cheminė sudėtis (vandens, baltymų, riebalų, laktozės ir mineralinių medžiagų kiekiai), kuri yra pateikta 3.7. lentelėje.

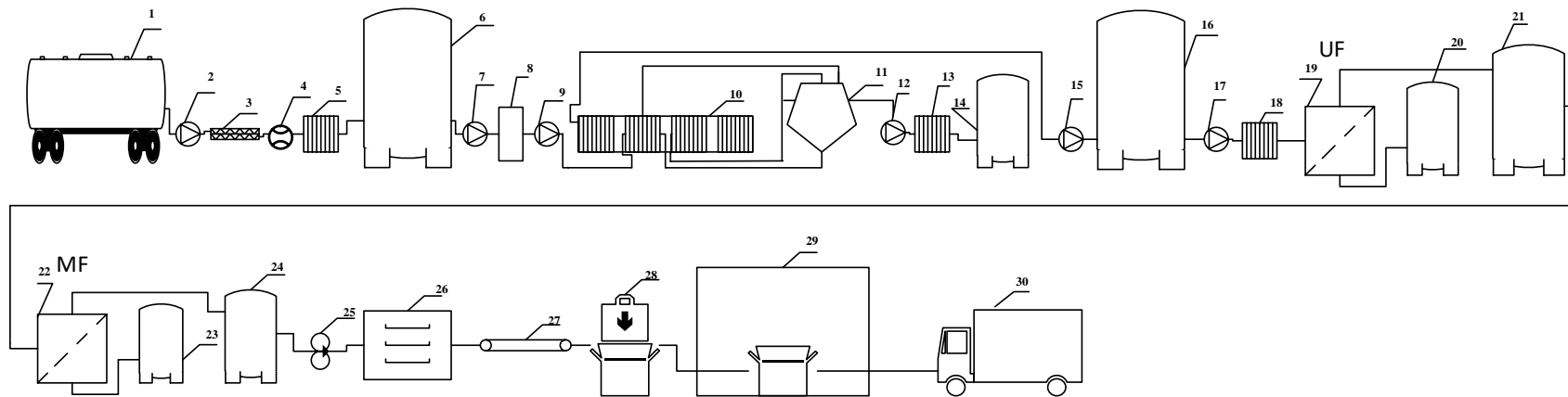
3.7. lentelė. Gautų priešpienio ir jo frakcijų sausų miltelių cheminė sudėtis, %

Rodiklio pavadinimas	KP	LP1	LPR1	LPR2	LPP2
Vanduo	3,7±0,4	3,5±0,2	3,2±0,5	3,1±0,1	4,6±0,3
Baltymai	52,4±2,1	57,1±1,1	65,1±0,8	72,7±2,3	25,8±2,4
Riebalai	15,3±1,2	3,4±1,9	3,63±1,8	2,5±1,2	-
Laktozė	24,3±0,4	31,5±0,1	23,2±0,5	15,1±0,3	50,5±0,2
Mineralinės medžiagos	8,3±2,8	8,7±2,7	6,9±2,9	4,2±2,8	22,3±2,8

Didžiausias baltymų kiekis buvo nustatytas po mikrofiltravimo susidariusiam lieso priešpienio retante (LPR2), kuriame baltymų kiekis buvo randamas net 3 kartus didesnis nei lieso priešpienio permeate (LPP2). Didžiausi vandens, mineralinių medžiagų, laktozės kiekiai buvo aptinkami LPP2. Didžiausias riebalų kiekis buvo randamas karvės priešpienyje (KP) (6 kartus daugiau lyginant su su LPR2).

4. REKOMENDACIJOS

Lieso priešpienio retanto po mikrofiltravimo gamybos schema pateikta 4.1. paveiksle. Karvių priešpienis pristatomas autocisternomis [1]. Priimamo priešpienio temperatūra neturi viršyti 5°C . Priimant priešpienį nustatomi pirminiai kokybės rodikliai – spalva, kvapas, konsistencija, matuojama temperatūra. Po kokybės įvertinimo, priešpienis išcentrinio siurblio [2] sudarytu slėgiu yra filtruojamas [3] ir transportuojamas per debitomatį [4] į plokštelinį šaldytuvą [5], kur atšaldomas iki $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ir laikomas priešpienio rezervuaruose [6] ne ilgiau nei 12 valandų. Iš priešpienio rezervuaro [6] išcentrinio siurblio [7,9] sudarytu slėgiu per lygio reguliatorių [8] priešpienis tiekiamas į pirmąjį ketursekcinio plokštelinio pasterizatoriaus – šaldytuvo [10] regeneravimo sekciją, kur pašildomas iki separavimui optimalios temperatūros (50°C) ir nukreipiamas priešpienis į separatorių [11]. Separavimo metu atskirti priešpienio riebalai, išcentrinio siurblio [12] sudarytu slėgiu, tiekiami į vamzdinį šaldytuvą [13], kur atšaldomi iki $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ir laikomi priešpienio riebalų rezervuaruose [14]. Liesas priešpienis iš separatoriaus [11] leidžiamas į pasterizatoriaus – šaldytuvo [10] antrąją regeneravimo sekciją, kuriame pašildomas iki $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ir pasterizavimo sekciją, kur pašildomas iki $72 \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūros ir užlaikomas 20 s. Pasterizuotas liesas priešpienis išcentrinio siurblio [15] sudarytu slėgiu tiekiamas į lieso priešpienio laikymo talpą [16]. Lieso priešpienio temperatūra talpoje negali būti aukštesnė kaip 5°C . Liesas priešpienis iš laikymo talpos [16], išcentrinio siurblio [17] sudarytu slėgiu tiekiamas į vamzdinį šilumokaitį [18], kur pašildomas iki $15 \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūros. Pašildytas priešpienis paduodamas į membraninės ultrafiltracijos įrangą [19]. Ultrafiltraciją vykdoma 3,5 bar slėgyje, naudojant polisulfonines 10 kDa membranas. Šioje įrangoje, per membranas perėjęs permeatas vamzdžiais tiekiamas į permeato rezervuarą [20]. Šioje įrangoje, per membranas perėjęs retantas, vamzdžiais tiekiamas į retanto rezervuarą [21]. Gautas retantas iš retanto laikymo talpos [21] tiekiamas į mikrofiltracijos įrangą [22]. Mikrofiltracija vykdoma 3 bar slėgyje, naudojant 1,4 μm polisulfonines membranas. Šioje įrangoje, per membranas perėjęs permeatas 2 vamzdžiais tiekiamas į permeato rezervuarą [23]. Šioje įrangoje, per membranas perėjęs retantas 2, vamzdžiais tiekiamas į retanto rezervuarą [24]. Retantas 2, krumpliaratorinio siurblio [25] sudarytu slėgiu, tiekiamas į liofilizatorių [26], kur retantas džiovinamas 0,5 mbar slėgyje, temperatūra: palaipsniui keliami nuo 20 iki 40°C , o džiovinimo trukmė – 24 val. Retanto milteliai iš liofilizatoriaus [26] konvejeriu [27] transportuojami į fasavimo įrenginį [28], kuriame milteliai yra vakuumuojami. Sufasuoti retanto milteliai pakuojami į kartonines dėžes ir atvežami į sandėlį [29], kuriame palaikoma $0 - 6^{\circ}\text{C}$ temperatūra ir ne didesnė kaip 85 % santykinė oro drėgmė. Dėžės laikomos iki išvežimo [30], bet ne ilgiau, kaip iki galiojimo laiko pabaigos.



4.1. pav. Lieso priešpienio retanto po mikrofiltravimo gamybos technologinė schema

IŠVADOS

1. Laboratorinėmis sąlygomis iš karvės priešpienio buvo gautos 6 frakcijos – liesas priešpienis, priešpienio riebalai, kazeininė frakcija, priešpienio išrūgų baltymai, priešpienio išrūgų retantas ir permeatas. Naudojant biotechnologinį būdą (proteolitinį fermentą chimoziną) buvo gautos dvi frakcijos – kazeininė frakcija ir priešpienio išrūgų baltymai. Taikant ultrafiltraciją, iš priešpienio išrūgų baltymų frakcijos buvo išskirtos taip pat dvi frakcijos – priešpienio išrūgų retantas (> 10 kDa) ir permeatas (< 10 kDa).
2. Pirmos dienos karvės priešpienyje buvo nustatyta cheminė sudėtis: 7,05 % riebalų, 15,10 % baltymų, 2,96 % laktozės, 1,12 % mineralinių medžiagų. Visose frakcijose buvo identifikuoti baltymai: laktoferinas, serumo albuminas, β -laktoglobulinas, α -laktoalbuminas.
3. Vertinant priešpienio riebalų frakcijos oksidacinį stabilumą pagreitintu metodu, nustatyta, kad priešpienio riebalai pasižymėjo mažesne oksidacija lyginant su pieno riebalais (priešpienio riebalų indukcinis periodas – $6,42 \pm 0,27$ h, pieno riebalų – $4,58 \pm 0,06$ h). Tačiau įvertinus priešpienio riebalų rūgščių cheminę analizę po metų šaldymo, nustatyta, kad padaugėjo laisvųjų riebalų rūgščių (suintensyvėjusi riebalų hidrolizė) ir oksidavosi didžioji dalis nesočiųjų riebalų rūgščių (nebuvo aptikta elaido, linolelaidino, α -linoleno).
4. Nustatyta, kad priešpienis ir jo frakcijos pasižymėjo nedideliu antioksidaciniu aktyvumu. Nustatyta, kad didžiausiu antimikrobiniu poveikiu pasižymėjo priešpienio išrūgų baltymų frakcija, kai koncentracija 1000 $\mu\text{g/ml}$ (slopavimo zona 20mm). Gram-neigiama *E. coli* kultūra buvo jautresnė priešpienio frakcijoms nei gram-teigiama *B. subtilis* kultūra.
5. Taikant mažo našumo technologinę gamybos liniją, buvo sėkmingai atliktas karvių priešpienio perdirbimas. Taikant ultrafiltraciją, iš lieso priešpienio buvo gautos dvi frakcijos – lieso priešpienio retantas 1 ir permeatas 1. Taikant mikrofiltraciją, iš lieso priešpienio retanto buvo išskirtos taip pat dvi frakcijos – lieso priešpienio retantas 2 ir permeatas 2. Nustatyta, kad separuojant priešpienį, optimaliausia temperatūra – 50° C. Nustatyta, kad priešpienio bandinių džiovavimo optimalios sąlygos, kai slėgis: 0,5 mbar, temperatūra: palaipsniui keliama nuo 20 iki 40° C, o džiovavimo trukmė – 24 val.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. BAGWE, S., L. J. THARAPPEL, G. KAUR and H. S. BUTTAR. Bovine colostrum: an emerging nutraceutical. *J Complement Integr Med* [interaktyvus]. 2015, 12(3), 175–185. [žiūrėta 2017-02-22]. Prieiga per doi:[10.1515/jcim-2014-0039](https://doi.org/10.1515/jcim-2014-0039).
2. SASIDHARAN, S., Y. CHEN, D. SARAVANAN, K.M. SUNDRAM, and L. Y. LATHA. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* [interaktyvus] 2011, 8(1), 1-10 [žiūrėta 2017-02-18]. Prieiga per <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3218439/pdf/AJT0801-0001.pdf>
3. SCUMACI, D., F. TRIMBOLI, L. D. AQUILA, A. CONCOLINO, G. PAPPAIANNI, L. TAMMÈ, GI. VIGNOLA, A. LUCIANI, D. MORELLI, G. CUDA, A. BOARI, and D. BRITTI. Proteomics-Driven Analysis of Ovine Whey Colostrum. *PLoS One* [interaktyvus] 2015, 10(2) [žiūrėta 2017-03-01]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117433>.
4. BIELMANN, V., J. GILLAN, N. R. PERKINS, A. L. SKIDMORE, S. GODDEN, and K. E. LESLIE. An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2010, 93(8), 3713-3721 [žiūrėta 2017-02-18]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2009-2943>.
5. URUAKPA. F. O., M. A. H. ISMOND, and E. N. T. AKOBUNDU. Colostrum and its benefits: a review. *Nutrition Research* [interaktyvus] 2002, 22, 755–767 [žiūrėta 2017-02-22]. Prieiga per doi: [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(02\)00373-1](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(02)00373-1).
6. BLUM, J. V., and H. HAMMON. Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science* [interaktyvus]. 2000, 66, 151–159. [žiūrėta 2017-02-22]. Prieiga per doi:[https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00222-0](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00222-0)
7. Flaminia Bardanzellu * ID , Vassilios Fanos and Alessandra Reali. “Omics” in Human Colostrum and Mature Milk: Looking to Old Data with New Eyes. *Nutrients* [interaktyvus] 2017, 9(8), 843 [žiūrėta 2017-02-22]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3390/nu9080843>.
8. MCGRATH, B. A., P. F. FOX, L. H. MCSWEENEY and A. L. KELLY. Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Sci. & Technol* [interaktyvus]. 2016, 96, 133–158 [žiūrėta 2017-02-23]. Prieiga per doi:[10.1007/s13594-015-0258-x](https://doi.org/10.1007/s13594-015-0258-x).
9. ABD EL-FATTAH, A. M., F. H. R. ABD RABO, S. M. EL-DIEB, and H. S. EL-KASHEF. Changes in composition of colostrum of Egyptian buffaloes and Holstein cows. *BMC Veterinary Research*

- [interaktyvus]. 2012, 8, 19. [žiūrėta 2017-02-22]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-19>.
10. HADJIPANAYIOTOU. M. Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrum of ewes and goats. *Small Ruminant Research* [interaktyvus] 1995, 18(3), 255-262 [žiūrėta 2017-02-23]. Prieiga per doi:[https://doi.org/10.1016/0921-4488\(95\)00697-3](https://doi.org/10.1016/0921-4488(95)00697-3).
 11. ANDREW, S. M. Effect of composition of colostrum and transition milk from Holstein heifers on specificity rates of antibiotic residue tests. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2001,84, 100–106 [žiūrėta 2017-02-23]. Prieiga per doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74457-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74457-8).
 12. HULSHOF, P. J. M., T. VAN ROEKEL-JANSEN, P. VAN DE BOVENKAMPY, and C. E. WESTZ. Variation in retinol and carotenoid content of milk and milk products in The Netherlands. *Journal of Food Composition and Analysis* [interaktyvus]. 2006, 19, 67–75 [žiūrėta 2017-02-24]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.005>.
 13. MADSEN, B. D., M. D. RASMUSSEN, M. O. NIELSEN, L. WIKING, and L. B. LARSEN. Physical properties of mammary secretions in relation to chemical changes during transition from colostrum to milk. *Journal of Dairy Research* [interaktyvus]. 2004, 71, 263–272. [žiūrėta 2017-02-24]. Prieiga per doi: [10.1017/S0022029904000263](https://doi.org/10.1017/S0022029904000263).
 14. DE OLIVES A. M., J. R. DIAZ, M. P. MOLINA, and C. PERIS. Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *J Dairy Sci* [interaktyvus]. 2013, 96, 7698–7707 [žiūrėta 2017-02-23]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2013-6998>.
 15. SUNARIC, S., M. DENIC, J. LALIC, T. JOVANOVIĆ, A. SPASIC, J. ŽIVKOVIĆ, N. TRUTIC, and G. KOCIC. Physicochemical and biochemical parameters in milk of Serbian breastfeeding women. *Turkish Journal of Medical Sciences* [interaktyvus]. 2017, 47, 246-251 7707 [žiūrėta 2017-02-25]. Prieiga per doi:[10.3906/sag-1511-110](https://doi.org/10.3906/sag-1511-110).
 16. TSILOULPAS, A., A. S. GRANDISON, and M. J. LEWIS. Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. *J Dairy Sci* [interaktyvus]. 2007, 90(11), 5012-7 [žiūrėta 2017-02-25]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0192>.
 17. KLIMEŠ, J., P. JAGOŠ, J. BOUDA, and S. GAJDUŠEK. Basic Qualitative Parameters of Cow Colostrum and Their Dependence on Season and Post Partum Time. *Acta Vet. Brno* [interaktyvus]. 1986, 55, 23-39 [žiūrėta 2017-02-25]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.2754/avb198655010023>.
 18. THAPA, B. R. Health factors in colostrum. *Indian Journal of Pediatrics* [interaktyvus]. 2005, 72(7), 579-581 [žiūrėta 2017-02-25] Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1007/BF02724182>

19. LANGER, P. Differences in the composition of colostrum and milk in eutherians reflect differences in immunoglobulin transfer. *Journal of Mammalogy* [interaktyvus]. 2009, 90(2), 332–339 [žiūrėta 2017-02-23]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1644/08-MAMM-A-071.1>.
20. EL-HATMI, H., J. M. GIRARDET, J. L. GAILLARD, M. H. YAHYAOU, and H. ATTIA. Characterisation of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrum. *Small Ruminant Research* [interaktyvus] 2007, 70, 267–271 [žiūrėta 2017-02-23]. Prieiga per doi: [doi:10.1016/j.smallrumres.2006.04.001](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.04.001).
21. BENKERROUM, N., B. MAKKAOU, N. BENNANI and H. KAMAL. Antimicrobial activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Int J Dairy Technol* [interaktyvus] 2004, 57, 39-43 [žiūrėta 2017-02-23]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00127.x>.
22. JRAD, Z., N. OULAHAL, I. ADT, T. KHORCHANI, P. DEGRAEVE, and H. EL-HATMI. Camel colostrum: Nutritional composition and improvement of the antimicrobial activity after enzymatic hydrolysis. *Emir J Food Agric* [interaktyvus] 2015, 27(4), 384-389 [žiūrėta 2017-02-23]. Prieiga per doi: [doi:10.9755/ejfa.v27i4.19912](https://doi.org/10.9755/ejfa.v27i4.19912).
23. PALMER D. J., V. C. KELLY, A. M. SMIT, S. KUY, C. G. KNIGHT, and G. J. COOPER. Human colostrum: identification of minor proteins in the aqueous phase by proteomics. *Proteomics* [interaktyvus] 2006, 6(7), 2208-16 [žiūrėta 2017-02-23]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1002/pmic.200500558>.
24. GODHIA, M. L., and M. PATEL. Colostrum - its Composition, Benefits as a Nutraceutical - A Review. *Current Research in Nutrition and Food Science* [interaktyvus]. 2013, 1(1), 37-47 [žiūrėta 2017-02-26]. Prieiga per doi: <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.1.1.04>.
25. PLAYFORD, R. J., C. E. MACDONALD, and W. S. JOHNSON. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am J Clin Nutr* [interaktyvus]. 2000, 72, 5-14 [žiūrėta 2017-02-26]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.1.5>.
26. KADUCU, A. F. O, S. A. OKIA, G. UPENYTHO, L. ELFSTRAND, and C. H. FLORÉN. Effect of bovine colostrum-based food supplement in the treatment of HIV-associated diarrhea in Northern Uganda: a randomized controlled trial. *Indian J Gastroenterology* [interaktyvus]. 2011, 30(6), 270–276 [žiūrėta 2017-02-26]. Prieiga per doi: [10.1007/s12664-011-0146-0](https://doi.org/10.1007/s12664-011-0146-0).
27. STELWAGEN, K., E. CARPENTER, B. HAIGH, A. HODGKINSON, and T. T. WHEELER. Immune components of bovine colostrum and milk. *J Anim Sci* [interaktyvus]. 2009, 87(13), 3-9 [žiūrėta 2017-03-06]. Prieiga per doi: [10.2527/jas.2008-1377](https://doi.org/10.2527/jas.2008-1377).

28. WHEELER, T. T., A. J. HODGKINSON, C. G. PROSSER, and S. R. DAVIS. Immune components of colostrum and milk—A historical perspective. *J. Mammary Gland Biol Neoplasia* [interaktyvus] 2007, 12, 237–247 [žiūrėta 2017-03-06]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9051-7>.
29. AHMED, L., S. NAZRUL, M. N. KHAN, S. HUQUE, and M. AHSAN. Antioxidant micronutrient profile (vitamin E, C, A, copper, zinc, iron) of colostrum: association with maternal characteristics. *J Trop Pediatr* [interaktyvus] 2004, 50(6), 357-8 [žiūrėta 2017-03-06]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1093/tropej/50.6.357>.
30. SHARMA, P., and R. P. THAPA. Evaluation of Antioxidant Activity in Foods with Special Reference to TEAC Method. *American Journal of Food Technology* [interaktyvus]. 2013, 8(2), 83-101 [žiūrėta 2017-03-06]. Prieiga per doi:[10.3923/ajft.2013.83.101](https://doi.org/10.3923/ajft.2013.83.101).
31. WEAVER, D. M., J. W. TYLER, D. C. VANMETRE, D. E. HOSTETLER, AND G. M. BARRINGTON. Passive Transfer of Colostral Immunoglobulins in Calves. *J Vet Intern Med* [interaktyvus] 2000, 14, 569–577 [žiūrėta 2017-03-06] Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02278.x>.
32. ZAGORSKA, J., I. EIHALVALDE, I. GRAMATINA, and S. SARVI. Evaluation of colostrum quality and new possibilities for its application. *Foodbalt* [interaktyvus]. 2011 [žiūrėta 2017-03-06]. ISBN [9789984480459](https://doi.org/10.1007/9789984480459).
33. HWA, V., Y. OH, and R. G. ROSENFELD. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* [interaktyvus] 1999, 20(6), 761-87 [žiūrėta 2017-03-06] Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1210/edrv.20.6.0382>.
34. GEORGIEV, G. Differences in chemical composition between cow colostrum and milk. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* [interaktyvus]. 2008, 11(1), 3–1 [žiūrėta 2017-03-06]. ISSN [1311-1477](https://doi.org/10.1007/9789984480459).
35. HANUŠOVSKÝ, O., D. BÍRO, B. GÁLIK, M. ROLINEC, M. ŠIMKO, M. JURÁČEK M, and M. RUŠINOVÁ. Changes in the average concentration of minerals in the colostrum of sows during the first 48 hours after parturition. *Research of Pig Breeding* [interaktyvus]. 2014, 8(1), 48–51 [žiūrėta 2017-03-06]. ISSN 1802-7547.
36. PLAYFORD, R. J. Peptide therapy and the gastroenterologist: colostrum and milk-derived growth factors. *Clin Nutr* [interaktyvus]. 2001, 20, 101–106 [žiūrėta 2017-03-08]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1054/clnu.2001.0434>.

37. DAVIS, P. F., N. S. GREENHILL, A. M. ROWAN, and L. M. SCHOLLUM. The safety of New Zealand bovine colostrum: nutritional and physiological evaluation in rats. *Food Chem Toxicol* [interaktyvus]. 2007, 45, 229–236 106 [žiūrėta 2017-03-08]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.034>.
38. Kelly, G. S. Bovine colostrums: a review of clinical uses. *Altern Med Rev* [žiūrėta 2017-03-08]. 2004, 9(1), 69 [žiūrėta 2017-03-12]. Prieiga per <http://archive.foundationalmedicinereview.com/publications/8/4/378.pdf>
39. CONTE, F., and S. SCARANTINO. A study on the quality of bovine colostrum: physical, chemical and safety assessment. *International Food Research Journal* [interaktyvus]. 2013, 20(2), 925-931 [žiūrėta 2017-03-08]. Prieiga per [http://www.ifrj.upm.edu.my/20%20\(02\)%202013/58%20IFRJ%2020%20\(02\)%202013%20Conte%20\(288\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/20%20(02)%202013/58%20IFRJ%2020%20(02)%202013%20Conte%20(288).pdf)
40. ONTSOUKA, C. E., R. M. BRUCKMAIER, and J. W. BLUM. Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2003, 86, 2005–2011 [žiūrėta 2017-03-08]. Prieiga per doi:[10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73789-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73789-8).
41. BLUM, J. Nutritional physiology of neonatal calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* [interaktyvus]. 2006, 90, 1–11 [žiūrėta 2017-03-12]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2005.00614.x>.
42. YOUNG, W. Park, ed. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products* [interaktyvus] Winley–Blackwel, 2009 [žiūrėta 2017-03-12] Prieiga per <https://bengreenfieldfitness.com/wp-content/uploads/2017/02/Bioactive-Components-in-Milk-and-Dairy-Products.pdf>
43. FESSAS, D, S. LAMETTI, A. SCHIRALDI, and F. BONOMI. Thermal unfolding of monomeric and dimeric b-lactoglobulins. *European Journal of Biochemistry* [interaktyvus]. 2001, 268, 5439–5448 [žiūrėta 2017-03-12]. Prieiga per doi:[10.1046/j.0014-2956.2001.02484.x](https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02484.x)
44. PECKA, E., Z. DOBRZAN, A. ZACHWIEJA, T. SZULC, and K. CZYZ. Studies of composition and major protein level in milk and colostrum of mares. *Animal Science Journal* [interaktyvus]. 2012, 83, 162–168 [žiūrėta 2017-03-12]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2011.00930.x>.
45. TRIPATHI, T., AND B. VASHISHTHA. Bioactive Compounds of Colostrum and Its Application. *Food Reviews International* [interaktyvus] 2006, 22, 225–244 [žiūrėta 2017-03-13]. Prieiga per doi:[10.1080/87559120600694606](https://doi.org/10.1080/87559120600694606).

46. PRZYBYLSKA, J., E. ALBERA, and M. KANKOFER. Antioxidants in Bovine Colostrum. *Reprod Dom Anim* [interaktyvus]. 2007, 42, 402–409 [žiūrėta 2017-03-14]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00799.x>.
47. FARRELL, H. M., R. JIMENEZ-FLORES, G. T. BLECK, E. M. BROWN, J. E. BUTLER, L. K. CREAMER, C. L. HICKS, C. M. HOLLAR, K. F. NG-KWAI-HANG, and H. E. SWAISGOOD. Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *J Dairy Sci* [interaktyvus]. 2004, 87(6), 1641-74 [žiūrėta 2017-03-14]. Prieiga per doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6).
48. HARMSSEN, M.C., P. J. SWART, M. P. DEBETHUNE, R. PAUWELS, E. DECLEREQ, and D. K. F MEIJER. Antiviral effects of plasma and milk proteins: Lactoferrin shows potent activity against both human immuno-deficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *Journal of Infectious Diseases* [interaktyvus] 1995, 172, 380–388 [žiūrėta 2017-03-14]. Prieiga per <https://scihub.tw/https://doi.org/10.1093/infdis/172.2.380>
49. KANAAN, S. A., B. SAFIEH-GARABEDIAN, M. KARAM, H. KHANSA, S. J. JABBUR, A. R. JURJUS, and N. E. SAADE. Thymulin reduces the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by cutaneous leishmaniasis in mice. *Brain Behav Immun* [interaktyvus] 2002, 16(4), 450-60 [žiūrėta 2017-03-15]. Prieiga per doi: [doi:10.1006/brbi.2001.0631](https://doi.org/10.1006/brbi.2001.0631).
50. GOPAL, P. K., and H. S. GILL. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *British Journal of Nutrition* [interaktyvus] 2000, 84(1), 69-74 [žiūrėta 2017-03-15]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1017/S0007114500002270>.
51. BISWAS, P., A. VECCHI, P. MANTEGANI, B. MANTELLI, C. FORTIS, and A. LAZZARIN. Immunomodulatory effects of bovine colostrum in human peripheral blood mononuclear cells. *New Microbiol* [interaktyvus] 2007, 30(4), 447-54 74 [žiūrėta 2017-03-16]. Prieiga per http://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2007/4/447.pdf
52. HAGIWARA, K., S. KATAOKA, H. YAMANAKA, R. KIRISAWA, and H. IWAI. Detection of cytokines in bovine colostrum. *Vet Immunol Immunopathol* [interaktyvus] 2000, 76, 183–190 74 [žiūrėta 2017-03-16]. Prieiga per doi: [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(00\)00213-0](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(00)00213-0)
53. CONTARINI, G., M. POVOLO, V. PELIZZOLA, L. MONTI, A. BRUNI, L. PASSOLUNGO, F. ABENI, and L. DEGANO. Bovine colostrum: changes in lipid constituents in the first 5 days after parturition. *J Dairy Sci* [interaktyvus] 2014, 97(8), 5065-72 [žiūrėta 2017-03-16]. Prieiga per doi: [10.3168/jds.2013-7517](https://doi.org/10.3168/jds.2013-7517).

54. GROZIAK, S. M., and G. D. MILLER. Natural bioactive substances in milk and colostrum: effects on the arterial blood pressure system. *British Journal of Nutrition* [interaktyvus] 2000, 84(1), 119-125 [žiūrėta 2017-03-16]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1017/S0007114500002348>.
55. SMOLENSKI, G., S. HAINES, F. Y. S. KWAN, J. BOND, V. FARR, S. R. DAVIS, K. STELWAGEN, and T. T. WHEELER. Characterisation of host defense proteins in milk using a proteomic approach. *J Proteome Res* [interaktyvus] 2007, 6, 207–215 [žiūrėta 2017-03-16]. Prieiga per doi:[10.1021/pr0603405](https://doi.org/10.1021/pr0603405).
56. ZHANG, L. Y., J. Q. WANG, Y. X. YANG, D. P. BU, S. S. LI, and L. Y. ZHOU. Comparative proteomic analysis of changes in the bovine whey proteome during the transition from colostrum to milk. *Asian Aus J Anim Sci* [interaktyvus] 2011, 24, 272– 278 [žiūrėta 2017-03-16]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10122>.
57. HURLEY W. L., and P. K. THEIL. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients* [interaktyvus] 2011, 3, 442-474 [žiūrėta 2017-03-16]. Prieiga per doi:[10.3390/nu3040442](https://doi.org/10.3390/nu3040442).
58. KEHOE, S. I., B. M. JAYARAO, and A. J. HEINRICHS. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *J Dairy Sci* [interaktyvus] 2007, 90(9), 4108-16 [žiūrėta 2017-03-18]. Prieiga per doi:[10.3168/jds.2007-0040](https://doi.org/10.3168/jds.2007-0040).
59. BAGIS, S., L. TAMER, G. SAHIN, R. BILGIN, H. GULER, B. ERCAN, and C. ERDOGAN. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorders? *Rheumatol Int* [interaktyvus] 2005, 25, 188-90 [žiūrėta 2017-03-18]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1007/s00296-003-0427-8>.
60. KARPFENBAUER, K., R. BIRNBACHER, H. VIERHAPPER, K. HERKNER, D. KAMPEL, and G. LUBEC. Glycooxidation and protein and DNA oxidation in patients with diabetes mellitus. *Clin. Sci* [interaktyvus] 1998, 95, 331-7 [žiūrėta 2017-03-18]. Prieiga per doi:[10.1042/cs0950331](https://doi.org/10.1042/cs0950331).
61. WEST, I. C. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Med* [interaktyvus] 2000, 17, 171-180 [žiūrėta 2017-03-20]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2000.00259.x>.
62. DOREA, J. G. Selenium and breast-feeding. *British Journal of Nutrition* [interaktyvus] 2002, 88, 443-461 [žiūrėta 2017-03-20]. Prieiga per doi:[10.1079/BJN2002692](https://doi.org/10.1079/BJN2002692).
63. KANKOFER, M., and J. LIPKO-PRZYBYLSKA. Physiological antioxidative/oxidative status in bovine colostrum and mature milk. *Acta Veterinaria* [interaktyvus] 2008, 58(2-3), 231-239 [žiūrėta 2017-03-20]. Prieiga per doi:[10.2298/AVB0803231K](https://doi.org/10.2298/AVB0803231K).

64. CHIANG, S. H., and C. Y. CHANG. Antioxidant properties of casein and whey proteins from bovine colostrum. *J Food Drug Anal* [interaktyvus] 2005, 13, 57–63 [žiūrėta 2017-04-12]. Prieiga per https://www.researchgate.net/publication/268375156_Antioxidant_Properties_of_Caseins_and_Whey_Proteins_from_Colostrums
65. APPUKUTTY, M., A. K. RADHAKRISHNAN, K. RAMASAMY, R. RAMASAMY, A. B. ABDUL MAJEED, M. I. NOOR, N. S. SAFII, P. B. KOON, K. CHINNA, and N. HALEAGRAHARA. Colostrum supplementation protects against exercise - induced oxidative stress in skeletal muscle in mice. *BMC Research Notes* [interaktyvus] 2012, 5, 649 [žiūrėta 2017-03-20]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-649>.
66. MARINKOVIC, V., M. RANKOVIC-JANEVSKI, S. SPASIC, A. NIKOLIC-KOKIC, N. LUGONJA, § D. DJUROVIC, S. MILETIC, M. M. VRVIC, and I. SPASOJEVIC. Antioxidative Activity of Colostrum and Human Milk: Effects of Pasteurization and Storage. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [interaktyvus] 2016, 62(6), 901-6 [žiūrėta 2017-03-20] Prieiga per doi:[10.1097/MPG.0000000000001090](https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001090).
67. YADAV, R., T. ANGOLKAR, G. KAUR, and H. S. BUTTAR. Antibacterial and Antiinflammatory Properties of Bovine Colostrum. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* [interaktyvus] 2016, 10(1), 49-53 [žiūrėta 2017-03-20] Prieiga per doi:<https://doi.org/10.2174/1872214810666160219163118>.
68. RAINARD, P. Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria. *Vet Microbiol* [interaktyvus] 1986, 11(4), 387-92 [žiūrėta 2017-03-20]. Prieiga per doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(86\)90068-4](https://doi.org/10.1016/0378-1135(86)90068-4).
69. SAITO, H., H. MIYAKAWA, Y. TAMURA, S. SHIMAMURA, and M. TOMITA. Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus] 1991,74, 3724-3730 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78563-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78563-9).
70. ASHRAF, H., D. MAHALANABIS, A. K. MITRA, S. TZIPORI, and G. J. FUCHS. Hyperimmune bovine colostrum in the treatment of shigellosis in children: a double-blind, randomized, controlled trial. *Acta Paediatr* [interaktyvus] 2001, 90(12), 1373-8 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2001.tb01598.x>.
71. PAYNE, K. D., P. M. DAVIDSON, G. L. CHRISTEN, and S. P. OLIVER. Influence of bovine lactoferrin on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* [interaktyvus]

- 1990, 53(6), 468-472 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.6.468>.
72. LASSITER, M. O., A. L. NEWSOME, L. D. SAMS, and R. R. ARNOLD. Characterization of lactoferrin interaction with *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research* [interaktyvus] 1987, 66, 480- 485 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1177/00220345870660021601>.
73. ORAM, J. D., and B. REITER. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochim Biophys Acta* [interaktyvus] 1968, 170(2), 351-365 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per doi:[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(68\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0304-4165(68)90015-9).
74. Brock, J. H. Lactoferrin – 50years on. *Biochem Cell Biol* [intearaktyvus] 2012, 90, 245–251 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1139/o2012-018>.
75. CHEN, P. W., Y. W. KU, and F. Y. CHU. Influence of bovine lactoferrin on the growth of selected probiotic bacteria under aerobic conditions. *Biometals* [interaktyvus] 2014, 27(5), 905-14 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per doi:[10.1007/s10534-014-9758-z](https://doi.org/10.1007/s10534-014-9758-z).
76. ERDEI, J., A. FORSGREN, and A. S. NAIDU. Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Echericia coli*. *Infect Immun* [interaktyvus] 1994, 62(4), 1236-40 251 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186264/pdf/iai00004-0116.pdf>
77. NAIDU, A. S., and R. R. ARNOLD. Lactoferrin interaction with *Salmonellae* potentiates antibiotic susceptibility in vitro. *Diagn Microbiol Infect Dis* [interaktyvus] 1994, 20, 69-75 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per doi: [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0732-8893(94)90094-9).
78. PAKKANEN, P., and J. AALTO. Growth Factors and Antimicrobial Factors of Bovine Colostrum. *Int. Dairy Journal* [interaktyvus] 1997, 7, 285-291 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00022-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00022-8).
79. BULLEN, J. J., H. J. ROGERS, and L. LEIGHT. Iron binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *British Medical Journal* [interaktyvus] 1972, 1, 69-75 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1789269/pdf/brmedj02184-0017.pdf>
80. GRIFITHS, E., and J. HUMPHREYS. Bacteriostatic effect of human milk and bovine colostrum on *Escherichia coli*: importance of bicarbonate. *Infect Immun* [interaktyvus] 1977, 15(2), 396-401 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC421381/pdf/iai00206-0054.pdf>
81. MONTAGNE, P., M. L. CUILLIÈRE, C. MOLÉ, M. C. BÉNÉ, and G. FAURE. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. *Adv Exp*

- Med Biol* [interaktyvus] 2001, 501, 241-7 [žiūrėta 2017-03-22]. Prieiga per [doi:10.1007/978-1-4615-1371-1_30](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1371-1_30).
82. RE, R., N. PELLEGRINI, A. PROTEGGENTE, A. PANNALA, M. YANG, and C. RICE-EVANS. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* [interaktyvus] 1999, 26, 1231–1237 [žiūrėta 2017-03-24]. Prieiga per [doi:https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
83. YAMAUCHI, K., M. TOIMITA, T. J. GICHL, and R. T. ELLISON. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun* [interaktyvus] 1993, 61(2), 719-728 [žiūrėta 2017-03-24]. Prieiga per <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC302785/pdf/iai00014-0359.pdf>
84. CALS, M M., P. MAILLIART, G. BRIGNON, P. ANGLADE, and B. R. DUMAS. Primary structure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family. *Eur J Biochem* [interaktyvus] 1991, 198, 733-739 [žiūrėta 2017-03-24]. Prieiga per [doi:https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16073.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16073.x).
85. TODHUNTER, D. A., K. L. SMITH, and P. S. SCHOENBERGER. In vitro growth of mastitis-associated streptococci in bovine mammary secretions. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus] 1985, 68, 2337-2346 [žiūrėta 2017-03-25]. Prieiga per [doi:https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81108-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81108-5).
86. GAYA, P., M. MEDINA, and M. NUNEZ. Effect of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. *Appl Environ Microbiol* [interaktyvus] 1991, 57, 3355-3360 [žiūrėta 2017-03-25]. Prieiga per <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC183971/pdf/aem00064-0309.pdf>
87. THOMAS, E. L., K. A. PERA, K. W. SMITH, and A. K. CHWANG. Inhibition of *Streptococcus mutans* by the lactoperoxidase antimicrobial system. *Infection and Immunity* [interaktyvus] 1976, 39, 767-778 [žiūrėta 2017-03-28]. Prieiga per <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC348016/pdf/iai00143-0289.pdf>
88. KAMAU, D. N., S. DOORES, and K. M. PRUITT. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Appl Environ Microbiol* [interaktyvus] 1990, 56(9), 2711-2716 [žiūrėta 2017-03-28]. Prieiga per <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184832/pdf/aem00090-0131.pdf>

89. BESSER, T. E., and C. C. GAY. The importance of colostrum to the health of the neonatal calf. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* [interaktyvus] 1994, 10(1), 107-17 [žiūrėta 2017-03-28]. Prieiga per doi: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30591-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30591-0).
90. GAPPER, L.W., D. E. COPESTAKE, D. E. OTTER, and H. E. Indyk. Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [interaktyvus] 2007, 389(1),93-109 [žiūrėta 2017-04-05]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1391-z>.
91. AFZAL, A., M. S. MAHMOOD, I. HUSSAIN, and M. AKHTAR. Adulteration and microbiological quality of milk (a review). *Pak J Nutr* [interaktyvus] 2011, 10, 1195–202 [žiūrėta 2017-04-06]. Prieiga per doi:<https://scialert.net/abstract/?doi=pjn.2011.1195.1202>
92. KORHONEN. H., and A. PIHLANTO. Technological Options for the Production of Health-Promoting Proteins and Peptides Derived from Milk and Colostrum. *Current Pharmaceutical Design* [inetraktyvus] 2007, 13, 829-843 [žiūrėta 2017-04-06]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.2174/138161207780363112>.
93. HAYES, M. Bovine colostrum. *All thesis* [interaktyvus] 2010 [žiūrėta 2017-04-06]. Prieiga per https://tigerprints.clemson.edu/all_theses/987
94. GRIMBLE, G. K. Mechanisms of peptide and amino acid transport and their regulation. *Proteins, Peptides and Amino Acids in Enteral Nutrition* [interaktyvus] 2000, 3, 63-88 [žiūrėta 2017-04-08]. Prieiga per doi:[10.1159/000061797](https://doi.org/10.1159/000061797).
95. RADHA, C., P. R. KUMAR, and V. PRAKASH. Preparation and characterization of a protein hydrolysate from an oilseed flour mixture. *Food Chem* [intarekatyvus] 2007, 106, 1166–1174 [žiūrėta 2017-04-12]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.063>.
96. MANNINEN, A. H. Protein hydrolysates in sports nutrition. *Nutrition & Metabolism* [interaktyvus] 2009, 6, 38 [žiūrėta 2017-04-12]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-38>.
97. CHEN, C.W., S. H. CHIANG, S. Y. WANG, Y. T. LIN, and C. Y. CHANG. Growth inhibition and differentiating effects of protein hydrolysates from bovine colostrums on human leukemic U937 cell. *J Food Biochem* [interaktyvus] 2013, 37, 8–17 [žiūrėta 2017-04-14]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00590.x>.
98. KIM, J., H. D. PAIK, Y. C. YOON, and E. PARK. Whey protein inhibits iron overload-induced oxidative stress in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* [interaktyvus] 2013, 59, 198–205 [žiūrėta 2017-04-14]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.3177/jnsv.59.198>.

99. CHEN, C.W., S. H. CHIANG, and C. Y. CHANG. The inhibition effect of cell DNA oxidative damage and LDL oxidation by bovine colostrums. *Molecules* [interaktyvus] 2016, 21, 1378–1390 [žiūrėta 2017-04-16]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3390/molecules21101378>.
100. ZIMECKI, M., and M. L. KRUZEL. Effect Of Lactoferrin On the methotrexate-induced suppression of the cellular and humoral immune response in mice. *Anticancer research* [interaktyvus] 2004, 24, 3831-3836 [žiūrėta 2017-04-19]. Prieiga per <http://ar.iiarjournals.org/content/24/6/3831.long>
101. RATHIAS, M., RATHE K. MÜLLER, P. T. SANGILD, and S. HUSBY. Clinical applications of bovine colostrum therapy: a systematic review. *Nutrition Reviews* [interaktyvus] 2014, 72(4), 237–254 [žiūrėta 2017-04-20]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1111/nure.12089>.
102. MACDONALD, H. B. Conjugated linoleic acid and disease prevention: A review of current knowledge. *Journal of American college of nutrition* [interaktyvus] 2000, 10(2), 111-118 [žiūrėta 2017-04-19]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718082>.
103. NEWSBURG, D. S., and D. R. HILL. Clinical applications of bioactive milk components. *Nutr Rev* [interaktyvus] 2015, 73(7), 463-76 [žiūrėta 2017-04-25]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv009>.
104. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST EN ISO 8968 – 1:2014]. *Pienas ir pieno gaminiai. Azoto kiekio nustatymas. 1 dalis. Kjeldalio principas (ISO 8968 – 1:2014) = Milk and milk products. Determination of nitrogen content -- Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation: Europos Standartas EN ISO 16212:2011 turi Lietuvos standarto statusą*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2014.
105. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST ISO 8968-4:2001]. *Pienas. Azoto kiekio nustatymas (ISO 8968-4:2001)*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2001.
106. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST ISO 11870:2009]. *Pienas ir pieno gaminiai. Riebalų kiekio nustatymas. Bendrieji butirometrinių metodų taikymo nurodymai (ISO 11870:2009)*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2009.
107. LIETUVOS STANDARTIZACIJOS DEPARTAMENTAS. [LST ISO 6731:2010]. *Pienas, grietinėlė ir sutirštintas pienas. Visuminio sausųjų medžiagų kiekio nustatymas (pamatinis metodas) (ISO 6731:2010)*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2010.
108. VALGAS, C., S. M. SOUZA, E. F. A. SMANIA, and A. SMANIA. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol* [interaktyvus] 2007, 38, 369-80 [žiūrėta 2017-05-25]. Prieiga per doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>

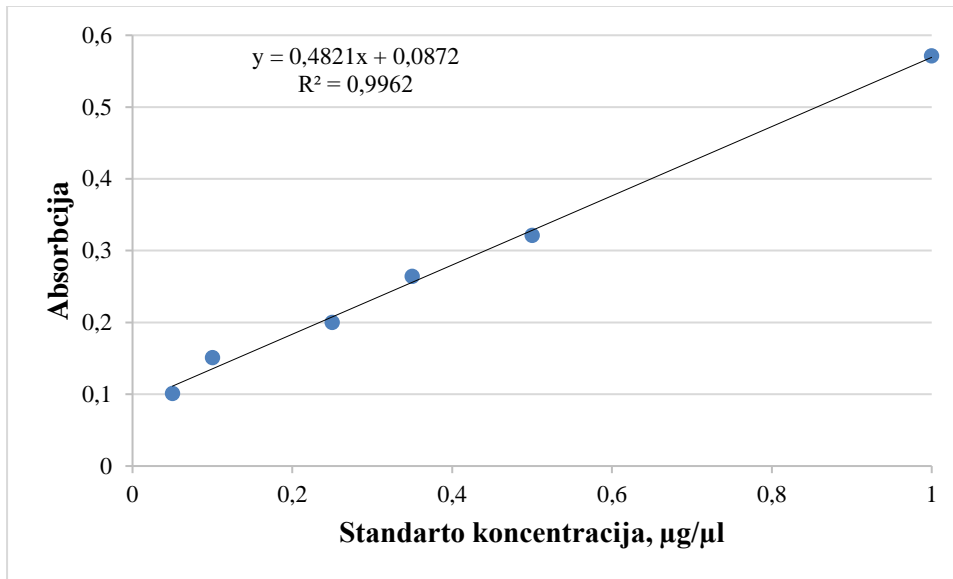
109. COSENTINO, C., G. NOTARNICOLA, R. PAOLINO, C. D'ADAMO, C. LABELLA, M. MUSTO, and P. FRESCHI. Colostrum and Milk Characteristics in Murgese Breed Mares. *Czech J. Anim. Sci* [interaktyvus] 2017, 62(11), 466–472 [žiūrėta 2017-05-27]. Prieiga per <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/227292.pdf>
110. GROSS, J. J., E. C. KESSLER, and R. M. BRUCKMAIER. Colour measurement of colostrum for estimation of colostral IgG and colostrum composition in dairy cows. *Journal of Dairy Research* [interaktyvus] 2014, 81, 440–444 [žiūrėta 2017-05-27]. Prieiga per doi:[10.1017/S0022029914000466](https://doi.org/10.1017/S0022029914000466).
111. CALDERON, F., B. CHAUVEAU-DURIOT, B. MARTIN, B. GRAULET, M. DOREAU, and P. NOZIERE. Variations in carotenoids, vitamins A and E, and colour in cow's plasma and milk during late pregnancy and the first three months of lactation. *J Dairy Sci* [interaktyvus] 2007, 90, 2335–2346 [žiūrėta 2017-05-27]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2006-630>.
112. AHMADI, M., O. BOLDURA, C. MILOVANOV, D. DRONCA, C. MIRCUI, I. HUȚU, S. POPESCU, I. PĂDEANU, and C. TULCAN. Colostrum from Different Animal Species – A Product for Health Status Enhancement. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies* [interaktyvus] 2016, 73(1) [žiūrėta 2017-05-29]. Prieiga per doi: <http://dx.doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:11949>.
113. MICIŃSKI J., J. POGORZELSKA, A. BEISENOV, I. AITZHANOVA, G. SHAIKAMAL, D. DZIĘGELEWSKA-KUŹMIŃSKA, B. MICIŃSKI, and M. SOBCZUK-SZUL. Basic And Mineral Composition Of Colostrum From Cows In Different Ages And Calving Period. *J. Elem* [interaktyvus] 2017, 22(1), 259-269 [žiūrėta 2017-05-29]. Prieiga per doi: [10.5601/jelem.2016.21.2.1159](https://doi.org/10.5601/jelem.2016.21.2.1159).
114. STREKOZOV, N. I., E. N. MOTOVA, and Y. N. FEDOROV. Evaluation of the chemical composition and immunological properties of colostrum of cow's first milk yield. *Russ Agric Sci* [interaktyvus] 2008, 34:259–260 [žiūrėta 2017-05-29]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3103/S1068367408040149>.
115. JEONG, S. G., J. S. HAM, D. H. KIM, C. N. AHN, H. S. CHAE, Y. M. YOU, A. JANG, I. K. KWON, and S. G. LEE. Physiochemical properties of colostrum by milking time of Gyeonggi Province. *Korean J Food Sci Ann* [interaktyvus] 2009, 29, 445–456 [žiūrėta 2017-05-30]. Prieiga per doi: [10.5851/kosfa.2009.29.4.445](https://doi.org/10.5851/kosfa.2009.29.4.445).
116. NARDONE, A., N. LACETERA, U. BERNABUCCI, and B. RONCHI. Composition of colostrum from dairy heifers exposed to high air temperatures during late pregnancy and the early post-partum

- period. *J Dairy Sci* [interaktyvus] 1997, 80, 838–844 [žiūrėta 2017-05-30]. Prieiga per doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76005-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76005-3).
- 117.MCINTYRE, R. T., D. B. PARRISH, and F. C. FOUNTAINE. Properties of the colostrum of the dairy cow. VII. pH, buffering capacity and osmotic pressure. *J Dairy Sci* [interaktyvus] 1952, 23, 405–422 [žiūrėta 2017-09-30] Prieiga per doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(52\)93714-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(52)93714-4).
- 118.MURAKAMI, K., M. LAGARDE, and Y. YUKI. Identification of minor proteins of human colostrum and mature milk by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* [interaktyvus]1998, 19, 2521-2527 [žiūrėta 2017-09-30] Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1002/elps.1150191427>.
- 119.RACHMANA, A. B., R. R. A. MAHESWARIB, and M. S. BACHROEMC. Composition and Isolation of Lactoferrin from Colostrum and Milk of Various Goat Breeds. *Procedia Food Science* [interaktyvus] 2015, 3, 200 – 210 [žiūrėta 2017-10-12] Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.022>.
- 120.VERARDO, V., A. M. GÓMEZ-CARAVACA, D. ARRÁEZ-ROMÁN, and K. HETTINGA. Recent Advances in Phospholipids from Colostrum, Milk and *Dairy By-Products Int J Mol Sci* [interaktyvus] 2017, 18, 173 [žiūrėta 2017-10-13] Prieiga per doi:[10.3390/ijms18010173](https://doi.org/10.3390/ijms18010173).
- 121.POP, F., and D. BOLTEA. Evaluation of oxidation and hydrolysis in milk fat during freezing storage. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* [interaktyvus] 2014, 20(1), 39-45 [žiūrėta 2017-10-13] Prieiga per [https://www.journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/21375L7_Vol_20\(1\)_2014_39-45.pdf](https://www.journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/21375L7_Vol_20(1)_2014_39-45.pdf)
- 122.LIU, Q., J. WANG, D. BU, KHAS-ERDENE, K. LIU, H. WEI, L. ZHOU, and D. C. BEITZ. Influence of linolenic acid content on the oxidation of milk fat. *J Agric Food Chem* [interaktyvus] 2010, 58(6), 3741-6 [žiūrėta 2017-10-15] Prieiga per doi:[10.1021/jf903128j](https://doi.org/10.1021/jf903128j).
- 123.CHOE, E., and D. B. MIN. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [interaktyvus] 2006, 5(4), 169 – 186 [žiūrėta 2017-10-15] Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x>.
- 124.BUČEVIĆ-POPOVIĆ, V., I. DELAŠ, S. MEĐUGORAC, M. PAVELA-VRANČIĆ, and T. KULIŠIĆ-BILUŠIĆ. Oxidative stability and antioxidant activity of bovine, caprine, ovine and asinine milk. *International Journal of Dairy Science* [interaktyvus] 2014, 67(3) [žiūrėta 2017-10-15] Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12126>.

125. VELASCO, J., and C. DOBARGANES. Oxidative stability of virgin olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol* [interaktyvus] 2002, 104, 661–676 [žiūrėta 2017-10-15] Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12126>.
126. SIMOS, Y., A. METSIOS, I. VERGINADIS, ANGELA. F. D’ALESSANDRO, P. LOIUDICE, E. JIRILLO, P. CHARALAMPIDIS, V. KOUIMANIS, A. BOULAKA, G. MARTEMUCCI, and S. KARKABOUNAS. Antioxidant and anti-platelet properties of milk from goat, donkey and cow: An in vitro, ex vivo and in vivo study. *International Dairy Journal* [interaktyvus] 2011, 21, 901-906 [žiūrėta 2017-10-25] Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.05.007>.
127. STRUSIŃSKA, D., Z. ANTOSZKIEWICZ, and J. KALINIEWICZ. The concentrations of β -carotene, vitamin A and vitamin E in bovine milk in regard to the feeding season and the share of concentrate in the feed ration. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego* [interaktyvus] 2010, 4 [žiūrėta 2017-10-25] Prieiga per http://ptz.icm.edu.pl/download/2010/tom_6_4/19_Strusinska_The_concentrations.pdf
128. H. L. MANSSON. Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr Res* [interaktyvus] 2008, 53 [žiūrėta 2017-10-29] Prieiga per doi: <https://dx.doi.org/10.3402%2Ffnr.v52i0.1821>.
129. ANANTAKRISHNAN, C. P., V. R. BHALE RAO, and T. M. PAUL. The Component Acids of Cow Colostrum. *Biochem J* [interaktyvus] 1946, 40(2), 292-297 [žiūrėta 2017-10-25] Prieiga per <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1258339/pdf/biochemj00958-0111.pdf>
130. BALDWIN, R., and H. E. LONGENECKER. Component fatty acids from the fat of cow colostrum. [interaktyvus] 1944 [žiūrėta 2017-11-22]. Prieiga per <http://www.jbc.org/content/155/2/407.full.pdf>
131. TOMÁS M.C., and M. C. AÓÓN. Study on the influence of freezing rate on lipid oxidation in fish (salmon) and chicken breast muscles. *Intern J Food Sci Technol* [interaktyvus] 1990, 25, 718–721 [žiūrėta 2017-11-22]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb01134.x>.
132. VAN DE VOORT, F.R., A. A. ISMAIL, J. SEDMAN, and G. EMO. Monitoring the oxidation of edible oils by Transform infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists Society* [interaktyvus] 1994, 71, 243–253 [žiūrėta 2017-12-22]. Prieiga per <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02638049.pdf>
133. WILSON T. A., R. T. NICOLOSI, M. CHRYSAM, and D. KRITCHEVSKY. Conjugated Linoleic acid reduces early aortic atherosclerosis greater than linoleic acid in hypercholesterolemic hamsters. *Nutr Res* [interaktyvus] 2000, 20(12), 1795–1805 [žiūrėta 2017-12-22]. Prieiga per doi: [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00268-2](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00268-2).

134. BRODY E P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition* [interaktyvus] 2000, 84, 39–46 [žiūrėta 2017-01-22]. Prieiga per doi:<https://doi.org/10.1017/S0007114500002233>.
135. MANN, S., U. K. SHANDILYA, M. SODHI, P. KUMAR, V. K. BHARTI, P. VERMA, A. SHARMA, A. MOHANTY, and M. MUKESH. Determination of Antioxidant Capacity and Free Radical Scavenging Activity of Milk from Native Cows (*Bos Indicus*), Exotic Cows (*Bos Taurus*), and Riverine Buffaloes (*Bubalus Bubalis*) Across Different Lactation Stages. *International Journal of Dairy Processing & Research* [interaktyvus] 2016 [žiūrėta 2017-02-24]. Prieiga per <https://scidoc.org/articlepdfs/IJDPR/IJDPR-03-401.pdf>
136. ZARBAN, A., F. TAHERI, T. CHAHKANDI, G. SHARIFZADEH, and M. KHORASHADIZADEH. Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Human Colostrum, Transitional and Mature Milk. *J Clin Biochem Nutr* [interaktyvus] 2009, 45, 150–154 [žiūrėta 2017-02-24]. Prieiga per doi:<https://dx.doi.org/10.3164%2Fjcbn.08-233>.

PRIEDAS Nr. 1



1 pav. Kalibracinė Bradfordo metodo kiekybinio baltymų nustatymo kreivė

PRIEDAS Nr. 2

Poliakrilamidinio gelio gamyba elektroforezei

12% atskiriančiojo gelio ruošimas:

1. Sudėtis: 30 % akrilamido/0,8 % bisakrilamido; distiliuotas vanduo; 4× Tris-HCl/NDS buferis pH 8,8; 10 % amonio persulfato (APS); 0,1 % TEMED
2. 15 ml gelio ruošinio gamybai reikia: 5,25 ml distiliuoto vandens, 6 ml akrilamido/bisakrilamido, 3,75 ml 4× Tris-HCl/NDS buferio, pH 8,8, 0,05 ml 10 % APS, 0,01 ml TEMED
3. Serologinėmis pipetėmis atmatuojami reikalingų tirpalų kiekiai. APS ir TEMED tirpalai į gelio ruošinį turi būti įmaišyti tik prieš gelio liejimą.

5% koncentruojančiojo gelio ruošimas:

1. Sudėtis: 30 % akrilamido/0,8 % bisakrilamido; distiliuotas vanduo; 4× Tris-HCl/NDS buferis pH 6,8; 10 % amonio persulfato (APS); 0,1 % TEMED
2. 5 ml gelio ruošiniui reikia: 3,05 ml distiliuoto vandens, 0,65 ml akrilamido/bisakrilamido, 1,25 ml Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 ml 10% SDS tirpalo, 25 µl 10% APS tirpalo, 5 µl TEMED
3. Serologinėmis pipetėmis atmatuojami reikalingų tirpalų kiekiai. APS ir TEMED tirpalai į gelio ruošinį turi būti įmaišyti tik prieš gelio liejimą.

2× baltymų denatūravimo buferio paruošimas. 25 ml 4× Tris-HCl/NDS buferio pH 6,8, 20 ml glicerolio, 4 g NDS, 2 ml 2-merkaptoetanolio, 1 mg bromfenolio mėlynojo ir pripilama distiliuoto vandens iki 100 ml.

Elektroforezės buferio paruošimas. 3,02 g TRIS, 14,4 g glicino, 1 g NDS ir pripilama distiliuoto vandens iki 1000 ml.

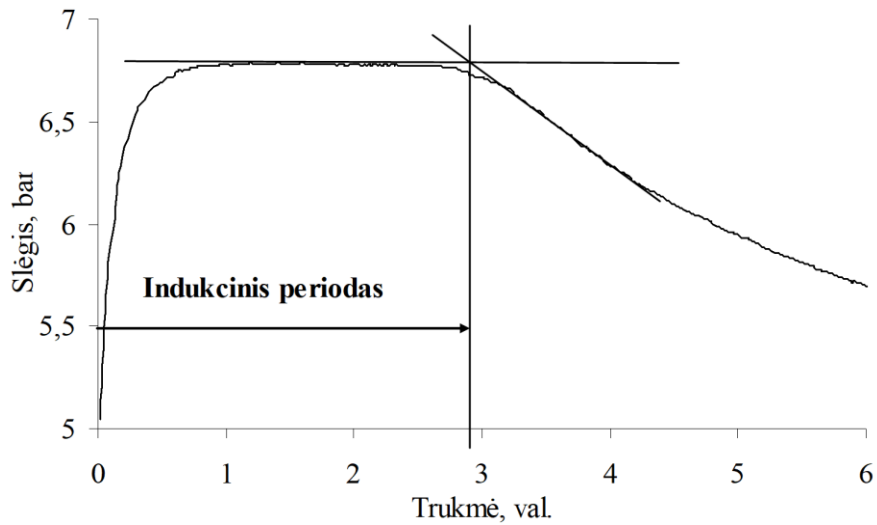
PRIEDAS Nr. 3

Luria-Bertani (LB) terpės pH 7,2. LB terpės pH sureguliuota su 1N NaOH ir 1N H₂SO₄.

1 lentelė. LB terpės paruošimas

Reagentai	Reagentų kiekiai, reikalingi 1 l terpės
NaCl	10 g
Triptonas	10 g
Mielų ekstraktas	5 g
Agar-agaras	10 g

PRIEDAS Nr. 4



2 pav. Oksipresu užrašyta oksidacijos kinetikos kreivė ir indukcinio periodo nustatymo liestinės