



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Pieno rūgštis bakterijų ir fermentų taikymas išrūgų baltymų produktų modifikavimui

Baigiamasis magistro projektas

Eglė Ragauskaitė

Projekto autorė

Doc. dr. Dalia Čižeikienė

Vadovė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Pieno rūgšties bakterijų ir fermentų taikymas išrūgų baltymų produktų modifikavimui

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Eglė Ragauskaitė
Projekto autorė

Doc. dr. Dalia Čižeikienė
Vadovė

Lekt. dr. Renata Žvirdauskienė
Recenzentė

Kaunas, 2020

Ragauskaitė, Eglė. Pieno rūgšties bakterijų ir fermentų taikymas išrūgų baltymų produktų modifikavimui. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Dalia Čižeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): biotechnologijos, technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: išrūgų baltymai, pieno rūgšties bakterijos, fermentai, fenoliniai junginiai

Kaunas, 2020. 67 p.

Santrauka

Baigiamasis magistro projektas yra skirtas ištirti pieno rūgšties bakterijų, fermentų ir fenolinių junginių taikymą išrūgų baltymų produktų modifikavimui. Šiame darbe buvo atlikta išrūgų baltymų hidrolizė fermentais (pepsinu P7000, proteaze iš *Bacillus amyloliquefaciens* P1236 ir pankreatinu P1750). Ištirta temperatūros, pH vertės ir hidrolizės trukmės įtaka išrūgų baltymų hidrolizės efektyvumui, antioksidaciniam bei antimikrobiniam išrūgų baltymų produktų aktyvumui. Didžiausias išrūgų baltymų hidrolizės efektyvumas (1,98 $\mu\text{mol/ml}$ išlaisvinto tirozino) buvo nustatytas išrūgų baltymų, paveiktų pepsinu, mėginiuose vykdant hidrolizę 40 min., 50 °C temperatūroje, terpės pH vertė 3. Didžiausias antioksidacinis bei antimikrobinis aktyvumas buvo pastebėtas išrūgų baltymų, paveiktų pepsinu, mėginiuose vykdant hidrolizę 40 min., 40 °C temperatūroje, terpės pH vertė 3. Išrūgų baltymų, paveiktų pankreatinu ir proteaze, didžiausias hidrolizės efektyvumas gautas vykdant hidrolizę 40 min., 40 °C temperatūroje, terpės pH vertė 7,5. Darbe buvo atlikta išrūgų fermentacija naudojant pieno rūgšties bakterijas (*Lactobacillus plantarum* DSM 20174, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 bei *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082). Išrūgų baltymų kiekis mažėjo vykdant fermentinę hidrolizę. Išrūgų baltymų mėginys su *Bif. bifidum* DSM 20082, fermentuotas 32 val. pasižymėjo didžiausiu proteazių aktyvumu (11 AV/ml). Tyrimo metu nustatyta, kad ilgėjant fermentacijos trukmei, stiprėja išrūgų baltymų produktų antioksidacinės savybės. Antimikrobinės fermentuotų išrūgų produktų savybės stiprėjo ilgiau vykdant fermentaciją. Tirti išrūgų baltymų hidrolizės produktai buvo antimikrobiškai aktyvūs prieš visas tyrime naudotas patogenines bakterijas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ir *Salmonella typhimurium*). Vertikalią natrio dodecilsulfato elektroforezė parodė išrūgų baltymų pokyčius atlikus fermentaciją su pienarūgštėmis bakterijomis ir fermentinę hidrolizę. Taip pat nustatytos išrūgų baltymų modifikavimo galimybės įvairiais fenoliniais junginiais (galo rūgštimi, karvakroliu ir m-cymenu). Tyrimas parodė, kad antioksidacinės savybės padidėjo, modifikuojant išrūgų baltymus fenoliniais junginiais (vidutiniškai iki 12 kartų), o antimikrobinės savybės – iki 2 kartų.

Ragauskaitė, Eglė. Application of Lactic Acid Bacteria and Enzymes for Modification of Whey Protein Products. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Dalia Čižeikienė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): biotechnology, technological sciences.

Keywords: whey protein, lactic acid bacteria, enzymes, phenolic compounds.

Kaunas, 2020. 67 p.

Summary

The final master's project is designed to investigate the application of lactic acid bacteria, enzymes and phenolic compounds to the modification of whey protein products. In this work, the hydrolysis of whey proteins using enzymes (pepsin P7000, protease from *Bacillus amyloliquefaciens* P1236 and pancreatin P1750) was performed. The influence of temperature, pH and hydrolysis time on the efficiency of whey protein hydrolysis, antioxidant and antimicrobial activity of whey protein products was investigated. The highest efficiency of hydrolysis (1.98 $\mu\text{mol/ml}$ released tyrosine) was obtained using pepsin for 40 min at 50 °C and pH 3. The highest antioxidant and antimicrobial activity were observed in the samples of whey proteins treated with pepsin for 40 minutes at 40 °C and pH 3. The highest hydrolysis efficiency of whey proteins treated with pancreatin and protease was obtained by hydrolysis 40 minutes at 40 °C and pH 7.5. Whey fermentation was performed using lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* DSM 20174, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 and *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082). Total protein content in whey decreased during enzymatic hydrolysis. The whey protein sample fermented for 32 hours with *Bif. bifidum* showed the highest protease activity (11 AV/ml). The study shows that the antioxidant properties of whey protein products increase with increasing fermentation time. The antimicrobial properties of fermented whey products were enhanced by prolonged fermentation. The tested samples of whey protein products were antimicrobially active against pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ir *Salmonella typhimurium*). The sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis showed the changes of whey proteins after fermentation and enzymatic hydrolysis. Modification possibilities of whey proteins with various phenolic compounds (gallic acid, carvacrol and m-cymene) have also been identified. The study showed that the antioxidant properties were improved by modifying the whey proteins with phenolic compounds (up to 12 times on average) and the antimicrobial properties – up to 2 times.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas.....	8
Įvadas.....	9
1. Literatūros apžvalga.....	11
1.1. Išrūgų baltymai, jų fiziologinis poveikis ir panaudojimas	11
1.1.1. Išrūgų baltymų klasifikacija	13
1.1.2. Išrūgų baltymų hidrolizė.....	14
1.1.3. Išrūgų baltymų antioksidacinės savybės.....	17
1.1.4. Išrūgų baltymų antimikrobinės savybės	19
1.1.5. Išrūgų baltymų modifikavimo fenoliniais junginiais.....	20
2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	22
2.1. Tyrimo objektai, reagentai ir instrumentai	22
2.1.1. Reagentai	22
2.1.2. Instrumentai	22
2.1.3. Tyrimo objektai	22
2.1.4. Mitybinės terpės ir buferiniai tirpalai	22
2.2. Tyrimo metodai	23
2.2.1. Pieno rūgšties bakterijų išskyrimas iš raugų.....	23
2.2.2. Proteazių aktyvumo nustatymas	23
2.2.3. Išrūgų baltymų fermentinė hidrolizė	25
2.2.4. Išrūgų fermentacija pieno rūgšties bakterijomis.....	26
2.2.5. Išrūgų baltymų modifikavimas fenoliniais junginiais	26
2.2.6. Pienarūgščių bakterijų skaičiaus nustatymas.....	26
2.2.7. Baltymų kiekio nustatymas Bradfordo metodu.....	27
2.2.8. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu.....	28
2.2.9. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu.....	29
2.2.10. Antimikrobinio aktyvumo nustatymas	29
2.2.11. Baltymų hidrolizės efektyvumo nustatymas.....	30
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	34
3.1. Pieno rūgšties bakterijų proteazių aktyvumas	34
3.2. Fermentinės hidrolizės sąlygų įtaka išrūgų produktų savybėms	34
3.2.1. Temperatūros, terpės pH vertės ir hidrolizės trukmės įtaka išrūgų baltymų hidrolizės efektyvumui.....	35
3.2.2. Temperatūros, terpės pH vertės ir hidrolizės trukmės įtaka išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui.....	36
3.2.3. Temperatūros, terpės pH vertės ir hidrolizės trukmės įtaka išrūgų baltymų produktų antimikrobiniam aktyvumui	40
3.2.4. Fermentinės hidrolizės įtaka išrūgų baltymų produktų pokyčiams	42
3.3. Fermentacijos, taikant <i>Lactobacillus</i> ir <i>Bifidobacterium</i> rūšims priklausančias bakterijas, įtaka išrūgų produktų savybėms	43
3.3.1. Pieno rūgšties bakterijų pokyčiai fermentacijos metu.....	43
3.3.2. Pieno rūgšties bakterijų įtaka proteazių aktyvumui išrūgų baltymų terpėje fermentacijos metu.....	45
3.3.3. Pieno rūgšties bakterijų įtaka baltymų kiekiui išrūgų terpėje fermentacijos metu.....	46

3.3.4. Fermentacijos su įvairiomis pieno rūgšties bakterijomis įtaka išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui.....	47
3.3.5. Fermentacijos su įvairiomis pieno rūgšties bakterijomis įtaka išrūgų baltymų produktų antimikrobiniam aktyvumui	48
3.3.6. Fermentacijos su įvairiomis pieno rūgšties bakterijomis įtaka išrūgų baltymų pokyčiams	50
3.4. Išrūgų baltymų modifikavimo fenoliniais junginiais galimybės	50
3.4.1. Modifikavimo fenoliniais junginiais įtaka išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui.....	50
3.4.2 Modifikavimo fenoliniais junginiais įtaka išrūgų baltymų antimikrobiniam aktyvumui.....	52
4. Rekomendacijų dalis	53
Išvados	55
Literatūros sąrašas	57
Publikacijų sąrašas	67

Santrumpų ir terminų sąrašas

ABTS^{•+} – 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties katijono laisvasis radikalas;
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas;
MRS – De Man, Rogosa ir Sharpe mitybinė terpė;
PRB – pieno rūgšties bakterijos;
NDS – natrio dodecilsulfatas;
TEMED – tetrametiledilendiaminas;
TRIS – *tris*(hidroksimetil)aminometanas;
WPC (Whey Protein Concentrate) – išrūgų baltymų koncentratas;
WPI (Whey Protein Isolate) – išrūgų baltymų izoliatas;
GMP – glikomakropeptidas;
 α -La – α - laktoalbuminas;
 β -Lg – β -laktoglobulinas;
BSA (Bovine Serum Albumin) – jaučio serumo albuminas;
TE – trolokso ekvivalentas;
PPO – polifenolio oksidazė;
MIX – *L. acidophilus* DSM 20079, *L. plantarum* DSM 20174 ir *Bif. bifidum* DSM 20082 bakterijų mišinys (santykis 1:1:1).

Mikroorganizmų santrumpos:

A. – *Aspergillus*;
B. – *Bacillus*;
Bif. – *Bifidobacterium*
E. – *Escherichia*;
L. – *Lactobacillus*;
P. – *Pseudomonas*;
S. – *Salmonella*;
St. – *Staphylococcus*.

Įvadas

Didėjantis vartotojų poreikis sveikesniems maisto produktams, pastaruoju metu skatina mokslininkus skirti vis didesnę dėmesį antioksidaciniu aktyvumu ir antimikrobiniu poveikiu pasižyminčių medžiagų paieškai, jų savybių tyrimams bei panaudojimo galimybėms maisto pramonėje, ypač kuriant naujus maisto produktus. Organizme vykstančių įvairių cheminių reakcijų metu susidaro laisvieji radikalai, kurie yra labai nestabilios reaktyvaus deguonies molekulės. Laisvieji radikalai atakuoja ląsteles, pažeisdami lipidų, baltymų ir DNR struktūrą, dėl to palaipsniui ląstelės pradeda senti. Žmogaus organizmo antioksidacinė sistema apsaugo organizmą nuo laisvųjų radikalų poveikio, stabdo jų susidarymą, taip pat neutralizuoja naujai susidariusius laisvuosius radikalus, o sutrikus pusiausvyrai tarp laisvųjų radikalų susidarymo ir organizme veikiančių antioksidantų, pasireiškia „oksidacinis stresas“. „Oksidacinis stresas“ pažeidžia ląsteles ir padidina kai kurių lėtinių ligų susirgimo riziką, be to, kaip manoma, viena iš senėjimo priežasčių yra „laisvųjų radikalų teorija“. Dėl „oksidacinio streso“ susilpnėja organizmo apsauga, kas ir lemia progresuojantį organizmo nusidėvėjimą. Oksidaciniam stresui išvengti labai svarbi subalansuota mityba, kurioje gausu antioksidantų. Sūrio gamybos metu susidariusių išrūgų sudėtyje yra baltymų, kurie visai neseniai buvo apibūdinti kaip antioksidantai. Literatūroje yra duomenų apie peptidų, gautų po fermentinės hidrolizės arba po fermentacijos stipresnį antioksidacinį aktyvumą, susidariusių peptidų antimikrobines savybes. Dar vienas būdas antioksidacinių ir / arba antimikrobinių medžiagų gavimui galėtų būti išrūgų fermentacija probiotinėmis pieno rūgšties bakterijomis, kurios yra pripažintos saugiomis, o jų gaminami baltyminės prigimties junginiai – bakteriocinai, laikomi natūraliais inhibitoriais ir turi GRAS statusą (angl. *Generally Recognized as Safe*) – Pasaulinės Sveikatos Organizacijos pripažinimą.

Pastaruosius du dešimtmečius susidomėjimas probiotinėmis bakterijomis tiek Lietuvoje, tiek pasaulyje stipriai išaugo. Per metus pasaulyje surengiama daugybė konferencijų, simpoziumų, kongresų probiotikų tematika. Web of Science duomenų bazėje paskelbta probiotikų tema 3194 publikacija (2019 m.), o išrūgų baltymų tyrimai publikuoti 1481 publikacijose (2019 m.), kurių cituojamumas yra labai aukštas.

Probiotikų nauda neginčijama – atlikta daugybė mokslinių tyrimų įrodančių probiotikų naudą sveikatai tiek naudojant prevenciškai, tiek gydant įvairias ligas, ypač virškinamojo trakto ligas bei stiprinant imuninę sistemą. Probiotinėms bakterijoms priskiriamos *Lactobacillus* genčiai priklausančios pieno rūgšties bakterijos, tokios kaip *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* ir kt. Pastaruoju metu didelio mokslininkų susidomėjimo sulaukė savitomis savybėmis pasižyminčių bioproduktų gamyba, naudojant jų fermentacijai atrinktas pradines kultūras ir / arba fermentus. Pienarūgštės bakterijos parenkamos pagal pageidaujamą gauti poveikį technologiniam procesui ir gatavo produkto funkcines savybes ar kokybės rodiklius. Parinkus atitinkamas pradines kultūras, galima pagerinti maisto produktų aromatą, reologines ir juslines savybes, taip pat išvengti mikrobiologinio gedimo, praturtinti produktus antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčiomis medžiagomis.

Šio mokslinio **tyrimo tikslas** – ištirti išrūgų baltymų hidrolizės ir fermentacijos produktų savybes, bei baltymų modifikavimo galimybes. Tikslui pasiekti suformuluoti penki **darbo uždaviniai**:

1. įvertinti komercinių pieno rūgšties bakterijų bei bakterijų, išskirtų iš duonos raugų, proteazinį aktyvumą.

2. atlikti išrūgų baltymų hidrolizę fermentais (pepsinu P7000, proteaze iš *B. amyloliquefaciens* P1236 ir pankreatinu P1750) ir nustatyti temperatūros, pH ir hidrolizės trukmės įtaką baltymų hidrolizės efektyvumui bei jų antioksidaciniam ir antimikrobiniam aktyvumui.
3. atlikti išrūgų fermentaciją pieno rūgšties bakterijomis *L. acidophilus* DSM 20079, *L. plantarum* DSM 20174, *Bif. bifidum* DSM 20082 ir jų mišiniu bei nustatyti pieno rūgšties bakterijų įtaką baltymų kiekiui, antioksidaciniam ir antimikrobiniam aktyvumui, pieno rūgšties bakterijų skaičių po fermentacijos, proteazinį aktyvumą.
4. įvertinti fermentacijos ir hidrolizės įtaką išrūgų baltymų pokyčiams vertikaliaja vienkrypte natrio dodecilsulfato elektroforeze.
5. nustatyti išrūgų baltymų modifikavimo galimybes įvairiais fenoliniais junginiais (galo rūgštimi, m-cymenu ir karvakroliu), ištirti modifikuotų baltymų-fenolinių junginių antioksidacinį ir antimikrobinį aktyvumą.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Išrūgų baltymai, jų fiziologinis poveikis ir panaudojimas

Išrūgos yra šalutinis pieno pramonės produktas. Tai vertingos maistinės medžiagos, turinčios svarbių funkcinių ir maistinių savybių. Pienas pasižymi dviem vertingais baltymų šaltiniais: išrūgų baltymais ir kazeinu [1]. Karvės piene yra apie 80 % kazeino ir 20 % išrūgų baltymų [2, 3]. Išrūgų baltymai yra pieno sudedamoji dalis ir yra viena naudingiausių maistinių medžiagų [4]. Išrūgų baltymai pasižymi išskirtinėmis savybėmis, tokiomis kaip didelis virškinimo greitis [5], didelis α -laktalbumino, β -laktalbumino, šakotų aminorūgščių grandinių ir glutamino kiekis, lyginant su kitais baltymų šaltiniais [6, 7, 8]. Taip pat jie yra tirpūs, juose gausu aminorūgščių, mineralų, vitaminų, laktozės [9] ir glikomakropeptidų (GMP), laktoferino ir laktoperoksidazės (žr. 1.1 lentelę) [10, 11]. Išrūgų baltymai, turintys reikiamą lizino kiekį, gali būti naudojami kaip augalinių baltymų papildas, ypač javų grūdų produktuose [12]. Kadangi išrūgų baltymai pasižymi išskirtinėmis savybėmis, jie plačiai naudojami maisto pramonėje įvairių rūšių sūriams ir duonai gaminti. Moksliniai tyrimai parodė, kad išrūgų baltymai gali pagerinti sveikatą – buvo atlikta daugybė tyrimų apie teigiamą išrūgų baltymų poveikį žmogaus sveikatai ir medžiagų apykaitos ligų, tokių kaip nutukimas ar diabetas, prevenciją [13, 14, 15]. Išrūgų baltymai gali stimuliuoti insulino sekreciją, nes juose esančios šakotos aminorūgščių grandinės, pavyzdžiui, izoleucinas, trukdo gliukozės pernešimą ir tai gali padėti sumažinti atsparumą insulinui antro tipo diabetu sergantiems žmonėms. Be to, išrūgų baltymai apsaugo nuo hiperglikemijos. Tyrimai patvirtina šių baltymų poveikį svorio metimui ir riebalų kaupimosi organizme mažinimui. Remiantis kai kuriais tyrimais, išrūgų baltymai, turintys šakotas aminorūgščių grandines (leucinas, valinas ir izoleucinas), efektyviai mažina trigliceridų ir cholesterolio kiekį. Išrūgų baltymai taip pat skatina riebalų išsiskyrimą iš organizmo ir neleidžia kauptis riebalams [5]. Osama ir jo kolegos [16] taip pat pareiškė, kad išrūgų baltymai turi reikšmės bakterijų sukeltų kvėpavimo takų infekcijų prevencijai ir gyjimui. Remiantis atliktais moksliniais tyrimais, išrūgų baltymai daro teigiamą poveikį kepenims [17] ir apsaugo DNR nuo pažeidimo. Be to, išrūgų baltymų vartojimas daro tiesioginį poveikį organizmo antioksidaciniam aktyvumui, raumenų fiziniam pajėgumui, mažina cukraus kiekį kraujyje po valgio, apsaugo nuo kai kurių vėžio rūšių [5]. Taikant pažangias technologijas, skirtas gryninimo procesams, yra išgaunami išrūgų baltymai ir gaminami kaip koncentratas (išrūgų baltymų koncentratas, WPC) arba kaip izoliatas (išrūgų baltymų izoliatas, WPI).

1.1 lentelė. Biologinės išrūgų baltymų funkcijos ir koncentracijos karvės piene [5]

Išrūgų komponentai	Kiekis, g/l	Privalumai / funkcijos
Bendras išrūgų baltymų kiekis	5,5–7,0	
Kazeino / išrūgų santykis	4,7	
β -laktoglobulinas	3,2–3,3	Nepakeičiamų ir šakotos grandinės aminorūgščių šaltinis, antioksidantas. Prisijungimas prie retinolio ir riebalų rūgščių. Slopina naviko vystymąsi.
α -laktoalbuminas	1,2–1,3	Nepakeičiamų ir šakotos grandinės aminorūgščių šaltinis, imunomodulatorius, antikancerogenas. Gamina laktozę, pernešą kalcį, slopina naviko vystymąsi.
Imunoglobulinas	0,5–1,0	Priešuždegiminis, antimikrobinis. Patogenų slopinimas, fagocitozės aktyvinimas, atsakas į alergenų.

1.1 lentelė (tęsinys). Biologinės išrūgų baltymų funkcijos ir koncentracijos karvės piene [5]

Serumo albuminas	0,3–0,4	Antioksidantas, opioidų agonistas, augimą slopinantis poveikis žmogaus krūties vėžio ląstelėms.
Laktoferinas	0,02–0,1	Antioksidantas, antibakterinis, antikancerogeninis, antivirusinis, priešgrybeliniai vaistai skatina naudingų bakterijų augimą.
Lizocimas	labai maži kiekiai / pėdsakai	Antimikrobiniai, sinergijos veiksmai su imunoglobulinais ir laktoferinu.
Glikomakropeptidas	1,2	Antivirusinis, bifidogenas.

Išrūgų baltymų aminorūgštys, turinčios sieros, palaiko glutationo lygį ir pasižymi antioksidaciniu aktyvumu organizme. Didelis kiekis lizino ir arginino skatina metabolinio hormono sekreciją ir skatina žmogaus raumenų augimą. Išrūgų baltymai pasižymi išskirtinėmis hidrodinaminėmis arba su hidratacija susijusiomis savybėmis, įskaitant vandens absorbciją, tirpumą, klampumą ir geliaciją, be to, pasižymi geromis paviršiaus aktyviosiomis savybėmis, tokiomis kaip emulsinimas, putų susidarymas ir plėvelės formavimo galimybės. Todėl išrūgų baltymai yra funkciniai komponentai pridėtinės vertės produktų gamyboje [18].

Nors išrūgų baltymai pasižymi biologinėmis ir funkcinėmis savybėmis, yra sukurti kai kurie išrūgų baltymų biologinio aktyvumo ir funkcionalumo pagerinimo metodai, įskaitant fizinį, cheminį ir fermentinį metodą. Fizinis išrūgų baltymų modifikavimas paprastai laikomas saugiu, netoksišku ir nekenksmingu aplinkai. Cheminis modifikavimas yra veiksmingas būdas pagerinti išrūgų baltymų funkcines savybes, tačiau cheminėms reakcijoms atlikti yra naudojami toksiški reagentai ir tai gali sukelti pavojų. Taikant fermentinę hidrolizės technologiją, išrūgų baltymai gali būti hidrolizuojami, kad būtų gauti bioaktyvūs peptidai, tačiau šie peptidai yra kartaus skonio. Fizikinis išrūgų baltymų modifikavimas suteikia didelį pranašumą prieš kitus metodus. Pastaraisiais metais daugelyje tyrimų buvo atkreiptas dėmesys į ultragarso poveikį išrūgų baltymams. Pavyzdžiui, WPI suspensijų tirpumas ir putojimo savybės sumažėjo atlikus tyrimą naudojant ultragaršą. Aukšto intensyvumo ultragaršas gali būti naudojamas gaminant WPI gelius, pasižyminčius aukštesnėmis gelio savybėmis. Be to, dėl ultragarso ir šildymo sumažėja membranos užsiteršimas išrūgų ultrafiltracijoje. Apdorojimas ultragarsu padidino gelio stiprumą ir išrūgų baltymų putų stabilumą [18].

Panaudojimas. Anksčiau išrūgos bei išrūgų baltymų produktai buvo laikomi sūrių gamybos atliekomis, tačiau šiais laikais jie yra plačiai naudojami dėl vertingų funkcinių ir maistinių savybių [19, 20]. Išrūgų baltymų panaudojimas skirtinguose maisto produktuose skiriasi priklausomai nuo jų panaudojimo tikslo. Tačiau išrūgų baltymai dažniausiai yra naudojami biologinei vertei padidinti, geresnėms fizinėms, tekstūros ar kitoms maisto funkcinėms savybėms stiprinti, sensorinėms savybėms gerinti ir produktams, kuriuose yra daug baltymų. Išrūgų baltymai yra plačiai naudojami maisto pramonėje kaip komponentai tokiuose produktuose kaip pieno produktai (ypač sūriai, jogurtai, sausieji pieno mišiniai ir gėrimai iš pieno), medicininis maistas, maistas, skirtas sportininkams, enterinis maistas, gėrimai, sriubos ir baltymų batonėliai. Išrūgų baltymai išpopuliarėjo kaip funkcinis maistas, naudojamas sportininkų dietoms stiprinti, nes juose gausu raumenis stiprinančių aminorūgščių. Didelis susidomėjimas išrūgų baltymų vartojimu yra susijęs su galima nauda sveikatai, įskaitant padidėjusį sotumą, medžiagų apykaitos reguliavimą ir kaip svorio mažinimo intervencijos programos dalis. Viena iš išrūgų baltymų panaudojimo sričių – baltyminiai gėrimai, tokie kaip maisto pakaitalai ar sportininkų gėrimai. Išrūgų baltymų gėrimai turi būti termiškai apdorjami, kad būtų užtikrintas saugumas ir stabilumas. Pagrindiniai išrūgų baltymų gėrimų gamybos reikalavimai yra

didelė baltymų koncentracija, stabilumas termiškai apdorojant, tinkamas klampumas ir jutiminės savybės bei stabilumas po perdirbimo [21].

Taip pat išrūgų baltymai tapo vis labiau naudojami kaip riebalų pakaitalai, nes jie pasižymi mažomis energijos savybėmis, o kartu ir konkurencingomis sensorinėmis savybėmis ir yra aptinkami tokiuose produktuose kaip ledai, sūris bei jogurtai. Išrūgų baltymai dėl savo funkcinių savybių naudojami kaip emulsikliai ar putų stabilizatoriai. Išrūgų baltymai taip pat naudojami kepinuose, mėsos produktuose, riebioms užtepėlėms, desertams ir padažams gaminti. Šiais laikais mokslininkai itin stengiasi išsiaiškinti naujas išrūgų baltymų panaudojimo galimybes. Tyrėjams itin aktualu išsiaiškinti valgomųjų plėvelių gamybos principą naudojant išrūgų baltymus. Valgomosios arba biologiškai skaidomos plėvelės yra patogi priemonė, galinti pailginti maisto produktų galiojimo laiką ir pagerinti jų kokybę, nedidinat aplinkos taršos. Šios plėvelės yra „žalia“ tradicinio plastiko alternatyva. Dėl puikių deguonies barjerinių savybių, išrūgų baltymų plėvelės gali būti konkurencingos biologiškai skaidžioms medžiagoms, pakeičiančioms nailoną arba poliesterius, kurios paprastai naudojamos kaip deguonies barjerai [22].

1.1.1. Išrūgų baltymų klasifikacija

Išrūgų baltymai yra klasifikuojami pagal turimą baltymų kiekį į: hidrolizatus, išrūgų baltymų koncentratų (WPC) ir išrūgų baltymų izoliatus (WPI). WPC ir WPI taip pat yra svarbūs komponentai gaminant pridėtinę vertę [23]. Pagrindiniai baltymai tokiose išrūgų sistemose yra pieno globulininiai baltymai, α -laktalbuminas ir β -laktoglobulinas, nedideli serumo albumino ir imunoglobulinų kiekiai (žr. 1.2 lentelę) [24].

1.2 lentelė. Išrūgų baltymų sudėtis ir jų molekulinė masė [25]

Baltymai	Sudėtis (%)	Molekulinė masė (kDa)
β -laktoglobulinas	48–58	18
α -laktoalbuminas	13–19	14
Glikomakropeptidas	12–20	8,6
Jaučio serumo albuminas	6	66
Imunoglobulinas	8–12	150
Laktoferinas	2	77
Laktoperoksidazė	0,5	78

Hidrolizuoti išrūgų baltymai. Hidrolizuotos išrūgos sudaro dalį išrūgų baltymų, hidrolizuotų į mažesnius fragmentus (peptidus, aminorūgštis). Hidrolizei atlikti naudojami fermentai, tokie kaip tripsinas, chimotripsinas ir kt. Produkto profilis labai skiriasi. Konkretūs naudojami fermentai, fermentų kompozicijos, reakcijos laikas, reakcijos temperatūra ir kt. veiksniai yra svarbūs ir gali turėti įtakos gaminamų baltymų fragmentų tipui.

Šiuo metu gamintojai WPC naudoja kaip pradinę medžiagą hidrolizuotų baltymų, pasižyminčių didesniu baltymų kiekiu, gamybai [26]. Komercinių hidrolizuotų išrūgų baltymų sudėtis: 80–90 % baltymų, 0,5–8 % riebalų ir 0,5–10 % laktozės [27].

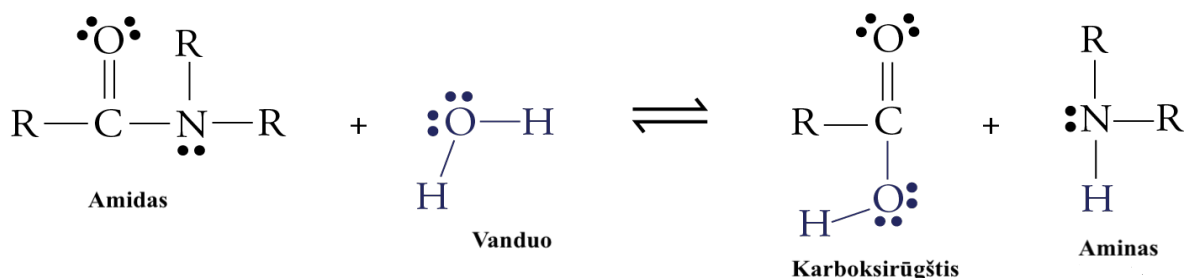
Išrūgų baltymų koncentratas (WPC). WPC gaminamas naudojant slėgio procesą, vadinamą ultrafiltracija. Ultrafiltracijai naudojamos pusiau pralaidžios membranos. Laktozė ir mineralai yra pašalinami, kol bus pasiektas norimas baltymų kiekis. Šalutinis šio proceso produktas yra skvarbus.

Norint pašalinti didesnę kiekį laktozės ir pelenų iš daugiau baltymų turinčių WPC, diafiltracijos procesui atlikti yra reikalingas vanduo. Baltymai nėra denatūruoti ultrafiltracijos proceso metu, todėl WPC gali būti labai tirpūs. Gali būti naudojamos saldžiosios arba rūgščiosios išrūgos, tačiau WPC paprastai gaminamos iš saldžiųjų išrūgų. Išrūgų baltymų koncentratai – laktozė, mineralai ir nebaltyminiai azoto junginiai pašalinami, tokiu būdu sukonzentruojant baltymų frakciją. Galutiniame sausame produkte turi būti ne mažiau kaip 25 % baltymų [26]. Komercinių WPC sudėtis: 34–80 % baltymų, 1–7 % riebalų ir 4–52 % laktozės [27].

Išrūgų baltymų izoliatai (WPI). Išrūgų baltymų koncentratai, kurių baltymų kiekis sausoje medžiagoje sudaro daugiau kaip 90%, yra vadinami išrūgų baltymų izoliatais. WPI gaminami vienu iš dviejų būdų: mikrofiltracija / ultrafiltracija arba atliekant jonų mainų chromatografiją. WPI baltymų sudėtis priklausys nuo naudojamo metodo. Didžiausias skirtumas yra glikomakropeptido (GMP) buvimas. GMP yra baltymo fragmentas, atsirandantis dėl šliužo fermento poveikio kazeinui gaminant sūrius. Jonų mainų proceso metu GMP yra pašalinamas, o mikrofiltracijos / ultrafiltracijos proceso metu yra išsaugomas GMP ir randamas galutiniame WPI produkte [26]. Komercinių WPI sudėtis: 90–95 % baltymų, 0,5–1 % riebalų ir 0,5–1 % laktozės [27].

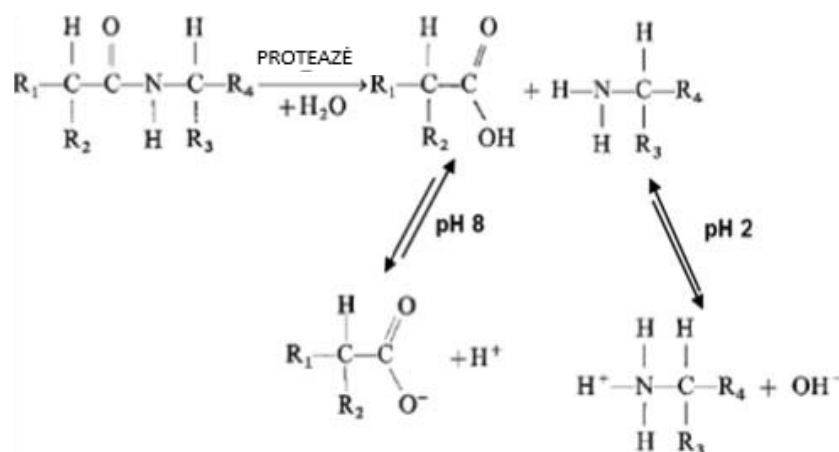
1.1.2. Išrūgų baltymų hidrolizė

Baltymų hidrolizės metu prie peptidinės jungties pridedama suskaidyta vandens molekulė, kuri padalijama taip, kad būtų atlaisvinti du galai su karboksirūgšties grupe (C–galas) ir amino grupe (N–galas) (žr. 1.1 pav.). (N–C) jungties skilimui įtakos turi fermentai, pavyzdžiui, proteazės. Pasak mokslininkų, fermentas, toks kaip galvijų tripsinas (EC 3.4.21.4) yra specifiškas peptidinių ryšių, susiformavusių tarp bet kurios kitos aminorūgšties, skilimui lizino ar arginino C terminaluose, išskyrus atvejus, kai ta kita aminorūgštis yra prolinas [28].



1.1 pav. Baltymų hidrolizės mechanizmas, kuriame pridedama vandens molekulė, kad suskaidytų amidinį ryšį

Suskaidžius peptidines jungtis, terminalai yra jonizuojami, atsižvelgiant į tam tikras hidrolizės sąlygas, tokias kaip terpės pH ir temperatūra. Hidrolizės metu esant rūgštiniam pH, išsiskiria hidroksilo jonų grupės, tuo tarpu esant šarminiam pH, hidrolizė sukelia H⁺ išsiskyrimą (žr. 1.2 pav.).



1.2 pav. Peptidų hidrolizės mechanizmas, rodantis jonizacijos galimybes esant skirtingoms terpės pH vertėms: pH 2 ir pH 8

Tyrimai parodė, kad esant rūgščiai hidrolizei, pH vertė hidrolizės metu didėja, o hidrolizės metu esant šarminiam pH – pH vertė mažėja. Dėl baltymų, ypač pieno baltymų, buferinio poveikio (gebėjimas palaikyti tam tikrą terpės pH) tikėtina, kad pH pokytis nėra visiškai proporcingas vandenilio ir (arba) hidroksilo jonų išsiskyrimui. Fermentai yra jautrūs terpės pH ir esant netinkamam pH fermentai denatūruos, todėl hidrolizės pH yra reguliuojamas pridendant buferinių tirpalų arba tiesiog naudojant natrio šarmą ar vandenilio chloridą, kurių koncentracija neviršija 2 mol/l, kad nedenatūruotų baltymai [28]. Hidrolizės laipsnis yra svarbus baltymų hidrolizės indeksas, nulemiantis keletą hidrolizatų savybių [29]. Hidrolizuotų baltymų peptidų kompozicija įvertinama nustatant peptido pasiskirstymą pagal grandinės ilgį. Peptidų grandinės ilgis turi įtakos absorbcijos greičiui, taip pat ir baltymų maistinei vertei [30].

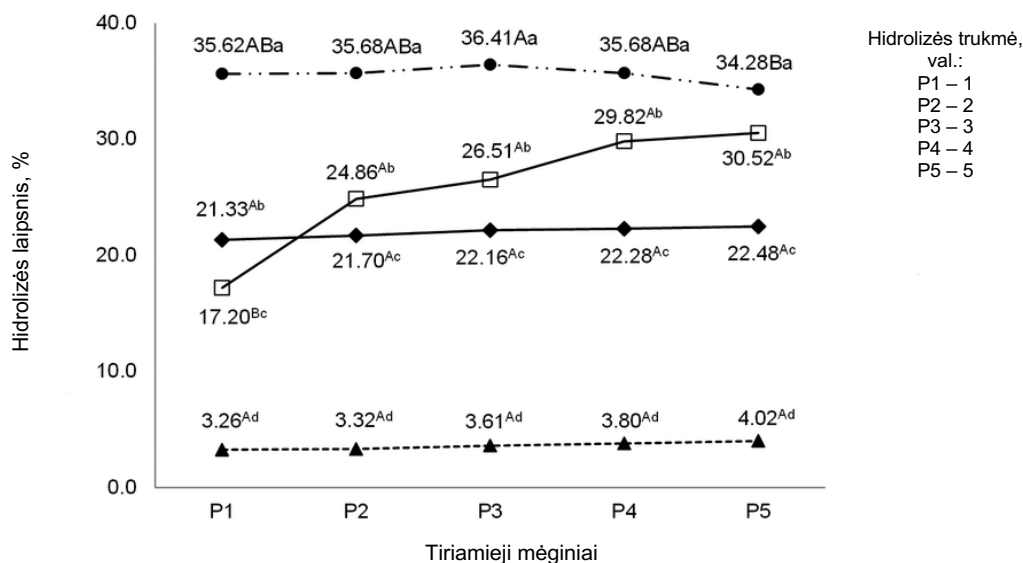
Hidrolizės laipsnis nurodo suhidrolizuotų peptidinių jungčių procentą [31]. Pastebėta sąsaja tarp hidrolizės trukmės, išmatuoto hidrolizės laipsnio ir hidrolizatų savybių, tokių kaip alergišumas, funkcinės savybės ir biologinis aktyvumas, tačiau įtakos antioksidaciniam išrūgų baltymų hidrolizatų veikimui jis neturi [28, 32]. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad hidrolizės laipsnis turi įtakos peptidų kartumui – tai savybė, kuri gali neigiamai paveikti baltymų hidrolizatų pritaikomumą [28].

Fermentinei hidrolizei atlikti gali būti naudojamos kelių rūšių proteazės, viena iš jų – pankreatinas. Pankreatinas – tai fermentinis kompleksas, kurio sudedamosios dalys yra iš kasos išskiriami fermentai. Šis fermentinis preparatas pasižymi proteolitiniu, amilolitinu bei lipolitinu aktyvumu. Šios pankreatino proteazės yra suskirstytos į endopeptidazes (tripsiną, chimotripsiną ir elastazę) ir eksopeptidazes (A ir B karboksipeptidazes) [33]. Hidrolizės laipsniui įtakos turi hidrolizės trukmė – didėjant trukmei hidrolizės laipsnis gali mažėti, didėti ar išlikti pastovus (žr 1.3 pav.).

Baltymų hidrolizė pagerina funkcines ir maistines savybes, nesumažinus maistinės vertės. Išrūgų baltymų hidrolizė atliekama naudojant rūgštis, šarmus ir fermentus. WPI hidrolizė atliekama siekiant pagerinti baltymų šilumos stabilumą (baltymų savybė, padedanti išvengti pažeidimų aukštoje temperatūroje), sumažinti alergišumą, pagerinti virškinamumą ir išlaisvinti bioaktyvius peptidus [28].

Literatūros duomenimis fermentus naudoti hidrolizei yra geriau, nes jie yra laikomi saugiais (GRAS), o hidrolizatai yra gaminami esant švelnioms terpės pH ir temperatūros sąlygoms, kurios yra nepalankios šalutinių reakcijų produktų susidarymui. Cheminės hidrolizės metu yra pagaminama

daugiau laisvų aminorūgščių nei fermentinės hidrolizės metu. Kai kurios aminorūgštys, tokios kaip triptofanas, asparaginas ir glutaminas, yra prarandamos cheminės hidrolizės metu, o asparagino ir glutamino atveju jos virsta rūgšties dariniais, atitinkamai asparto ir glutamo rūgštimis [28].



1.3 pav. WPC hidrolizatų hidrolizės laipsnis, gautas veikiant pankreatinu. Metodai: formolio titravimo metodas (□), reakcija su orto-ftaladehidu (◆), užšalimo temperatūros metodas (○), tirpių baltymų kiekis (▲). Skirtingos didžiosios raidės žymi tų pačių metodų, bet skirtingų hidrolizatų esminius skirtumus, o mažosios raidės žymi skirtingas to paties hidrolizato, bet skirtingų metodų esminius skirtumus [30]

Išrūgų baltymams hidrolizuoti yra naudojami įvairūs fermentai. Jie apima gyvūninės kilmės fermentus, tokius kaip tripsinas, chimotripsinas ir pepsinas. Tyrimuose buvo naudojami ir augalinės kilmės fermentai, tokie kaip papainas, *Cardosin A*, taip pat *Cynara cardunculus* ekstraktai. Mikrobinės kilmės fermentai pasižymi plačiu selektyvumu ir labai gerai hidrolizuoja baltymus – pasiekiamos aukštos hidrolizės laipsnio vertės. Išrūgų baltymai buvo hidrolizuoti naudojant fermentą alkalazę, *Debitrase* (natūralus pieno skonio fermentas, mažinantis kartumą išrūgų perdirbimo metu), *flavorzyme* (proteazė iš *Aspergillus oryzae*), neutrazę, proteazę N, proteazę A ir proteazę iš *Bacillus sp.* [28].

Priešpienio išrūgos, turinčios jaučio serumo albumino (BSA), α -laktoalbumino ir β -laktoglobulino, buvo hidrolizuotos naudojant įvairius fermentus. Tyrimo rezultatai parodė, kad papainas nepilnai suhidrolizavo BSA, β -Lg ir α -La. Priešingai, pepsinas visiškai pašalino BSA, bet ne β -Lg, esančio pašildytose išrūgose. Alkalazė visiškai pašalino BSA, β -Lg ir α -La iš priešpienio. Be to, pašildytos ir natūralios išrūgos buvo hidrolizuotos naudojant fermentus pepsiną ir tripsiną [34]. α -La natūraliose WPC buvo šiek tiek suskaidytas, kai išrūgos buvo inkubuotos su 0,1 % pepsinu, po to su 0,1 % tripsinu, o per 60 minučių po inkubacijos buvo beveik visiškai suhidrolizuotas su 0,5 % pepsinu ir po to su 0,5 % tripsinu. Natūralaus WPC inkubavimas su 1 % pepsinu ir po to su 1 % tripsinu 30 min. visiškai pašalino BSA ir α -La. Natyvinių WPC esančio β -Lg, pepsinas ir tripsinas nepaveikė. Priešingai, β -Lg pakaitintose WPC buvo iš dalies suhidrolizuotas apdorojant 0,1 ir 0,5 % pepsinu bei tripsinu ir buvo visiškai suskaidytas apdorojant 1 % pepsinu ir tripsinu [28].

Mikrobinės kilmės proteazės paprastai atakuoja atsitiktinius peptidų ryšius, todėl susidaro kartūs hidrolizuoti produktai, turintys trumpus hidrofobinius peptidus bei aukštą hidrolizės laipsnį. Kadangi hidrolizės tikslas yra gauti produktą, turintį palankias funkcines ir bioaktyvias savybes, svarbu

užtikrinti, kad juslinės savybės nebūtų neigiamos. Mokslinių šaltinių duomenimis hidrolizatų kartumas yra susijęs su peptido struktūra, o galinės aminorūgštys lemia keletą ryškių kartaus skonio savybių, išskyrus hidrofobinių aminorūgščių buvimą. Mokslininkai taip pat tvirtina, kad tvirtos hidrofobinės aminorūgštys C gale ir nepatogios bazinės aminorūgštys N gale siejamos su kartumu. Ši peptidų savybė yra pritaikoma panaudotam fermentui ir baltymo aminorūgščių sekai, nes kiekvienas fermentas turi unikalų hidrolizės modelį, o tai reiškia, kad galinės aminorūgštys priklausys nuo to, kaip baltymas yra „užpultas“ fermento. Fermento pasirinkimas gali turėti įtakos peptidų kartumui [28].

1.1.3. Išrūgų baltymų antioksidacinės savybės

Išrūgų baltymai, šalutinis produktas, pripažintas vertingu maisto ingredientu, turinčiu svarbių maistinių ir funkcinių savybių, vis labiau pripažįstami kaip funkciniai maisto komponentai. Literatūros duomenimis, daugelis augalinės ir gyvūninės kilmės baltymų pasižymi geromis antioksidacinėmis savybėmis. Ankstesniuose tyrimuose buvo įrodyta, kad išrūgų ir sojos baltymų hidrolizatai gali būti naudojami kaip natūralūs antioksidantai. Terminiškai apdoroto WPI hidrolizė, trukusi 0,5 arba 1 val. sąlygojo stipriomis antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių hidrolizatų susidarymą. Šių mėginių analizė vykdant elektroforezę parodė, kad išrūgų ir sojos baltymų hidrolizatai turi tarpinių ir mažų baltymų frakcijas (<6 kDa). Todėl buvo pasiūlyta, kad hidroliziniai komponentai, turintys antioksidacinį aktyvumą, gali būti lyginami su mažos molekulinės masės peptidais, taip pat tam tikromis laisvosiomis aminorūgštimis. Tyrimai rodo, kad išrūgų baltymų hidrolizatų gebėjimas slopinti žalingus pokyčius, kuriuos sukelia lipidų oksidacija, yra susijęs su tam tikrais peptidų aminorūgščių likučiais, tokiais kaip tirozinas, metioninas, histidinas, lizinas ir triptofanas [32]. Mažos molekulinės masės rūgščių išrūgų baltymų frakcijos liposominėje sistemoje slopina nemetalų bei metalų oksidaciją. Tong'as ir kt. [35, 36] ištyrė didelės molekulinės masės išrūgų komponentų antioksidacinį aktyvumą emulsijos sistemoje. Rezultatai parodė, kad didelės molekulinės masės baltymai, slopindami lipidų peroksido gamybą, buvo veiksmingesni nei mažos molekulinės masės polipeptidai. Laisvosios aminorūgštys taip pat gali sulėtinti lipidų oksidaciją. Įrodyta, kad kelios aminorūgštys, tokios kaip tirozinas, metioninas, histidinas, lizinas, triptofanas ir prolinas, veikia kaip antioksidantai, nors tam tikrais atvejais (pvz., didelėmis koncentracijomis) jos taip pat gali veikti kaip prooksidantai [37]. Dryakova ir kt. [38] nustatė, kad atliekant hidrolizę su mikrobu proteazėmis (alkalaze, *Flavourzyme*, *Protamex* ir *neutraze*), išrūgų baltymų antioksidacinis aktyvumas padidėjo nuo 7–19,8 iki 40–54,2 %. Kyla susirūpinimas dėl galimo sintetinių antioksidantų poveikio sveikatai, todėl pastaruoju metu padidėjo natūralių antioksidantų poreikis. Dėl šios priežasties daugėja mokslinių tyrimų, skirtų natūralių antioksidantų, gautų iš maisto ingredientų, kurie galėtų sulėtinti lipidų peroksidaciją, kūrimui [39].

Išrūgų baltymų izoliatai (WPI) yra plačiai naudojami kaip funkciniai maisto produktų ingredientai. Buvo pasiūlyta keletas būdų, kaip modifikuoti išrūgų baltymus, kad būtų galima visapusiškai išnaudoti jų funkcines savybes. Aukštas slėgis, terminis apdorojimas ir fermentinė hidrolizė gali veiksmingai pakeisti struktūrą ir taip pakeisti išrūgų baltymų funkcionalumą. Hidrolizatų savybės priklauso nuo naudojamo fermento tipo, hidrolizės laipsnio, aplinkos sąlygų ir pirminio substrato apdorojimo. Naujausi tyrimai parodė, kad kai kurie maisto baltymai, hidrolizuojami tam tikrais fermentais ar rūgštimis, gali veikti kaip antioksidantai pavyzdinėse sistemose. Peptidai, turintys antioksidacinį poveikį, turi didelį potencialą būti naudojami kaip natūralūs antioksidantai maisto produktuose. Skirtingais metodais įvertintos išrūgų baltymų antioksidacinės savybės pateiktos 1.3 lentelėje.

Aminorūgščių sudėtis, seka ir peptidų konfigūracija taip pat veikia jų antioksidacinį aktyvumą. Įrodytas antioksidacinis kai kurių di- arba tripeptidų poveikis aliejaus ar metalų katalizuojamose liposominėse suspensijose. Įrodytas rūgščių išrūgų antioksidacinis aktyvumas liposomų modelių sistemoje ir saldžiųjų išrūgų miltelių, esančių sojų aliejuje, aktyvumas buvo priskirtas nežinomiems peptidams [32].

1.3 lentelė. Apdorojimo būdų ir fermentinės hidrolizės poveikis antioksidaciniam išrūgų baltymų izoliato, išrūgų baltymų koncentrato ir išrūgų baltymų aktyvumui [27]

Produktas ¹	Apdorojimas karščiu	Fermentas, sąlygos	Metodas ²	Rezultatai ³	Lit. šaltinis
WPI (95% baltymų)	pašildyti 95°C, 5 min.	Subtilizinas (pH 8,5, 65 °C, po 1, 2, 3, 4, 5 ir 8 val.)	DPPH	Hidrolizė pagerino antioksidacines savybes (DPPH slopinimas: WPI = 11,4 %, 5 val. Hidrolizuoti WP = 62,9 %)	[40]
WPI	pašildyti 85°C, 15 min.	Papainas (pH 8,0, 35–55 °C, 2–6 val.)	DPPH	didesnis antioksidacinis aktyvumas po hidrolizės (3,6 val. 45,7 °C (DPPH = 31,36 %))	[41]
	nešildyti arba pašildyti (80 °C, 15 min.)	Pepsinas (pH 2,6, 37 °C) Tripsinas (pH 7,8, 37 °C) Chimotripsinas (pH 7,8, 37 °C) 12 arba 24 val.	ABTS ORAC	Hidrolizė pagerino antioksidacines savybes (WPH tripsinas = 0,32, WPI = 0,08 μmol of TE/mg baltymų) Nepastebėta skirtumo tarp fermentų, trukmės ir pašildymo	[42]
		Papainas (pH 7,0, 65 °C, 0–5 val.) Pepsinas (pH 2,0, 37 °C, 0–5 val.) Subtilizinas (pH 8,3, 55 °C, 0–5 val.)	FRAP	Antioksidacinis aktyvumas, naudojant papainą, priklausė nuo laiko. Nepastebėti pokyčiai antioksidaciniame aktyvume naudojant subtiliziną ar pepsino hidrolizatus.	[43]
Natyvinių WPI (1 mg/ml)		Apdorojimas slėgiu (1 ciklas 550 MPa), pepsinas (pH 1,9, 37 °C, 15 min.), tripsinas, chimotripsinas ir peptidazė (pH 7,4, 37 °C, 1 val.), filtracija per membranas (10 kDa permeato)	FRAP	WPI pasižymėjo geresniais rezultatais – 21 % didesnis antioksidacinis aktyvumas nei natyvinių WPI	[44]
WPI (≥ 90 % baltymų)	pašildyti (85 °C, 5 val., pH 2,0)	Fermentų kompleksas Corolase N (pH 7,7, 55 °C, 5 val.)	DPPH	Hidrolizė ir kaitinimas padidino antioksidacinį aktyvumą WPI = 13 %, WPH = 60 %)	[45]
WPC (80 % baltymų)			DPPH	WPC antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo dozės (20–100 mg/100 ml)	[46]
WPC	nešildyti arba pašildyti (95 °C, 5–10 min.)	Pepsinas (pH 2,0, 37 °C, 2 val.) Tripsinas (pH 8,0, 37 °C, 2 val.) Subtilizinas (pH 9,0, 50 °C, 2 val.) Leucino aminopeptidazė (pH 7,0, 50 °C, 2 val.)	FRAP DPPH	Hidrolizė padidino antioksidacinį aktyvumą (naudojant subtiliziną DPPH slopinimas – 62 %, naudojant tripsiną ar pepsiną – mažesnis)	[47]
	pašildyti 90 °C, 5 min.	Pepsinas (pH 1,5, 37 °C) po to tripsinas (pH 7,6, 50 °C) 1,5 val.	DPPH FRAP	WPH antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo dozės (0–10 mg/ml)	[48]

1.3 lentelė (tęsinys). Apdorojimo būdų ir fermentinės hidrolizės poveikis antioksidaciniam išrūgų baltymų izoliato, išrūgų baltymų koncentrato ir išrūgų baltymų aktyvumui [27]

komercinės WPC		Pepsinas (pH 2,0, 37 °C, 1,5 val.) po to Corolase PP (pH 7,5, 37 °C, 2,5 val.)	ORAC	Imituojamas virškinimo trakto virškinimas padidino WPC antioksidacinį aktyvumą (WPC = 13,662; SGID WPC = 36,605 μmol TE/100 g miltelių)	[49]
WPC (4% baltymų)	pašildyti 50–54 °C, 10 min.	Proteazė, subtilizinas arba abu fermentai (pH 7,0; 0,5, 1, 1,5 val.; 45, 50, 55 °C)	ABTS ORAC	WPC = 2,83 mM TE WPH proteazė = 4,27 mM TE WPH su abiem fermentais = 6,33 mM TE	[50]
WPX (11 % baltymų)			DPPH	WP 72,15 % laisvųjų radikalų šalinimo aktyvumas	[51]
WPX		Leucino aminopeptidazė Subtilizinas Proteazė iš <i>Aspergillus oryzae</i> Optimali temperatūra ir pH vertė, 4 val.	ORAC DPPH	Hidrolizė padidino WP hidrolizatų, naudojant proteazę iš <i>Aspergillus oryzae</i> , antioksidacinį aktyvumą. ORAC tyrimo rezultatai (172,11 μmol of TE/g) ir DPPH (69,53 %)	[52]
Saldžios ir rūgščios WPC		Polimerizacija glikuojant ⁴ (pH 7,0 ir 9,0), po to hidrolizė naudojant <i>Bacillus subtilis</i> biomasę (pH 7,0, 50 °C, 24 val.)	ABTS	Hidrolizė ir glikacija padidino antioksidacinį aktyvumą (rūgščios WPC = 55 %, WPH = 85 %, WPC glikuotos = 75 %, WPH glikuotos = 95 %)	[53]

¹ WPI – baltymų išrūgų izoliatas; WPC – baltymų išrūgų koncentratas; WPH – baltymų išrūgų hidrolizatas; WPX – išrūgų baltymai, tipas nenustatytas;

² FRAP – geležies jonų redukcijos antioksidacinės galios tyrimas, DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas radikalas; ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfoninė rūgštis); ORAC – deguonies radikalų absorbcijos talpa;

³ SGID – imituojamas virškinimo trakto virškinimas; TE – trolokso ekvivalentas.

⁴ Glikacija – procesas, kai nekontroliuojami fermentų baltymai prisijungia prie cukraus molekulių (gliukozės ar fruktozės).

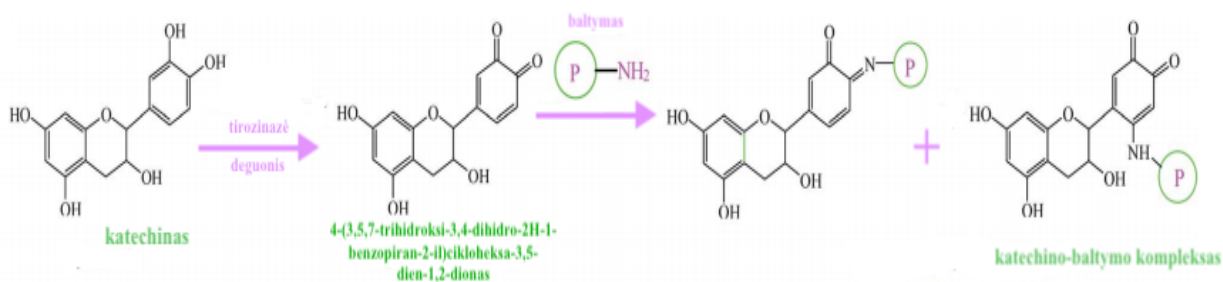
1.1.4. Išrūgų baltymų antimikrobinės savybės

Išrūgos turi natūralią apsauginę funkciją – jos gali padidinti atsparumą infekcijai ir slopinti galimai patogeninių mikroorganizmų veikimą. Antimikrobinis aktyvumas išrūgose labiausiai priskiriamas kai kuriems nedideliems išrūgų baltymams: laktoferinui, lizocimui, imunoglobulinams ir laktoperoksidazei. Išrūgų baltymų antimikrobinis aktyvumas daugiausia priskiriamas lizocimui ir kiek mažiau laktoferinui [54]. Kai kurie tyrimai rodo, kad lizocimas, laktoferinas ir imunoglobulinas veikdami kartu su pienu, sukuria sinergiją su galimomis virškinamojo trakto funkcijomis, slopindami mikrobu augimą ir sumažindami virškinimo trakto infekcijų dažnį, ypač kūdikystėje ir vaikystėje [55, 56]. Išrūgų baltymuose esančių α-laktalbumino, β-laktoglobulino, imunoglobulinų, albumino, laktoferino ir laktoperoksidazės hidrolizės metu gaunami bioaktyvūs peptidai [57, 58], kuriuos galima įtraukti į maistą kaip funkcinius komponentus. Bioaktyvieji peptidai yra apibrėžiami kaip specifiniai gyvūninės ar augalinės kilmės baltymų fragmentai, turintys teigiamą poveikį kūno funkcijoms ar sąlygoms, galinčioms paveikti žmogaus sveikatą [59]. Išrūgų baltymai pasižymi antimikrobinėmis, antioksidantinėmis ir antihipertenzinėmis savybėmis. Šie peptidai paprastai gaunami iš baltymų, atliekant cheminę ar fermentinę hidrolizę [60, 61, 62]. Peptidai, turintys antimikrobinį poveikį, yra apibūdinami pagal dydį: nuo 3 iki 20 aminorūgščių. Tyrimai parodė, kad išrūgose esantys laktoferino ir izofermentų fragmentai, laktoperoksidazės ir imunoglobulinai slopina mikrobu augimą, susijusį su teigiamu šių peptidų krūviu. Daugelis pagrindinių aminorūgščių sukelia antimikrobinį poveikį,

formuodamos α -spiralės formos kilpą karboksilo gale, dėl kurio susidaro joniniai kanalai mikroorganizmo membranoje, taip pakeisdami jos pralaidumą ir sukeldami ląstelių žūtį [63]. Ankstesnis darbas parodė, kad peptidai, kuriuos išskiria proteolitiniai fermentai, tokie kaip pepsinas iš kiaulės skrandžio gleivinės, *B. licheniformis* alkalazė, galvijų kilmės chimotripsinas, chimosinas ar tripsinas – visi slopina tiek gramteigiamas (*Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Streptococcus* gentims priklausančias bakterijas), tiek gramneigiamas (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella* ir kt. gentims priklausančias bakterijas) bakterijas, taip pat patogenines mieles, tokias kaip *Candida albicans* [64, 62, 65].

1.1.5. Išrūgų baltymų modifikavimo fenoliniais junginiais galimybės

Fenoliniai junginiai yra antriniai metabolitai plačiai paplitę augaluose, kurie yra sintetinami pentozės fosfato ir fenilpropanoideo keliais [66, 67]. Fenolio junginiai yra sudaryti iš aromatinio žiedo su vienu ar daugiau hidroksilo pakaitų, pradedant nuo paprastų fenolinių molekulių ir baigiant labai polimerizuotais junginiais [68, 69]. Šių mikroelementų gausu žmogaus racione. Maisto produktuose fenoliniai junginiai gali būti naudojami kaip natūralūs dažikliai bei konservantai. Taip pat šie junginiai pasižymi antioksidacinėmis, antimikrobinėmis, antimutageninėmis, priešvėžinėmis, antialerginėmis, priešūždegiminėmis bei antivirusinėmis savybėmis [70]. Dėl šios priežasties maisto produktai, praturtinti fenolio junginiais, pasižymi dideliu funkcionalumu. Per pastarąjį dešimtmetį baltymų funkcionalumas fenolio junginiais sulaukė vis didesnio dėmesio. Dėl fenolinių junginių ir baltymų svarbos mitybai ir sveikatai didėja susidomėjimas baltymų ir fenolių sąveika. Yra keturi galimi fenolinių junginių ir baltymų sąveikos tipai: jungiantis vandeniliu, hidrofobinis, joninis ir kovalentinis. Fenolio hidroksilo grupė yra vandenilio jungčių donoras ir sudaro tvirtus vandenilio ryšius su peptido „stuburo“ amido karbonilu. Susidariusiems kompleksams stabilizuoti svarbesnė yra hidrofobinė sąveika, kuriai susidarius svarbiausias vaidmuo tenka prolino liekanoms. Kovalentinis jungimasis prie baltymų vyksta per oksiduotas fenolines medžiagas (chinonus) (žr. 1.4 pav.), tuo tarpu benzeno žiedo 2 padėtis, pvz., kofeino rūgšties molekulėje yra elektrofiliškiausia ir nukleofilinis pridėjimas ten vyksta pirmiausia. Toliau oksidavus šį papildomą produktą, pvz., per lakazę (redoks aktyvus fermentas, katalizuojantis deguonies redukciją iki vandens, randamas aukštesniuose grybuose ir augaluose [71]), kad susidarytų jos chinonas, įvyksta antrasis pridėjimas, dėl kurio gali susidaryti susieti baltymų polimerai [72]. Fenolio ir baltymų junginiai gali sudaryti fenolio-baltymų kompleksus per nekovalentinę sąveiką (pvz.: elektrostatinis, hidrofobinis, van der Valso ir vandenilinis ryšys) [73]. Šie kompleksai gali būti susijungę ir per kovalentinį ryšį – susidaro fenolio-baltymo konjugatai [74, 75]. Literatūros duomenimis kovalentiškai sujungti fenolio-baltymo konjugatai yra stabilesni nei nekovalentiniai fenolio-baltymo kompleksai, nors abi sąveikos gali pakeisti baltymų savybes [76, 77]. Literatūros duomenimis, fenolio junginių prisijungimas prie baltymų blokuoja kai kurias aminorūgščių liekanas [78, 79, 80, 81].



1.4 pav. Katechino-baltymo konjugato sintezės mechanizmas naudojant fermentą tirozinazę

Veiksniai, tokie kaip temperatūra, pH vertė, baltymų rūšis, baltymų koncentracija, fenolinių junginių rūšis ir struktūros bei keletas kitų veiksnių turi įtakos baltymų ir fenolių sąveikai. Kai kurie moksliniai tyrimai parodė, kad baltymų ir fenolių surišimo giminingumas mažėja didinant temperatūrą, tuo tarpu kituose – gauti priešingi rezultatai. Baltymų-fenolio sąveikai įtakos turi ir terpės pH vertė. Esant žemesniam pH yra gaunamas stipresnis surišimas, nes baltymas disociaciuoja ir atsiranda daugiau jungimosi vietų. Skirtingas baltymų hidrofobiškumas ir izoelektriniai taškai bei aminorūgščių sudėties skirtumas taip pat turi įtakos jungimosi giminingumui. Skirtingi fenolio junginių tipai ir struktūros taip pat turi įtakos baltymų ir fenolių sąveikai. Kiti veiksniai, tokie kaip druskos koncentracija ir tam tikrų reagentų pridėjimas taip pat turi įtakos fenolio-baltymo sąveikai. Atlikus mokslinius tyrimus buvo pastebėta, kad baltymų ir fenolio sąveika padidina baltymų molekulinę masę. Padidėjęs fenolinių junginių kiekis sumažina baltymų tirpumą. Be to, baltymų sąveika su fenolio junginiais gali pagerinti baltymų šiluminį stabilumą [79].

Fenolio junginiai (ypač fenolio rūgštys ir flavonoidai) su baltymais (daugiausia želatinos, išrūgų ir kiaušinių baltymais) gali sukelti reikšmingus struktūrinių, fizikinių ir cheminių bei biologinių savybių pokyčius, turėti įtakos baltymų struktūrai, tirpumui, hidrofobiškumui, šiluminiam stabilumui ir izoelektriniam taškui [78, 79] bei praplėsti baltymų panaudojimo galimybes.

Visai neseniai, visuomenė pademonstravo vis didesnę supratimą ir susidomėjimą „funkcionaliu maistu“. Žalioji arbata dedama į funkcinius maisto produktus ar maisto papildus, nes yra stiprus antioksidantas. Žaliosios arbatos naudojimas parodė puikius rezultatus, susijusius su jos antimikrobiniu poveikiu keliems su maistu pernešamiems mikroorganizmams. Nepaisant to, kad vis dažniau žalioji arbata naudojama maiste, dauguma antimikrobino aktyvumo eksperimentų buvo atlikti tik laboratorinėse terpėse [82]. Kol kas daugiausia tyrimų yra atlikta naudojant tik arbatą, kavą ir šokoladą kaip fenolio junginių šaltinius, o pieną bei išrūgas – kaip baltymų šaltinį, tačiau mokslininkai vis dažniau pradėjo tirti ir kitus fenolinius junginius, tokius kaip cinamonas, rozmarinas ir kiti bei jų sąveiką su baltymais. Fenolių ir išrūgų baltymų konjugatai gali būti naudojami kaip emulsijos maistinių medžiagų tiekimui, valgomosios plėvelės maisto pakuotėms, hidrogeliai bei nanodalelės kontroliuojamam vaistų išleidimui [70].

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimo objektai, reagentai ir instrumentai

2.1.1. Reagentai

De Man, Rogosa ir Sharpe mitybinė terpė (MRS: peptonas, jautienos ekstraktas, mielių ekstraktas, gliukozė, dikaliohidrofosfatas, natrio acetatas, amonio citratas, magnio sulfatas, mangano sulfatas, Tween 80) (Biolife, Italija), agaras (Liofilchem, Italija), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH), natrio šarmas, natrio chloridas, kazeinas, natrio karbonatas, Folin-Ciocalteu reagentas, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfoninė rūgštis (ABTS), Bradforfo reagentas (Kumasi briliantinis mėlis G250, 95 % etanolis, 85 % fosforo rūgštis ir vanduo), *Nutrient* agaras (peptonas, jautienos ekstraktas, mielių ekstraktas, natrio chloridas ir agaras) (Liofilchem, Italija), m-cymenas (Fluka Analytical, JAV), karvakrolis (Merck, Vokietija), galo rūgštis (Eurochemicals, Lietuva).

2.1.2. Instrumentai

Automatinės pipetės, termostatas (Termaks, Series B9000, Norvegija), autoklavas, vandens vonelės, centrifuga (VWR, Galaxy MiniStar, Jungtinės Amerikos Valstijos), spektrofotometras (Genesys 10 UV, Vokietija), svarstyklės, magnetinė maišyklė, vandens vonelė su purtykle ir elektroforezės sistema (Cleaver Scientific Ltd, Didžioji Britanija), liofilizatorius (MAXI dry lyo, Danija).

2.1.3. Tyrimo objektai

Pieno rūgšties bakterijų (PRB) išskyrimui iš raugų laboratorijoje buvo paruošti raugai iš trijų rūšių miltų: raugas iš 550C tipo kvietinių miltų (UAB „Malsena“), ekologiškų viso grūdo dalių ruginių miltų (UAB „Malsena“) ir viso grūdo dalių kvietinių miltų (UAB „Malsena“).

Tyrimui buvo naudojami išrūgų baltymų koncentratas (80 g/100 g) (Vilkyškių pieninė, Lietuva); Komercinės *Lactobacillus plantarum* DSM 20174, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 bakterijos bei šių trijų pienarūgščių bakterijų mišinys, paruoštas sumaišius užaugintas kultūras santykiu 1:1:1. Fermentai (Merck, Vokietija): kiaulės skrandžio gleivinės pepsinas P7000, proteazė iš *B. amyloliquefaciens* P1236 ir kiaulės kasos pankreatinas P1750.

2.1.4. Mitybinės terpės ir buferiniai tirpalai

Pagrindinė pienarūgščių bakterijų auginimo terpė buvo MRS sultinys. Litrai mitybinės terpės paruošti buvo atsverta 55,2 g MRS produkto. Ištirpinus mitybinė terpė buvo sterilizuota 15 min. 121 °C 1 atm. slėgyje. Agarizuota terpė ruošta įdėjus 16 g/l agaro prieš sterilizavimą. Terpė buvo naudojama PRB auginimui.

Patogeninių bakterijų auginimo terpė (Nutrient agar). Litrai terpės paruošti buvo atsverta 28 g *Nutrient* agaro. Terpė buvo sterilizuota 15 min. 121°C 1 atm. slėgyje. Terpė buvo naudojama indikatorinių (patogeninių) mikroorganizmų auginimui.

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Pieno rūgšties bakterijų išskyrimas iš raugų

Raugų paruošimas. Raugai buvo ruošti sumaišant miltus ir vandentiekio vandenį lygiomis dalimis ir rauginti ~ 20–25 °C temperatūroje. Septynių–devynių dienų laikotarpyje raugai buvo dauginami papildant lygiomis dalimis miltų ir vandens maitinamuoju mišiniu (pirmą dieną buvo įdėta 25 g miltų ir buvo įpilta 25 ml vandens, antrą dieną – 50 g miltų ir 50 ml vandens, trečią dieną – 100 g miltų ir 100 ml vandens ir t.t.).

PRB išskyrimas iš raugų. Pieno rūgšties bakterijos buvo išskirtos atliekant dešimtkarčius raugų mėginių skiedimus. Atitinkamai 10^{-4} , 10^{-5} ir 10^{-6} skiediniai pasėti į *Petri* lėkšteles ant MRS agaro paviršiniu būdu. Lėkštelės inkubuotos optimalioje raugams 30 °C temperatūroje. Po trijų parų lėkštelės buvo išimtos ir iš kiekvieno raugo buvo išskirta po 5 izoliatus besiskiriančius spalva, forma ir dydžiu (žr. 2.1 lentelę). Tam sterilia kilpele kolonijos buvo persėtos ant naujų *Petri* lėkštelių, augintos 3 paras 30 °C temperatūroje. Po to, nuo lėkštelių po 1 koloniją buvo pernešta į skytą MRS terpę ir auginta 18 val. Užaugusios PRB buvo užšaldytos 25 % glicerolio tirpale -80 °C temperatūroje.

2.1 lentelė. Tyrimui pasirinktų mikroorganizmų kolonijų, išskirtų iš ruginio, kvietinio bei viso grūdo dalių ruginio raugo, apibūdinimas

Kolonijos numeris	Skiedimo numeris	Skersmuo, mm	Kolonijos apibūdinimas
<i>Ruginis raugas</i>			
1	5	3	Balta su geltonais kraštais
2	5	0,5	Balta su geltonu viduriuku, truputį geltonas kraštas
3	5	0,5	Visiškai balta
4	6	6	Balta kolonija su dideliu geltonu viduriuku
5	6	3	Balta, iškilusi
<i>Kvietinis raugas</i>			
1	5	5	Didelė balta, su geltonu viduriuku
2	4	4	Balta, iškilusi
3	4	3	Gėlytės formos, iškilusi, balta, be apvado
4	4	2	Balta, iškilusi
5	4	4	Balta, iškilusi, be apvado
<i>Viso grūdo dalių ruginis raugas</i>			
1	5	3	Visiškai balta
2	5	4	Balta su geltonu taškeliu viduryje
3	6	3	Visiškai balta, iškilusi
4	6	2	Baltas viduriukas, pati gelsva
5	6	3	Visiškai balta

2.2.2. Proteazių aktyvumo nustatymas

Proteazių aktyvumas nustatytas pagal *Cupp-Enyard* [83].

Tirpalų paruošimas:

50 mM fosfatinio buferio (pH 7,5) paruošimas. Į 100 ml stiklinę buvo atsverta 1,14 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ir buvo ištirpinta 70 ml vandens. Tirpalo pH su 0,1 M NaOH ar 0,1 M HCl buvo sureguliuojamas iki 7,5. Turinys buvo perpiltas į 100 ml matavimo kolbą ir iki žymės praskiestas distiliuotu vandeniu.

Kazeino tirpalo paruošimas. 0,13 g kazeino buvo ištirpinta 20 ml fosfatinio buferio (50 mM, pH 7,5) kaitinant 80–90 °C temperatūroje ir maišant ant magnetinės maišyklės.

110 mM trichloracto rūgšties tirpalo paruošimas. 1,8 g trichloracto rūgšties buvo ištirpinta 80 ml distiliuoto vandens, perpilta į 100 ml matavimo kolbą ir praskiesta iki žymės distiliuotu vandeniu.

0,5 M Na_2CO_3 tirpalo paruošimas. 2,65 g Na_2CO_3 buvo ištirpinta 50 distiliuoto vandens.

1mM L-tirozino standartinio tirpalo paruošimas. 2 mg L-tirozino buvo ištirpinta 10 ml vandens.

Proteazių aktyvumo nustatymas

Į du mėgintuvėlius buvo įpilta po 5 ml (0,65 %) kazeino tirpalo ir mėgintuvėliai buvo pamerkti į 37 °C temperatūros vandens vonią 5 min. Tik į pirmąjį mėgintuvėlį buvo įpilta 1 ml tiriamo fermento tirpalo ir mėgintuvėlio turinys buvo gerai sumaišomas. Mėgintuvėliai buvo pamerkti į 37 °C temperatūros vandens vonią 10 min. Po to mėgintuvėliai buvo išimti iš vandens vonios ir fermentinė reakcija sustabdoma įpilant po 5 ml 110 mM trichloracto rūgšties į abu mėgintuvėlius. Mėgintuvėlių turinys gerai sumaišomas. Po to, tik į antrąjį mėgintuvėlį buvo įpilta 1 ml tiriamo fermento tirpalo ir turinys gerai sumaišomas. Mėgintuvėliai buvo pamerkti į 37 °C temperatūros vandens vonią 30 min. Po kaitinimo mėgintuvėliai buvo išimti iš vandens vonios ir jų turinys buvo filtruojamas pro 0,45 μ m filtro popierių (vietoj filtravimo, nuosėdų atskyrimui, mėginius galima centrifuguoti 5 min. 5000 aps./min.). Gautas filtratas / centrifugatas buvo naudojamas tolimesniems tyrimams. 2 ml gautų filtratų perpilami į sausus mėgintuvėlius, po to į mėgintuvėlius buvo įpilta 5 ml 500 mM natrio karbonato tirpalo ir 1 ml 1,1 mM Folin-Ciocalteu reagento tirpalo. Turinys gerai sumaišomas. Mėgintuvėliai buvo pamerkami į 37 °C temperatūros vandens vonią 30 min. Atvėsinus iki kambario temperatūros, mėginiai buvo filtruojami pro 0,45 μ m porų skersmens filtrą arba centrifuguojami 5 min. 5000 aps./min. greičiu ir spektrofotometru buvo matuojama 660 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. Vienas fermento aktyvumo vienetas gali išskirti 1,0 nmol tirozino ekvivalentą iš substrato per 1 min., esant terpės pH 7,5 ir 37 °C temperatūrai.

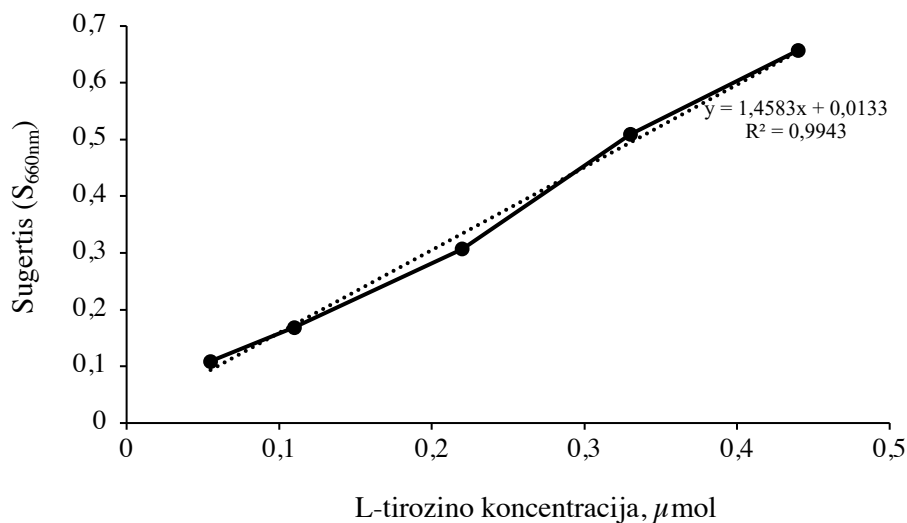
Tirozino standartinės kreivės sudarymas

Į šešis mėgintuvėlius buvo supilti reagentai (mililitrais) kaip nurodyta 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Tirpalų koncentracijos, ml, tirozino standartinės kreivės paruošimui

Tirpalai	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6
1,1 mM L-tirozino standartas	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0
Distiliuotas vanduo	1,95	1,90	1,80	1,7	1,6	2,0
0,5 M Na_2CO_3	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Folin-Ciocalteu tirpalas	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Mėgintuvėlių turinys buvo gerai sumaišomas. Spektrofotometru buvo matuojama 660 nm bangos ilgio, šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. Gauta kalibracinė tirozino tiesė pateikta 2.1 paveiksle.



2.1 pav. Tirozino kalibracinė tiesė

Fermento aktyvumo apskaičiavimas ir rezultatų pateikimas

Iš standartinės tiesės buvo apskaičiuojama L-tirozino ekvivalento vertė, μmol, tiriamajame mėginyje. Tam iš šviesos spindulio sugerties tiriamojo tirpalo atimama šviesos spindulio sugertis *tuščio mėginio*, o gauta ΔS_{660nm} vertė buvo naudojama L-tirozino koncentracijos ekvivalento vertei apskaičiuoti pagal standartinę L-tirozino kreivę (2.1 pav.). Apskaičiuota L-tirozino koncentracijos ekvivalento vertė tiesėje buvo naudojama proteazės aktyvumui tiriamajame mėginyje apskaičiuoti pagal 1 formulę.

$$AV / ml = \frac{TEV \times 11}{1 \times 10 \times 2} \quad (1)$$

čia: *TEV* – tirozino ekvivalento vertė, μmol; *11* – bendras reakcijos tūris, ml; *10* – fermentinės reakcijos trukmė, min.; *1* – fermento tūris naudotas matavimams, ml; *2* – tūris naudotas kolorimetriniame nustatyme, ml.

2.2.3. Išrūgų baltymų fermentinė hidrolizė

Atlikta išrūgų fermentinė hidrolizė naudojant skirtingus fermentus: kiaulės skrandžio gleivinės pepsiną P7000, proteazę iš *B. amyloliquefaciens* P1236 ir kiaulės kasos pankreatiną P1750. Tam buvo ruošti išrūgų baltymų mėginiai – 10 g išrūgų baltymų miltelių (80 % baltymų), buvo ištirpinti reikalingos pH vertės buferiniuose tirpaluose (pH pepsinui: 2, 3, 4; pH pankreatinui bei proteazei: 6,5; 7,5 bei 8,5) iki 100 ml. Į kiekvieną tiriamąjį buvo įdėta 0,12 g fermento/100 g baltymų (kiekis buvo apskaičiuotas pagal formulę, aprašytą 1.2.10 skyrelyje). Mėginiai buvo kaitinami vandens vonelėje su purtykle 40 minučių, 40 °C temperatūroje.

Išrūgų fermentinės hidrolizės buvo atliekama norint nustatyti temperatūros, pH ir hidrolizės trukmės įtaką produktų baltymų hidrolizės efektyvumui bei jų antioksidaciniam ir antimikrobiniam aktyvumui.

2.2.4. Išrūgų fermentacija pieno rūgšties bakterijomis

Atlikta išrūgų fermentacija skirtingomis pieno rūgšties bakterijomis: *Lactobacillus plantarum* DSM 20174, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082, taip pat buvo naudotas trijų pieno rūgšties bakterijų mišinys, sudarytas santykiu 1:1:1. Tam buvo ruoštos išrūgos (5 g išrūgų baltymų miltelių/100 ml vandens), kurios buvo pasterizuotos autoklave (116 °C, 20 min.), atvėsintos ir 0,2 % nuo išrūgų tūrio buvo įnešta pieno rūgšties bakterijų, praplautų steriliu vandeniu. Išrūgos su bakterijomis buvo laikomos termostate 37 °C temperatūroje 32 valandas, mėginiai tyrimui buvo imami po 0, 16, 24 ir 32 valandų.

Fermentuotuose išrūgų mėginiuose nustatytas pieno rūgšties bakterijų skaičius, proteazių aktyvumas, baltymų kiekis, antioksidacinis aktyvumas.

2.2.5. Išrūgų baltymų modifikavimas fenoliniais junginiais

Išrūgų baltymų modifikavimas atliktas pagal Ali [84]. Išrūgų baltymų ir fenolinių junginių konjugatai buvo paruošti taip: išrūgų baltymai (1 g) buvo ištirpinti distiliuotame vandenyje (22,5 ml), o tirpalo pH sureguliuotas iki 9, naudojant 1 N NaOH arba HCl. Tada tirpalai buvo maišomi valandą, kad būtų užtikrintas visiškas ištirpimas. Vėliau į mėginius pridedama po 120 mg šių fenolinių junginių: galo rūgšties, karvakrolio ir m-cymeno, ištirpintų 2,5 ml etanolio. Junginių pH vėl buvo sureguliuotas iki 9 ir tirpalas paliktas maišytis 24 valandas. Tuomet tirpalai buvo centrifuguojami mėgintuvėliuose su 10 kDa celiuliozės membranomis (Merck, Vokietija) (6000 aps./min., 15 min.) ir praplaunami distiliuotu vandeniu 4 kartus. Baltymai, likę ant membranos buvo išplauti vandeniu (15–20 ml), užšaldyti ir liofilizuoti 24 valandas -110 °C temperatūroje (MAXI dry lyo, Danija). Gauti liofilizatai buvo naudojami tolesniems tyrimams. Tyrime nemodifikuoti išrūgų baltymai (kai nebuvo pridedami fenoliniai junginiai) buvo naudojami kaip kontrolinis mėginys.

2.2.6. Pienarūgščių bakterijų skaičiaus nustatymas

Šiam tyrimui atlikti buvo paruoštos išrūgos (5 g išrūgų baltymų/100 ml vandens), kurios buvo pasterizuotos autoklave (116 °C, 20 min.), atvėsintos ir 0,2 % nuo išrūgų tūrio buvo įnešta pieno rūgšties bakterijų, praplautų steriliu vandeniu. Išrūgos su bakterijomis buvo laikomos termostate 37 °C temperatūroje 32 valandas, mėginiai tyrimui buvo imami po 0, 16, 24 ir 32 valandų. Pirmiausiai buvo atlikti mėginio skiedimai, kurie sumažina mikroorganizmų skaičių tūrio vienetu ir palengvina jų skaičiavimą. Skiedimui buvo naudotas 0,9 % NaCl tirpalas kaip skiediklis, kuris išpilstytas po 9 ml į mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai buvo sterilizuoti 15 min. 121 °C temperatūroje, 1 atm. slėgyje. Iš tiriamo mėginio buvo paimtas 1 ml tirpalo ir perkeltas į pirmą mėgintuvėlį – pirmas skiedimas. Vėliau iš pirmo mėgintuvėlio – į antrą ir t.t. Iš viso buvo atlikti 8 dešimtkarčiai skiedimai. PRB skaičiui sužinoti PRB buvo sėjamos giluminiu būdu. Su kiekvienu mėginiu buvo atliekami atskiri du tyrimai į lėkšteles sėjant 3-ią – 7-tą skiedimus. Į *Petri* lėkšteles buvo įpilta po 1 ml praskiestų PRB mėginių, vėliau – vienoje pusėje pakėlus dangtelį buvo įpilta po ~ 20 ml mitybinės MRS agarų terpės. PRB kartu su terpe buvo maišomos sukant *Petri* lėkšteles pagal / prieš laikrodžio rodyklę bei pirmyn / atgal. Mitybinei terpei buvo leista sustingti kambario temperatūroje, vėliau lėkštelės buvo apverstos ir padėtos į 30 °C termostatą 5 paroms.

Rezultatų vertinimas. Kolonijos, išaugusios lėkštelėse, buvo skaičiuotos neryškioje šviesoje. Norint gauti kuo tikslesnius rezultatus, buvo atrinktos lėkštelės, kuriose išaugo ne mažiau nei 15 kolonijų ir

ne daugiau nei 300. Kolonijų skaičius išreikštas kolonijas sudarančiu vienetų (KSV) skaičiumi viename mililitre mėginio [85].

Kolonijas sudarančių vienetų (KSV) skaičius 1 ml produkto apskaičiuotas pagal 2 formulę:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 * n_2) * d} \quad (2)$$

čia: $\sum C$ – suma kolonijų, suskaičiuota ant visų vertinimui atrinktų lėkštelių; n_1 – skaičius pirmojo skiedimo lėkštelių, kuriose buvo suskaičiuota nuo 10 iki 300 kolonijų; n_2 – skaičius antrojo skiedimo lėkštelių, kuriose buvo suskaičiuota nuo 10 iki 300 kolonijų; d – skiedimo koeficientas, atitinkantis pirmąjį skiedinį, kurio lėkštelės buvo atrinktos kolonijoms skaičiuoti.

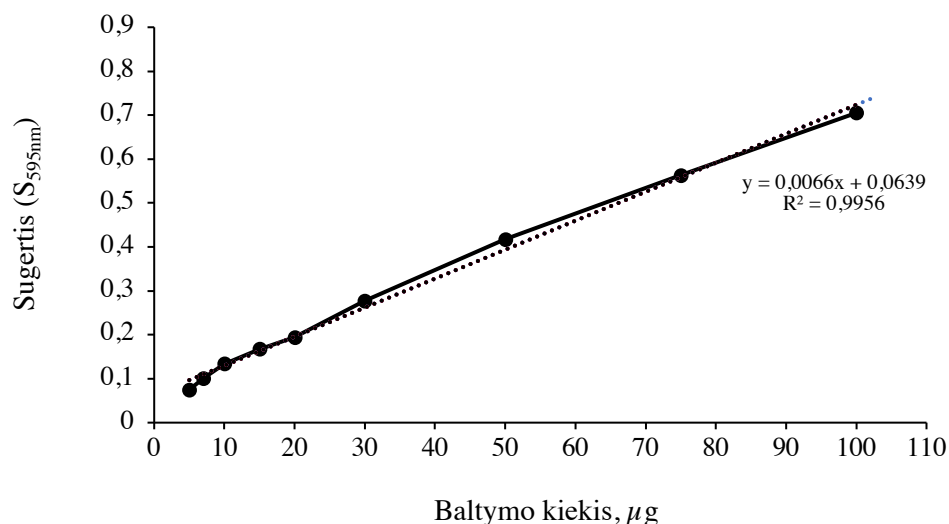
2.2.7. Baltymų kiekio nustatymas Bradfordo metodu

Baltymai jungiasi su Kumasi brilantinio mėlio dažikliu ir matuojamas susidariusio komplekso spalvos intensyvumas.

Tirpalų paruošimas: 1 mg/ml jaučio serumo albumino tirpalas; 0,15 M NaCl tirpalas; Kumasi brilantinio mėlio G250 dažiklio tirpalas (Bradfordo reagentas): 50 mg Kumasi brilantinio mėlio G250 buvo ištirpinta 25 ml 95 % etanolio ir įpilta 50 ml 85 % fosforo rūgšties, vandens buvo įpilta iki 500 ml žymės, tuomet buvo filtruojama ir laikoma 4 °C temperatūros sąlygomis tamsoje.

Buvo brėžiama kalibravimo tiesė, pasirenkant 9 taškus ir atlikta po du pakartojimus. Į 10 mėgintuvėlių buvo įpilta atitinkamai po 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 ir 100 µl jaučio serumo albumino tirpalo ir į visus įpilta iki 100 µl 0,15 M natrio chlorido tirpalo. Į kontrolinius mėgintuvėlius buvo įpilta tik 100 µl 0,15 M NaCl tirpalo. Vėliau į visus mėgintuvėlius buvo įpilta po 1,0 ml Kumasi brilantinio mėlio G 250 tirpalo ir sumaišoma. Mėginiai buvo laikomi 2 min. kambario temperatūros sąlygomis ir po to spektrofotometru buvo matuota 595 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamais tirpalais, tuomet brėžiama kalibracinė tiesė. Ant ordinačių ašies buvo atidedama sugertis (S_{595}), o ant abscisių – baltymo kiekis (µg). Gauta sugerties priklausomybė nuo baltymo kiekio pavaizduota 2.2 paveiksle.

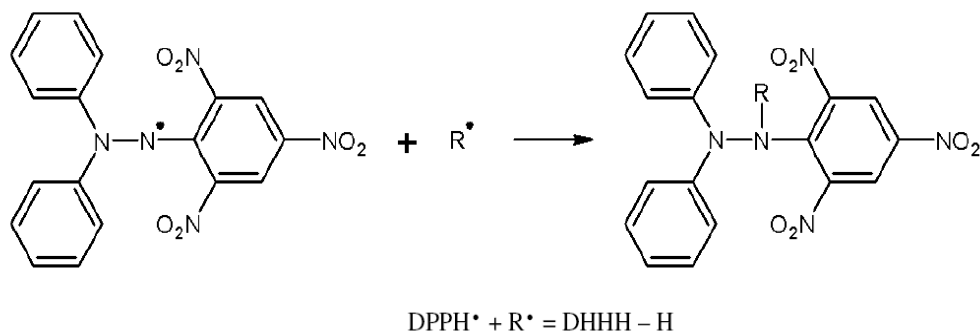
Su PRB fermentuotos išrūgos buvo centrifuguotos (6000 aps./min., 4 °C, 15 min.). Į 50 µl skirtingomis PRB fermentuotas išrūgas buvo įpilta 50 µl 0,15 M NaCl tirpalo bei 1,0 ml Kumasi brilantinio mėlio G 250 tirpalo ir sumaišoma. Buvo laikyta 2 min. kambario temperatūros sąlygomis. Spektrofotometru buvo matuota 595 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamais tirpalais, baltymo kiekis buvo nustatomas iš kalibravimo tiesės. Matuojamo baltymo sugertis buvo per didelė ir nustatyti duomenys nepateko į kalibravimo kreivės ribas, todėl išrūgų mėginiai buvo skiedžiami 10 kartų ir buvo pakartotinai matuojama.



2.2 pav. Kalibravimo tiesė: šviesos spindulio sugerties priklausomybė nuo baltymo kiekio

2.2.8. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu

Išrūgų baltymų antiradikalinis aktyvumas įvertinamas matuojant, kiek procentų stabilaus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai. Radikalo DPPH·redukcijos reakcija su antioksidantu pavaizduota 2.3 paveiksle. Dėl savo gebėjimo išaktyvinti laisvuosius radikalus, fenoliniai junginiai pasižymi antioksidaciniu aktyvumu. Reakcijos metu antioksidantas atiduoda vandenilį ir taip išaktyvina laisvuosius radikalus – jie tampa stabiliais DHHP-H tipo junginiais.



2.3 pav. Radikalo DPPH·redukcijos reakcija su antioksidantu

Darbo eiga: 1 ml tiriamojo išrūgų baltymų mėginio buvo centrifuguojama 9000 aps./min. 10 minučių ir supernatantas buvo surenkamas. Etaloninis DPPH tirpalas buvo ruošiamas 0,0024 g DPPH radikalo ištirpinus 100 ml metanolio. Tiriamasis tirpalas buvo ruošiamas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml paruošto tiriamojo išrūgų mėginio ir 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turinys buvo sumaišomas ir 15 minučių laikomas tamsoje. Vėliau buvo matuojamas 515 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamais tirpalais [86]. Palyginamasis tirpalas ruošiamas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml metanolio bei 3 ml paruošto DPPH etaloninio tirpalo. Antioksidacinis slopinimas procentais buvo apskaičiuojamas pagal žemiau pateiktą formulę:

$$\text{DPPH laisvųjų radikalų surišimas, \%} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100 \quad (3)$$

čia: A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis; A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

2.2.9. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu

Laisvųjų radikalų sujungimo geba buvo tirta naudojant 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfoninę rūgštį), dar vadinamą ABTS [87]. ABTS laisvasis radikalas buvo gautas 16 valandų vykdant reakciją tarp ABTS (7 mM) vandeninio tirpalo ir kalio persulfato (2,45 mM) santykiu 1:1, kambario temperatūroje tamsoje. Gautas $ABTS^{\bullet+}$ tirpalas buvo skiedžiamas metanolio tol, kol 734 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis buvo gauta 0,700. Tyrimui atlikti buvo sumaišyta 50 μ l išrūgų baltymų frakcijos su 3950 μ l praskiestu $ABTS^{\bullet+}$ tirpalu. Mišinys buvo maišomas 30 min. ir 734 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais buvo matuota spektrofotometru.

ABTS trolokso ekvivalentui nustatyti buvo išmatuota ABTS laisvojo radikalo ir metanolio 734 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis. Bandymui atlikti buvo sumaišyti 50 μ l metanolio ir 3950 μ l praskiesto $ABTS^{\bullet+}$ tirpalo.

Laisvųjų radikalų sujungimo geba buvo apskaičiuota pagal 4 formulę [87]:

$$ABTS \text{ laisvųjų radikalų sujungimo geba, \%} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100 \quad (4)$$

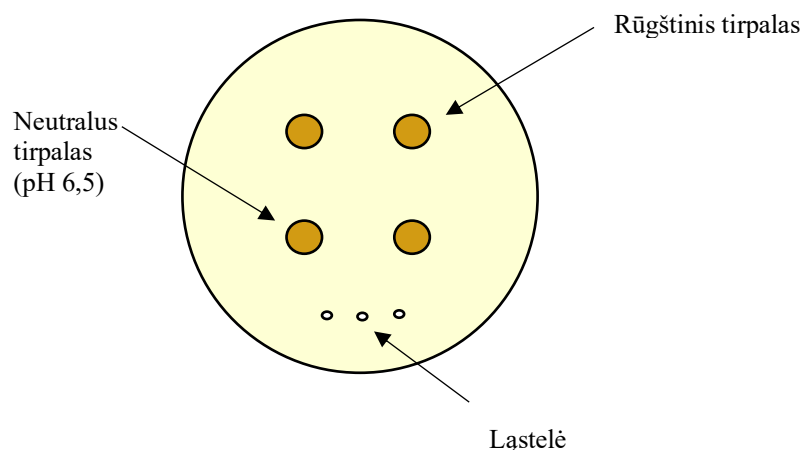
čia: A_B – ABTS laisvojo radikalo ir metanolio šviesos spindulio sugertis;

A_A – ABTS laisvojo radikalo ir tiriamų baltymų frakcijų šviesos spindulio sugertis.

2.2.10. Antimikrobinio aktyvumo nustatymas

Antimikrobinio poveikio tyrimui atlikti buvo naudojama 12 indikatorinių mikroorganizmų: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*.

Indikatoriniai mikroorganizmai kilpele buvo pasėti ant *Nutrient* agarų ir buvo auginti 24 val. 30 °C termostate. Po 24 valandų indikatoriniai mikroorganizmai kilpele buvo paimti iš *Petri* lėkštelės ir perkelti į sterilų fiziologinį 0,9 % NaCl tirpalą – gauta suspensija. Mikroorganizmų kiekis suspensijoje pagal drumstumą buvo lyginamas su *McFarland* standartu (numeris 0,5), kuris prilygsta 1×10^8 KSV/ml. Suspensija (0,135 ml) buvo sėjama į *Petri* lėkštes giluminiu būdu. Agarizuota mitybinė terpė buvo gaminama iš *Nutrient* agarų. Terpė buvo autoklavuojama 15 min. 121 °C 1 atm. slėgyje. Mitybinė terpė buvo išpilstyta po ~ 20 ml į *Petri* lėkštes vienoje pusėje pakėlus dangtelį. Mikroorganizmų suspensija kartu su terpe buvo maišomos sukant *Petri* lėkštes pagal / prieš laikrodžio rodyklę bei pirmyn / atgal. Vėliau lėkštelės buvo paliktos sustingti. Sustingus terpei *Petri* lėkštelėse buvo padaromi 4 „šulinukai“ (skersmuo 8 mm), į juos buvo supilti tiriami mėginiai (jų paruošimas pateiktas žemiau) po 0,1 ml, buvo atlikti du pakartojimai. Lėkštelių apačioje kilpele buvo uždedamos ląstelės, kurios buvo atskirtos nuo tirpalo centrifuguojant 6000 aps./min., 25 min., 4 °C (žr. 2.4 pav.). *Petri* lėkštelės buvo paliktos termostate 24 valandoms 30 °C. Po 24 val. buvo ieškoma skaidrių zonų apie šulinėlius ir matuojamas skaidrių zonų skersmuo milimetrais. Jei lėkštelėse nėra skaidrių zonų – nėra antimikrobinio poveikio.

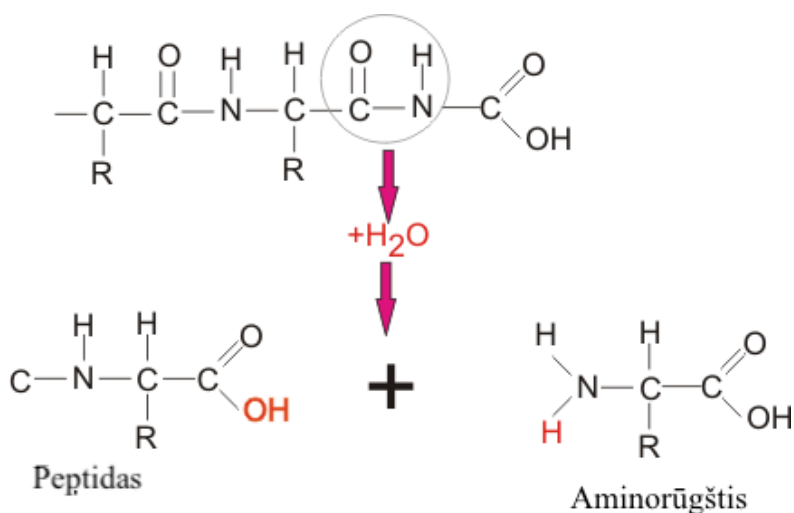


2.4 pav. Antimikrobinio tyrimo atlikimo technika

Tiriamų mėginių paruošimas (tirpalo pH suregulavimas). 30 ml tiriamų mikroorganizmų (pienarūgščių bakterijų) tirpalas buvo centrifuguojamas (6000 aps./min., 25 min., 4°C) ir padalintas į du sterilius mėgintuvėlius po 15 ml. Ant mėgintuvėlio dugno likusios ląstelės buvo naudojamos tolesniam tyrimui. Viename mėgintuvėlyje terpė buvo rūgštinė, kitame – terpės pH buvo reguliuojamas iki neutralaus naudojant sterilų 5 M NaOH tirpalą. Suregulavus tirpalų terpės pH, tiek neutralūs, tiek rūgštiniai tirpalai buvo prafiltruoti pro sterilų filtrą.

2.2.11. Baltymų hidrolizės efektyvumo nustatymas

Baltymų hidrolizės eiga gali būti įvertinta naudojant hidrolizės laipsnio sąvoką. Hidrolizės laipsnis yra apibrėžiamas kaip hidrolizuotų peptidinių jungčių procentinė dalis. Metodus yra pagrįstas prielaida, kad laisva aminogrupė ir laisva karboksilo grupė išsiskiria kiekvieną kartą, kai hidrolizuojasi peptidinis ryšys (žr. 2.5 pav.). Metodus kiekybiškai apibūdina tokių grupių koncentracijos padidėjimą kaip kintamąjį, kad būtų galima įvertinti hidrolizės eigą.



2.5 pav. Peptidinio ryšio hidrolizė

Reagentai: substratas (išrūgos), fermentai (pepsinas, proteazė bei pankreatinas) ištirpinti buferiniame tirpale, 1 N HCl.

Pirmiausia buvo nustatomas reikiamas substrato ir fermento kiekis, kuris buvo naudojamas hidrolizės reakcijai. Nustatytas substrato kiekis buvo toks, kuriame baltymai sudarė 8 % (m/m) visos reakcijos,

ir fermentas buvo apskaičiuotas santykiu 0,012 Anson U/g baltymų. Fermento masė gramais (ME) buvo apskaičiuojama $ME = MP \times (A / E)$, kur (MP) yra baltymo masė (g) substrate, A yra siūlomas fermento aktyvumas Ansono vienetais/grame (0,012 AU/g), o E yra tikrasis fermento aktyvumas, kurį nurodo gamintojas. Visų aukščiau paminėtų fermentų atveju ME buvo apskaičiuojamas taip: $ME = 8 \text{ g} \times (0,012 \text{ AU/g} \div 0,8 \text{ AU/g}) = 0,12 \text{ g fermento/100 g baltymų}$. Vėliau substratas (10 g WPC80) buvo sumaišytas su atitinkamu buferiniu tirpalu (100 ml) norimo pH. Kiekvienas mėginys buvo analizuojamas atliekant po du pakartojimus. Prieš įdedant fermentą į substratą, buvo paruošti du kontrolinių mėginių variantai – šarminės išrūgos, kurių pH buvo 7,5 ir rūgštinės išrūgos, kurių pH buvo 3. Į likusį substrato tirpalą buvo įpilti apskaičiuoti fermento kiekiai (0,12 g) ir mišinys buvo gerai išmaišomas. Reakcija buvo atliekama naudojant skirtingas sąlygas: temperatūra (30 °C, 40 °C ir 50 °C), terpės pH vertė (pepsinui: 2, 3, 4; pankreatinui bei proteazei: 6,5; 7,5 bei 8,5), hidrolizės trukmė (20, 40 bei 60 min.). Reakcijos sustabdymui buvo naudojamas 1 N HCl tirpalas sumažinant pH reikšmę iki 4. Taip pat HCl buvo naudojamas ir mėginiams be fermentų [88].

Hidrolizės efektyvumas buvo vertintas pagal išlaisvinto tirozino koncentraciją. Kuo daugiau tirozino išlaisvinama, tuo didesnis hidrolizės efektyvumas. Hidrolizės efektyvumas buvo nustatomas naudojant 1,1 mM Folin-Ciocalteu reagento tirpalą. Po hidrolizės išsilaisvinęs tirozinas ir kitos aromatinį žiedą turinčios amino rūgštys sudaro mėlynos spalvos junginius su Folin-Ciocalteu reagentu. 2 ml centrifugato buvo sumaišoma su 5 ml 500 mM natrio karbonato tirpalu ir 1 ml 1,1 mM Folin-Ciocalteu reagento tirpalu, pašildoma 30 min. iki 37 °C ir filtruojama. Spektrofotometru buvo išmatuojama 660 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais. Kiekvienam mėginiui atskirai buvo nustatytas išskiriamų aminogrupių kiekis pagal tiroziną. Tam buvo sudaryta tirozino kalibracinė tiesė 0–0,442 μmol ribose.

2.2.12. Baltymų elektroforezė

Elektroforezės metu įkrautos molekulės juda elektriniame lauke. Metodas yra plačiai taikomas biomolekulėms atskirti ir apibūdinti. Baltymų ir nukleorūgščių elektroforezė dažniausiai yra atliekama buferiniais tirpalais prisotintuose geliuose, pavyzdžiui, poliakrilamido. Baltymų molekulės atsiskiria poliakrilamido gelyje, turinčiame 5–15 % akrilamido ir 0,2–0,5 % N,N'-metilenbisakrilamido. Šiomis sąlygomis yra stebima tiesinė priklausomybė tarp santykinio baltymų molekulių elektroforezinio judrio ir jų molekulinų masių logaritmo. Vienkryptėje gelektroforezėje denatūravimo sąlygomis (esant 0,1 % NDS) baltymų molekulės elektriniame lauke poliakrilamido gelyje juda anodo link ir atsiskiria – tai priklauso nuo molekulinės jų masės. Baltymų NDS-PAGE dažniausiai atliekama esant nekintamam elektros srovės stiprumui [89].

Tirpalų paruošimas:

1. 30 % akrilamido/0,8 % N,N'-metilenbisakrilamido tirpalas. Tirpalui paruošti buvo ištirpinta 30 g akrilamido ir 0,8 g N,N'-metilenbisakrilamido ir pripilta vandens iki 100 ml. Tirpalas buvo perfiltruojamas pro 0,45 μm porų dydžio filtrą ir laikomas tamsoje, esant 4 °C temperatūrai. $4\times$ TRIS·HCl/NDS buferis pH 6,8 (0,5 M TRIS·HCl, 0,4 % NDS). 6,05 g TRIS buvo ištirpinta 40 ml vandens. Į gautą tirpalą buvo įpilama 1N HCl, kol tirpalo pH vertė bus 6,8 ir pripilama vandens iki 100 ml. Tirpalas buvo perfiltruojamas pro 0,45 μm porų dydžio filtrą ir pridodama 0,4 g NDS.
2. $4\times$ TRIS·HCl/NDS buferis pH 8,8 (1,5 M TRIS·HCl, 0,4 % NDS). 91 g TRIS buvo ištirpinta 300 ml vandens. Į gautą tirpalą buvo pilama 1 N HCl, kol tirpalo pH vertė bus 8,8 ir buvo pripilta

- vandens iki 500 ml. Tirpalas buvo perfiltruojamas pro 0,45 µm porų dydžio filtrą ir pridedama 2 g NDS.
3. $1 \times$ TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas pH 8,8 (praskiedžiamas $4 \times$ TRIS·HCl/NDS buferis pH 8,8).
 4. $2 \times$ baltymų denatūravimo (pavyzdžio) buferinis tirpalas (25 ml $4 \times$ TRIS·HCl/NDS buferio pH 6,8, 20 ml glicerolio, 4 g NDS, 2 ml 2-merkaptoetanolio, 1 mg bromfenolio mėlynojo ir pripilama vandens iki 100 ml).
 5. 10 % amonio peroksosulfato $[(NH_4)_2S_2O_8]$ tirpalas (svoris/tūris). Tirpalas buvo ruošiamas prieš pat naudojimą.
 6. Tetrametiledilendiaminas (TEMED).
 7. Elektroforezės buferinis tirpalas (3,02 g TRIS, 14,4 g glicino, 1 g NDS ir pripilama vandens iki 1000 ml).
 8. Standartinis baltymų mišinys, žinant baltymų molekulinės masės (markeris SigmaMarker S8445, Merck, Vokietija).
 9. Tiriamieji pavyzdžiai: jaučio serumo albuminas, naudotas kaip kontrolė, išrūgų baltymo koncentratas, išrūgų baltymų hidrolizės produktai bei išrūgų baltymų fermentacijos produktai.
 10. Baltymų tvirtinimo tirpalas (25 % (tūrio) izopropilo alkoholio, 10 % (tūrio) acto rūgšties ir 65 % vandens).
 11. Dažo Coomassie mėlio tirpalas (10 % (tūrio) acto rūgšties, 0,006 % (svoris/tūris) Coomassie mėlio G-250, 90 % vandens).
 12. 10 % (tūrio) acto rūgšties.

Skiriamojo gelio paruošimas:

1. Naudojant du švarius stiklus ir dvi tarpines buvo surenkama elektroforezės aparato gardelė, skirta pripildyti skiriamojo ir koncentruojamojo poliakrilamidinio geliu.
2. Stiklai buvo suspausti spaustukais tarpusavyje. Gardelė įstatoma į pildymui skirtą stovėlį.
3. Į cheminę stiklinę buvo supilti tirpalai, reikalingi skiriamajam geliui paruošti: 6 ml 30 % akrilamido/0,8 % N,N'-metilenbisakrilamido tirpalo, 3,75 ml $4 \times$ TRIS·HCl/NDS buferio (pH 8,8), 5,25 ml H₂O, 0,15 ml 10 % amonio peroksosulfato tirpalo ir 0,02 ml TEMED. Gerai išmaišoma.
4. Paruoštu tirpalu buvo pripildyta elektroforezės aparato gardelė. Tirpalas pilamas šalia tarpinės, esančios tarp stiklo. Nuo stiklo viršaus koncentruojamajam geliui paliekamas ~ 3 cm tarpas.
5. Ant paviršiaus tirpalo, esančio tarp stiklo, pipete atsargiai užsluoksniuojama izobutilo alkoholio, prisotinto vandens. Pilama palengva, iš pradžių šalia vienos, vėliau šalia kitos tarpinių, esančių tarp stiklų. Izobutilo alkoholio sluoksnis neleidžia patekti deguoniui į polimerizacijos mišinį. Be to, gaunamas lygus ir plokščias poliakrilamido gelio paviršius.
6. Laukiama, kol įvyks polimerizacijos reakcija (30–60 min. kambario temperatūros sąlygomis).

Koncentruojamojo gelio paruošimas:

1. Nupilamas izobutilo alkoholis, prisotintas vandens, ir gelio paviršius kelis kartus praplaunamas $1 \times$ TRIS·Cl/NDS buferiu pH 8,8.
2. Į cheminę stiklinę pripilama 1,7 ml 30 % akrilamido/0,8 % N,N'-metilenbisakrilamido tirpalo, 2,5 ml $4 \times$ TRIS·HCl/NDS buferio pH 6,8 ir 5,7 ml H₂O. Pripilama 150 µl 10 % amonio peroksosulfato tirpalo ir 10 µl TEMED. Gerai išmaišoma.
3. Gautas tirpalas supilamas tarp stiklų ant skiriamojo gelio. Tarp stiklų įpiltame koncentruojamajame gelyje neturi būti oro burbulų. Į užpiltą koncentruojamojo gelio sluoksnį įstatomos „šukos“ ir, jeigu

reikia, papildomas koncentruojamojo gelio sluoksnis. Laukiama, kol įvyks polimerizacijos reakcija (30–45 min. kambario temperatūros sąlygomis).

Baltymų preparatų paruošimas ir jų įpylimas į koncentruojamojo gelio šulinėlius:

1. Pirmiausia buvo pašalinamos druskos iš tiriamųjų mėginių, tam mėginiai buvo centrifuguojami (6000 aps./min., 15 min, 4 °C) mėgintuvėliuose su celiuliozės 10 kDa membranomis, 2–3 kartus praplaunant distiliuotu vandeniu. Prafiltruoti tiriamieji išrūgų baltymų mėginiai su pienarūgštėmis bakterijomis buvo skiedžiami vandeniu santykiu 1:6, o išrūgų baltymų hidrolizės produktai veikiami fermentais – 1:9.
2. 1,5 ml plastikiniame mėgintuvėlyje dalis tiriamo baltymų tirpalo buvo praskiedžiama santykiu 1:2 su 2 × baltymus denatūruojančiu (pavyzdžio) buferiu ir 3 min. mišinys buvo kaitinamas verdančio vandens vonioje.
3. Standartinis baltymų tirpalas *SigmaMarker* S8445 (Merck, Vokietija) buvo paruoštas pagal gamintojo reikalavimus.

Preparatų įpylimas į šulinėlius bei elektroforezės sąlygos:

Paruošus skiriamąjį ir koncentruojamąjį gelius, išimamos „šukos“, į šulinėlius įleidžiami mėginiai. Stiklai su geliais įstatomi į elektroforezės aparatą ir pripilama elektroforezės buferinio tirpalo. Buferinis tirpalas turi papildyti koncentruojamajame gelyje esančius šulinėlius ir skalauti skiriamojo gelio apačią. Stačioji baltymų elektroforezė atlikta 10x10 cm dydžio poliakrilamido gelio plokštelėje, kurios storis 0,75 mm, esant 230 V įtampai, 40 mA srovės stipriui. Elektroforezė vykdyta 70 min.

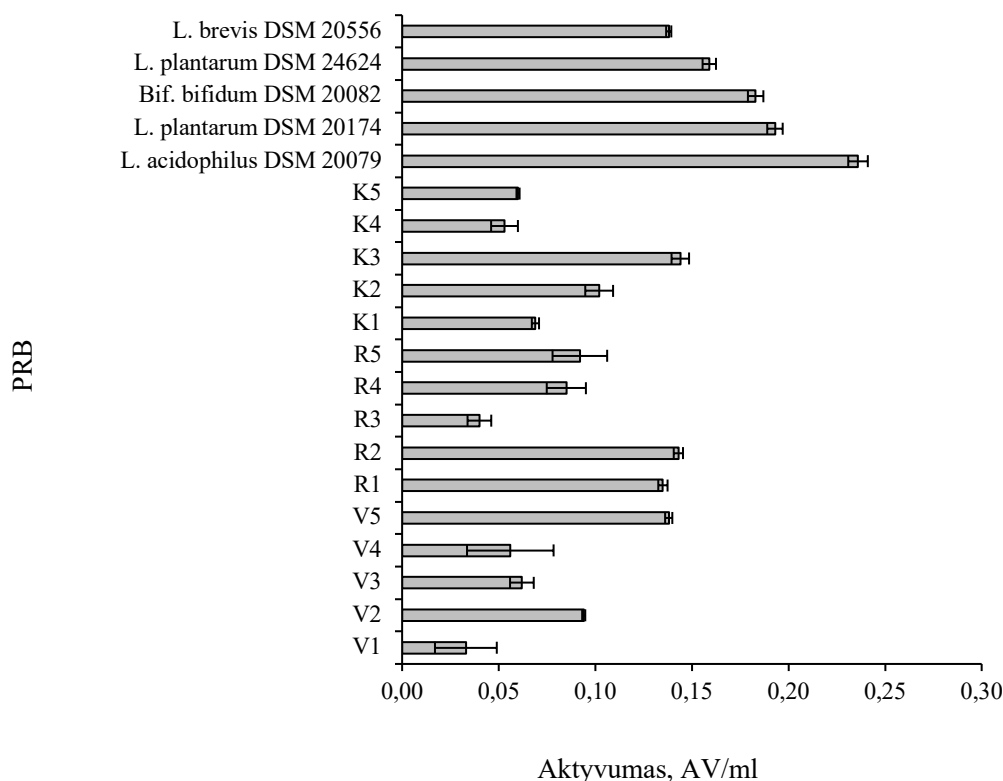
Baltymų dažymas Coomassie mėliu gelyje po elektroforezės:

1. Po elektroforezės poliakrilamido gelis įdedamas į plastikinę ar stiklinę vonelę ir užpilamas 3–5 gelio tūriais baltymų tvirtinimo tirpalu. Vonelė lėtai siūbuojama kambario temperatūros sąlygomis – 60 min.
2. Išpilamas baltymų tvirtinimo tirpalas ir užpilama Coomassie mėlio dažo tirpalu. Vonelė lėtai siūbuojama kambario temperatūros sąlygomis, kol baltymų juostelės nusidažys norimo ryškumo mėlyna spalva (1 val.).
3. Dažų tirpalas buvo išpilamas ir užpilama 10 % acto rūgštimi. Vonelė lėtai siūbuojama kambario temperatūros sąlygomis, kol iš gelio išsiplaus dažas, nesusirišęs su baltymu (≥ 2 val.). Nuolatos pakeičiamas 10 % acto rūgšties tirpalas.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Pieno rūgšties bakterijų proteazių aktyvumas

PRB proteolitinės sistemos yra svarbios laisvųjų aminorūgščių ir peptidų gamybai iš pieno baltymų. Literatūros duomenimis, didžiąją PRB dalį sudaro proteazės, skaidančios kazeinus į didelius peptidus, tarpląstelinės peptidazės, kurios toliau skaido šiuos peptidus iki mažų peptidų ir aminorūgščių. Taip pat PRB sudaro ir specifiniai transportiniai baltymai, pernešantys aminorūgštis ir peptidus per citoplazminę membraną [90]. Komercinių ir iš duonos raugų, ruoštų laboratorijoje, išskirtų PRB proteazių aktyvumas pateiktas 3.1 paveiksle. Didesniu proteazių aktyvumu pasižymėjo komercinės PRB, tokios kaip *L. plantarum* DSM 20174, *L. plantarum* DSM 24624, *L. acidophilus* DSM 20079, *Bif. bifidum* DSM 20082, atitinkamai 0,193, 0,159, 0,236, 0,183 AV/ml lyginant su PRB, išskirtomis iš raugų. Iš raugų išskirtos PRB: K3, R1, R2 ir V5 pasižymėjo didžiausiu proteazių aktyvumu, atitinkamai 0,144, 0,135, 0,143 ir 0,138 AV/ml lyginant tarpusavyje. Shihata ir kt. [91] nustatė, kad atlikus lieso pieno fermentaciją (6 val., 37 °C) *L. acidophilus* ir *Bifidobacterium* bakterijomis, *L. acidophilus* pasižymėjo didesniu proteazių aktyvumu lyginant su *Bifidobacterium*. Giori ir kt. [92] ištyrę temperatūros įtaką *Lactobacillus* padermių proteazių aktyvumui nustatė, kad didžiausiu proteazių aktyvumu *L. plantarum* pasižymėjo 15, 30 ir 45 °C temperatūroje. Tolesniems tyrimams atlikti atrinktos PRB: *L. plantarum* DSM 20174, *L. acidophilus* DSM 20079, *Bif. bifidum* DSM 20082, pasižymėjusios didžiausiu proteazių aktyvumu.



3.1 pav. Komercinių ir iš duonos raugų išskirtų PRB proteazių aktyvumas MRS terpėje

3.2. Fermentinės hidrolizės sąlygų įtaka išrūgų produktų savybėms

Atlikta išrūgų baltymų hidrolizė fermentais (pepsinu, proteaze iš *B. amyloliquefaciens* ir pankreatinu) ir nustatyta temperatūros, terpės pH vertės ir hidrolizės trukmės įtaka baltymų hidrolizės efektyvumui bei susidariusių produktų antioksidaciniam ir antimikrobiniam aktyvumui.

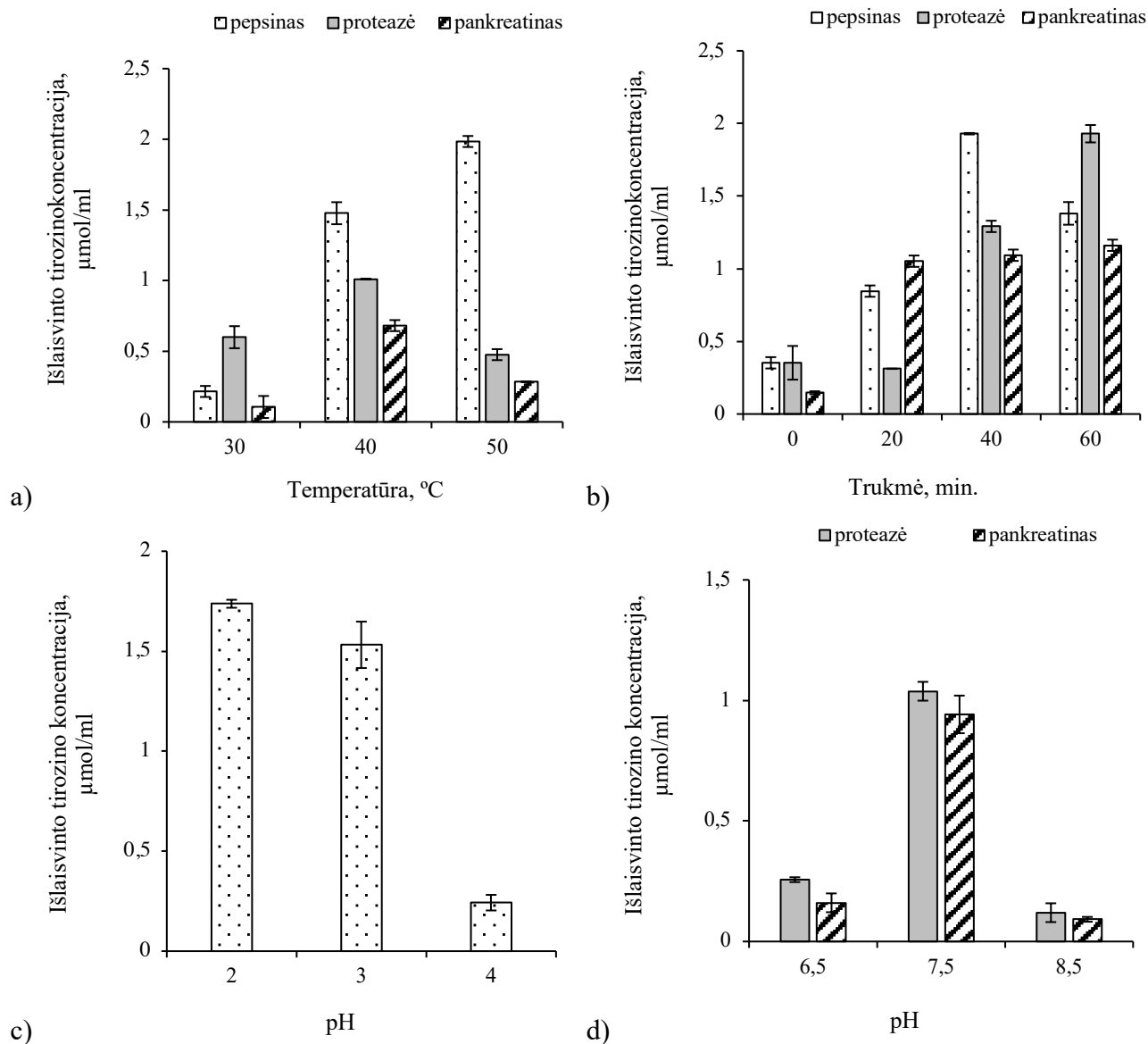
3.2.1. Temperatūros, terpės pH vertės ir hidrolizės trukmės įtaka išrūgų baltymų hidrolizės efektyvumui

Išrūgų baltymų hidrolizės efektyvumas buvo vertinamas pagal išlaisvinto tirozino koncentraciją (žr. 3.2 pav. a, b, c, d). Literatūros duomenimis 2,7 g tirozino yra 100g išrūgų baltymų [93]. Kuo daugiau tirozino buvo išlaisvinta, tuo daugiau baltymų buvo suhidrolizuota ir pasiektas didesnis hidrolizės efektyvumas. Vertinant fermentinės hidrolizės temperatūros įtaką, didžiausia išlaisvinto tirozino koncentracija nustatyta 50 °C temperatūroje naudojant fermentą pepsiną (1,98 μmol/ml išlaisvinto tirozino). Embiriekah'as ir kt. [94] atlikę tyrimą nustatė, kad didžiausias hidrolizės laipsnis buvo pasiektas naudojant pepsiną 50 °C temperatūroje. Taip pat literatūros duomenimis, aukštesnė temperatūra sukelia nuo temperatūros priklausomą termodenaturaciją ir konformacinius pokyčius, sąlygojančius pakitusius baltymus, prieinamų peptidų jungčių skaičių [95]. Ši temperatūra buvo optimali tik pepsinui, tačiau vykdant hidrolizę 40 °C temperatūroje visi tiriamieji pasižymėjo didele išlaisvinto tirozino koncentracija – mėginiai veikiami pepsinu – 1,48 μmol/ml, proteaze – 1,01 μmol/ml ir su pankreatinu – 0,68 μmol/ml. Mažiausia išlaisvinto tirozino koncentracija buvo pastebėta tiriamuosiuose mėginiuose su pepsinu bei pankreatinu hidrolizavus mėginius 30 °C temperatūroje, atitinkamai 0,22 μmol/ml ir 0,11 μmol/ml.

Vertinant hidrolizės trukmės įtaką išlaisvinto tirozino koncentracijai, galima daryti išvadą, kad optimalios hidrolizės trukmės tiriamiesiems mėginiams yra 40 ir 60 minučių. Vykdant hidrolizę 40 min. didžiausia išlaisvinto tirozino koncentracija pasižymėjo mėginiai su pepsinu (1,93 μmol/ml), o toliau tęsiant hidrolizę, tirozino koncentracija sumažėjo 29 %. Kim'as ir kt. [34] atlikę baltymų išrūgų hidrolizę naudojant pepsiną, nustatė, kad ilginant hidrolizės trukmę – didėja hidrolizės laipsnis. Vykdant hidrolizę 40 min. mėginiuose su proteaze išlaisvinto tirozino koncentracija buvo 1,29 μmol/ml, o ją tęsiant – hidrolizės efektyvumas padidėjo iki 1,93 μmol/ml. Butre ir kt. [96] WPI hidrolizę atliko naudodami proteazę iš *B. licheniformis* ir nustatė, kad hidrolizės laipsnis iki 60 min. sparčiai didėjo, o vėliau stabilizavosi. Mėginiuose su pankreatinu nustatyta išlaisvinto tirozino koncentracija 40 ir 60 hidrolizės minutę atitinkamai buvo 1,09 μmol/ml ir 1,16 μmol/ml. Pasak Silvestre ir kt. [30] WPC baltymų hidrolizės laipsnis yra silpnai veikiamas hidrolizės trukmės.

Tiriamųjų mėginių tirpalo pH vertė taip pat turėjo įtakos išlaisvinto tirozino koncentracijai. Mėginiams su pepsinu optimali pH vertė buvo 2, tačiau geri rezultatai gauti ir terpėje, kurios pH vertė 3, atitinkamai 1,74 ir 1,53 μmol/ml. Terpėje, kurios pH 4, išlaisvinto tirozino koncentracija sumažėjo 84 %.

Mėginiams su proteaze ir pankreatinu optimaliausia pH vertė buvo 7,5. Hidrolizavus išrūgų baltymus terpėje, kurios pH vertė 7,5, tirozino buvo išlaisvinta 1,04 ir 0,94 μmol/ml. Literatūros duomenimis mėginiuose su proteaze iš *B. licheniformis* hidrolizės laipsnis buvo didesnis, kai terpės pH buvo 9 nei 7 [96]. Tačiau literatūroje taip pat randama, kad naudojant anksčiau paminėtą proteazę, didžiausias hidrolizės laipsnis buvo nustatytas, kai terpės pH 8, o mažesni aktyvumai nustatyti, kai terpės pH vertės buvo 7,0 ir 9,0 [97]. Mažiausiai tirozino buvo išlaisvinta išrūgų baltymų mėginiuose, kurių pH buvo 8,5 – su proteaze 0,12 μmol/ml ir su pankreatinu 0,09 μmol/ml. Terpėje, kurios pH vertė buvo 6,5 išlaisvinto tirozino kiekis mėginiuose su proteaze sumažėjo 76 %, o mėginiuose su pankreatinu net 83 %, lyginant su optimaliu terpės pH.



3.2 pav. Išlaisvinto tirozino koncentracija išrūgų hidrolizės produktuose: (a) – temperatūros įtaka, (b) – hidrolizės trukmės įtaka, (c) pH vertės įtaka veikiant pepsinu ir (d) – pH vertės įtaka veikiant proteaze iš *B. amyloliquefaciens* ir pankreatinu

3.2.2. Temperatūros, terpės pH vertės ir hidrolizės trukmės įtaka išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui

Corrochano ir kt. [27] nustatė, kad galvijų išrūgos ir išrūgų baltymai (buvo tirti skirtingi komerciniai išrūgų produktai – WPC ir WPI) pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Antioksidacinis aktyvumas yra gana atsparus perdirbimo metodui ir padidėja fermentinės hidrolizės metu. Literatūros duomenimis keli sintetiniai peptidai, gauti iš β -LG ir α -LA, pasižymėjo antioksidaciniu aktyvumu, taip pat tikėtina, kad fermentinės hidrolizės metu išsiskyrusios laisvos aminorūgštys prisideda prie šio biologinio aktyvumo [27]. Fermentinės hidrolizės įtaka išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui vertinant DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu pateikta 3.3 a, b, c ir d paveiksluose. Palyginti stabilus DPPH radikalas yra plačiai naudojamas tiriant junginių gebėjimą veikti kaip laisvųjų radikalų šalintojais ar vandenilio donorais ir tokiu būdu įvertinti antioksidanto aktyvumą. Literatūros duomenimis išrūgų baltymai pasižymi santykinai dideliu radikalų šalinimo aktyvumu, o laktoferinas yra pagrindinis slopinimo komponentas [98]. Vertinant fermentinės

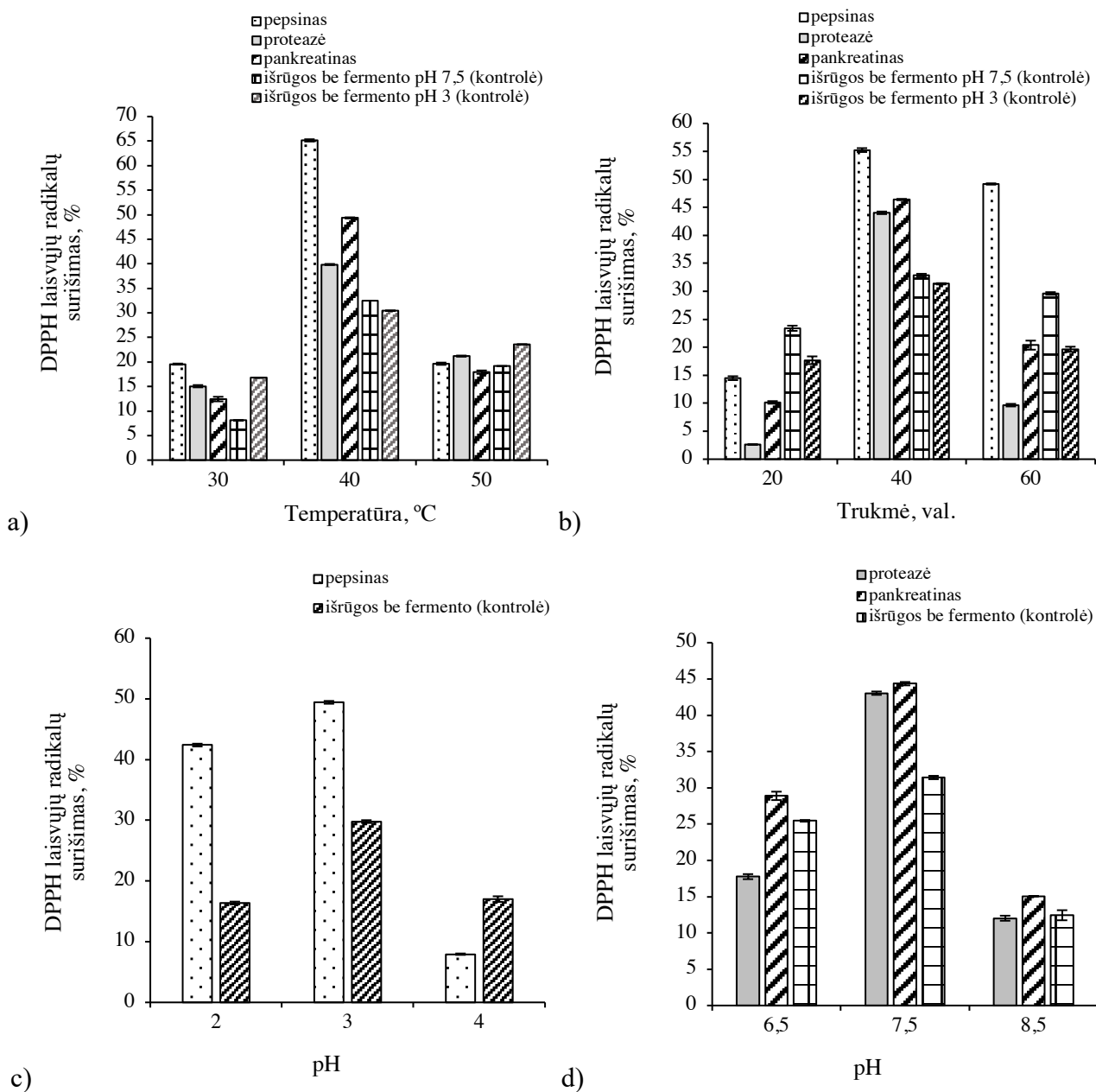
hidrolizės temperatūros įtaką didžiausias slopinimas buvo nustatytas 40 °C temperatūroje naudojant tiek pepsiną, tiek proteazę iš *B. amyloliquefaciens*, tiek ir pankreatiną. Ši temperatūra buvo optimali tiek fermentams, tiek išrūgoms (DPPH laisvųjų radikalų surišimo geba atitinkamai 43,04, 44,35 ir 31,42 %). Embiriekah'as ir kt. [94] atlikę fermentinę hidrolizę (4 val., 37 °C, fermento/substrato santykis 0,5 %, pH 2) nustatė, kad hidrolizuoti išrūgų baltymai, veikiami pepsinui pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu (54,1 %), lyginant su nehidrolizuotais išrūgų baltymais (32,1 %). Vykdamas fermentinę hidrolizę 30 °C temperatūroje tiriamieji mėginiai pasižymėjo mažu antioksidaciniu poveikiu. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas pastebėtas šarminėse išrūgose (pH 7,5) bei išrūgose su pankreatinu (DPPH laisvųjų radikalų surišimas atitinkamai 8,1 ir 12,44 %). 50 °C temperatūroje tiriamieji išrūgų baltymų mėginiai taip pat pasižymėjo ne itin dideliu antioksidaciniu aktyvumu. Lyginant su optimalia tiriamiesiems temperatūra išrūgų baltymų veikiamų pepsinu antioksidacinės savybės sumažėjo 70 %, proteaze – 50 %, pankreatinu – 64 %, šarminių išrūgų – 41 % ir rūgščių išrūgų – 23 %.

Vertinant fermentinės hidrolizės trukmės įtaką didžiausias slopinimas buvo nustatytas vykdamas fermentinę hidrolizę 40 minučių naudojant visus tris anksčiau paminėtus fermentus. Ši trukmė buvo optimali tiek fermentams, tiek išrūgoms. Correa ir kt. [99] atlikę tyrimą nustatė, kad ilgėjant hidrolizės trukmei, iš pradžių antioksidacinis poveikis mėginiuose su proteaze stiprėjo, vėliau pradėjo silpnėti. Vykdamas hidrolizę 20 minučių lyginant su optimalia hidrolizės trukme tiriamieji išrūgų mėginiai pasižymėjo mažesniu antioksidaciniu poveikiu. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas buvo pastebėtas mėginiuose su fermentais proteaze bei pankreatinu (laisvųjų radikalų surišimas atitinkamai 2,62 ir 10,15 %). Vykdamas hidrolizę 60 minučių, tiriamųjų mėginių, veikiamų pepsinu antioksidacinės savybės sumažėjo 11 %, proteaze – 78 %, pankreatinu – 56 %, šarminių išrūgų – 10 % ir rūgščių išrūgų – 37 % lyginant su optimalia mėginiams (40 min.) hidrolizės trukme.

Vertinant fermento pepsino ir rūgštinių išrūgų terpės pH vertės įtaką išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui didžiausias slopinimas (atitinkamai 49,43 ir 29,79 %) buvo nustatytas terpėje, kurios pH vertė 3. Šios pH vertė buvo optimali tiek fermentui, tiek išrūgoms. Vykdamas hidrolizę mėginiai, kurių terpės pH buvo 2, pasižymėjo mažesniu antioksidaciniu poveikiu (laisvųjų radikalų surišimas buvo atitinkamai 42,39 ir 16,37 %). Lin ir kt. [47] atlikę fermentinę išrūgų baltymų hidrolizę (pH 2, 37 °C, 2 val.) veikiant pepsinui nustatė, kad antioksidacinis aktyvumas padidėjo pašildžius mėginį 5–10 min. 95 °C prieš hidrolizę. Vykdamas hidrolizę mėginiai, kurių pH vertė buvo 4, pasižymėjo dar mažesniu antioksidaciniu aktyvumu. Lyginant su optimalia mėginiams terpės pH verte pepsino antioksidacinės savybės sumažėjo 84 %, o rūgštinių išrūgų – 43 %.

Vertinant fermentų pankreatino, proteazės ir šarminių išrūgų terpės pH vertės įtaką išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui didžiausias slopinimas buvo nustatytas terpėje, kurios pH vertė 7,5. Šios pH vertės buvo optimalios tiek fermentams, tiek išrūgoms. Silvestre ir kt. [30] atlikę fermentinę hidrolizę (50 °C, pH 7, 5 val.) nustatė, kad hidrolizuoti išrūgų baltymai veikiant proteazei iš *A. sojae* ir pankreatinui pasižymėjo dideliu antioksidaciniu aktyvumu atitinkamai 59,7 ir 49,44 %. Vykdamas hidrolizę mėginiai, kurių terpės pH buvo 6,5 pasižymėjo mažesniu antioksidaciniu poveikiu. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas buvo pastebėtas mėginiuose su proteaze bei mėginyje be fermento (šarminėse išrūgose), laisvųjų radikalų surišimas buvo atitinkamai 17,76 ir 25,45 %. Vykdamas hidrolizę mėginiai, kurių pH vertė buvo 8,5 pasižymėjo dar mažesniu antioksidaciniu aktyvumu. Lyginant su mėginiams optimalia terpės pH verte hidrolizuotų išrūgų baltymų veikiant

proteazei antioksidacinės savybės sumažėjo 72 %, pankreatinui – 66 %, o išrūgų baltymų be fermento (šarminių išrūgų) – 60 %.



3.3 pav. Išrūgų ir išrūgų hidrolizės, naudojant fermentus, produktų DPPH laisvųjų radikalų surišimo geba priklausomai nuo: (a) – temperatūros, (b) – hidrolizės trukmės, (c ir d) – pH vertės

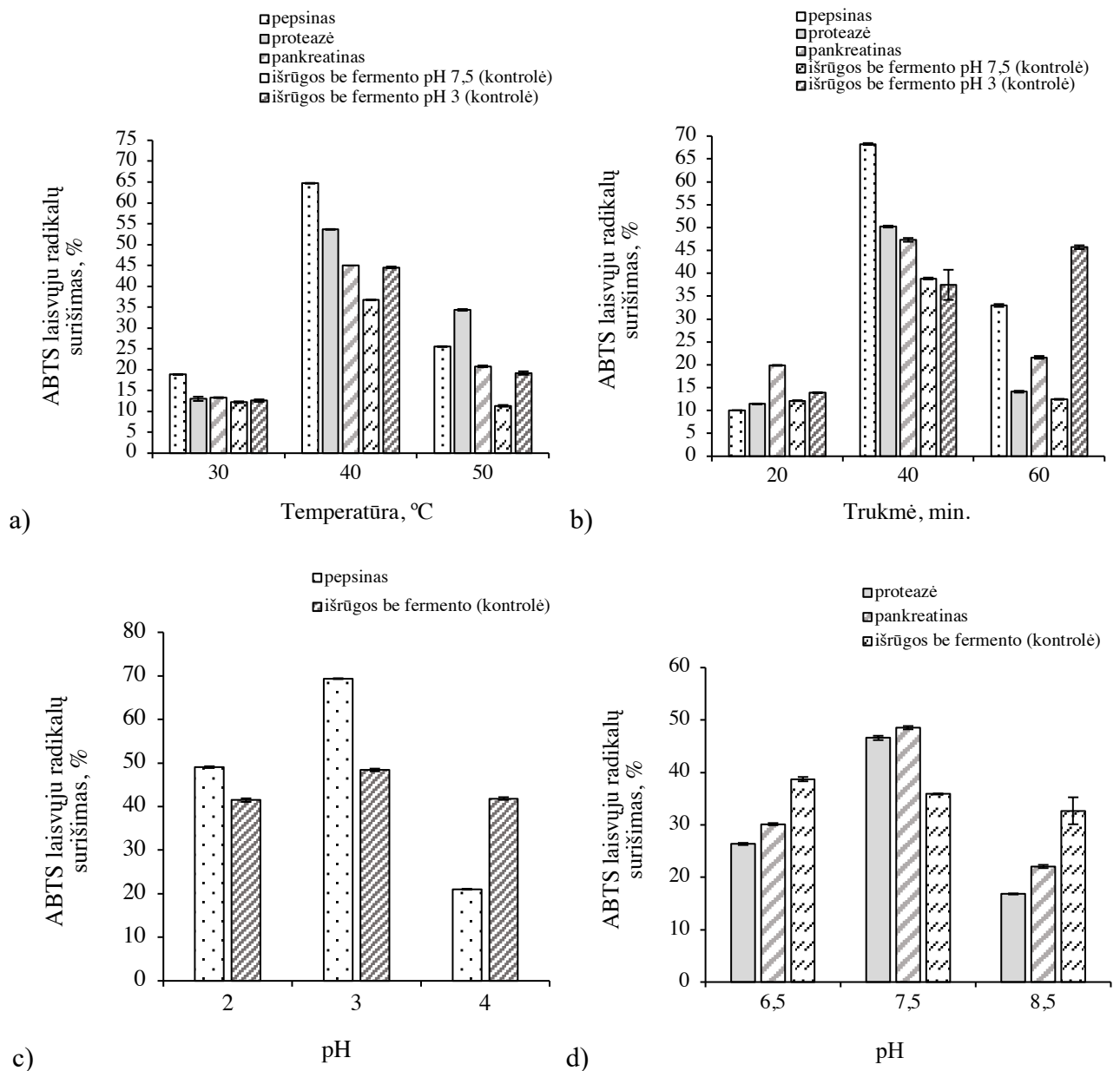
Fermentinės hidrolizės metu fermentai išlaisvina peptidus, pasižyminčius antioksidantinėmis savybėmis, iš pirminio baltymo. Išrūgų baltymų hidrolizės metu padidėja laisvų aminorūgščių kiekis, vandenilio jonų prieinamumas ir karboksirūgšties grupių koncentracija. Šie veiksniai turi įtakos antioksidacinio aktyvumo padidėjimui [45]. Fermentinės hidrolizės įtaka išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui vertinant ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu pateikta 3.4 a, b, c ir d paveiksluose. Vertinant fermentinės hidrolizės temperatūros įtaką didžiausias laisvųjų radikalų surišimas buvo nustatytas atliekant hidrolizę 40 °C temperatūroje naudojant tiek pepsiną, tiek proteazę iš *B. amyloliquefaciens*, tiek ir pankreatiną. Ši temperatūra buvo optimali tiek fermentams, tiek išrūgoms. Hidrolizuojant išrūgų baltymus 30 °C temperatūroje tiriamieji išrūgų baltymų mėginiai pasižymėjo mažu antioksidaciniu poveikiu. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas

pastebėtas šarminėse bei rūgščiose išrūgose (ABTS laisvųjų radikalų surišimas buvo atitinkamai 12,23 ir 12,59 %). Atliekant išrūgų baltymų hidrolizę 50 °C temperatūroje išrūgų baltymų mėginiai taip pat pasižymėjo ne itin dideliu antioksidaciniu aktyvumu. Lyginant su optimalia tiriamiesiems temperatūra išrūgų baltymų, paveiktų pepsinu, antioksidacinės savybės sumažėjo 60 %, proteaze – 36 %, pankreatinu – 54 %, šarminių išrūgų – 69% ir rūgščių išrūgų – 57 %. Corrochano ir kt. [100] atlikę fermentinę išrūgų baltymų hidrolizę (50 °C, pH 8, 3 val.) nustatė, kad veikiant proteazei iš *B. licheniformis* išrūgų baltymų hidrolizatai pasižymi ~ 5 kartus stipresniu antioksidaciniu aktyvumu lyginant su nehidrolizuotu išrūgų baltymų izoliatu.

Vertinant fermentinės hidrolizės trukmės įtaką didžiausias slopinimas buvo nustatytas vykdant fermentinę hidrolizę 40 minučių naudojant visus tris anksčiau paminėtus fermentus. Ši trukmė buvo optimali tiek fermentams, tiek išrūgoms. Vykdant hidrolizę 20 minučių lyginant su optimalia hidrolizės trukme, tiriamieji pasižymėjo mažesniu antioksidaciniu poveikiu. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas buvo pastebėtas mėginiuose su fermentais pepsinu bei proteaze (laisvųjų radikalų surišimas buvo atitinkamai 10,04 ir 11,43 %). Vykdant hidrolizę 60 minučių tiriamieji mėginiai taip pat pasižymėjo pakankamai mažesniu antioksidaciniu aktyvumu. Lyginant su optimalia mėginiams hidrolizės trukme hidrolizuotų išrūgų baltymų veikiant pepsinui antioksidacinės savybės sumažėjo 52 %, proteazei – 72 %, pankreatinui – 54 %, šarminių išrūgų – 68 %, o rūgščių išrūgų antioksidacinės savybės sustiprėjo – 22 %. Dryakova ir kt. [38] paskelbė, kad nehidrolizuoti išrūgų baltymai pasižymėjo mažu antioksidaciniu aktyvumu (7–19,8 %), o atlikus hidrolizę (45 °C, fermentai – *Protamex* (pH 6), *Flavourzyme* (pH 7) ir alkalazė (pH 8), 3 val.) reikšmės pastebimai padidėjo 40–54,2 %. Mokslininkų teigimu, mažesnis nehidrolizuotų išrūgų baltymų antioksidacinis aktyvumas patvirtina faktą, kad patys išrūgų baltymai pasižymi kai kuriomis antioksidacinėmis savybėmis [38].

Vertinant fermento pepsino ir rūgštinių išrūgų terpės pH vertės įtaką išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui didžiausias slopinimas (atitinkamai 69,36 ir 48,4 %) buvo nustatytas terpėje, kurios pH vertė 3. Ši pH vertė buvo optimali tiek fermentui, tiek išrūgoms. Vykdant hidrolizę išrūgų baltymų mėginiai, kurių terpės pH buvo 2 pasižymėjo mažesniu antioksidaciniu poveikiu (laisvųjų radikalų surišimas atitinkamai 49,05 ir 41,48 %). Vykdant hidrolizę mėginių, kurių pH vertė buvo 4, lyginant su optimalia mėginiams terpės pH verte, su pepsinu antioksidacinės savybės sumažėjo 70 %, o rūgštinių išrūgų – 14 %.

Vertinant fermentų pankreatino, proteazės ir šarminių išrūgų terpės pH vertės įtaką išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui didžiausias slopinimas buvo nustatytas terpėje, kurios pH vertė 7,5. Šios pH vertės buvo optimalios tiek fermentams, tiek išrūgoms. Vykdant hidrolizę mėginiai, kurių terpės pH buvo 6,5 pasižymėjo mažesniu antioksidaciniu poveikiu. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas buvo pastebėtas mėginiuose su fermentais proteaze bei pankreatinu (laisvųjų radikalų surišimas buvo atitinkamai 26,35 ir 30,13 %). Mann ir kt. [39] hidrolizavę (pH 6,5, 50 °C, 8 val.) išrūgų baltymus veikiant juos proteaze iš *A. oryzae* nustatė, kad antioksidacinis aktyvumas padidėjo 7 kartus lyginant su nehidrolizuotu išrūgų baltymų antioksidaciniu aktyvumu. Vykdant hidrolizę išrūgų baltymų mėginiai, kurių pH vertė buvo 8,5 pasižymėjo dar mažesniu antioksidaciniu aktyvumu. Lyginant su optimalia mėginiams terpės pH verte, išrūgų baltymų hidrolizės veikiant proteazei produktų antioksidacinės savybės sumažėjo 64 %, pankreatinui – 55 %, o šarminių išrūgų tik – 10 %.



3.4 pav. Išrūgų ir išrūgų hidrolizės, naudojant fermentus, produktų ABTS^{•+} radikalų sujungimo geba priklausomai nuo: (a) – temperatūros, (b) – hidrolizės trukmės, (c ir d) – pH vertės

3.2.3. Temperatūros, terpės pH vertės ir hidrolizės trukmės įtaka išrūgų baltymų produktų antimikrobiniam aktyvumui

Išrūgų baltymai, tokie kaip laktoferinas, lizocimas, imunoglobulinas ir laktoperoksidazė, yra antimikrobiškai aktyvūs ir slopina patogeninių mikroorganizmų [101]. Fermentinės hidrolizės įtaka išrūgų baltymų produktų antimikrobiniam aktyvumui pateikta 3.1 lentelėje. Vertinant fermentinės hidrolizės temperatūros įtaką produktų antimikrobiniam aktyvumui, didžiausias patogeninių bakterijų augimo slopinimas buvo nustatytas hidrolizatu, gautu 40 °C temperatūroje naudojant tiek pepsiną, tiek proteazę iš *B. amyloliquefaciens*, tiek ir pankreatiną. Hidrolizės produktai su pepsinu ir pankreatinu geriausiai slopino *S. typhimurium* bei *St. aureus* patogenines bakterijas, slopinimo zona atitinkamai buvo 15±0, 14±0 ir 18±0 18±0,7 mm. Išrūgų baltymų produktai, gauti veikiant proteaze iš *B. amyloliquefaciens* pasižymėjo *St. aureus* bei *B. cereus* patogeninių bakterijų augimo slopinimu, didžiausia slopinimo zona atitinkamai buvo 17±0,7 ir 16±0,7 mm. Correa ir kt. [99] atlikę avių pieno

kazeinato hidrolizę (pH 8, 3 val. 45 °C) veikiant proteaze iš *Bacillus* pastebėjo, kad hidrolizatai slopino patogeninės bakterijos *B. cereus* augimą (9,33 mm). Jrad'as ir kt. [102] nustatė, kad vykdant kupranugarių pieno kazeino hidrolizę 4 valandas, 40 °C temperatūroje ir veikiant pepsinu bei pankreatinu, buvo išlaisvinti antibakteriniai fragmentai ir antimikrobinis aktyvumas padidėjo, lyginant su nehidrolizuoto kazeino aktyvumu [102]. 30 °C temperatūroje gauti hidrolizės produktai veikiant pepsinu bei proteaze nepasižymėjo antimikrobinio poveikiu *S. typhimurium* bakterijoms. 50 °C temperatūroje gauti išrūgų baltymų hidrolizės produktai veikiant pankreatinu labiausiai slopino *S. typhimurium* bei *St. aureus* patogenines bakterijas, slopinimo zona atitinkamai buvo 16±0,7 ir 17±0,7 mm.

Vertinant fermentinės hidrolizės pH vertės įtaką produktų antimikrobiniam aktyvumui tinkamiausia terpės pH vertė mėginiams su pepsinu buvo 3, o mėginiams su pankreatinu ir proteaze – 7,5. Tokių pH verčių terpėse vykdant hidrolizę didžiausiu *S. typhimurium* bei *St. aureus* augimo slopinimu pasižymėjo mėginiai veikti pepsinu, atitinkamai 17±0,7, 16±0,7 ir pankreatinu, atitinkamai 18±0, 18±0,7 mm. Hidrolizės produktai, gauti veikiant proteazei iš *B. amyloliquefaciens* geriausiai slopino *St. aureus* ir *E. coli* patogeninių bakterijų augimą, slopinimo zona atitinkamai buvo 16±0 ir 18±0,7 mm. Kumar'as ir kt. [103] atlikę kupranugarių kazeino hidrolizę (pH 8, 6 val., 55 °C) veikiant proteaze iš *B. licheniformis* nustatė, kad mėginiai pasižymėjo antimikrobinio aktyvumu ir slopino *E. coli*, *St. aureus* ir *B. cereus* patogenines bakterijas, atitinkamai 17,93±0,82, 14,98±0,41 ir 18,95±0,34 mm. Vykdant hidrolizę, kai terpės pH buvo 2, išrūgų baltymai, veikiami pepsinu, slopino *St. aureus* ir *E. coli* augimą, atitinkamai 14±0,7, 14±0 mm ir 14±0,7, 15±0,7 mm, kai terpės pH buvo 4. Theolier'as ir kt. [104] hidrolizavę išrūgų baltymus (pH 2, 2,5 val. 37 °C) veikiant pepsinui pastebėjo mėginių antimikrobinį poveikį slopinant *E. coli* augimą. Išrūgų baltymų hidrolizės produktai (pH 6,5) veikiant proteazei iš *B. amyloliquefaciens* mažiausiai slopino *B. cereus* patogenines bakterijas (10±0 mm), tuo tarpu mėginiai veikiami pankreatinu nepasižymėjo antimikrobinio poveikiu slopinant *St. aureus*, bet pakankamai gerai slopino *B. cereus* patogenines bakterijas (17±1,4 mm). Vykdant hidrolizę, kai terpės pH 8,5, produktai su proteaze mažiausiai slopino *B. cereus* patogenines bakterijas (11±0 mm), o mėginiai su pankreatinu – *E. coli* (13±0,7).

Vertinant fermentinės hidrolizės trukmės įtaką produktų antimikrobiniam aktyvumui, didžiausias patogeninių bakterijų augimo slopinimas buvo nustatytas hidrolizę vykdant 40 min., naudojant tiek pepsiną, tiek proteazę iš *B. amyloliquefaciens*, tiek ir pankreatiną. Hidrolizės produktai veikiant pepsinu ir pankreatinu šioje temperatūroje geriausiai slopino *St. aureus* patogenines bakterijas, slopinimo zona atitinkamai buvo 16±0 ir 16±1,4 mm. Išrūgų baltymų hidrolizės produktai veikiant proteaze iš *B. amyloliquefaciens* taip pat pasižymėjo stipriu antimikrobinio poveikiu slopinant *E. coli* augimą (16±0 mm), o mėginiai veikiami pankreatinu slopino *S. typhimurium* patogeninę bakteriją (17±0,7 mm), tačiau neslopino *B. cereus* augimo. Vykdant hidrolizę 20 ir 60 min. tiriamieji mėginiai veikiami pepsinu pasižymėjo silpnesniu antimikrobinio poveikiu (11±0 mm) arba nepasižymėjo antimikrobinio poveikiu slopinant *E. coli* bakterijos augimą (11±0 mm). Vykdant hidrolizę 20 min. gauti hidrolizės produktai veikiami pankreatinu neslopino *S. typhimurium* patogeninės bakterijos, o prailginus hidrolizės trukmę iki 60 min., tiriamieji išrūgų baltymų mėginiai veikiami proteazės ir pankreatino labiausiai slopino šią patogeninę bakteriją, atitinkamai 16±0,7 ir 17±0 mm.

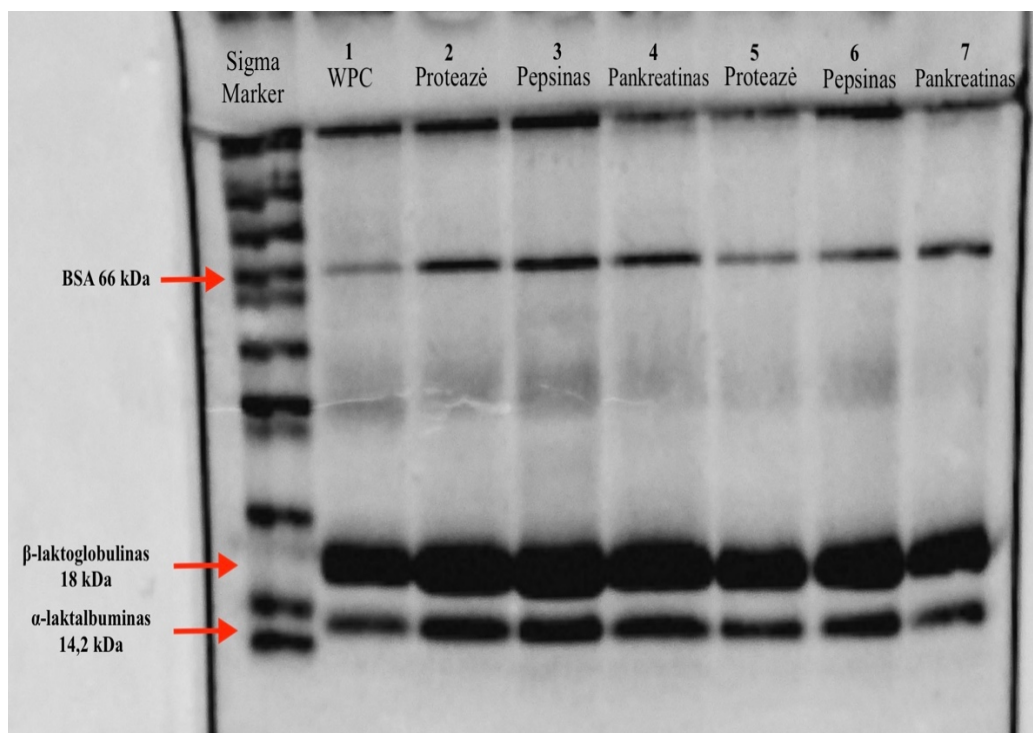
3.1 lentelė. Antimikrobinis išrūgų baltymų hidrolizės produktų poveikis patogeninėms bakterijoms, vertinant po 24 val., mm (šulinėlio skersmuo 8 mm)

Fermentas	Fermentinės hidrolizės sąlygos		Indikatorinis mikroorganizmas			
			<i>St. aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E.coli</i>
			Slopinimo zonos skersmuo agarą terpėje, mm			
Pepsinas P7000	temperatūra, °C	30	11±0,7	12±0	–	12±0,7
		40	15±0	14±0,7	14±0	13±0
		50	14±0,7	13±0,7	13±1,4	12±1,4
	pH vertė	2	14±0,7	13±0	12±0	14±0,7
		3	16±0,7	15±1,4	17±0,7	14±1,4
		4	14±0	14±0,7	13±0	15±0,7
	hidrolizės trukmė, min.	20	13±0	12±1,4	12±0	11±0
		40	16±0	14±0	15±0	14±0
		60	15±0,7	14±0,7	13±0,7	–
Proteazė iš <i>B. amyloliquifaciens</i> P1236	temperatūra, °C	30	12±0	14±0,7	–	15±0,7
		40	17±0,7	16±0,7	10±0	18±0
		50	11±0	12±0,7	11±0,7	12±0
	pH vertė	6,5	14±0	10±0	12±0,7	14±0,7
		7,5	16±0	14±0	14±1,4	18±0,7
		8,5	16±0,7	11±0	15±0,7	16±0,7
	hidrolizės trukmė, min.	20	13±0	12±1,4	12±0	13±0
		40	15±0,7	15±0	12±0,7	16±0
		60	12±0,7	12±0,7	16±0,7	13±0,7
Pankreatinas P1750	temperatūra, °C	30	16±0,7	11±0	16±0,7	14±0
		40	18±0	–	18±0,7	14±0,7
		50	17±0,7	11±1,4	16±0,7	14±0
	pH vertė	6,5	–	17±1,4	15±0,7	12±0
		7,5	18±0,7	–	18±0	14±0
		8,5	16±0	14±0,7	17±1,4	13±0,7
	hidrolizės trukmė, min.	20	15±0,7	11±0	–	15±0
		40	16±1,4	–	17±0,7	15±0
		60	16±0,7	11±0,7	17±0	15±0,7

3.2.4. Fermentinės hidrolizės įtaka išrūgų baltymų produktų pokyčiams

Fermentinės hidrolizės įtaka išrūgų baltymų pokyčiams buvo įvertinta atliekant vertikaliąją vienkryptę natrio dodecilsulfato elektroforezę (žr. 3.6 pav.). Tiriamųjų juostoms identifikuoti buvo naudojamas standartinis baltymų tirpalas *SigmaMarker* S8445. Nefermentuotos WPC buvo kontrolinis mėginys, pagal kurį buvo įvertinti pokyčiai. Hidrolizuoti išrūgų baltymai ir išrūgų baltymai prieš hidrolizę (kontrolinis mėginys) buvo panašūs baltymų pėdsakų skaičiumi ir molekulinio svoriu gelyje. Atlikus tyrimą nustatyta, kad hidrolizė pilnai neįvyko, gauti rezultatai parodė, kad dalis išrūgų baltymų nebuvo suhidrolizuoti. BSA (66 kDa), β-laktoglobulinas (18 kDa) ir α-laktalbuminas (14,2 kDa) fermentinės hidrolizės metu nebuvo suhidrolizuoti. Tam įtakos galėjo turėti nepilnai įvykusi hidrolizė, per trumpa hidrolizės trukmė bei per didelė tiriamųjų mėginių

koncentracija. Briczinski ir kt. [105], gavę panašų hidrolizuotų ir nehidrolizuotų išrūgų baltymų vaizdą gelyje, padarė išvadas, kad fermentai pirmiausiai elgėsi kaip egzopeptidazės, kai po pirminio peptidinių jungčių skaidymo, tarpinis produktas smarkiai suskaidomas į mažesnius peptidus. Jei endopeptidazės aktyvumas būtų buvęs palankus, fermentų skaidymas būtų buvęs labiau atsitiktinis, o gelyje būtų matomi įvairūs tarpiniai peptidai. Chaudhari ir kt. [106] pranešė, kad išrūgų baltymų, paveiktų pepsinu, fermentinės hidrolizės (pH 2, 37 °C) metu β -laktoglobulinas nebuvo suhidrolizuotas, o α -laktalbumino pėdsakų gelyje nematyti. Hidrolizuojant išrūgų baltymus pankreatinu (pH 7,5, 40 °C) nei α -laktalbuminas, nei β -laktoglobulinas nebuvo suhidrolizuoti.



3.5 pav. Išrūgų baltymų hidrolizatų (40 min, 40 °C, pH 7,5 (proteazei ir pankreatinui), pepsinui – 3) apdorotų pepsinu, proteaze bei pankreatinu, vienkryptė natrio dodecilsulfato elektroforezė. Tiriamųjų mėginių, esančių 2, 3 ir 4 takeliuose koncentracija dvigubai didesnė nei mėginių, esančių 5, 6 ir 7 takeliuose.

3.3. Fermentacijos, taikant *Lactobacillus* ir *Bifidobacterium* rūšims priklausančias bakterijas, įtaka išrūgų produktų savybėms

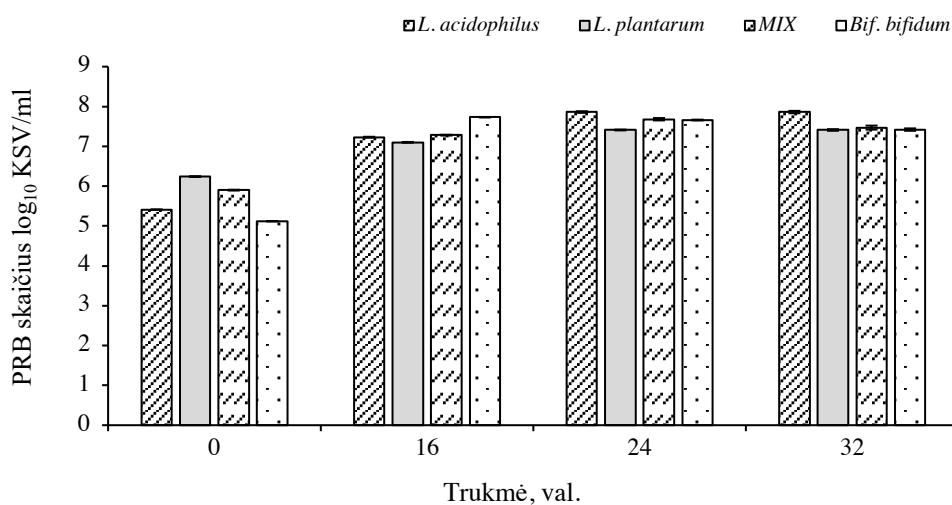
Atlikta išrūgų baltymų fermentacija skirtingomis pieno rūgšties bakterijomis (*L. acidophilus* DSM 20079, *L. plantarum* DSM 20174, *Bif. bifidum* DSM 20082 ir šių bakterijų mišiniu (santykis 1:1:1)) ir nustatyta pieno rūgšties bakterijų įtaka fermentuotų išrūgų produktų antioksidaciniam aktyvumui, proteazių aktyvumui, baltymų kiekiui bei nustatytas pieno rūgšties bakterijų skaičius 32 val. fermentacijos metu.

3.3.1. Pieno rūgšties bakterijų pokyčiai fermentacijos metu

Vykdamas fermentaciją pieno rūgšties bakterijomis, jų skaičius išrūgų baltymų terpėje po 0, 16, 24 ir 32 val. pateiktas 3.6 paveiksle. Didžiausias bakterijų skaičius po 0 val. (pradžioje fermentacijos) buvo terpėje su *L. plantarum* DSM 20174 bakterijomis (6,24 log₁₀ KSV/ml). Po 16 val. bakterijų skaičius padidėjo iki 7,1 log₁₀ KSV/ml. Po 24 val. *L. plantarum* DSM 20174 bakterijų skaičius padidėjo iki 7,41 log₁₀ KSV/ml ir po 32 val. fermentacijos išliko toks pat. Xiao ir kt. [107] atliko sojų išrūgų

fermentaciją *L. plantarum* B1–6 bakterijomis ir nustatė, kad po 14 val. fermentacijos PRB skaičius padidėjo nuo 7,3 log₁₀ KSV/ml (pradinis taškas; pH 8,3) iki 8,3 log₁₀ KSV/ml (pH 4), o po 24 val. šiek tiek sumažėjo (8,1 log₁₀ KSV/ml; pH 4).

Pradinis *Bif. bifidum* DSM 20082 bakterijų skaičius buvo 5,12 log₁₀ KSV/ml, o po 16 val. fermentacijos nustatyta, kad *Bif. bifidum* DSM 20082 bakterijų skaičius buvo didžiausias lyginant su kitomis bakterijomis (7,73 log₁₀ KSV/ml). Vykdamt fermentaciją 24 val. šių bakterijų skaičius ėmė mažėti ir po 32 val. sumažėjo iki 7,42 log₁₀ KSV/ml. Drgalic ir kt. [108] atlikę 24 val. fermentaciją 37 °C temperatūroje nustatė, kad *Bif. bifidum* bakterijų skaičius fermentuotų išrūgų terpėje su inulinu padidėjo nuo ~ 7,3 iki 8,3 log₁₀ KSV/ml. Trujillo-de Santijago ir kt. [109] taip pat nustatė, kad atliekant išrūgų fermentaciją (13 val., 38 °C) *Bif. infantis* bakterijų skaičius padidėjo nuo ~ 4,4 iki ~ 8,7 log₁₀ KSV/ml.



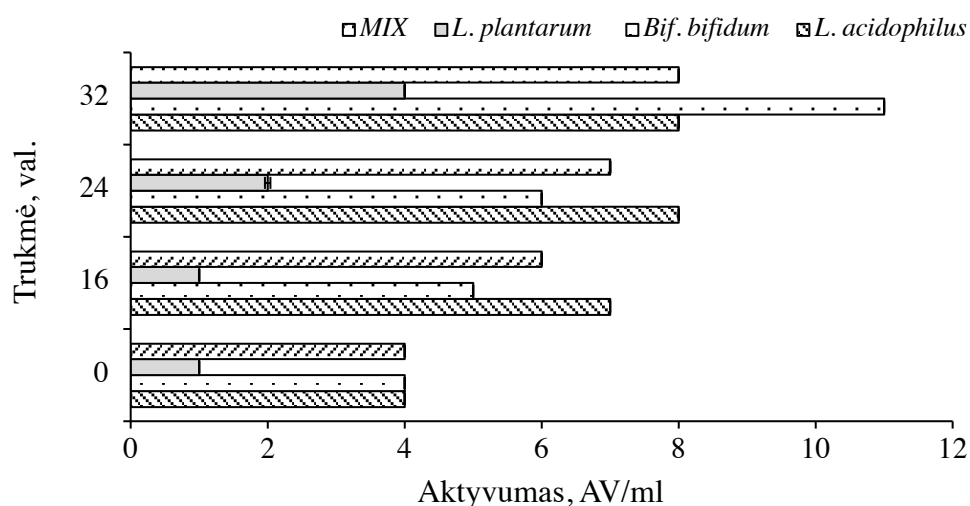
3.6 pav. PRB skaičiaus priklausomybė nuo augimo trukmės išrūgų baltymų terpėje

Pradiniame taške (0 val.) bakterijų *L. acidophilus* DSM 20174 skaičius buvo 5,41 log₁₀ KSV/ml. Vykdamt fermentaciją šių bakterijų skaičius proporcingai didėjo ir po fermentacijos (po 32 val.) bakterijų skaičius išsaugo iki 7,86 log₁₀ KSV/ml. Matijevic‘as ir kt. [110] atlikę probiotinių bakterijų augimo išrūgose tyrimą, nustatė, kad *L. acidophilus* skaičius fermentacijos metu didėjo (išsaugo nuo 6,62 log₁₀ KSV/ml iki 9,45 log₁₀ KSV/ml) ir padarė išvadą, kad išrūgos yra tokia pati gera terpė augti pieno rūgšties bakterijoms kaip ir pienas. Tyrime dar didesnis PRB skaičius nustatytas pridėjus gliukozės ar laktozės kaip anglies šaltinio. Pescuma ir kt. [111] fermentuodami WPC (35 %, 37 °C, 24 val.) *L. acidophilus* bakterijomis nustatė, kad bakterijų skaičius padidėjo 1,3 karto lyginant su pradiniu skaičiumi. Shukla ir kt. [112] ištyrę *L. acidophilus* NCDC–015 pokytį 24 val. 37 °C temperatūroje fermentuojant išrūgas bei išrūgas su ananasų sultimis nustatė, kad išrūgose su ananasų sultimis užaugo daugiau bakterijų (4,7 log₁₀ KSV/ml) lyginant su skaičiumi išrūgose iki 10 val., o po 15 val. išrūgose bakterijų skaičius išsaugo nuo 6,89 iki 9,69 log₁₀ KSV/ml.

Bakterijų (*L. acidophilus* DSM 20079, *L. plantarum* DSM 20174 ir *Bif. bifidum* DSM 20082) mišinio (santykis 1:1:1) skaičius prieš fermentaciją buvo pakankamai didelis lyginant su kitomis bakterijomis (5,9 log₁₀ KSV/ml). Vykdamt fermentaciją bakterijų skaičius didėjo ir po 24 val. išsaugo iki 7,68 log₁₀ KSV/ml, tačiau dar po 8 val. šis skaičius nežymiai sumažėjo iki 7,47 log₁₀ KSV/ml.

3.3.2. Pieno rūgšties bakterijų įtaka proteazių aktyvumui išrūgų baltymų terpėje fermentacijos metu

Proteolizė yra baltymų peptidinių jungčių hidrolizė, kai peptidai ir laisvosios aminorūgštys yra išlaisvinamos. PRB turi sudėtingą proteazės / peptidazės sistemą, kurią sudaro trys komponentai: proteazės, inicijuojančios kazeino skilimą į oligopeptidus, peptidų pernešėjai ir tarpląstelinės peptidazės, skaidančios peptidus į trumpesnius peptidus ir laisvas aminorūgštis [113]. Šio eksperimento metu buvo tirtas proteazių aktyvumas išrūgų baltymų koncentrato terpėje fermentacijos 32 val. laikotarpyje (žr. 3.7 pav.). Proteazių aktyvumas fermentacijos pradžioje su *L. acidophilus* DSM 20079, *Bif. bifidum* DSM 20082 ir bakterijų mišiniu (santykis 1:1:1) buvo lygus 4 AV/ml. Mažiausias proteazių aktyvumas nustatytas terpėje su *L. plantarum* DSM 20174 (1 AV/ml). Batmunkh'as ir kt. [114] nustatė, kad sojų pieno fermentacijos (20 val., 37 °C) *L. fermentum* BM-325 bakterijomis metu padidėjo laisvų amino grupių bei peptidų kiekis ir didžiausias proteazių aktyvumas nustatytas po 4 val. fermentacijos (25,3 AV/ml). Vėliau proteazinis aktyvumas kiek padidėjo ir stabilizavosi (20,5 AV/ml).



3.7 pav. Trukmės įtaka proteazių aktyvumui išrūgų fermentacijos terpėje, naudojant įvairias PRB ir jų mišinį

Po 16 val. fermentacijos *L. plantarum* DSM 20174 bakterijų proteazių aktyvumas nepakito. Nustatytas didžiausias proteazių aktyvumas fermentuotuose išrūgų baltymuose su *L. acidophilus* DSM 20079 (7 AV/ml), *Bif. bifidum* DSM 20082 bakterijų bei bakterijų mišinio aktyvumas taip pat padidėjo, atitinkamai 25 ir 50 %.

Po 24 val. išrūgų fermentacijos produktų su *Bif. bifidum* DSM 20082, bakterijų mišiniu ir *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis proteazių aktyvumas nežymiai padidėjo, atitinkamai 20, 17 ir 14 %. Mėginių su pieno rūgšties bakterijomis *L. plantarum* DSM 20174 aktyvumas padidėjo du kartus. Pescuma ir kt. [111] po 24 val. fermentacijos nustatė, kad išrūgų baltymai fermentuoti *L. acidophilus* bakterijomis pasižymėjo ~ 2 kartus didesniu proteaziniu aktyvumu lyginant su pradiniu.

Po 32 val. fermentacijos didžiausias proteazių aktyvumas buvo nustatytas išrūgų baltymų produktuose su *Bif. bifidum* DSM 20082 bakterijomis (11 AV/ml). Tiriamajame mėginyje su *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis aktyvumas išliko toks pat (8 AV/ml). Mėginyje su *L. plantarum*

DSM 20174 bakterijų aktyvumas padidėjo 4 kartus lyginant su pradiniu aktyvumu. Bakterijų mišinio proteazių aktyvumas fermentacijos eigoje eksponentiškai didėjo.

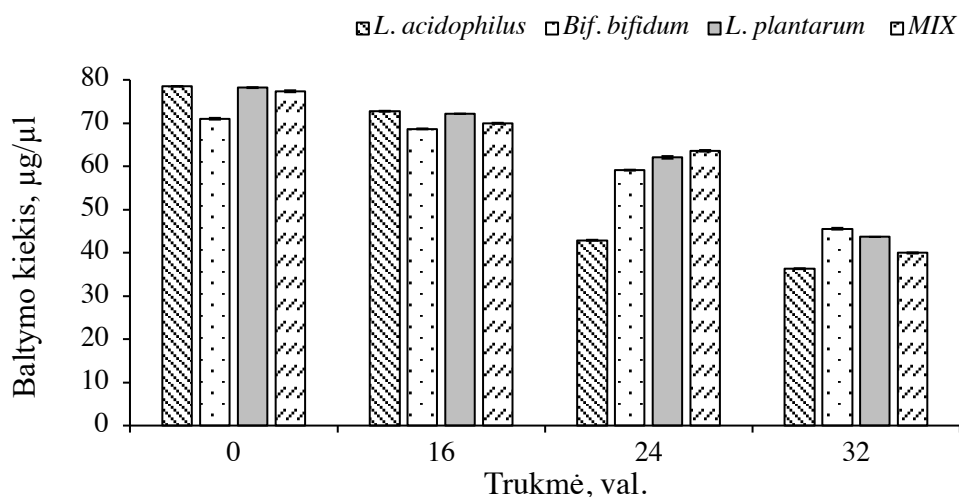
3.3.3. Pieno rūgšties bakterijų įtaka baltymų kiekiui išrūgų terpėje fermentacijos metu

Fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis metu išrūgų baltymai yra skaidomi į aminorūgštis, peptidus, todėl jų kiekis išrūgose mažėja. Skudra ir kt. [115] pranešė, kad išrūgų baltymų fermentacija padidina laisvųjų aminorūgščių ir vitaminų koncentraciją išrūgose. Fermentuojant išrūgas *L. acidophilus* ir *L. bulgaricus* bakterijomis laisvųjų aminorūgščių kiekis padidėjo atitinkamai 3,3 ir 2,8 karto lyginant su nefermentuotomis išrūgomis [115]. Tyrimo metu buvo nustatomas baltymo kiekis išrūgų fermentacijos su įvairiomis PRB metu (žr. 3.8 pav.). Pradiniame fermentacijos etape baltymų kiekis išrūgų terpėje buvo nuo 71 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ iki 78,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Po 16 val. išrūgų terpėje su PRB mišiniu ir *L. plantarum* DSM 20174, baltymų kiekis sumažėjo atitinkamai 10 ir 7 %. Mažiausias baltymų kiekis nustatytas terpėje su *Bif. bifidum* DSM 20082 bakterijomis (68,65 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Terpėje su *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis baltymų kiekis sumažėjo 7 %.

Po 24 val. fermentacijos didžiausi baltymų kiekiai buvo terpėje su bakterijų mišiniu ir *L. plantarum* DSM 20174 atitinkamai 63,58 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ir 62,06 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Išrūgų terpėje su *L. acidophilus* DSM 20079 baltymų kiekis sumažėjo 55 %, o terpėje su *Bif. bifidum* DSM 20082 bakterijomis baltymų kiekis sumažėjo 17 % lyginant su pradiniu baltymų kiekiu.

Po 32 val. mažiausias baltymų kiekis išrūgų terpėje lyginant su kitomis PRB buvo išrūgose su *L. acidophilus* DSM 20079 (36,30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Išrūgų baltymų mėginiuose su PRB mišiniu, *L. plantarum* DSM 20174 ir *Bif. bifidum* DSM 20082 bakterijomis baltymų kiekis sumažėjo atitinkamai 48, 44 ir 36 % lyginant su pradiniu baltymų kiekiu. Pescuma ir kt. [116] atliko saldžių išrūgų fermentaciją (37 °C, 42 °C, 24 val.) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 bei *L. acidophilus* CRL 636 bakterijomis ir nustatė, kad šios PRB skaido išrūgų baltymus, tačiau skirtingai. Pagrindiniai išrūgų baltymai, tokie kaip α -laktoalbuminas ir β -laktoglobulinas tiek 37 °C, tiek ir 42 °C buvo geriau suskaidyti *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 bakterijos nei *L. acidophilus* CRL 636. Atliekant išrūgų fermentaciją pienarūgštėmis bakterijomis sumažėja laktozės kiekis išrūgose, nes yra gaminama pieno rūgštis bei kiti metabolitai, tokie kaip aromatiniai junginiai.

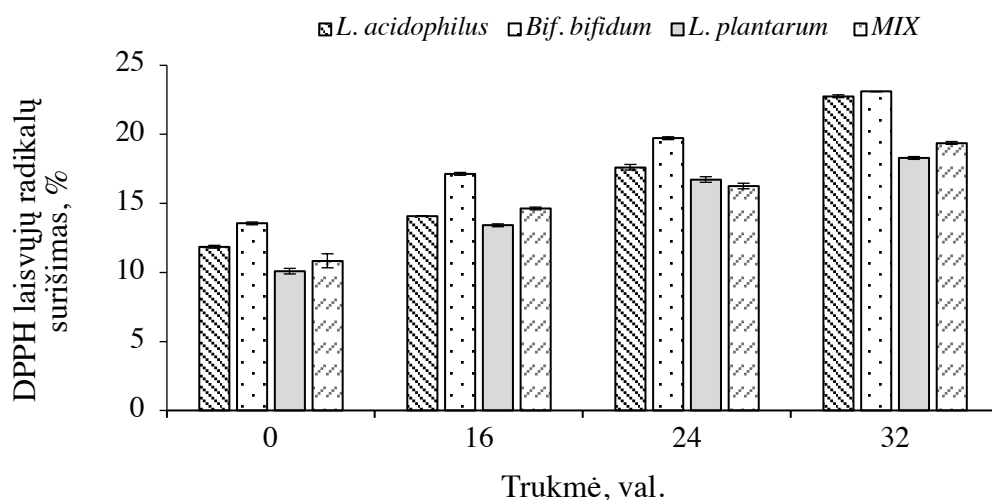


3.8 pav. PRB įtaka baltymų kiekiui išrūgų baltymų terpėje fermentacijos metu

3.3.4 Fermentacijos su įvairiomis pieno rūgšties bakterijomis įtaka išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui

Fermentacijos su įvairiomis pieno rūgšties bakterijomis įtaka išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui vertinant DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu pateikta 3.9 paveiksle. Tyrimo rezultatai parodė, kad fermentacijos metu išrūgų baltymų produktų antioksidacinis aktyvumas padidėjo.

Antioksidacinis aktyvumas išrūgų baltymų produktų, fermentuotų su *Bif. bifidum* DSM 20082 bakterijomis po 16 val., 24 val. ir 32 val. fermentacijos padidėjo atitinkamai 26, 46 ir 70 %. Antioksidacinis aktyvumas išrūgų baltymų produktų, fermentuotų su *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis po 16 val., 24 val. ir 32 val. fermentacijos padidėjo atitinkamai 19, 49 ir 92 %.



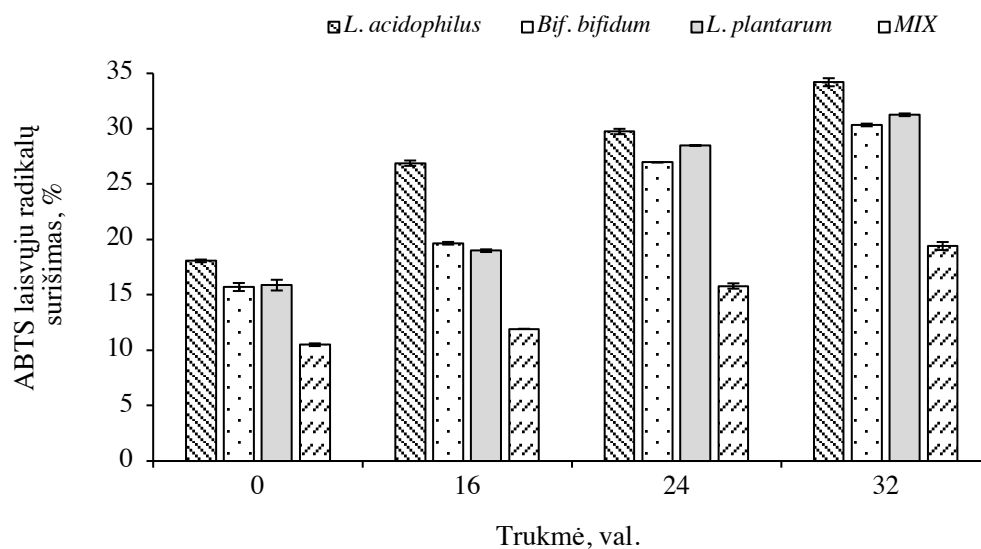
3.9 pav. Išrūgų baltymų produktų, gautų po 16, 24 ir 32 val. fermentacijos su įvairiomis PRB, antioksidacinis aktyvumas vertinant DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu

Išrūgų baltymų produktų, fermentuotų su *L. plantarum* DSM 20174 bakterijomis antioksidacinis aktyvumas po 16 val., 24 val. ir 32 val. fermentacijos padidėjo atitinkamai 33, 66 ir 81 %, o su probiotinių bakterijų mišiniu padidėjo atitinkamai 35, 50 ir 79 % lyginant su pradiniu aktyvumu (0 val.). Embiriekah'as ir kt. [117] nustatė, kad *L. acidophilus* padidino visų tiriamų sojos baltymų mėginių antioksidacinį aktyvumą per 24 valandas fermentacijos. Maksimalus antioksidacinis aktyvumas (64,9 %) buvo pasiektas atlikus sojos baltymų izoliato 24 valandų fermentaciją naudojant *L. acidophilus*. Gauti rezultatai rodo, kad ši padermė pagamino didelį kiekį antioksidacinių junginių, galimai dėl didesnio sojos baltymų proteazinio aktyvumo [117]. Amiri ir kt. [118] nustatė, kad sūrio išrūgos yra puiki terpė PRB ir po 24 val. fermentacijos *L. acidophilus* LA5 ir *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 bakterijomis, fermentuoti išrūgų baltymai pasižymėjo dideliu antioksidaciniu aktyvumu.

Fermentacijos su įvairiomis pieno rūgšties bakterijomis įtaka išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui vertinant ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu pateikta 3.10 paveiksle. Atlikus tyrimą rezultatai parodė, kad fermentacijos metu išrūgų baltymų produktų antioksidacinis aktyvumas didėjo.

Antioksidacinis aktyvumas išrūgų baltymų produktų, fermentuotų su *Bif. bifidum* DSM 20082 bakterijomis po 16 val., 24 val. ir 32 val. fermentacijos padidėjo atitinkamai 25, 72 ir 93 % lyginant su antioksidaciniu aktyvumu pradiniam taške (0 val.). Antioksidacinis aktyvumas išrūgų baltymų

produktų, fermentuotų su *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis po 16 val., 24 val. ir 32 val. fermentacijos padidėjo atitinkamai 49, 65 ir 89 % lyginant su pradiniu antioksidaciniu aktyvumu (0 val.). Virtanen'as ir kt. [119] atlikę tyrimus su *L. acidophilus* nustatė, kad antioksidacinis aktyvumas didėjo iki atliekant fermentaciją 20 valandų, vėliau pradėjo mažėti.



3.10 pav. Išrūgų baltymų produktų, gautų po 16, 24 ir 32 val. fermentacijos su įvairiomis PRB, antioksidacinis aktyvumas vertinant ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu

Išrūgų baltymų produktų fermentuotų su *L. plantarum* DSM 20174 bakterijomis antioksidacinis aktyvumas po 16 val., 24 val. ir 32 val. fermentacijos padidėjo atitinkamai 20, 79 ir 97 %, o su probiotinių bakterijų mišiniu padidėjo atitinkamai 13, 50 ir 85 %. Xiao ir kt. [107] atlikę sojų išrūgų fermentaciją *L. plantarum* bakterijomis pranešė, kad žymiai padidėjo ABTS laisvųjų radikalų surišimo geba. Mokslininkai nustatė, kad padidėjęs ABTS laisvųjų radikalų surišimas atsirado dėl padidėjusio aglikono (sojose aptinkamas izoflavonas) ir bendro fenolinių junginių kiekio, kurie yra veiksmingesni nutraukiant laisvųjų radikalų reakcijas [107]. Luz'as ir kt. [120] atliko išrūgų fermentaciją (37 °C, 24, 48 ir 72 val.) naudojant tris skirtingas *L. plantarum* padermes: CECT 220, 221 ir 748. Vertinant antioksidacinį aktyvumą ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu nustatyta, kad išrūgų, 72 val. fermentuotų *L. plantarum* CECT 220 bakterijomis, antioksidacinis aktyvumas padidėjo 27 % lyginant su kontroliniu mėginiu. Išrūgų, 72 val. fermentuotų *L. plantarum* CECT 221, antioksidacinis aktyvumas padidėjo 15 % lyginant su kontroliniu mėginiu. Išrūgų, fermentuotų *L. plantarum* CECT 748, antioksidacinis aktyvumas buvo didžiausias po 24 val. fermentacijos ir padidėjo 46 % lyginant su kontroliniu mėginiu. Mokslininkai daro prielaidą, kad *L. plantarum* padermės fermentacijos terpėse išskiria skirtingas endopeptidazes ir įvairių endopeptidazių veikla terpėje, kurioje yra baltymų, gali sukelti skirtingų antioksidantų junginių susidarymą [120].

3.3.5 Fermentacijos su įvairiomis pieno rūgšties bakterijomis įtaka išrūgų baltymų produktų antimikrobiniam aktyvumui

Literatūros duomenimis įvairios PRB padermės geba slopinti patogeninių mikroorganizmų augimą bei pasižymi antimikrobinio poveikio. Išrūgų baltymų fermentacijos metu PRB gamina ir į terpę išskiria organines rūgštis (acto, pieno, skruzdžių, sviesto ir propiono rūgštis), bakteriocinus (nizinas, pediocinas, laktinas ir kt.), vandenilio peroksida, pasižymintį antimikrobinio poveikiu kai kuriems

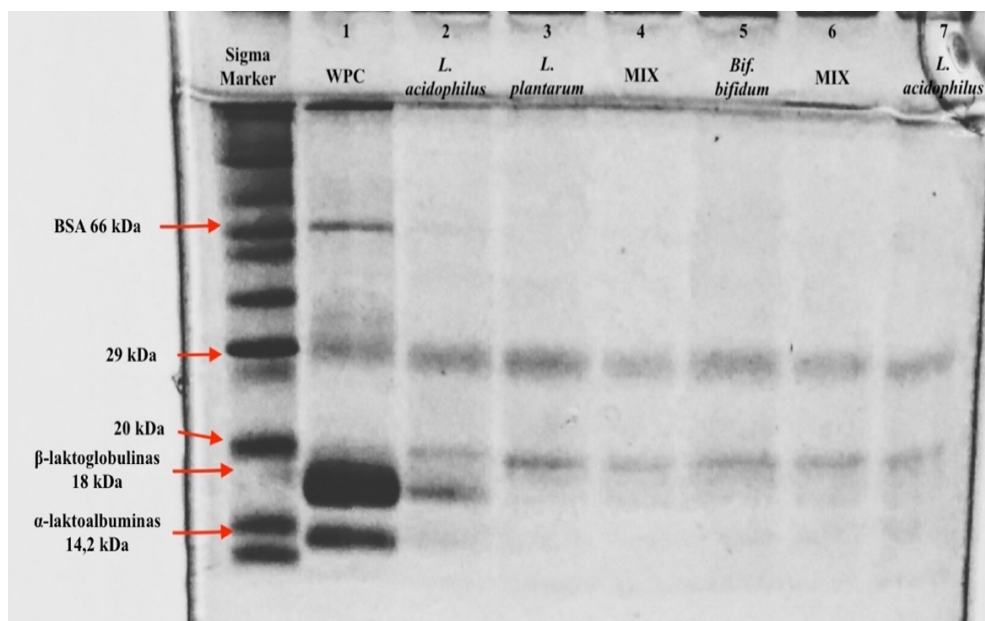
patogeniniams mikroorganizmams [121]. Fermentacijos PRB įtaka išrūgų baltymų produktų antimikrobiniam aktyvumui pateikta 3.2 lentelėje. Pradiniame taške (0 val.) išrūgų baltymų mėginiai su PRB pasižymėjo patogeninių bakterijų augimo slopinimu, galimai dėl kartu su PRB patekusių metabolizmo produktų, kurie jau pasižymėjo antimikrobinio poveikiu. Fermentuoti išrūgų baltymų mėginiai slopino įvairias patogenines bakterijas ir jų slopinimas didėjo ilgėjant fermentacijos trukmei. Visi tirti fermentuoti PRB mėginiai buvo antimikrobiškai aktyvūs slopinant *St. aureus* ir *B. cereus* patogeninių bakterijų augimą. Didžiausias išrūgų baltymų fermentacijos su *Bif. bifidum* DSM 20082 produktų antimikrobinis poveikis pasireiškė *St. aureus* patogeninėms bakterijoms (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje buvo iki $26\pm 1,4$ mm) ir mėginių su *L. acidophilus* DSM 20079 – *E. coli* bakterijoms (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje buvo iki $23\pm 0,7$ mm). Madureira ir kt. [122] ištyrę sūrio išrūgų matricų, fermentuotų *Bif. animalis* LAFTI B94 bakterijomis antimikrobinį aktyvumą nustatė, kad *Bifidobacterium* gamina acto, pieno ir skruzdžių rūgštis, kurios slopina gramneigiamas bakterijas (*E. coli*, *S. enteridis* ir kt.). Šiame tyrime taip pat pastebėtas ir *Bif. Animalis* LAFTI B94 gramteigiamų bakterijų *St. aureus* augimo slopinimas. Mažiausiu antimikrobinio poveikiu PRB pasižymėjo slopinant *S. typhimurium* (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje kito priklausomai nuo fermentacijos trukmės bei PRB padermės kito nuo $12\pm 0,7$ iki $18\pm 1,4$ mm).

3.2 lentelė. Išrūgų baltymų produktų, gautų po 16, 24 ir 32 val. fermentacijos su įvairiomis PRB, antimikrobinis poveikis patogeninėms bakterijoms, mm (šulinėlio skersmuo 8 mm)

PRB	Indikatorinis mikroorganizmas			
	<i>St. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E.coli</i>
po 0 val.				
<i>Bif. bifidum</i> DSM 20082	22±0,7	20±0	14±1,4	–
MIX	–	17±1,4	12±0,7	12±1,4
<i>L. acidophilus</i> DSM 20079	15±0,7	17±0	–	21±1,4
<i>L. plantarum</i> DSM 20174	16±0,7	14±0	15±2,1	18±0
po 16 val.				
<i>Bif. bifidum</i> DSM 20082	25±0,7	20±0	15±0	14±0
MIX	16±0	18±0,7	14±0,7	14±0
<i>L. acidophilus</i> DSM 20079	18±0,7	20±0,7	16±1,4	22±0,7
<i>L. plantarum</i> DSM 20174	17±0,7	17±1,4	15±0	20±0,7
po 24 val.				
<i>Bif. bifidum</i> DSM 20082	25±0	21±1,4	16±0,7	16±0
MIX	19±0,7	19±2,1	–	15±0
<i>L. acidophilus</i> DSM 20079	20±0,7	21±0,7	18±1,4	23±0,7
<i>L. plantarum</i> DSM 20174	19±1,4	18±1,4	–	20±0
po 32 val.				
<i>Bif. bifidum</i> DSM 20082	26±1,4	20±0,7	–	16±0,7
MIX	20±0	19±0,7	16±0	16±0
<i>L. acidophilus</i> DSM 20079	19±0,7	20±0	20±0	–
<i>L. plantarum</i> DSM 20174	20±1,4	19±0,7	19±0,7	21±1,4

3.3.6. Fermentacijos su įvairiomis pieno rūgšties bakterijomis įtaka išrūgų baltymų pokyčiams

Fermentacijos įvairiomis PRB įtaka išrūgų baltymų pokyčiams buvo įvertinta atliekant vertikaliąją vienkryptę natrio dodecilsulfato elektroforezę (žr. 3.11 pav.). Tiriamųjų mėginių baltymams identifikuoti buvo naudojamas standartinis baltymų tirpalas *SigmaMarker* S8445 (Merck, Vokietija). Nefermentuotos WPC buvo kontrolinis mėginys, pagal kurį buvo įvertinti pokyčiai. Nustatyta, kad visos tirtos PRB padermės suardė BSA (66 kDa) ir α -laktoalbuminą (14,2 kDa). Pescuma ir kt. [123] tyrimo rezultatai rodo, kad *L. acidophilus* visiškai suskaidė α -laktoalbuminą. Tačiau *L. acidophilus* DSM 20079 (2 takelis) nevisiškai suskaidė β -laktoglobuliną (~18 kDa). Fermentacijos metu PRB nepilnai suhidrolizavo baltymus, kurių molekulinė masė yra 29 kDa ir 20 kDa – gelyje matomi neryškūs baltymų pėdsakai.



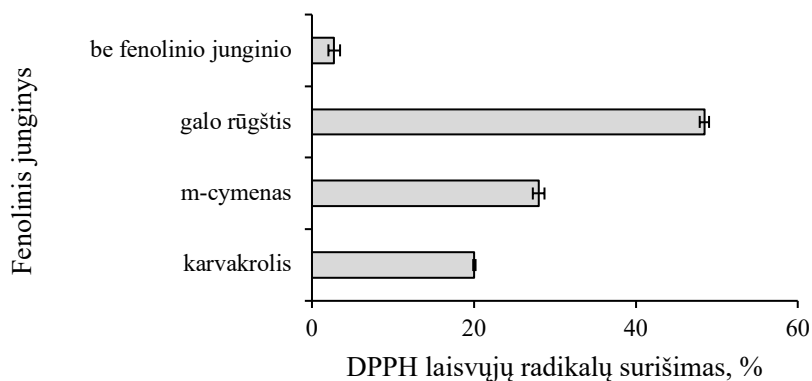
3.11 pav. Išrūgų baltymų (po 32 val. fermentacijos), apdorotų *L. acidophilus* DSM 20079, *L. plantarum* DSM 20174, *Bif. bifidum* DSM 20082 bei visų šių bakterijų mišiniu (santykis 1:1:1), vienkryptė natrio dodecilsulfato elektroforezė. Tiriamųjų mėginių, esančių 2, 3, 4 ir 5 takeliuose koncentracija dvigubai didesnė nei mėginių, esančių 6 ir 7 takeliuose.

3.4 Išrūgų baltymų modifikavimo fenoliniais junginiais galimybės

3.4.1 Modifikavimo fenoliniais junginiais įtaka išrūgų baltymų produktų antioksidaciniam aktyvumui

Išrūgų baltymų modifikacijos karvakroliu, m-cymenu bei galo rūgštimi įtaka antioksidaciniam aktyvumui vertinant DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu pateikta 3.12 paveiksle. Didžiausiu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo baltymų mėginys, modifikuotas galo rūgštimi (48,47 %). Konjugatai su m-cymenu ir karvakroliu pasižymėjo mažesniu antioksidaciniu aktyvumu, atitinkamai 28,00 ir 20,06 %. Išrūgų baltymai nepaveikti jokių fenolinių junginių neutralizavo labai mažą procentą (2,75 %) DPPH radikalo. Literatūros duomenimis antioksidacinis baltymų aktyvumas gali būti padidintas konjuguojant su fenolio junginiais [84]. Fenolio-baltymų konjugatų antioksidacinis aktyvumas yra susijęs su naudojamu modifikavimo metodu. Ali ir kt. [124] nustatė, kad 5-kofeilchininės rūgšties ir pieno išrūgų baltymų konjugatas, gautas katalizuojant polifenolio oksidazę (PPO) pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu, lyginant su konjugatu, gautu

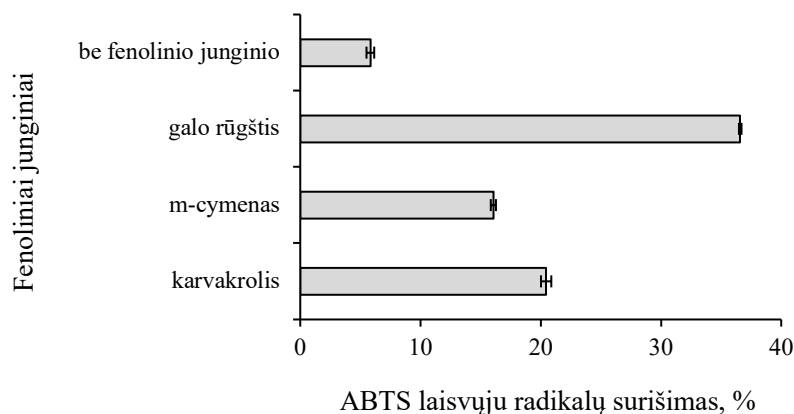
šarminėmis sąlygomis. Šie mokslininkai taip pat nustatė, kad rozmarino rūgšties konjugato antioksidacinis aktyvumas su išrūgų baltymų izoliatais šarminėmis sąlygomis yra didesnis nei modifikuoto konjugato atliekant PPO katalizę. Be to, konjugatas, gautas šarminėmis sąlygomis, pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu, lyginant su PPO katalizės metodu. Taip pat fenolio-baltymo konjugatų antioksidacinis aktyvumas taip pat susijęs su fenolio junginio tipu [70].



3.12 pav. Modifikavimo fenoliniais junginiais įtaka išrūgų baltymų antioksidaciniam aktyvumui vertinant DPPH laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu

Ali ir kt. [84] nustatė, kad nmodifikuoti išrūgų baltymai pasižymi mažu antioksidaciniu aktyvumu lyginant su išrūgų baltymų, modifikuotų chlorogenine ir rozmarino rūgštimis, konjugatais, kurie pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu, atitinkamai 4 ir 6,8 karto [84]. Šie duomenys rodo, kad kovalentinis chlorogeninės ir rozmarino rūgšties prisijungimas prie išrūgų baltymų galėtų pagerinti produktų stabilumą, pašalindamas laisvus radikalus ir nutraukdamas radikalų grandininę reakciją. Todėl išrūgų baltymų, modifikuotų chlorogenine ir rozmarino rūgštimis, konjugatai gali būti naudojami maistui kaip veiksmingi antioksidantai. Aewsiri ir kt. [125] modifikavę želatiną feruline, kofeino ir tanino rūgštimi, nustatė, kad antioksidacinis aktyvumas padidėjo, atitinkamai iki 292,57, 420,69 ir 491,68 l mol TE/mg baltymų. Kontrolinio želatinos mėginio (be fenolinių junginių) DPPH laisvųjų radikalų surišimo geba buvo 249,87 mmol TE/mg baltymų.

Išrūgų baltymų modifikacijos karvakroliu, m-cymenu bei galo rūgštimi įtaka antioksidaciniam aktyvumui vertinant ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu pateikta 3.13 paveiksle. Didžiausiu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo mėginys su galo rūgštimi (36,59 %). Konjugatai su m-cymenu ir karvakroliu pasižymėjo mažesniu antioksidaciniu aktyvumu, atitinkamai 16,06 ir 20,45.



3.13 pav. Modifikavimo fenoliniais junginiais įtaka išrūgų baltymų antioksidaciniam aktyvumui vertinant ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu

Išrūgų baltymai, nepaveikti jokių fenolinių junginių, neutralizavo labai mažą procentą (5,83 %) ABTS^{•+} radikalo. Cao ir kt. [126] atlikę antioksidacinio aktyvumo nustatymą ABTS laisvųjų radikalų surišimo gebos metodu nustatė, kad galo rūgštimi ir epigalokatechino galatu (EGCG) modifikuoti išrūgų baltymai pasižymėjo 4–5 kartus didesniu antioksidaciniu aktyvumu, lyginant su nemodifikuotais išrūgų baltymais. Aewsiri ir kt. [125] nustatė, kad želatina, modifikuota oksiduota tanino ir kofeino rūgštimis, pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu didėjant fenolinių junginių koncentracijai. Šis rezultatas leido manyti, kad tanino ir kofeino rūgštys, sujungtos su želatina, gali sudaryti stabilesnį produktą ir nutraukti radikalų grandininę reakciją.

3.4.2 Modifikavimo fenoliniais junginiais įtaka išrūgų baltymų antimikrobiniam aktyvumui

Modifikacijos fenolių junginiais įtaka išrūgų baltymų antimikrobiniam aktyvumui pateikta 3.3 lentelėje. Nors išrūgų baltymuose esantys junginiai, tokie kaip α -laktalbuminas, β -laktoglobulinas, laktoferinas, jaučio serumo albuminas ir laktoperoksidazė, pasižymi antimikrobinium poveikiu ir slopina patogeninių bakterijų augimą [127], bet išrūgų baltymų antimikrobinės savybės pagerėjo modifikavus juos fenolių junginiais. Didžiausias antimikrobinis aktyvumas slopinant *St. aureus* patogenines bakterijas buvo nustatytas išrūgų baltymų ir galo rūgšties konjugatuose (25±0,7 mm). Nemažas antimikrobinis poveikis slopinant šias bakterijas pastebėtas ir m-cymeno bei karvakrolio konjugatuose, atitinkamai 23±0,7 ir 22±1,4 mm. Literatūros duomenimis žaliosios arbatos užpilai visiškai slopino *St. aureus* mikroorganizmų augimą [82]. Slopinant *B. cereus* patogenines bakterijas didžiausiu antimikrobinium aktyvumu pasižymėjo konjugatai su m-cymenu. Pakankamai mažas antimikrobinis aktyvumas nustatytas slopinant *S. typhimurium* ir *E.coli*. Konjugatai su karvakroliu visiškai nepasižymėjo antimikrobinium poveikiu slopinant *S. typhimurium*. Staszewski ir kt. [82] atlikę tyrimą nustatė, kad *S. typhimurium* atveju mažiau koncentruoti žaliosios arbatos mėginiai nesukėlė jokio slopinančio poveikio. Priešingai, *E. coli* šiek tiek slopino tik kai kurie tirti žaliosios arbatos užpilai. Chou ir kt. [128] taip pat pastebėjo nedidelį *E. coli* slopinimą naudojant žaliąją arbatą, o Wu ir kt. [129] nenustatė jokio antimikrobinio poveikio *E. coli* bakterijoms. Tiriamasis mėginys, nepaveiktas fenolių junginiais, nepasižymėjo dideliu antimikrobinium aktyvumu, o *E. coli* patogeninės bakterijos visiškai neslopino. Ali ir kt. [84] nustatė, kad nemodifikuoti išrūgų baltymai ir šarminėmis sąlygomis (0.8 mM rozmarino rūgštis, pH 9) rozmarino rūgštimi modifikuoti išrūgų baltymai nepasižymėjo dideliu antimikrobinium poveikiu slopinant *St. aureus* ir *E. coli* patogenines bakterijas. Priešingai, modifikuojuant išrūgų baltymus fermentiniu būdu (0.8 mM rozmarino rūgštis, pH 6,5, tirozinazė) buvo užfiksuotas visiškas patogeninių bakterijų *St. aureus* augimo slopinimas.

3.3 lentelė. Antimikrobinis išrūgų baltymų ir fenolinių junginių konjugatų poveikis prieš patogenines bakterijas, mm (šulinėlio skersmuo 8 mm)

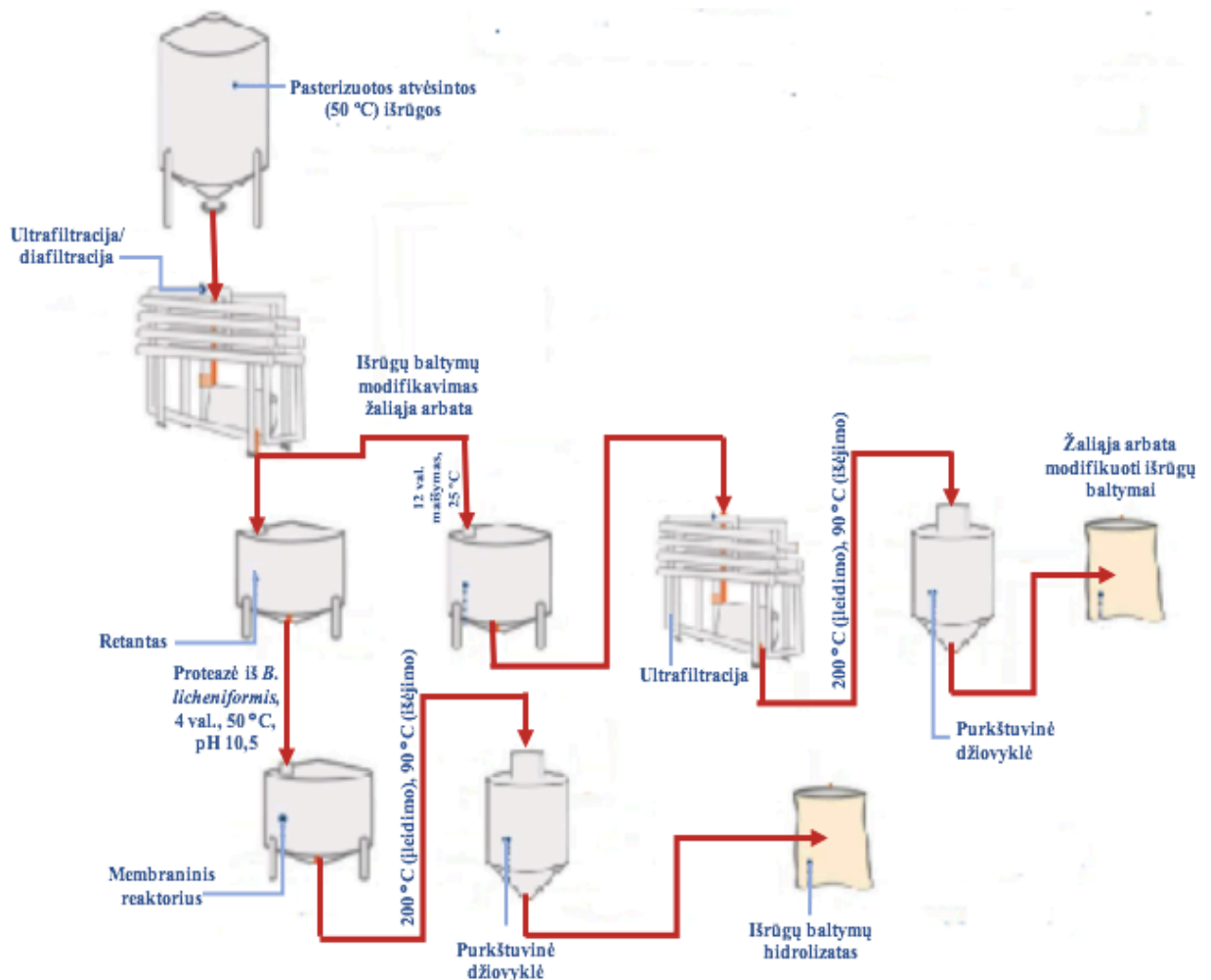
Išrūgų baltymai, modifikuoti šiais fenoliniais junginiais	Indikatorinis mikroorganizmas			
	<i>St. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E.coli</i>
galo rūgštis	25±0,7	19±1,4	12±0,7	14±1,4
m-cymenas	23±0,7	21±0	13±0	15±0
karvakrolis	22±1,4	20±1,4	–	15±1,4
be fenolinio junginio	17±0	11±0	15±0,7	–

4. Rekomendacijų dalis

Išrūgų baltymų hidrolizatai pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu ir didesniu antimikrobiniu poveikiu slopinant patogenines bakterijas nei nehidrolizuoti išrūgų baltymai. Dėl šių priežasčių rekomenduojama hidrolizuoti išrūgų baltymus atliekant fermentinę hidrolizę arba modifikuoti baltymus vykdant fermentaciją su pieno rūgšties bakterijomis ar fenoliniais junginiais.

Didžiausias hidrolizės laipsnis (29,53 %) nustatytas išrūgų baltymuose, veikiant proteaze iš *Bacillus licheniformis* 50 °C temperatūroje, 4 val., terpėje, kurios pH vertė yra 10,5. Išrūgų baltymų hidrolizatai pasižymėjo dideliu DPPH laisvųjų radikalų surišimu (62,77 %) [38].

Išrūgų baltymų hidrolizatų gamyba yra pateikta 4.1 paveiksle. Išrūgos yra gaunamos gaminant sūrį, jos pasterizuojamos, atvėsinaamos (50 °C) o vėliau – ultrafiltruojamos. Norint pasiekti didesnę baltymų koncentraciją išrūgos yra papildomai diafiltruojamos. Gautas retantas – išrūgų baltymų koncentratas (WPC), naudojamas hidrolizatų gamybai. Į reaktorių, kuriame yra WPC pridama šarminės proteazės iš *B. licheniformis* 2709 (2 g fermento/100 g baltymų, 200 U/g, WuXi, Kinija). Atliekama fermentinė hidrolizė 50 °C temperatūroje 4 valandas [130]. Atlikus hidrolizę išrūgų baltymų hidrolizatai yra džiovinami naudojant purkštuvinę džiovyklę (temperatūra mėginių įleidimo vietoje 200 °C, o išėjimo – 90 °C), o vėliau supakuojami į pasirinkto dydžio sandarias pakuotes.



4.1 pav. Išrūgų baltymų hidrolizatų ir modifikuotų išrūgų baltymų gamybos technologinė schema

Taip pat rekomenduojama modifikuoti išrūgų baltymus fenoliniais junginiais, pavyzdžiui, žaliaja arbata, pasižymintia stipriomis antioksidacinėmis savybėmis. Išrūgų baltymų koncentrato pH sureguliuojamas iki 9,0 naudojant 0,5 M NaOH. Žaliosios arbatos ekstraktas (5 mg/ml) įdedamas į reaktorių ir 12 val. vykdoma reakcija nuolat maišant 25 °C temperatūroje. Po reakcijos terpės pH sureguliuojamas iki 6,8, naudojant 0,5 M HCl. Norint pašalinti laisvuosius fenolinius junginius, atliekama ultrafiltracija 5 kDa membranomis [131]. Gautas retantas išdžiovinamas naudojant purkštuvinę džiovyklę (temperatūra mėginių įleidimo vietoje 200 °C, o išėjimo – 90 °C). Gauti modifikuoti išrūgų baltymų milteliai supakuojami į pasirinkto dydžio sandarias pakuotes.

Norint padidinti fermentų stabilumą bei juos naudoti pakartotinai, didesnę atsparumą konformacijos pokyčiams, kuriuos sukelia šiluma ar pH, rekomenduojama fermentą imobilizuoti.

Išvados

1. Komercinių PRB: *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082, *Lactobacillus plantarum* DSM 20174, *Lactobacillus plantarum* DSM 24624, *Lactobacillus brevis* DSM 20556 bei *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 proteazių aktyvumas buvo didesnis nei bakterijų, išskirtų iš duonos raugų. Didžiausiu proteaziniu aktyvumu pasižymėjo *Bif. bifidum* DSM 20082, *L. plantarum* DSM 20174 bei *L. acidophilus* DSM 20079 pieno rūgšties bakterijos, atitinkamai 0,183, 0,193 ir 0,236 AV/ml, dėl to jos pasirinktos tolesniems tyrimams.

2. Atlikus fermentinę išrūgų baltymų hidrolizę didžiausias hidrolizės efektyvumas, antimikrobinis ir antioksidacinis aktyvumas buvo nustatyti esant 40 °C temperatūrai, hidrolizei vykstant 40 min., terpės pH vertė 7,5 pankreatinui bei proteazei ir pH 3 – pepsinui. DPPH laisvųjų radikalų surišimo metodas parodė, kad žemesnė hidrolizės temperatūra slopino išrūgų baltymų hidrolizės produktų, paveiktų pepsinu, proteaze iš *B. amyloliquefaciens* ir pankreatinu, antioksidacinį aktyvumą, atitinkamai 70, 50 ir 64 %, hidrolizės trukmė – atitinkamai 11 %, 78 %, 56 %, o pH vertė – atitinkamai 84, 72 ir 66 %. Panašūs rezultatai gauti ir ABTS laisvųjų radikalų surišimo metodu.

Optimaliomis (40 min., 40 °C, pH 7,5 (pankreatinui bei proteazei) ir pH 3 (pepsinui)) sąlygomis hidrolizės produktai, gauti veikiant pepsinu ir pankreatinu geriausiai slopino *S. typhimurium* bei *St. aureus* patogeninių bakterijų augimą, slopinimo zona atitinkamai buvo 17±0,7, 16±0,7 (veikiant pepsinu) ir 18±0, 18±0,7 mm (veikiant pankreatinu). Išrūgų baltymų hidrolizės produktai veikiant proteazei pasižymėjo stipriu antimikrobinio poveikiu slopinant *E. coli* patogeninę bakteriją, didžiausia slopinimo zona buvo 18±0,7 mm.

3. Fermentuojant išrūgų baltymus PRB skaičius didėjo ir po fermentacijos, po 32 val., *L. acidophilus* DSM 20079, *L. plantarum* DSM 20174, *Bif. bifidum* DSM 20082 ir PRB bakterijų mišinio skaičius atitinkamai padidėjo iki 7,86, 7,41, 7,42 ir 7,47 log₁₀ KSV/ml.

Po 32 val. PRB fermentacijos, didžiausias proteazių aktyvumas buvo nustatytas išrūgų baltymų produktuose su *Bif. bifidum* DSM 20082 bakterijomis (11 AV/ml), o mažiausias – mėginiuose su *L. plantarum* DSM 20174 (4 AV/ml).

Atlikus 32 val. fermentaciją nustatyta, kad baltymų kiekis išrūgų baltymų mėginiuose su *L. acidophilus* DSM 20079, *L. plantarum* DSM 20174, *Bif. bifidum* DSM 20082 ir PRB bakterijų mišiniu sumažėjo atitinkamai 54, 44, 36 ir 49 % lyginant su pradiniu baltymų kiekiu.

Po fermentacijos (32 val.) išrūgų baltymų mėginių antioksidacinis aktyvumas padidėjo lyginant su aktyvumu prieš fermentaciją. Fermentuotų išrūgų su *L. acidophilus* DSM 20079, *L. plantarum* DSM 20174, *Bif. bifidum* DSM 20082 ir PRB bakterijų mišiniu antioksidacinis aktyvumas, nustatytas DPPH laisvųjų radikalų surišimo metodu, padidėjo, atitinkamai 92, 81, 70 ir 79 % lyginant su pradiniu aktyvumu (prieš fermentaciją). Fermentuotų išrūgų su *L. acidophilus* DSM 20079, *L. plantarum* DSM 20174, *Bif. bifidum* DSM 20082 ir PRB bakterijų mišiniu antioksidacinis aktyvumas, nustatytas ABTS laisvųjų radikalų surišimo metodu taip pat padidėjo 32 val. laikotarpyje, atitinkamai 89, 97, 93 ir 85 % lyginant su pradiniu aktyvumu (prieš fermentaciją).

Fermentuotų išrūgų baltymų antimikrobinis aktyvumas slopinant patogenines bakterijas didėjo ilgiau fermentuojant. Didžiausias išrūgų baltymų fermentacijos su *Bif. bifidum* DSM 20082 produktų antimikrobinis aktyvumas pasireiškė slopinant *St. aureus* bakterijas (slopinimo zonų skersmuo agaro

terpėje iki $26 \pm 1,4$ mm) ir išrūgų baltymų, fermentuotų *L. acidophilus* DSM 20079 bakterijomis, *E. coli* bakterijų augimo slopinimas (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje iki $23 \pm 0,7$ mm). Silpniausiai išrūgų baltymų produktai, susidarę po fermentacijos slopino *S. typhimurium* (slopinimo zonų skersmuo agarų terpėje kito nuo $12 \pm 0,7$ iki $18 \pm 1,4$ mm).

4. Atlikus vertikaliąją vienkryptę natrio dodecilsulfato elektroforezę nustatyta, kad visos tirtos PRB padermės suardė BSA (66 kDa) ir α -laktoalbuminą (14,2 kDa), bet nepilnai suhidrolizavo baltymus, kurių molekulinė masė 24 kDa ir 20 kDa. Tačiau *L. acidophilus* DSM 20079 nevisiškai suskaidė β -laktoglobuliną (~18 kDa).

Hidrolizuotų išrūgų baltymai ir nehidrolizuotų išrūgų baltymai pasižymėjo panašiu baltymų pėdsakų skaičiumi ir molekulinio svorio gelyje. Elektroforezės gelis parodė, kad hidrolizė pilnai neįvyko, dalis išrūgų baltymų, tokie kaip BSA (66 kDa), β -laktoglobulinas (18 kDa) ir α -laktalbuminas (14,2 kDa) fermentinės hidrolizės metu nebuvo suhidrolizuoti.

5. Išrūgų baltymų modifikavimas fenoliniais junginiais, tokiais kaip galo rūgštis, karvakrolis ir m-cymenas, padidino antioksidacinį vidutiniškai iki 12 kartų. Didžiausiu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo mėginys su galo rūgštimi (36,59 % vertinant ABTS laisvųjų radikalų surišimo metodu ir 48,47 % vertinant DPPH laisvųjų radikalų surišimo metodu). Fenoliniais junginiais modifikuoti išrūgų baltymai buvo antimikrobiškai aktyvesni prieš patogenines bakterijas nei nemonifikuoti išrūgų baltymai.

Literatūros sąrašas

1. WALZEM R. L., C. J. DILLARD, J. B. GERMAN. Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2002, 42(4), 353–375 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1080/10408690290825574](https://doi.org/10.1080/10408690290825574).
2. KRISSENS, G. W. Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their Clinical Implications. *Journal of American College of Nutrition*. 2007, 26(6), 713S–723S. [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1080/07315724.2007.10719652](https://doi.org/10.1080/07315724.2007.10719652).
3. RUDLOFF, S., C. KUNZ. Protein and Nonprotein Nitrogen Components in Human Milk, Bovine Milk, and Infant Formula: Quantitative and Qualitative Aspects in Infant Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 1997, 24(3), 328–344 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1097/00005176-199703000-00017](https://doi.org/10.1097/00005176-199703000-00017).
4. MARSHALL, K. Therapeutic application of whey protein. *Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic* [interaktyvus]. Thorne Research, 2004, vol. 9(2), 136–156 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per Altmedrev.
5. ALIMORADI, F., E. HOJAJI, H. JOOYANDEH et al. Whey Proteins: Health Benefits and Food Applications. *Journal of International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. International Knowledge Press, 2016, 9(2), [žiūrėta 2020-03-17]. ISSN 2395-4477. Prieiga per ResearchGate.
6. LAYMAN, D. K. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *The Journal of Nutrition*. 2003, 133(1), 261S–267S [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1093/jn/133.1.261S](https://doi.org/10.1093/jn/133.1.261S).
7. HE, Y., T. B. HAKVOORT, S. E. KOHLER et al. Glutamine synthetase in muscle is required for glutamine production during fasting and extrahepatic ammonia detoxification. *Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285(13), 9516–9524 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1074/jbc.M109.092429](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.092429).
8. LOLLO, P. C., J. AMAYA-FARFAN, L. B. de CARVALHO-SILVA. Physiological and physical effects of different milk protein supplements in elite soccer players. *Journal of Human Kinetics*. 2011, 30, 49–57 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.2478/v10078-011-0072-3](https://doi.org/10.2478/v10078-011-0072-3).
9. HERNANDEZ-LEDESMA, B., M. RAMOS, J. A. GOMEZ-RUIZ. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*. 2011, 101, 196–204 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1016/j.smallrumres.2011.09.040](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.040).
10. BRODY, E. P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*. 2000, 84(1), S39–S46 204 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1017/s0007114500002233](https://doi.org/10.1017/s0007114500002233).
11. ETZEL, M. R. Manufacture and use of dairy protein fractions. *The Journal of Nutrition*. 2004, 134(4), 996S–1002S [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1093/jn/134.4.996S](https://doi.org/10.1093/jn/134.4.996S).
12. BABELLA, G. The development and utilization of milk and whey protein concentrates in Hungary. *Developments in Food Science*. 1982, 9, 241–251.
13. FRID, A. H., M. NILSSON, J. J. HOLST, et al. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *Journal of American College of Nutrition*. 2005, 24(1), 69–75 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1093/ajcn.24.1.69](https://doi.org/10.1093/ajcn.24.1.69).
14. MORTENSEN L. S., J. HOLMER-JENSEN, M.L. HARTVINGSEN et al. Effects of different fractions of whey protein on postprandial lipid and hormone responses in type 2 diabetes.

- European Journal of Clinical Nutrition*. 2012, 66(7), 799–805 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1038/ejcn.2012.48](https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.48).
15. PAL, S., V. ELLIS, S. DHALIWAL. Effects of whey protein isolate on body composition, lipids, insulin and glucose in overweight and obese individuals. *British Journal of Nutrition*. 2010, 104(5), 716–23 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1017/S0007114510000991](https://doi.org/10.1017/S0007114510000991).
 16. OSAMA, A. M. I. KISHTA, N. DAULETBAEV et al. Pressurized whey protein can limit bacterial burden and protein oxidation in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Nutrition*. 2013, 29(6), 918–924 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1016/j.nut.2012.11.009](https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.11.009).
 17. HAMAD, E. M., S. H. TAHA, A. G. ABOU DAWOOD, et al. Protective effect of whey proteins against nonalcoholic fatty liver in rats. *Lipids in Health and Disease*. 2011, 10, 57 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: [10.1186/1476-511X-10-57](https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-57).
 18. JIANG, Z., K. YAO, X. YUAN et al. Effects of ultrasound treatment on physico-chemical, functional properties and antioxidant activity of whey protein isolate in the presence of calcium lactate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017, 98(4), 1522–1529 [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per doi: [10.1002/jsfa.8623](https://doi.org/10.1002/jsfa.8623).
 19. JOOYANDEH, H., K. S. MINHAS, A. KAUR. Sensory quality and chemical composition of wheat breads supplemented with fermented whey protein concentrate and whey permeate. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. Springer Verlag, 2009, 46(2), 146–148 224 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per ResearchGate.
 20. JOOYANDEH, H., K. S. MINHAS. Effect of addition of fermented whey protein concentrate on cheese yield and fat and protein recoveries of Feta cheese. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. Springer Verlag, 2009, 46(3), 221–224 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per ResearchGate.
 21. WAGONER, T. B. & E. A. FOEGEDING. Whey protein–pectin soluble complexes for beverage applications. *Food Hydrocolloids*. 2017, 63, 130–138 [žiūrėta 2020-05-06]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodhyd.2016.08.027](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.027).
 22. JOOYANDEH, H. Whey protein films and coatings: A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2011, 10(3), 296–301 [žiūrėta 2020-03-24]. Prieiga per doi: [10.3923/pjn.2011.296.301](https://doi.org/10.3923/pjn.2011.296.301).
 23. LUCENA, M.E., S. ALVAREZ, C. MENENDEZ et al. Beta-Lactoglobulin removal from whey protein concentrates production of milk derivatives as a base for infant formulas. *Separation and Purification Technology*. 2006, 52(2), 310–316 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.1016/j.seppur.2006.05.006](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.05.006).
 24. ROJAS, E.E.G., J.S.R. COIMBRA, L.A. MINIM et al. Size-exclusion chromatography applied to the purification of whey proteins from the polymeric and saline phases of aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*. 2004, 39(11), 1751–1759 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.1016/j.procbio.2003.07.002](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.07.002).
 25. GUO, M. and G. WANG. Whey protein polymerisation and its applications in environmentally safe adhesives. *International Journal of Dairy Technology*. 2016, 69(4), 481–488 [žiūrėta 2020-05-15]. Prieiga per doi: [10.1111/1471-0307.12303](https://doi.org/10.1111/1471-0307.12303).
 26. SMITH, Karen. Dried Dairy Ingredients [interaktyvus]. Wisconsin Center for Dairy Research, 2008 [žiūrėta 2020-03-24]. Prieiga per: Center For Dairy Research.
 27. CORROCHANO, A. R., V. BUCKIN, P. M. KELLY, P and L. GIBLIN. Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. *Journal of Dairy Science*. 2018, 101(6), 4747–4761 [žiūrėta 2020-03-24]. Prieiga per doi: [10.3168/jds.2017-13618](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13618).

28. CHEISON, S. C. And U. KULOZIK. Impact of the environmental conditions and substrate pre-treatment on whey protein hydrolysis: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015, 57(2), 418–453 [žiūrēta 2020-04-17]. Prieiga per doi: [10.1080/10408398.2014.959115](https://doi.org/10.1080/10408398.2014.959115).
29. ADLER-NISSEN, J. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986 [žiūrēta 2020-01-29]. ISBN 0853343861. Prieiga per: ResearchGate.
30. SILVESTRE, M. P. C., H. A. MORAIS, V. D. M. SILVA and M. R. SILVA. Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. *Journal of Brazilian Society for Food and Nutrition*. 2013, 38(3), 278–290 [žiūrēta 2020-04-08]. Prieiga per doi: [10.4322/nutrire.2013.026](https://doi.org/10.4322/nutrire.2013.026).
31. GHOSH, B. C., L. N. PRASAD and N. P. SAHA. Enzymatic hydrolysis of whey and its analysis. *Journal of Food Science and Technology*. 2017, 54(6), 1476–1483 [žiūrēta 2020-05-06]. Prieiga per doi: [10.1007/s13197-017-2574-z](https://doi.org/10.1007/s13197-017-2574-z).
32. PENA-RAMOS, E. A. and Y. L. Xiong. Antioxidative Activity of Whey Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *Journal of Dairy Science*. 2001, 84(12), 2577–2583 [žiūrēta 2020-04-15]. Prieiga per doi: [10.3168/jds.s0022-0302\(01\)74711-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(01)74711-x).
33. ANDRIAMIHAJA, M. A. GUILLOT, A. SVENDSEN et al. Comparative efficiency of microbial enzyme preparations versus pancreatin for in vitro alimentary protein digestion. *Amino Acids*. 2013, 44, 563–572 [žiūrēta 2020-05-06]. Prieiga per doi: [10.1007/s00726-012-1373-0](https://doi.org/10.1007/s00726-012-1373-0).
34. KIM, S. B., K. S. KI, M. A. KHAN et al. (2007). Peptic and Tryptic Hydrolysis of Native and Heated Whey Protein to Reduce Its Antigenicity. *Journal of Dairy Science*. 2007, 90(9), 4043–4050 [žiūrēta 2020-04-27]. Prieiga per doi: [10.3168/jds.2007-0169](https://doi.org/10.3168/jds.2007-0169).
35. TONG, L. M. , S. SASAKI, D. J. MCCLEMENTS and E. A. DECKER. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48(5), 1473–1478 [žiūrēta 2020-04-15]. Prieiga per doi: [10.1021/jf991342v](https://doi.org/10.1021/jf991342v).
36. TONG, L. M. , S. SASAKI, D. J. MCCLEMENTS and E. A. DECKER. Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *Journal of Food Science* . 2000, 65, 1325–1329 [žiūrēta 2020-04-15]. Prieiga per doi: [10.1111/j.1365-2621.2000.tb10606.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10606.x).
37. PENA-RAMOS, E. A., Y. L. XIONG and G. E. ARTEAGA. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2004, 84(14), 1908–1918 [žiūrēta 2020-04-15]. Prieiga per doi: [10.1002/jsfa.1886](https://doi.org/10.1002/jsfa.1886).
38. DRYAKOVA, A., A. PIHLANTO, P. MARNILA et al. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *European Food Research and Technology*. 2010, 230, 865–874 [žiūrēta 2020-05-06]. Prieiga per doi: [10.1007/s00217-010-1231-9](https://doi.org/10.1007/s00217-010-1231-9).
39. MANN, B., A. KUMARI, R. KUMAR et. al. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*. 2015, 52(6), 3235–3241 [žiūrēta 2020-03-24]. Prieiga per doi: [10.1007/s13197-014-1361-3](https://doi.org/10.1007/s13197-014-1361-3).
40. PENG, X., B.KONG,X. XIA and Q. LIU. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. *International Dairy Journal*. 2010, 20(5), 360–365 [žiūrēta 2020-03-25]. Prieiga per doi: [10.1016/j.idairyj.2009.11.019](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.019).
41. ZHIDONG, L., C. BENHENG, L. XUEZHONG, D. ZHENMIN, et al. Optimisation of hydrolysis conditions for antioxidant hydrolysate production from whey protein isolates using response surface methodology. *Irish Journal of Agriculture and Food Research* [interaktyvus]. TEAGASC-Agriculture and Food Development Authority. 2013, 52, 53–65.

42. ADJONU, R., G. DORAN, P. TORLEY and S. AGBOOLA. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: influence of heat pretreatment and enzyme specificity. *Food Chemistry*. 2013, 136, 1435–1443 [žiūrēta 2020-03-25]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2012.09.053](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.053).
43. MOHAN, A., M. C. UDECHUKWU, S. R. C. K. RAJENDRAN et al. Modification of peptide functionality during enzymatic hydrolysis of whey proteins. *RSC Advances*. 2015, 5, 97400–97407 [žiūrēta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.1039/c5ra15140f](https://doi.org/10.1039/c5ra15140f).
44. ISKANDAR, M. M., L. C. LANDS, K. SABALLY et al. High hydrostatic pressure pretreatment of whey protein isolates improves their digestibility and antioxidant capacity. *Foods*. 2015, 4, 184–207 [žiūrēta 2020-03-25]. Prieiga per doi: [10.3390/foods4020184](https://doi.org/10.3390/foods4020184).
45. MOHAMMADIAN, M., A. MADADLOU. Characterization of fibrillated antioxidant whey protein hydrolysate and comparison with fibrillated protein solution. *Food Hydrocolloids*. 2016, 52, 221–230 [žiūrēta 2020-03-25]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodhyd.2015.06.022](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.022).
46. GAD, A. S., Y. A. KHADRAWY, A. A. EL-NEKEETY, S. R. MOHAMED et al. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and spirulina in rats. *Nutrition*. 2011, 27, 582–589 [žiūrēta 2020-03-25]. Prieiga per doi: [10.1016/j.nut.2010.04.002](https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.04.002).
47. LIN, S., W. TIAN, H. LI, J. CAO and W. JIANG. Improving antioxidant activities of whey protein hydrolysates obtained by thermal preheat treatment of pepsin, trypsin, alcalase and flavourzyme. *International Journal of Food Science and Technology*. 2012, 47(10), 2045–2051 [žiūrēta 2020-03-25]. Prieiga per doi: [10.1111/j.1365-2621.2012.03068.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03068.x).
48. ZHANG, Q. X., Y. F. LING, Z. SUN et al. Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells. *Biotechnology Letters*. 2012, 34, 2001–2006 [žiūrēta 2020-03-25]. Prieiga per doi: [10.1007/s10529-012-1017-1](https://doi.org/10.1007/s10529-012-1017-1).
49. POWER-GRANT, O., C. BRUEN, L. BRENNAN et al. In vitro bioactive properties of intact and enzymatically hydrolysed whey protein: Targeting the enteroinsular axis. *Food and Function*. 2015, 6, 972–980 [žiūrēta 2020-03-25]. Prieiga per doi: [10.1039/c4fo00983e](https://doi.org/10.1039/c4fo00983e).
50. TORKOVA, A., K. RYAZANTZEVA, E. AGARKOVA et al. Cheese whey catalytic conversion for obtaining a bioactive hydrolysate with reduced antigenicity. *Current Research in Nutrition and Food Science*. 2016, 4, 182–196 [žiūrēta 2020-03-25]. Prieiga per doi: [10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue-October.24](https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue-October.24).
51. ASHOUSH, I. S., O. I. EL-BATAWY and G. A. EL-SHOUBAGY. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of pomegranate peel and whey powders in rats. *Annals of Agricultural Sciences*. 2013, 58(1), 27–32 [žiūrēta 2020-03-25]. Prieiga per doi: [10.1016/j.aogas.2013.01.005](https://doi.org/10.1016/j.aogas.2013.01.005).
52. De CASTRO, R. J. S., H. H. SATO. Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014, 3(3), 58–65 [žiūrēta 2020-03-25]. Prieiga per doi: [10.1016/j.bcab.2013.11.012](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.11.012).
53. ORTEGA, L., A. ROMERO, C. MURO and F. RIERA. Antioxidant activity and functional properties of polymerized whey products by glycation process. *International Journal of Polymer Science*. 2015, 1–10 [žiūrēta 2020-03-25]. Prieiga per doi: [10.1155/2015/154262](https://doi.org/10.1155/2015/154262).
54. UNIACKE-LOWE, T., T. HUPPERTZ and P. F. FOX. Equine milk proteins: chemistry, structure and nutritional significance. *International Dairy Journal*. 2010, 20(9), 609–629 [žiūrēta 2020-04-16]. Prieiga per doi: [10.1016/j.idairyj.2010.02.007](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.007).

55. BALDI, A., I. POLITIS I, C. PECORINI et al. Biological effects of milk proteins and their peptides with emphasis on those related to the gastrointestinal eco system. *Journal of Dairy Research*. 2005, 72, 66–72 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: [10.1017/s002202990500110x](https://doi.org/10.1017/s002202990500110x).
56. BUSINCO, L., P. G. GIAMPIETRO and P. LUCENTI. Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000, 105(5), 1031–1034 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: [10.1067/mai.2000.106377](https://doi.org/10.1067/mai.2000.106377).
57. MURO-URISTA, C., R. ALVAREZ-FERNANDEZ, F. RIERA- RODRIGUEZ et al. Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science Technology International*. 2011, 17(4), 293–317 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: [10.1177/1082013211398801](https://doi.org/10.1177/1082013211398801).
58. SINHA, P.R., C. RAHDA, J. PRAKASH et al. Whey protein hydrolysate: functional properties nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*. 2007, 101(4), 1484–1491 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2006.04.021](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.021).
59. TOVAR-JIMENEZ, X. C. R. MURO-URISTA, A. TELLEZ-JURADO et al. Hydrolysate antimicrobial activity released from bovine whey protein concentrate by the aspartyl protease Eap1 pf *Sporisorium reilianum*. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica* [interaktyvus]. 2017, vol. 16(1), 11–18 [žiūrėta 2020-04-16]. ISSN 1665–2738. Prieiga per Redalyc.
60. LOPEZ-EXPOSITO, I., F. MINERVINI, L. AMIGO et al. Identification of antibacterial peptides from bovine-casein. *Journal of Food Protection*. 2006, 69(12), 2992–2997 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: [10.4315/0362-028x-69.12.2992](https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.12.2992).
61. HUANG, S.M., K. N. CHEN, Y. P. CHEN et al. Immunomodulatory properties of the milk whey products obtained by enzymatic and microbial hydrolysis. *International Journal of Food Science and Technology*. 2010, 45(5), 1061–1067 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: [10.1111/j.1365-2621.2010.02239.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02239.x).
62. SZWAJKOWSKA, M., A. WOLANCIUK, J. BARLOWSKA et al. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system-a review. *Animal Science Papers and Reports* [interaktyvus]. Poland: Institute of Genetics and Animal Breeding, 2011, vol. 29(4), 269–280 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per ResearchGate.
63. FIGUEROA-GONZALEZ, I., H. HERNANDEZ-SANCHEZ, G. RODRIGUEZ-SERRANO et al. Antimicrobial effect of Lactobacillus casei strain Shirota co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica* [interaktyvus]. 2010, 9(1), 11–16 [žiūrėta 2020-04-16]. ISSN 1665–2738. Prieiga per Redalyc.
64. MCCANN, K.B., B. J. SHIELL, W. P. MICHALSKI et al. Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide from bovine α s1-casein. *International Dairy Journal*. 2006, 16(4), 316–323 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: [10.1016/j.idairyj.2005.05.005](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.05.005).
65. ELBARBARY, H.A., A. M. ABDOU, Y. NAKAMURA et al. Identification of novel antibacterial peptides isolated from a commercially available casein hydrolysate by autofocusing technique. *Biofactors*. 2012, 38(4), 309–315 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: [10.1002/biof.1023](https://doi.org/10.1002/biof.1023).
66. BALASUNDRAM, N., K. SUNDRAM and S. SAMMAN. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*. 2006, 99(1), 191–203 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2005.07.042](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042).
67. LIU, J., X. WANG, H. YONG et al. Recent advances in flavonoid-grafted polysaccharides: Synthesis, structural characterization, bioactivities and potential applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 116, 1011–1025 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1016/j.ijbiomac.2018.05.149](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.149).

68. IGNAT, I., I. VOLF and VI POPA. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011, 126(4), 1821–1835 [žiūrēta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2010.12.026](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026).
69. LIU, J., R. BAI, Y. LIU et al. Isolation, structural characterization and bioactivities of naturally occurring polysaccharide-polyphenolic conjugates from medicinal plants – a review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 107, 2242–2250 [žiūrēta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1016/j.ijbiomac.2017.10.097](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.097).
70. LIU, J., H. YONG. X. YAO et al. Recent advances in phenolic-protein conjugates synthesis, characterization, biological activities and potential applications. *Royal Society of Chemistry Advances*. 2019, 9, 35825–35840 [žiūrēta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1039/c9ra07808h](https://doi.org/10.1039/c9ra07808h).
71. DAGYS, M., A. LAURYNĖNAS, D. RATAUTAS et al. Oxygen Electroreduction Catalysed by Laccase Wired to Gold Nanoparticles via the Trinuclear Copper Cluster. *Energy and Environmental Science*. 2016, 10(2), 498–502 [žiūrēta 2020-05-14]. Prieiga per doi: [10.1039/c6ee02232d](https://doi.org/10.1039/c6ee02232d).
72. RAWEL, H. M., J. KROLL & U. C. HOHL. Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. *Food/Nahrung*. 2001, 45(2), 72–81 [žiūrēta 2020-05-06]. Prieiga per doi: [10.1002/1521-3803\(20010401\)45:2<72::aid-food72>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20010401)45:2<72::aid-food72>3.0.co;2-u).
73. BANDYOPADHYAY, P., A. K. GHOSH and C. GHOSH. Recent developments on polyphenol-protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. *Journal of Food and Function*. 2012, 3(6), 592–605 [žiūrēta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1039/c2fo00006g](https://doi.org/10.1039/c2fo00006g).
74. SPIZZIRRI, U. G., F. IEMMA, F. PUOCI et al. Synthesis of antioxidant polymers by grafting of gallic acid and catechin on gelatin. *Biomacromolecules*. 2009, 10(7), 1923–1930 [žiūrēta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1021/bm900325t](https://doi.org/10.1021/bm900325t).
75. KIM, S., A. CAVACO-PAULO. Laccase-catalysed protein-flavanoid conjugates for flax fibre modification. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 93(2), 585–600 [žiūrēta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1007/s00253-011-3524-8](https://doi.org/10.1007/s00253-011-3524-8).
76. WEI, Z., W. YANG, R. FAN et al. Evaluation of structural and functional properties of protein-EGCG complexes and their ability of stabilizing a model β -carotene emulsion. *Food Hydrocolloids*. 2015, 45, 337–350 [žiūrēta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodhyd.2014.12.008](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.008).
77. LIU, F., C. MA, D. J. MACCLEMENTS et al. A comparative study of covalent and non-covalent interactions between zein and polyphenols in ethanol-water solution. *Food Hydrocolloids*. 2017, 63, 625–634 [žiūrēta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodhyd.2016.09.041](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.041).
78. JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*. 2015, 175, 556–567 [žiūrēta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2014.12.013](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013).
79. OZDAL, T.; E. CAPANOGLU and F. ALTAY. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*. 2013, 51(2), 954–970 [žiūrēta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodres.2013.02.009](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009).
80. RAWEL, H. M., D. CZAJKA, S. ROHN et al. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2002, 30(3-4), 137–150 [žiūrēta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1016/S0141-8130\(02\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00016-8).
81. RAWEL, H. M. and S. ROHN. Nature of hydroxycinnamate-protein interactions. *Phytochemistry Reviews*. 2009, 9, 93–109 [žiūrēta 2020-04-20]. Prieiga per doi: [10.1007/s11101-009-9154-4](https://doi.org/10.1007/s11101-009-9154-4).

82. VON STASZEWSKI, M., A. M. R. PILOSOFF and R. J. JAGUS. Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry*. 2011, 125, 186–192 [žiūrėta 2020-05-06]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2010.08.059](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.059).
83. CUPP-ENYARD, C. Sigma's Non-Specific Protease Activity Assay-Casein as a Substrate. *J Vis Exp*. 2008, 17(19), 899 [žiūrėta 2020-02-26]. Prieiga per doi: [10.3791/899](https://doi.org/10.3791/899).
84. ALI, M. and M.M. ELSHARKAWY. Characterization of Whey Protein Isolate Covalently Modified with Phenolic Compounds 1: Antioxidant and Antiviral Activities. *Journal of Food and Dairy Science*. 2018, 9(12), 385–393 [žiūrėta 2020-04-22]. Prieiga per doi: [10.21608/jfds.2018.36092](https://doi.org/10.21608/jfds.2018.36092).
85. ŠARKINAS, Antanas. *Bendrosios mikrobiologijos laboratoriniai darbai*. Kaunas: Leidykla „Technologija“, 2013. ISBN 978-9955-25-212-2.
86. BRAND-WILLIAMS, W., M. E. CUVELIER, C. BERSET. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*. 1995, 28(1), 25–30 [žiūrėta 2020-04-22]. Prieiga per doi:
87. RAJURKAR, N.S., S. M. HANDE. Estimation of Phytochemical Content and Antioxidant Activity of Some Selected Traditional Indian Medicinal Plants. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2011, 73 (2), 146–151 [žiūrėta 2020-01-29]. Prieiga per doi: IJPSONLINE
88. ANGELES NAVARRETE DEL TORO, M., F. L. GARCIA-CARRENO. Evaluation of the Progress Protein Hydrolysis. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2002, 10(1), 141–155 [žiūrėta 2020-04-22]. Prieiga per doi: [10.1002/0471142913.fab0202s10](https://doi.org/10.1002/0471142913.fab0202s10)
89. BAGDONIENĖ, Lida, Vida BENDIKIENĖ, Jurgis KADZIAUSKAS ir kt. *Biochemijos laboratoriniai darbai*. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 2006. ISBN 9986198410.
90. KENNY, O., R.J. FITZGERALD, G. O’CUINN et al. Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*. 2003, 13(7), 509–516 [žiūrėta 2020-04-22]. Prieiga per doi: [10.1016/s0958-6946\(03\)00073-6](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(03)00073-6)
91. SHIHATA, A., N. SHAH. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 2000, 10(5-6), 401–408 [žiūrėta 2020-05-20]. Prieiga per doi: [10.1016/s0958-6946\(00\)00072-8](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(00)00072-8).
92. DE GIORI, G. S., G.F. DE VALDEZ, A.P. DE RUIZ HOLGADO. Effect of pH and Temperature on the Proteolytic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*. 1985, 68(9), 2160–2164 [žiūrėta 2020-05-20]. Prieiga per doi: [10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81085-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81085-7)
93. KALMAN, D. Amino Acid Composition of an Organic Brown Rice Protein Concentrate and Isolate Compared to Soy and Whey Concentrates and Isolates. *Foods*. 2014, 3(3), 394–402 [žiūrėta 2020-05-20]. Prieiga per doi: [10.3390/foods3030394](https://doi.org/10.3390/foods3030394).
94. EMBIRIEKAH, S., M. BULATOVIC, M. BORIC et al. Antioxidant activity, functional properties and bioaccessibility of whey protein hydrolysates. *International Journal of Dairy Technology*. 2017, 71(1), 243–252 [žiūrėta 2020-04-22]. Prieiga per doi: [10.1111/1471-0307.12428](https://doi.org/10.1111/1471-0307.12428).
95. KELLA, N. K. and J. E. KINSELLA. Enhanced thermodynamic stability of β -lactoglobulin at low pH: a possible mechanism. *The Biochemical Journal*. 1988, 255, 113–118 [žiūrėta 2020-04-22]. Prieiga per doi: [10.1042/bj2550113](https://doi.org/10.1042/bj2550113).

96. BUTRE, C. I., S. SFORZA, P. A. WIERENGA et al. Determination of the influence of the pH of hydrolysis on enzyme selectivity of *Bacillus licheniformis* protease towards whey protein isolate. *International Dairy Journal*. 2015, 44, 44–53 [žiūrēta 2020-04-27]. Prieiga per doi: [10.1016/j.idairyj.2014.12.007](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.12.007).
97. SVENDSEN, I., & K. BREDDAM. Isolation and amino acid sequence of a glutamic acid specific endopeptidase from *Bacillus licheniformis*. *European Journal of Biochemistry*. 1992, 204, 165–171 [žiūrēta 2020-05-06]. Prieiga per doi: [10.1111/j.1432-1033.1992.tb16619.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16619.x).
98. CHIANG, S. H., C. Y. CHANG. Antioxidant Properties of Caseins and Whey Proteins from Colostrums. *Journal of Food and Drug Analysis* [interaktyvus]. Taiwan: Food and Drug Administration. 2005, 13(1), 57–63 [žiūrēta 2020-04-28]. ISSN 1021-9498. Prieiga per ResearchGate
99. CORREA, A. P. F., D. J. DAROIT, J. COELHO, et al. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011, 91(12), 2247–2254 [žiūrēta 2020-04-21]. Prieiga per doi: [10.1002/jsfa.4446](https://doi.org/10.1002/jsfa.4446).
100. CORROCHANO, A. R., Y. SARICAY, E. ARRANZ et al. Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science*. 2019, 102(1), 54–67 [žiūrēta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.3168/jds.2018-14581](https://doi.org/10.3168/jds.2018-14581)
101. BRUMINI, D., A. CRISCIONE, S. BORDONARO et al. Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. *Journal of Dairy Science and Technology*. 2015, 96, 1–14 [žiūrēta 2020-05-22]. Prieiga per doi: [10.1007/s13594-015-0246-1](https://doi.org/10.1007/s13594-015-0246-1)
102. JRAD, Z., H. EL HATMI, I. ADT et al. Antimicrobial activity of camel milk caseina and its hydrolysates. *Acta Alimentaria*. 2015, 44(4), 609–616 [žiūrēta 2020-05-22]. Prieiga per doi: [10.1556/066.2015.44.0034](https://doi.org/10.1556/066.2015.44.0034)
103. KUMAR, D., M. KUMAR CHATLI, R. SINGH et al. Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant Research*. 2016, 139, 20–25 [žiūrēta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.1016/j.smallrumres.2016.05.002](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.002)
104. THEOLIER, J. R. HAMMAMI, P. LABELLE et al. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Food*. 2013, 5(2), 706–714 [žiūrēta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.1016/j.jff.2013.01.014](https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.014)
105. BRICZINSKI, E. P. and R. F. ROBERTS. (2002). Production of an Exopolysaccharide-Containing Whey Protein Concentrate by Fermentation of Whey. *Journal of Dairy Science*. 2002, 85(12), 3189–3197 [žiūrēta 2020-04-22]. Prieiga per doi: [10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74407-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74407-x).
106. CHAUDHARI, D. D., R. SINGH, R. H. MALLAPPA. Evaluation of casein and whey protein hydrolysates well as milk fermentates from *Lactobacillus helveticus* for expression of gut hormones. *Indian Journal of Medical Research*. 2017, 146(3), 409–419 3197 [žiūrēta 2020-05-29]. Prieiga per doi: [10.4103/ijmr.IJMR_802_15](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_802_15)
107. XIAO, Y., L. WANG, X. RUI et al. Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1-6. *Journal of Functional Foods*. 2015, 12, 33–44 [žiūrēta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.1016/j.jff.2014.10.033](https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.033)

108. DRGALIC, I., L. TRATNIK, R. BOZANIC. Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. *Dairy Science and Technology*. 2005, 85(3), 171–179 3197 [žiūrėta 2020-05-22]. Prieiga per doi: [10.1051/lait:2005009](https://doi.org/10.1051/lait:2005009)
109. TRUJILLO-DE SANTIAGO, G., C. P. SAENZ-COLLINS, C. ROJAS-DE GANTE. Elaboration of probiotic oblea from whey fermented using *Lactobacillus acidophilus* or *Bifidobacterium infantis*. *Journal of Dairy Science*. 2012, 95(12), 6897–6904 [žiūrėta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.3168/jds.2012-5418](https://doi.org/10.3168/jds.2012-5418)
110. MATIJEVIC, B., K. LISAK, R. BOZANIC et al. Impact of enzymatic hydrolyzed lactose on fermentation and growth of probiotic bacteria in whey. *Mljekarstvo: Journal for Dairy Production and Processing Improvement* [interaktyvus]. Zagreb: Croatian Dairy Union. 2011, 61(2), 154–160 [žiūrėta 2020-04-27]. Prieiga per HRC AK.
111. PESCUA, M., E. M. HEBERT, F. MOZZI et al. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2019, 141, 73–81 [žiūrėta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011)
112. SHUKLA, M., Y. K. JHA, S. ADMASSU. Development of Probiotic Beverage from Whey and Pineapple Juice. *Journal of Food Processing and Technology*. 2013, 4(2), 1–4 [žiūrėta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.4172/2157-7110.1000206](https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000206)
113. GARCIA-CANO, I., D. ROCHA-MENDOZA, J. ORTEGA-ANAYA et al. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103, 5243–5257 [žiūrėta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.1007/s00253-019-09844-6](https://doi.org/10.1007/s00253-019-09844-6)
114. BATMUNKH, M., M.E. PUREV, B. BATDORJ. Functional properties of fermented soymilk by *Lactobacillus fermentum* BM-325. *Mongolian Journal of Chemistry*. 2018, 19(45), 32–37 [žiūrėta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.5564/mjc.v19i45.1087](https://doi.org/10.5564/mjc.v19i45.1087)
115. SKUDRA, L. A. BLIJA, E. STURMOVICA et al. Studies on Whey Fermentation Using Lactic Acid Bacteria *L. acidophilus* and *L. bulgaricus*. *Acta Biotechnology*. 1998, 18(3), 277–288 [žiūrėta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.1002/abio.370180314](https://doi.org/10.1002/abio.370180314)
116. PESCUA, M., E. M. HEBERT, F. MOZZI et al. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*. 2008, 25, 442–451 [žiūrėta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.1016/j.fm.2008.01.007](https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.01.007)
117. EMBIRIEKAH, S., M. BULATOVIC, M. BORIC et al. Selection of *Lactobacillus* strains for improvement of antioxidant activity of different soy, whey and milk protein substrates. *Journal of Hygienic Engineering and Design* [interaktyvus]. Skopje: Consulting and Training Centre, KEY, 2016, 16, 64–69 [žiūrėta 2020-05-25]. ISSN [1857-8489](https://doi.org/10.1857/8489). Prieiga per SemanticScholar.
118. AMIRI, S., R. R. MOKARRAM, M. S. KHIABANI et al. Development of the antioxidant activity in cheese whey and milk permeate using *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB12. *Food Science and Technology*. 2019, 16(91), 65–79 [žiūrėta 2020-05-28]. Prieiga per Tarbiat Modares University.
119. VIRTANEN, T., A. PIHLANTO, S. AKKANEN et al. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 102(1), 106–115 [žiūrėta 2020-04-21]. Prieiga per doi: [10.1111/j.1365-2672.2006.03072.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03072.x)
120. LUZ, C., L. IZZO, G. GRAZIANI et al. Evaluation of biological and antimicrobial properties of freeze-dried whey fermented by different strains of *Lactobacillus plantarum*. *Food & Function*. 2018, 9(7), 3688–3697 [žiūrėta 2020-05-29]. Prieiga per doi: [10.1039/c8fo00535d](https://doi.org/10.1039/c8fo00535d)

121. REIS, J. A., A. T. PAULA, S. N. CASAROTTI et al. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*. 2012, 4(2), 124–140 [žiūrēta 2020-05-20]. Prieiga per doi: [10.1007/s12393-012-9051-2](https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2).
122. MADUREIRA, R. A., M. E. PINTADO, A. M. P. GOMES et al. Incorporation of Probiotic Bacteria in Whey Cheese: Decreasing the Risk of Microbial Contamination. *Journal of Food Protection*. 2011, 74(7), 1194–1199 [žiūrēta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.4315/0362-028X.JFP-10-217](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-217)
123. PESCUA, M., E. M. HEBERT, H. RABESONA et al. Proteolytic action of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* CRL 656 reduces antigenic response to bovine β -lactoglobulin. *Food Chemistry*. 2011, 127(2), 487–492 [žiūrēta 2020-05-06]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2011.01.029](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.029).
124. ALI, M., J. K. KEPPLER, T. COENYE et al. Covalent Whey Protein-Rosmarinic Acid Interactions: A Comparison of Alkaline and Enzymatic Modifications on Physicochemical, Antioxidative, and Antibacterial Properties. *Journal of Food Science*. 2018, 83(8), 2092–2100 [žiūrēta 2020-05-20]. Prieiga per doi: [10.1111/1750-3841.14222](https://doi.org/10.1111/1750-3841.14222).
125. AEWSIRI, T., S. BENJAKUL, W. VISESSANGUAN et al. Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin modified by oxidised phenolic compounds. *Food Chemistry*. 2009, 117(1), 160–168 [žiūrēta 2020-05-20]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2009.03.092](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.092).
126. CAO, Y., Y. L. XIONG. Interaction of Whey Proteins with Phenolic Derivatives Under Neutral and Acidic pH Conditions. *Journal of Food Science*. 2017, 82(2), 409–419 [žiūrēta 2020-05-15]. Prieiga per doi: [10.1111/1750-3841.13607](https://doi.org/10.1111/1750-3841.13607).
127. DETHA, A. A. SAPUTRA and A. OLA. Antimicrobial activity of whey mare's milk against *Salmonella enteritidis*. *Journal of Physics: Conference Series*. 2019, 1–4 [žiūrēta 2020-05-25]. Prieiga per doi: [10.1088/1742-6596/1146/1/012027](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1146/1/012027)
128. CHOU, C. C., L. L. LIN & K. T. CHUNG (1999). Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, 48(2), 125–130 [žiūrēta 2020-05-06]. Prieiga per doi: [10.1016/S0168-1605\(99\)00034-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00034-3).
129. WU, S. C., G. C. YEN, B. S. WANG et al. Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *LWT – Food Science and Technology*. 2007, 40(3), 506–512 [žiūrēta 2020-05-06]. Prieiga per doi: [10.1016/j.lwt.2005.11.008](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.11.008).
130. KAMAU, S. M., R. R. LU. The effect of enzymes and hydrolysis conditions on degree of hydrolysis and DPPH radical scavenging activity of whey protein hydrolysates. *Current Research in Dairy Sciences*. 2011, 3(1), 25–35 [žiūrēta 2020-05-30]. Prieiga per doi: [10.3923/crds.2011.25.35](https://doi.org/10.3923/crds.2011.25.35)
131. JIA, Z., M. ZHENG, F. TAO. Effect of covalent modification by (–)-epigallocatechin-3-gallate on physicochemical and functional properties of whey protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*. 2016, 66, 305–310 [žiūrēta 2020-05-30]. Prieiga per doi: [10.1016/j.lwt.2015.10.054](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.054)

Publikacijų sąrašas

Publikacijos baigiamojo darbo tema

Pranešimai konferencijų medžiagoje

1. PRAKOPAVIČIŪTĖ, L., RAGAUSKAITĖ, E., ČIŽEIKIENĖ, D. Antimicrobial activity of some lactobacillus strains against pathogens. Lietuvos chemikų konferencijos „Chemija ir cheminė technologija 2019“ pranešimų medžiaga. 2019, p. 108. eISBN 9786090701676.
2. PRAKOPAVIČIŪTĖ, L., RAGAUSKAITĖ, E., ČIŽEIKIENĖ, D. Lactobacilli inhibition activity against pathogens. Jaunųjų mokslininkų paroda – konkursas „Technorama 2019: from vision to innovation!“.

Publikacijos magistro studijų metu

1. RAGAUSKAITĖ, E., ČIŽEIKIENĖ, D. Mielių gaminamų invertazių savybių tyrimai. Respublikinės studentų mokslinės konferencijos „Chemija ir cheminė technologija 2019“ pranešimų medžiaga. ISBN 978-609-07-0176-8. Vilniaus universitetas, Vilnius, 2019, p. 245–249.
2. RAGAUSKAITĖ, E., ČIŽEIKIENĖ, D. Sugar beet molasses and apple caviar application for invertase production using yeast belonging to Kluyveromyces genus. Tarptautinės mokslinės konferencijos “Foodbalt 2019 13th Baltic Conference on Food Science and Technology „Food. Nutrition. Well-being“ and NEEFOOD 2019 5th North and East European congress on food” pranešimų medžiaga. LLU, Jelgava. 2019, p. 130.
3. RAGAUSKAITĖ, E., ČIŽEIKIENĖ, D. Apple squeeze and sugar beet molasses application for yeast invertase production. Tarptautinės mokslinės konferencijos “Foodbalt 2019 13th Baltic Conference on Food Science and Technology „Food. Nutrition. Well-being” and NEEFOOD 2019 5th North and East European congress on food“ pranešimų medžiaga. 2019, p. 176–181. ISSN 2255-9817.