



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Kai kuriomis biotechnologinėmis priemonėmis apdorotų
gyvūninės kilmės baltymų virškinamumo įvertinimas *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas

Gabrielė Surblytė

Projekto autorė

Prof. dr. Daiva Leskauskaitė

Vadovė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Kai kuriomis biotechnologinėmis priemonėmis apdorotų
gyvūninės kilmės baltymų virškinamumo įvertinimas *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

Gabrielė Surblytė

Projekto autorė

prof. dr. Daiva Leskauskaitė

Vadovė

doc. dr. Rimgailė Degutytė

Recenzentė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Gabrielė Surblytė

Kai kuriomis biotechnologinėmis priemonėmis apdorotų gyvūninės kilmės baltymų virškinamumo įvertinimas *in vitro*

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Gabrielės Surblytės, baigiamasis projektas tema „Kai kuriomis biotechnologinėmis priemonėmis apdorotų gyvūninės kilmės baltymų virškinamumo įvertinimas *in vitro*“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Gabrielė Surblytė. Kai kuriomis biotechnologinėmis priemonėmis apdorotų gyvūninės kilmės baltymų virškinamumo įvertinimas *in vitro*. Magistro baigiamasis projektas / vadovė prof. dr. Daiva Leskauskaitė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: pieno baltymai, transglutaminazė, mėsos baltymai, mėsos brandinimas, virškinimas.

Kaunas, 2020. 77 p.

Santrauka

Šio tyrimo tikslas įvertinti gyvūninių baltymų apdorėjimo kai kuriomis biotechnologinėmis priemonėmis įtaką jų virškinamumui. Buvo vertinama iš transglutaminaze apdoroto pieno pagamintų pieno produktų ir skirtingomis sąlygomis brandintos mėsos baltymų hidrolizės kinetika *in vitro* virškinimo metu.

Įvertintos geriamojo pieno, rauginto pieno ir varškės pagamintos iš skirtingais transglutaminazės kiekiais apdoroto pieno, reologinės savybės. Skirtingomis plėvelėmis PA / PE (Supravis Group Spolka Akeyjna), PET / Alox (AZ-Pack) ir be plėvelės, apvilkti kiaulienos nugarinės (*musculus longissimus dorsi*) mėginiai buvo brandinami 3 °C temperatūroje 4, 8, 12 ir 22 paras. *In vitro* virškinimo procedūra pieno ir mėsos mėginiams buvo atlikta remiantis INFOGEST protokolu. Mėginių virškinamumas buvo įvertintas matuojant bendrą peptidų kiekį ir laisvų α -aminogrupių atsipalaidavimą skirtinguose skrandžio ir žarnyno virškinimo stadijose. Taip pat, po mėsos mėginių virškinimo žarnyne buvo įvertintas susidariusių laisvų aminorūgščių kiekis, peptidų profilis, angiotenziną konvertuojančio fermento slopinimas ir antioksidacinis peptidų aktyvumas.

Rezultatai parodė, kad naujų skersinių ryšių susiformavimas, paveikus pieno baltymus transglutaminaze, lemia didesnę produktų klampą ir išeigą. Transglutaminazės pridėjimas į pieną sumažino ($p < 0,05$) baltymų hidrolizės laipsnį *in vitro* virškinimo metu. Transglutaminaze apdoroto ir neapdoroto pieno mėginių hidrolizės laipsnis po virškinimo žarnyne buvo 42,89 proc. ir 45,16 proc., atitinkamai. Rauginto pieno hidrolizės laipsnis buvo 52,79 proc. Transglutaminaze apdorotame produkte ir 60,18 proc. kontroliniame mėginyje. Varškės, pagamintos iš pieno apdoroto transglutaminaze, hidrolizės laipsnis buvo 40,85 proc. ir 58,23 proc. kontrolėje. Taip pat, nustatyta, kad brandintos mėsos baltymų hidrolizės laipsnis buvo didesnis, lyginant su nebrandinta mėsa ($p < 0,05$). Šiame tyrimo etape buvo vertinama brandinimo trukmės ir plėvelės įtaka termiškai apdorotos mėsos virškinamumui. Rezultatai parodė, kad brandinimo trukmė yra kritinis parametras lemiantis didesnę hidrolizės laipsnį po *in vitro* virškinimo žarnyne ($p < 0,05$). Didžiausias hidrolizės laipsnis (57,59-58,04 proc.) ir didžiausias laisvų amino rūgščių kiekis (76,34 proc.) po virškinimo žarnyne buvo nustatytas mėsoje, kuri buvo brandinta 22 paras. Mėsos brandinimas naudojant skirtingas plėveles ir nenaudojant jokios plėvelės, neturi reikšmingos ($p > 0,05$) įtakos baltymų virškinamumui.

Gabrielė Surblytė. *In Vitro* Evaluation of Digestibility of Animal Proteins Treated by Some Biotechnological Means. Master's Final Degree Project / supervisor prof. dr. Daiva Leskauskaitė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Technological Sciences, Food Technologies.

Keywords: milk protein, transglutaminase, meat protein, meat aging, digestion.

Kaunas, 2020. 77 p.

Summary

The aim of this research was to evaluate the effect of animal protein treatment by some biotechnological means to their digestibility. In this research kinetics of protein hydrolysis during *in vitro* digestibility of cross-linked proteins in different dairy products and pork meat aged in different conditions, was evaluated.

Drinking milk, sour milk and acid induced curd were made from transglutaminase treated milk and their quality was evaluated on the basis of rheological characterisation. Pork loin (*musculus longissimus dorsi*) samples were aged at 3 °C covered by different films: film PA / PE (Supravis Group Spolka Akeyjna), film PET / Alox (AZ-Pack) and without film (control). Aging duration of all samples – 4, 8, 12 and 22 days. The *in vitro* digestion procedure of both, milk and meat, samples was carried out according to INFOGEST protocol. The extent of protein hydrolysis was evaluated by measuring total peptides and free α -amino groups content released during the gastric and duodenal stages of *in vitro* digestion. Also, released free amino acid content, peptide profile, ACE inhibition and antioxidant activity of peptides after digestion of different meat samples in duodenal stage, were evaluated.

It was shown that dairy proteins cross-linking caused higher viscosity and water-holding capacity of the products. Transglutaminase addition to milk induced the significant decrease ($P < 0.05$) in the rate of the protein hydrolysis at all points of *in vitro* digestion. For transglutaminase treated and not treated milk the rate of hydrolysis was 42.89% and 45.16%, respectively. For the sour milk the rate of protein hydrolysis was 52.79% for transglutaminase treated product and 60.18% for the control. Curd made from transglutaminase treated milk showed a protein hydrolysis degree of 40.85% and 58.23% for the control. Secondly, it was determined that the rate of protein hydrolysis of aged meat was significantly higher than that of the control samples. The duration of aging was shown to be the critical and more important ($P < 0.05$) parameter where the highest rates of protein hydrolysis (57.59-58.04%) and the highest amount of free amino acids (76.34%) at the end of gastrointestinal digestion of meat were achieved after 22 days of aging. Results revealed that no significant differences ($P > 0.05$) between *in vitro* digestibilities of pork meat samples aged covered by films and the control (without films) throughout the digestion of cooked meat.

TURINYS

LENTELIŲ SĄRAŠAS	8
PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS.....	9
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	11
ĮVADAS.....	12
1. LITERATŪROS ANALIZĖ	13
1.1. Fermento transglutaminazės poveikio baltymams esmė	13
1.2. Transglutaminazės poveikis pieno baltymams	14
1.3. Transglutaminazės įtaka maisto produktų kokybei bei sveikatingumui	15
1.3.1. Transglutaminazės įtaka maisto produktų kokybei.....	15
1.3.2. Transglutaminaze apdorotų maisto produktų įtakos vartotojų sveikatai tyrimai.....	17
1.4. Mėsos brandinimas ir jo metu vykstantys biocheminiai procesai	18
1.4.1. Mėsos brandinimo būdai	18
1.4.2. Brandinimo metu vykstantys biocheminiai procesai	20
1.4.3. Už brandinimo metu vykstančius mėsos skonio pokyčius atsakingi junginiai.....	21
1.4.4. Mikrobiologiniai pokyčiai vykstantys mėsos brandinimo metu.....	22
1.5. Gyvūninės kilmės baltymų virškinamumo ypatumai	23
1.5.1. Pieno baltymų virškinamumas	25
1.5.2. Mėsos baltymų virškinamumas.....	26
1.5.3. Gyvūninės kilmės baltymų virškinimo metu susidarantys peptidai ir jų biologinis aktyvumas	28
2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI.....	30
2.1. Medžiagos ir reagentai.....	30
2.1.1. Pieno apdorojimas transglutaminaze ir produktų gamyba	31
2.1.2. Mėsos paruošimas	32
2.2. Tyrimo metodai	33
2.2.1. Pieno produktų analizės metodai	33
2.2.2. Virškinimas <i>in vitro</i> statinėje modelinėje sistemoje	34
2.2.3. Baltymų hidrolizės įvertinimo metodai.....	36
2.2.4. Baltymų hidrolizės produktų biologinio aktyvumo nustatymas	37
2.2.5. Aminorūgščių identifikacija	38
2.2.6. Peptidų profilio įvertinimas	39
2.2.7. Statistinė analizė	40
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	41
3.1. Transglutaminaze paveiktų pieno baltymų virškinamumo tyrimai	41
3.1.1. Transglutaminazės įtaka pieno produktų savybėms.....	41
3.1.2. Transglutaminaze paveiktų pieno baltymų virškinamumo vertinimas skirtingų pieno produktų <i>in vitro</i> virškinimo metu	43
3.2. Kiaulienos nugarinės brandinimo sąlygų įtaka išvirtos mėsos baltymų virškinamumui....	48

3.2.1.	Skirtingomis sąlygomis brandintos kiaulienos baltymų hidrolizės vertinimas virtos mėsos <i>in vitro</i> virškinimo metu.....	49
3.2.2.	Skirtingomis sąlygomis brandintos kiaulienos aminorūgščių susidarymo vertinimas virtos mėsos <i>in vitro</i> virškinimo metu.....	52
3.2.3.	Skirtingomis sąlygomis brandintos virtos kiaulienos nugarinės <i>in vitro</i> virškinimo metu susidariusių peptidų vertinimas.....	56
3.2.4.	Peptidų biologiškai aktyvių savybių vertinimas	61
	IŠVADOS	64
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	65
	PADĖKA	77

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Brandinimui naudotų plėvelių charakteristikos.....	30
2 lentelė. Mėsos mėginių kodavimas.....	32
3 lentelė. Darbinių ir bazinių virškinamojo trakto sulčių sudėtis ir paruošimas	34
4 lentelė. Druskų ir fermentų paruošimas virškinimui.	35
5 lentelė. Gradientų programa pasirinkta aminorūgščių darinių atskyrimui.....	39
6 lentelė. Gradientų programa pasirinkta peptidų atskyrimui.....	40
7 lentelė. Brandinimo trukmės įtaka laisvų aminorūgščių sudėčiai tradiciniu būdu brandintos mėsos mėginiuose, po <i>in vitro</i> virškinimo žarnyne	54
8 lentelė. Brandinimo plėvelės įtaka laisvų aminorūgščių sudėčiai 22 paras brandintos mėsos mėginiuose po <i>in vitro</i> virškinimo žarnyne	55

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. MTG katalizuojamos reakcijos: A – acilo grupės perdavimas; B – skersinės jungties sudarymas tarp lizino ir glutamino; C – deamininimas	14
2 pav. Mikrobiologine transglutaminaze nepaveiktų ir paveiktų kazeino molekulių gelio tinklo skirtumai	16
3 pav. Baltymų virškinimo sistema žmogaus organizme	24
4 pav. Fermentinės baltymų hidrolizės schema	25
5 pav. Termiškai apdorotos mėsos miofibrilių vaizdas per mikroskopą prieš virškinimą ir po virškinimo 180 min	27
6 pav. <i>In vitro</i> virškinimo schema vienam mėginiui	34
7 pav. Pieno baltymų dalelių dydžių pasiskirstymas atgamino pieno mėginiuose	41
8 pav. Rauginto pieno, pagaminto iš skirtingu MTG kiekiu, klamos kreivės esant 20 °C ir 37 °C temperatūrai	42
9 pav. MTG įtaka varškės išeigai ir varškės bei išrūgų baltymų kiekiui	43
10 pav. Peptidų koncentracijos ir hidrolizės laipsnio kitimas MTG paveiktų atgaminto pieno baltymų virškinimo metu.....	45
11 pav. Peptidų koncentracijos ir hidrolizės laipsnio kitimas MTG paveiktų rauginto pieno baltymų virškinimo metu.....	46
12 pav. Peptidų koncentracijos ir hidrolizės laipsnio kitimas MTG paveiktų varškės baltymų virškinimo metu.	48
13 pav. Mėsos brandinimo trukmės ir plėvelės įtaka susidariusių peptidų kiekiui virškinimo metu ir baltymų hidrolizės laipsniui	49
14 pav. Peptidų koncentracijos ir hidrolizės laipsnio kitimas skirtingą laiko tarpą brandintos mėsos virškinimo metu.....	51
15 pav. Peptidų koncentracijos ir hidrolizės laipsnio kitimas skirtingomis sąlygomis brandintos mėsos virškinimo metu.....	52
16 pav. Aukšto slėgio efektyviosios skysčių chromatografijos ir MALDI-TOF peptidų profilių skirtumai po 22 parų be plėvelės brandintos mėsos virškinimo skrandžio fazėje ir žarnyno fazėje	58

17 pav. Mėsos brandinimo trukmės įtaka po jos virškinimo žarnyne atpalaiduotų aukšto slėgio efektyviosios skysčių chromatografijos ir MALDI-TOF peptidų profiliui.....	59
18 pav. Mėsos brandinimo būdo įtaka po jos virškinimo žarnyne išsiskyrusių aukšto slėgio efektyviosios skysčių chromatografijos ir MALDI-TOF peptidų profiliui.....	60
19 pav. Peptidų, gebančių inhibuoti angiotenziną konvertuojantį fermentą, aktyvumas mėginiuose, po <i>in vitro</i> virškinimo žarnyne	62
20 pav. Po <i>in vitro</i> virškinimo skrandyje ir žarnyne atpalaiduotų peptidų antioksidacinis aktyvumas pagal gebėjimą redukuoti geležies jonus	63

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

ACN – acetonitrilas;

AKF – angiotenziną konvertuojantis fermentas;

BHT – butilintas hidroksitoluenas;

MTG – mikrobiologinė transglutaminazė;

SGF – dirbtinės skrandžio sultys;

SIF – dirbtinės žarnyno sultys.

SSF – dirbtinės seilių sultys;

TCA – trichloracto rūgštis;

TFA – trifluoracto rūgštis;

TG – transglutaminazė.

IVADAS

Modernioje visuomenėje gyvūninės kilmės produktai prieš vartojimą dažniausiai yra apdorojami naudojant terminius, mechaninius arba biotechnologinius procesus. Apdorojimo metu vykstančios biocheminės reakcijos ir jų metu susidarantys nauji produktai yra daugelio maisto technologijų pagrindas. Nuo šių procesų priklauso ne tik maisto produktų juslinės, fizikinės cheminės savybės, bet ir jų virškinamumas bei įtaka vartotojų sveikatai. Naujos žinios apie maisto gamybos metu vykstančius biocheminius pokyčius leidžia tobulinti maisto technologijas, kuriant saugesnius bei sveikesnius maisto produktus. Pavyzdžiui, pieno produktų apdorojimui dažnai pasitelkiamas fermentas transglutaminazė, kuri gerina reologines pieno produktų savybes ir didina išeigą [1, 2]. Mėsos apdorojimui moderniojoje maisto pramonėje dažnai pasitelkiamas brandinimo procesas, kurio metu veikiant proteazėms mėsa pasidaro minkštesnė, pagerėja jos skonis ir tekstūra [3, 4]. Pieno ir mėsos apdorojimas šiais biotechnologiniais procesais keičia ir produktuose esančių baltymų virškinamumą. Nors biotechnologinių priemonių įtaka maisto produktų kokybei tirama jau seniai, tačiau virškinamumo tyrimai pradėti tik pastaraisiais metais, todėl informacijos apie tai labai trūksta [5, 6]. Virškinamumo greitis gali būti reguliuojamas atsižvelgiant į vartotojų interesus, todėl esant poreikiui, pasitelkiant moderniąsias technologijas, baltymų virškinimą galima lėtinti, arba atvirkščiai, greitinti.

Darbo aktualumas – augant gyvūninės kilmės maisto suvartojimui pasaulyje ir nuolat kintant vartotojų poreikiams bei mitybos įpročiams svarbu surasti naujų metodų, kurie pakreiptų virškinimo procesą vartotojui tinkama linkme ir padėtų išvengti įvairių virškinamojo trakto ligų.

Darbo tikslas – įvertinti kurių biotechnologinių priemonių įtaką pieno ir mėsos baltymų virškinamumui.

Darbo uždaviniai:

1. nustatyti mikrobiologinės transglutaminazės įtaką pieno, rauginto pieno ir varškės reologinėms savybėms ir produktų išeigai;
2. ištirti mikrobiologinės transglutaminazės įtaką geriamojo pieno, rauginto pieno ir varškės virškinamumui;
3. nustatyti brandinimo trukmės įtaką mėsos baltymų virškinamumui;
4. įvertinti mėsos brandinimo būdo įtaką baltymų virškinamumui;
5. ištirti po mėsos virškinimo plonajame žarnyne susidariusių peptidų bioaktyviasias savybes.

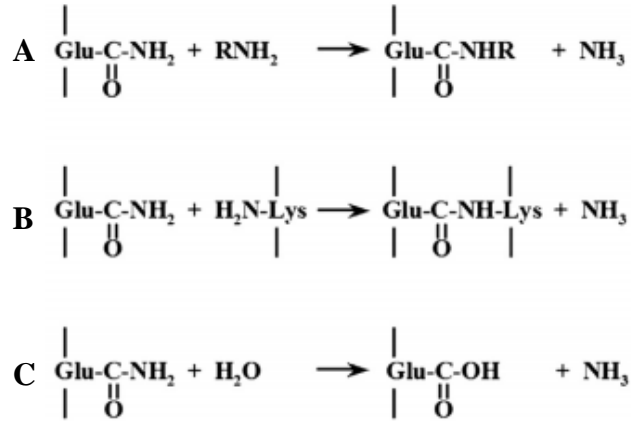
1. LITERATŪROS ANALIZĖ

1.1. Fermento transglutaminazės poveikio baltymams esmė

Skersinių ryšių susidarymas yra procesas, kurio metu chemiškai, kovalentiniu ryšiu sujungiamos dvi ar daugiau molekulės, arba sudaromi ryšiai molekulės viduje. Didelė skirtingų funkcinių grupių, esančių baltymuose, įvairovė, yra priežastis, kodėl baltymai yra pagrindinis taikinytis tiriant skersinių ryšių susidarymą. Ši biochemijos sritis vadinama biokonjugacija ir apima ne tik skersinių ryšių susidarymą, bet ir imobilizaciją, paviršiaus modifikaciją ir biomolekulių žymėjimą [7]. Skersinių ryšių susidarymą dažnai katalizuoja fermentai, kurių molekulės turi reaktyvias galūnes, galinčias reaguoti su tam tikromis funkcinėmis grupėmis (pirminiais aminais, sulfhidrilais ir t.t.), esančiomis baltymuose arba kitose molekulėse. Vienas tokių fermentų – transglutaminazė.

Transglutaminazė (TG) gamtoje dažniausiai paplitusi augaliniuose audiniuose (sojų pupelėse, pašariniuose runkeliuose, artišokuose, rozmarino lapuose), žinduolių audiniuose (jūrų kiaulyčių kepenyse, galvijų plazmoje), bestuburių gyvūnų audiniuose (krevetėse, krabuose, vėžiuose) ir mikrobuų ląstelėse [8]. Gyvuose organizmuose šis fermentas atsakingas už daugelį fiziologinių procesų, tokių kaip fotosintezė, kraujo koaguliacija, odos regeneracija, antimikrobinės imuninės reakcijos [9]. Tačiau maisto pramonėje dažniausiai naudojama mikrobiologinė transglutaminazė (MTG), išskirta iš *Streptomyces mobaraensis*. Didžiausi mikrobiologinės transglutaminazės privalumai, lyginant su transglutaminaze, gaunama iš augalinių arba gyvūninių šaltinių, tai maža kaina, nuo kalcio nepriklausomas aktyvumas ir didelis fermentinis aktyvumas, kuriam išgauti nereikalingi sudėtingi atskyrimo ir išgryninimo procesai [10]. Šis fermentas yra komerciškai prieinamas ir užtikrina fermentinį baltymų modifikavimą. Kovalentinio ryšio susidarymas tarp skirtingų baltymų arba baltymo viduje yra maisto fizinių savybių modifikacijų transglutaminaze pagrindas [11].

Viena perspektyviausių strategijų gerinant pieno produktų biofunkcines savybes – skersinių ryšių sudarymas naudojant fermentą transglutaminazę [12]. Transglutaminazė atsakinga už skersinių ryšių susidarymą tarp aminorūgščių likučių, esančių pieno baltymuose: α_1 , α_2 , β , κ -kazeinuose ir išrūgų baltymuose [12]. Fermentas gali modifikuoti baltymus įterpdamas aminus, paveikdamas intra- arba ekstramolekulinius skersinius ryšius arba katalizuoti deaminavimo reakciją. Pirmasis dviem atvejais katalizuojama acilo grupės perdavimo reakcija tarp baltyme esančio glutamino liekanos γ -karboksi grupės (donoro) ir įvairių pirminių amino grupių aminiuose (akceptorium), įskaitant lizino liekanos ϵ -amino grupes, esančias baltymų grandinėje, o kai baltyme nėra lizino arba kitų pirminių amino grupių, baltymų polipeptidinės grandinės reakcija vyksta su vandeniu, kuris reaguoja, kaip acilo akceptorius (žr. 1 pav.). Tada įvyksta hidrolitinės glutamino liekanos deaminavimas, kurio metu išsiskiria glutamo rūgštis. Šios reakcijos metu pasikeičia baltymo krūvis, o tai turi įtakos baltymo tirpumui [8].



1 pav. MTG katalizuojamos reakcijos: A – acilo grupės perdavimas; B – skersinės jungties sudarymas tarp lizino ir glutamino. Susiformavę tilteliai vadinami ϵ -(γ -glutamil) lizino ryšiais; C – deamininimas [8]

Kai baltymuose esančio lizino ϵ -amino grupės reaguoja, kaip acilo grupės akceptorai, susiformuoja vidiniai ir išoriniai molekuliniai ϵ -(γ -glutamil) lizino ryšiai. Šie izopeptidiniai ryšiai formuoja stabilų baltyminių tinklą, kuris yra svarbus gelių susidarymo procese [13], lemia baltymų hidrofobines savybes, kurios turi įtakos baltymo tirpumui, ir priklausomai nuo baltymo charakteristikos, gali turėti įtakos gelių, emulsijų ir putų formavimo procesams bei baltyminio produkto struktūrai [8, 12].

Baltymų matricoje deamininimas ir acilo grupės perdavimo reakcijos vyksta lėčiau negu ϵ -(γ -glutamil) lizino ryšių susiformavimas. Dėl šių ryšių formavimosi gali susidaryti didelės molekulinės masės polimerai (10^6 - 10^7 g/mol), kurie dėl savo savybių yra labai dažnai panaudojami maisto pramonėje [14]. Praktinis šios savybės pritaikymas, tai karščiui atsparių, negrižtamų gelių formavimas iš pieno, sojų arba kiaušinių baltymų [13]. Tiek polimerizacijos, tiek deamininimo reakcijos katalizuojamos fermento transglutaminazės, turi įtakos baltymų sistemos struktūros pokyčiams. Šie biotechnologiniai procesai gali pakeisti maisto produktų funkcines savybes, dėl to baltymai maisto pramonėje naudojami, kaip veiksmingi transformacijos agentai, norint gauti naujus produktus, pasižyminčius patobulintomis, naujoviškomis tekstūros savybėmis [8].

1.2. Transglutaminazės poveikis pieno baltymams

Apie transglutaminazės poveikį išrūgų baltymams žinoma, kad daugiausia skersinių ryšių, esant fermento įtakai, susidaro α -laktalbumino and β -laktoglobulino molekulėse. Nors α -laktalbumino polipeptidinėje grandinėje yra 8 glutamino ir 12 lizino, o β -laktoglobulino – 16 glutamino ir 15 lizino likučių, ne tarp visų iš jų gali susidaryti skersiniai ryšiai dėl šių baltymų globulinės struktūros [15]. Wen-qiong'as ir kiti (2017) atliko tyrimą apie transglutaminazės poveikį išrūgų baltymų molekulių struktūrai ir nustatė, kad daugiausia penki lizino ir penki glutamino likučiai α -laktalbumino molekulėje gali būti sujungti skersiniais ryšiais, bet procesas priklauso nuo

temperatūros, pH ir kalcio koncentracijos [16]. Kai kurie tyrimai rodo, kad maisto pramonėje MTG gali būti naudojama norint pagerinti išrūgų baltymų funkcines savybes: vandens surišimą, atsparumą karščiui, gebėjimą formuoti putas ir emulsijas. Dėl šių savybių transglutaminaze modifikuoti išrūgų baltymai gali būti dedami į maisto produktus, kaip funkcionalusis ingredientas [17].

Mažas arba jokios antrinės struktūros nebuvimas, lemia didelį kazeino molekulės lankstumą, todėl naudojant MTG kazeino molekulėse skersiniai ryšiai susidaro lengviau, lyginant su skersinių ryšių susidarymu išrūgų baltymuose, kurių struktūra yra globulinė ir labai tanki [2]. Taigi, MTG skatina tarpmolekulinę kazeinų polimerizaciją ir tinklo formavimąsi, dėl kurio iš esmės pasikeičia pieno produkto funkcinės savybės, pavyzdžiui, sumažėja sinerzė, padidėja jogurto klampa ir susidaro vienalytė produkto struktūra [18]. Fermentinis skersinių ryšių sudarymas naudojant MTG taip pat lemia kazeino micelių stabilizavimą. Nogueira ir kiti (2018) nustatė, kad dėl kovalentinių ryšių susiformavimo baltymo micelės viduje ir kovalentinio κ -kazeinų prijungimo prie kazeino micelės paviršiaus, kazeino molekulė tampa stabili karbamido, natrio citrato, aukštos temperatūros ir etanolio turinčioje aplinkoje [19].

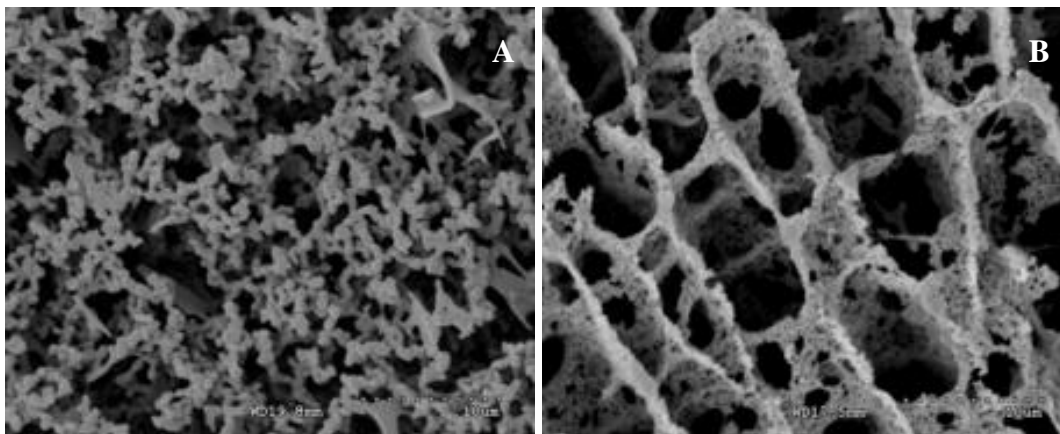
1.3. Transglutaminazės įtaka maisto produktų kokybei bei sveikatingumui

Sveikų, didelės maistinės vertės produktų suvartojimas nuolat didėja, todėl siekiant patenkinti vartotojų poreikius kuriami nauji produktai, kurių savybių modifikavimui naudojami įvairūs biotechnologiniai procesai, dažnai dalyvaujant fermentams. Dėl išskirtinių charakteristikų šiems tikslams plačiai naudojama mikrobiologinė transglutaminazė. Šio fermento katalizuojamų reakcijų produktai ne tik gerina maisto produktų tekstūrą, bet ir gali turėti teigiamos įtakos vartotojų sveikatai [20].

1.3.1. Transglutaminazės įtaka maisto produktų kokybei

Skersinių ryšių sudarymas tarp maiste esančių baltymų molekulių, turi įtakos jų tirpumui. Ši savybė priklauso nuo baltymo molekulės paviršiaus hidrofiliškumo ir hidrofobiškumo, kai baltymai patenka į vandeninę aplinką. Bendrai tariant, kuo mažiau baltymo molekulės paviršiuje yra hidrofobinių segmentų, tuo geresnis jo tirpumas [8]. Baltymų tirpumui įtakos turi ne tik vidinės fizikinės ir cheminės baltymo molekulės savybės, bet ir išoriniai veiksniai, tokie kaip aplinkos, kurioje yra baltymas, pH, temperatūra, joninė jėga ir organiniai tirpikliai. Baltymų tirpumą galima modifikuoti jį paveikiant MTG [21]. Hidrofilinių / hidrofobinių segmentų baltymo molekulės paviršiuje santykis kinta dėl baltymo deaminavimo proceso, kurį katalizuoja transglutaminazė. Todėl gali būti pakeistos baltyminio produkto tekstūros savybės, produktas tampa elastingesnis, pasižymi geresnėmis adhezinėmis savybėmis ir tampa lengviau kramtomas. Šie pokyčiai įvyksta dėl to, kad baltymų tirpumas tiesiogiai paveikia gelių, emulsijų, putų susidarymo, klampumo ir vandens sulaikymo savybes [8].

Jogurto, sūrio ar tofu gamybos metu susidariusi struktūra priklauso nuo baltymų gebėjimo suformuoti gelį. Visuose šiuose produktuose susiformuoja skirtingo stabilumo ir struktūros geliai dėl jų gamyboje naudojamų skirtingos struktūros baltymų bei skirtingų technologinių veiksnių, tokių kaip pH, temperatūra bei priedų ir druskų pridėjimo [8]. Stabilūs geliai dažniausiai formuojasi izoelektriniame baltymo taške, kai pH yra nutolęs nuo izoelektrinio taško, susiformuoja nestabilūs, silpnos struktūros geliai, kurie gali suskilti į nepageidaujamus galutinius junginius. Skersinių ryšių susiformavimas baltymo molekulėse, dėl MTG panaudojimo, lemia didesnę galutinio produkto elastingumą dėl negrižtamo gelio susidarymo, netgi tada, kai baltymų kiekis produkte nėra labai didelis, todėl produktas yra priimtinesnis vartotojui [22]. MTG modifikuotos kazeino molekulės sudaro tvirtesnę gelio tinklą, dėl to pieno produktai pagaminti naudojant fermentą pasižymi kietesne struktūra, mažesne sinereze (žr. 2 pav.) [23].



2 pav. Mikrobiologine transglutaminaze nepaveiktų (A) ir paveiktų (B) kazeino molekulių gelio tinklo skirtumai. Vaizdas padidintas 3000 kartų [23]

Gelio susidarymas, vienas iš pagrindinių funkcinių rodiklių, kai kalbama apie jogurto gamybą. Motoki ir Kumazawa (2000) savo darbuose aprašė tiesioginę MTG įtaką jogurto sinerezės slopinimui dėl ϵ -(γ -glutamil) lizino ryšių susiformavimo. Šių skersinių ryšių atsiradimas lemia stipraus ir stabilaus gelio, gebančio surišti vandenį savo baltyminiame tinkle, susiformavimą [8]. Faria (2010) tyrė, kaip papildomai pridėti, išrūgų baltymai, modifikuoti ir nemonifikuoti MTG, pakeičia galutinio produkto, šiuo atveju, sūrio, savybes [24]. Sūris su transglutaminaze, buvo standesnis, vientisesnis, be sinerezės, tinkamo klampumo ir konsistencijos. Šiuos savybių pokyčius lėmė baltymų polimerizacijos procesas, o tvirtesnio gelio susiformavimą – dėl transglutaminazės poveikio naujai susidarę skersiniai ryšiai. Tačiau per didelio fermento kiekio naudojimas, sumažina gelio stiprumą, nes per didelis skersinių ryšių kiekis gali trukdyti vieningo baltymų tinklo susidarymui [25].

Emulsijos atlieka svarbų vaidmenį tam tikrų maisto produktų gamyboje ir yra klasifikuojamos į keletą skirtingų grupių, priklausomai nuo jų tipo ir panaudojimo. Kai kurios emulsijos, pačios yra galutiniai produktai (sviestas, majonezas, grietinė), kai kurios įeina į maisto produktus, kaip vienas iš ingredientų (jogurtai ir kitos gelinės sistemos savo sudėtyje turi mažų emulsijos lašelių,

kurie reaguoja su kitais maisto ingredientais, būti aktyvūs, tačiau proceso metu neturi būti destabilizuoti), arba jų pagalba gali būti kuriamos naujos struktūros (plakta grietinėlė, ledai) [26]. Daugelis globulinių baltymų yra geri emulsikliai arba stabilizatoriai aliejaus-vandens fazių emulsijoms. Emulsija, kuriai pagaminti buvo naudojamas pramoninis α -lactalbumino koncentratas, paveiktas mikrobiologine transglutaminaze, pasižymėjo mažesniu dilataciniu paviršiaus klampumu, negu emulsija pagaminta iš α -lactalbumino, nepaveiktu transglutaminaze. Šias savybes lemia α -lactalbumino molekulėse susidarę papildomi skersiniai ryšiai, kurie ženkliai padidina emulsijų stabilumą [27].

Vienas iš veiksnių, lemiančių įvairių maisto produktų klampą, yra baltymų kiekis bei jų savybės. Anot Brauno ir Roseno (1999), kuo didesnė tirpale esančių baltymų molekulių koncentracija, forma, dydis ir tankis, tuo didesnė šių molekulių sąveika, tuo mažesni tarpai tarp jų, o tai lemia mažesnę vandens judrumą, todėl klampumas didėja [28]. Daugelyje maisto produktų, tarp jų leduose ir jogurte, klampa yra viena iš pagrindinių produkto kokybės bei priimtumo rodiklių. Baltyminių produktų klampa dažnai priklauso nuo baltymų hidrofiliškumo, o tai stipriai susiję su jų gebėjimu formuoti gelius bei emulsijas [29]. Mokslinėje literatūroje galima rasti įrodymų, kad gaminant jogurtą su išrūgų baltymų priedais, kurie buvo apdoroti MTG, gaunamas klampesnis produktas, lyginant su paprastais išrūgų baltymais praturtintu jogurtu. Dėl papildomų skersinių ryšių susidarymo, vyksta išrūgų baltymų polimerizacija, kurios metu susidaro didelės molekulinės masės polimerai stabdantys vandens mobilumą, sulaikydami vandens molekules polimeriniame tinkle [24]. Yra duomenų, kad transglutaminazės naudojimas ledų gamyboje lemia vientisesnę galutinio produkto tekstūrą, bei pagerinamos aeracijos ir putų stabilumo funkcines savybes. Šis metodas ypač tinka ledų su mažu riebalų kiekiu gamyboje, kai reikia pagerinti jų tekstūrą [8].

Taip pat, naudojant transglutaminazę kuriami naujos kartos produktai, tokie kaip baltyminės plėvelės, kurios gali būti dengiamos ant šviežių daržovių ir vaisių paviršiaus, taip pailginant šviežių produktų galiojimo laiką [20].

1.3.2. Transglutaminaze apdorotų maisto produktų įtakos vartotojų sveikatai tyrimai

Ksingas ir kiti (2016) savo darbuose aprašo sojos gėrimo baltymų modifikuotų, naudojant mikrobiologinę transglutaminazę, naudą žmogaus sveikatai. Autoriai teigia, kad vartojant baltymus paveiktus MTG, žmogaus organizmas su maistu gauna didesnę energijos kiekį, sumažinama alergijų, kurias sukelia sojų baltymai, rizika [30]. Kai kuriais atvejais, MTG katalizuojamos reakcijos gali paveikti ne tik baltymų stabilumą, virškinamumą bet ir pagerinti jų bio-prieinamumą [31]. Nustatyta, kad maisto produktai, kuriuose baltymai modifikuoti naudojant MTG, sukelia didesnę sotumo jausmą, pasižymi žemesniu alergiškumu ir ilgesniu galiojimo terminu [20]. Kai kurios transglutaminazės šeimos rūšys pasižymi savybe skatinančia greitesnį žaizdų gijimą, nes veikia kaip mediatoriai regeneracijos procese. Modifikuoti baltymai, turintys ϵ -(γ -glutamil) lizino ryšių dėl fermento veikimo, geba stabilizuoti baltymus ir taip kontroliuoti ląstelių pažeidimus [20]. Taip pat transglutaminazė, gerina vienos iš svarbiausių, nepakeičiamų

aminorūgščių, lizino surišimą su glutaminu ir gali turėti netiesioginės įtakos augimo hormonų veiklai.

Nors užsienio mokslininkų literatūroje galima rasti daug informacijos apie MTG įtaką pieno produktų stabilumui, struktūrai ir kitoms savybėms, informacijos apie taip modifikuotų baltymų virškinamumą konkrečiuose pieno produktuose labai nedaug. Yra duomenų tik apie atskirų pieno baltymų frakcijų, paveiktų MTG, virškinimą. Bėtgerio ir kitų (2018) atlikto tyrimo rezultatai parodo, kad atskirų pieno komponentų virškinamumas gali skirtis nuo tų pačių komponentų virškinimo kompleksinėse ar koloidinėse sistemose [6].

Vilas Boasas ir kiti (2012) aprašė transglutaminaze paveiktų β -laktoglobulinų virškinimą. Paprastai, nepriklausomai nuo to ar β -laktoglobuliniams terminai apdoroti ar ne, jie yra atsparūs skrandžio ir žarnyno virškinimo fermentams. Šių baltymų modifikacija MTG lemia struktūrinę modifikaciją ir geresnį virškinimo fermentų pepsino ir pankreatino prieinamumą prie substrato, taip pagerinamas β -laktoglobulinų virškinamumas [32]. Kazeino molekulių, priešingai nei β -laktoglobulino, modifikavimas transglutaminaze gali turėti neigiamos įtakos virškinamumui. Atskirų MTG paveiktų kazeino molekulių fragmentai yra atsparesni virškinimo procesui, lyginant su tų pačių, tik MTG nepaveiktų, fragmentais [6]. Juvonenos ir kitų (2015) atlikto tyrimo rezultatai parodo, kad emulsijų, į kurių sudėtį įeina MTG modifikuotas kazeinas, virškinimas taip pat yra prastesnis [5]. Remiantis šiais duomenimis galima reguliuoti mitybą ir esant poreikiui sumažinti kalorijų suvartojimą [6].

1.4. Mėsos brandinimas ir jo metu vykstantys biocheminiai procesai

Mėsos brandinimas – tai mėsos paruošimo būdas, kurio metu dalinai suardomas jungiamasis mėsos audinys. Brandinta mėsa pasižymi minkštesne, sultingesne tekstūra, geresniu, turtingesniu skoniu, pasikeičia mėsos spalva, aromatas, mėsa tampa lengviau virškinama.

1.4.1. Mėsos brandinimo būdai

Išskiriami du mėsos brandinimo būdai: sausasis brandinimas ir šlapiasis brandinimas. Sausasis brandinimas – tai tradicinis skerdenos ar jos dalių, laikymas patalpoje ant specialių karkasų, tam tikrose sąlygose, tam tikrą laiką tarpą [33]. Sausasis metodas laikomas tradiciniu ir taikomas nuo senų laikų, kuomet keliautojai laivais gabendavo šviežią mėsą, kuri laive natūraliai susibrandindavo. Tokio brandinimo metu išryškėja skrudintas, mėsiškas skonis, kuris yra laikomas pageidautinu [34]. Anot Kembelo ir kitų (2001) mėsos skonis tampa stabilus mėsa sausai brandinant 19 dienų ir po to laikant ją vakuume. Tai gana brangus procesas, nes labai svarbu griežtai kontroliuoti aplinkos sąlygas [4]. Sauso brandinimo specialistai nuolat tobulina receptus, kaip pagaminti kuo geresnę brandintą mėsą, tačiau vis dar aiškinamasi, kokios sąlygos yra optimaliausios [34]. Dažniausiai brandinimo patalpoje palaikoma 1-4 °C temperatūra, 65-85 proc. drėgmė, patalpa turi būti gerai vėdinama, oro srauto greitis 0,2-5 m/s [3]. Tokiomis sąlygomis mėsa laikoma iki 30 dienų, tačiau kai kurie specialistai mėsą brandina ilgiau. Tradiciškai sauso brandinimo procesas vyksta be jokios mėsą dengiančios plėvelės, dėl šios

priežasties padidėja taršos rizika [34]. 2006 metais sukurta ir įdiegta vandeniui laidžia plėvele dengtos mėsos brandinimo technologija, kuri palengvina aplinkos kontroliavimo procesą brandinimo metu [35].

Šlapiasis brandinimas – supjaustytos mėsos laikymas vakuuminėse pakuotėse tam tikrą laiko tarpą [3]. Tokio brandinimo metu veikia tie patys fermentai, kaip ir sausame brandinime, tačiau tokios vakuuminės pakuotės sulaiko drėgmę nuo vandens garavimo ir apsaugo mėsą nuo taršos. Tokiu būdu mėsa brandinasi savo pačios sultyse. Šlapijai brandinta mėsa yra rūgštesnė, atsiskleidžia kraujo/serumo ir metalo prieskoniai [36]. Per paskutiniuosius dešimtmečius šlapiasis brandinimas beveik pakeitė tradicinį, sausąjį brandinimą, nes taip brandinant išgarinama mažiau vandens dėl to gaunamos didesnės brandintos mėsos išeigos. Taip pat šlapiuoju būdu brandintą mėsą lengviau transportuoti, todėl sumažėja taršos rizika [37]. Šlapiajam brandinimui nėra taikomi tokie griežti aplinkos sąlygų reikalavimai. Brandinimo patalpoje palaikoma maždaug 0-7,2 °C temperatūra ir 60-80 proc. deguonies lygis, kad mėsa neprarastų savo spalvos. Toks brandinimas užtrunka trumpiau – pageidaujamos savybės atsiskleidžia po 4-10 dienų brandinimo. Pagrindinių skonių atsiradimą lemia tie patys brandinimo metu vykstantys procesai, kaip ir sausajame brandinime [3].

Nors tiek šlapiojo, tiek sausojo mėsos brandinimo metu vyksta panašūs procesai, galutinio produkto savybės skiriasi. Didžiausi yra mikrobiologiniai skirtumai ir vandens kiekis galutiniame produkte, o tai lemia produkto svorio kitimus, skonio, tekstūros, aromato, minkštumo skirtumus, nes skonį ir kitas savybes lemiantys junginiai yra labiau sukoncentruojami [3]. Li ir kitų (2013) tyrimas parodė, kad sausai brandintos mėsos svoris sumažėja 15,2 proc., o šlapijai brandintos – 2,4 proc. Tokį svorio pokyčių skirtumą lemia vandens išgarinimas ir mėsos paruošimas vartojimui: sausai brandintą mėsą reikia labiau apipjaustyti, nes didelė jos dalis dėl savo sausumo yra nebetinkama vartojimui [38]. Anot Li ir kitų (2014) mėsa, kurioje prieš brandinimą buvo 73,9 proc. vandens, po devyniolikos dienų sauso brandinimo prarado 4 proc., o po devyniolikos dienų šlapio brandinimo prarado 1,2 proc. vandens [39]. Tačiau pagal Lee ir kitų (2019) atliktus tyrimus, sausai brandintos mėsos ir šlapijai brandintos mėsos drėgmės kiekis iki dvidešimt pirmos brandinimo dienos buvo labai panašūs ir tik nuo tada pradėjo staigiai kisti, kuomet dvidešimt aštuntą brandinimo dieną vandens kiekio skirtumas skirtingai brandintoje mėsoje buvo maksimalus [3].

Kadangi mėsos brandinimas yra gana ilgas procesas, jo metu sunku išvengti įvairios mikrobiologinės taršos. Brandinant šlapiuoju būdu, vakuuminė pakuotė mėsą apsaugo nuo nepageidaujamos mikrobinės taršos, lėtinančios brandinimą ir mažinančios mėsos saugą. Po devyniolikos dienų brandinimo Li ir kiti (2014) nustatė, kad sausai brandintoje mėsoje bendras bakterijų skaičius buvo ženkliai didesnis, negu šlapijai brandintoje mėsoje [39].

1.4.2. Brandinimo metu vykstantys biocheminiai procesai

Mėsos brandinimo metu mėsa pasidaro minkštesnė, sultingesnė, lengviau virškinama. Šį procesą katalizuoja proteolitiniai fermentai, kuriems veikiant brandinimo metu gerinamas mėsos jungiamąjį audinį sudarančio baltymo kolageno tirpumas. Žinoma, kad šį procesą skatina bent keturios proteolitinių fermentų grupės: kalpainai, katepsinai, kaspazės ir proteasomos [40]. Brandintos mėsos tekstūros pokyčius nulemia ne tik pasikeitęs baltymų, bet vandens ir riebalų, kiekis. Toliau darbe plačiau aprašomi mėsos brandinimo metu vykstantys procesai ir už juos atsakingi junginiai.

Manoma, kad kalpains proteazės sistema atlieka dominuojantį vaidmenį mėsos minkštėjimo procese [41]. μ -kalpains ir m-kalpains yra izomerai, kurių aktyvumui reikalingos mikromolinės arba milimolinės kalcio koncentracijos [42]. Kadangi kalcio koncentracija mėsos ląstelių citozolyje yra mikromoliniame diapazone, m-kalpains atlieka svarbų vaidmenį skaldant miofibrinius baltymus. Kalpainai gali suskaidyti titiną, nebuliną, desminą, tropomioziną, troponiną-T ir C-baltymus, tačiau jie neturi įtakos miozinui ir aktinui [43]. Kalpainai yra jautrūs autolizei ir jų veikimą gali reguliuoti endogeninis inhibitorius kalpastatinas. Antras veiksnys lėtinantis kalpains aktyvumą – sumažėjusi pH vertė (5,5-5,6) raumeniniame audinyje. Šie du veiksniai paaiškina, kodėl brandinant mėsą ilgą laiką tarpą, mėsos minkštėjimo procesas sustoja [43].

Katepsinai yra rūgštinių lizosomų proteazių grupė, kuri, kaip manoma, dalyvauja mėsos minkštėjime brandinimo metu. Plačiai ištirtos penkios katepsinės endopeptidazės grupės: katepsinai B, D, E, H ir L [44]. Šios proteazės gali hidrolizuoti daugelį tų pačių substratų, kaip kalpains, tačiau papildomai geba paveikti ir mioziną bei aktiną. Vis dėlto, kyla daug diskusijų dėl katepsino vaidmens mėsos brandinime, nes katepsinai neturi tiesioginio kontakto su miofibriliniiais baltymais, kaip kalpainai. Taip pat, šios proteazės neturi didelių reikalavimų terpės pH bei pasižymi dideliu afiniškumu su miozinu ir aktinu, todėl nei vienas iš jų nesukelia raumeninio audinio struktūros degradacijos, ir neturi įtakos mėsos brandinimui [45]. Nepaisant to, visuotinai pripažinta, kad mėsą brandinant per ilgai, lizosominė membrana susilpnėja ir atpalaiduoti katepsinai pasklinda į tarpfibrilinę erdvę bei katalizuoja baltymų skaldymą [43].

Multikatalitinių proteinazių kompleksas - tai dar viena galima fermentinė sistema lemianti mėsos minkštėjimą brandinimo metu. 20S proteosoma yra fermento branduolio kompleksas, kuris buvo tyrinėjamas dėl galimo poveikio raumeninio audinio minkštėjimui. Pasak Roberts ir kitus (1999), galvijų proteasomos sugeba skaldyti miofibrilinius baltymus, įskaitant nebuliną, mioziną, aktiną ir tropomioziną. Tokie 20S proteosomos sukelti pokyčiai siejami su mėsos suminkštėjimu. Vis dėl to proteolizės modelis pagal 20S proteosomas, neatspindi anksčiau aprašyto mėsos minkštėjimą lemiančių baltymų hidrolizės modelių, todėl dvejotama ar multikatalitinių proteazių kompleksas tikrai turi įtakos mėsos brandinimui [46].

Kitas veiksnys, kuris gali lemti mėsos minkštėjimą brandinimo laikotarpiu, tai užprogramuota ląstelių mirtis [47]. Didelė cisteino peptidazių grupė, vadinama kaspazėmis. Kaspazės yra susijusios su apoptoze ir negyvų ląstelių pašalinimu. Jos dalyvauja ir raumenų skaidulų degradacijoje, skaldant miofibrilinius baltymus. Kaspazės yra skirstomos į iniciatorines ir efektorines, priklausomai nuo jų veikimo vietos ląstelių apoptozės kelyje. Kaspazės išlieka gyvos po gyvulio paskerdimo ir jų vaidmuo mėsos minkštėjime yra inaktyvuoti kalpastatina, tokių būdu didinant kalpains aktyvumą. Tačiau tikslus kaspazės vaidmuo ir biocheminis mechanizmas mėsos brandinimo ir minkštėjimo metu nėra visiškai išaiškintas [43].

1.4.3. Už brandinimo metu vykstančius mėsos skonio pokyčius atsakingi junginiai

Mėsos brandinimo metu, proteolitinis mėsos baltymų skaldymas į trumpus peptidus, nukleotidus, laisvas amino rūgštis ir kitus junginius, į kurių sudėtį įeina azotas, lemia mėsos skonio pokyčius brandinimo metu [43]. Lee ir kiti (2017) teigia, kad didelę įtaką naujų skonių atsiradimui turi ir inozino 5'-monofosfatas ir redukuojantys cukrūs [48]. Kita vertus, cheminės ir biocheminės reakcijos, ypač lipidų oksidacija ir baltymų oksidacija, gali sukelti skonio pablogėjimą dėl antrinių lipidų oksidacijos produktų ir sieros junginių susidarymo ant skerdenų ir mėsos gabalų paviršių [49]. Žinoma, jei mėsa yra užšaldyta vakuuminėje pakuotėje, oksidacijos reakcijos neturės didelės įtakos mėsos skoniui [43]. Tačiau brandintos mėsos skonio pasikeitimui didelę įtaką turi vandens kiekio sumažėjimas. Išgaruodamas, vanduo sukonzentruoja skonį nulemiančias molekules, todėl skonis pasidaro dar intensyvesnis [48].

Įvairūs tyrimai rodo, jog brandinant mėsą, joje ženkliai padidėja laisvųjų aminorūgščių ir peptidų kiekis, dėl brandinimo metu veikiančių proteolitinų fermentų, kurie skaldo baltymus. Tai yra lemiamas mėsos skonio pasikeitimo veiksnys [50]. Tyrimai rodo, kad greičiausiai aminorūgščių kiekis didėja per pirmąsias septynias brandinimo dienas. Po septynių dienų aminorūgščių susidarymas pradeda lėtėti, kol dvidešimt pirmą brandinimo dieną beveik visai sustoja [3]. Kim ir kiti (2016) įrodė, kad daugiau laisvųjų aminorūgščių būna sausuoju būdu brandintoje mėsoje (pvz.: glutamo rūgštis, izoleucinas, leucinas, fenilalaninas, tirptofanas, tirozinas, valinas), lyginant su mėsa, kuri buvo brandinta šlapiuoju būdu. Tai gali būti siejami su tuo, kad sauso brandinimo mėsoje dėl vandens garavimo ir / arba didesnio proteolizės greičio baltymų koncentracija yra didesnė. Tačiau šie procesai dar nėra iki galo ištirti [33]. Žinoma, kad Arg, His, Ile, Leu, ir Phe aminorūgštys suteikia mėsai kartų skonį, o Ala, Gly, Ser, ir Thr suteikia mėsai saldų skonį. Karčiųjų laisvųjų aminorūgščių koncentracija mėsoje po brandinimo padidėja vidutiniškai 2 kartus, o saldžiųjų – vidutiniškai 1,5 karto [48].

Laisvosios aminorūgštys keičia mėsos skonį dar ir dėl to, kad jos gali būti aromatinių lakiųjų medžiagų pirmtakais Mailardo ir Štrekerio degradacijos reakcijose [51]. Šių reakcijų metu susidaro daug skirtingų mažos molekulinės masės junginių, kurie lemia brandintos mėsos aromatą, apdorojant ją termiškai.

Raumenyse esantis inozino 5'-monofosfatas (IMP) pasižymi stipriu sinergistiniu ryšiu su laisvosiomis aminorūgštimis. Vėlesnėse mėsos brandinimo stadijose glutamo rūgštis reaguoja su IMP, susidaro mononatrio druska ir taip mėsoje atsiranda *umami* skonis [48, 52]. Šis skonis apibūdinamas, kaip pikantiškas, būdingas sultiniams ir mėsos patiekalams. Lee ir kitų (2017) duomenimis, brandinant mėsą, IMP koncentracija mažėja, o hipoksamino ir aminorūgščių koncentracija didėja. Mažiausia IMP koncentracija nustatoma 21-28 brandinimo dieną ir būna mažesnė sausai brandintoje mėsoje (55,07 mg / 100 g), negu šlapiai brandintoje mėsoje (87,14 mg / 100 g) [3].

Mėsos brandinimo metu gali susidaryti redukuojantys cukrūs. Jų susidarymas gali būti dvejopas: defosforilinant IMP ir tada inoziną suskaldant iki ribozės ir hipoksantino, arba IMP skylant iki hipoksantino ir ribozės-5-monofosfato. Ši reakcija vyksta ankstyvojoje mėsos brandinimo stadijoje. Brandinant mėsą IMP koncentracija mažėja, bet didėja jos skilimo produktų – hipoksantino ir redukuojančių cukrų – kiekis mėsoje [3]. Padidėjęs redukuojančių cukrų kiekis teigiamai paveikia brandintos mėsos skonį, nes suteikia jai saldumo ir yra aromatinių junginių, susidarančių Mailardo reakcijos metu, pirmtakas [51]. Nustatyta, kad dvidešimt aštuntąją brandinimo dieną sausai brandintoje mėsoje cukrų koncentracija buvo 14,37 mM, o šlapiai brandintoje mėsoje 10,16 mM [3].

Brandintos mėsos kokybei gali turėti įtakos du riebalų kitimo procesai: hidrolizė ir oksidacija. Lipolitiniai fermentai atskiria riebalų rūgštis nuo triglicerolio, o skylant fosfolipidams, kurių gausu plazmonėse membranose, susidaro neorganiniai fosfatai. Taip mėsos brandinimo metu susidaro nesočiosios riebalų rūgštis, kurios yra jautrios laisviesiems radikalams, ir tai lemia mėsos skonio pablogėjimą [43], bei paskatina mioglobino oksidaciją. Kai mioglobinas ir riebalai kontaktuoja mėsoje, įvyksta mėsos spalvos pasikeitimą lemianti reakcija [53]. Antriniai lipidų oksidacijos produktai, tokie kaip malonaldehidas ir 4-hidroksinonenas, gali prisijungti prie nukleofilinių histidino liekanų mioglobine, kakeisdamimėsos spalvą [43].

1.4.4. Mikrobiologiniai pokyčiai vykstantys mėsos brandinimo metu

Brandinant mėsą labai svarbu atsižvelgti į jos mikrobiologinį užterštumą, nes nuo to priklauso ar produktas yra saugus vartojimui. Brandinant mėsą jos mikrobiologinė tarša didėja, nepriklausomai nuo mėsos brandinimo būdo, tačiau ant sausai brandintos mėsos įprastai randama daugiau bakterijų, nes brandinimui nenaudojama plėvelė, kuri apsaugo mėsa nuo mikroorganizmų patekimo iš aplinkos. Atliekant mikrobiologinę mėsos analizę dažniausiai įvertinamas bendras bakterijų, Enterobacteriaceae, pienarūgščių bakterijų, mielių ir pelėsių skaičius ant mėsos paviršiaus ir mėsos viduje [39].

Viena iš mėsoje dominuojančių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų yra *E.Coli* bakterija. Dažniausiai užterštumas šia bakterija atsiranda dėl kryžminės taršos ir gali būti fekalinės arba nefekalinės taršos indikatorius. Anksčiau būtent ši bakterija buvo naudojama kaip rodiklis, mikrobiologiniam užterštumui vertinti, tačiau Mossel ir kiti (1957) rekomendavo užterštumą

vertinti pagal *Enterobacteriaceae*, nes *E.Coli* bakterija žūva mėsą dehidratuojant arba šaldant, todėl pagal šią bakteriją netikslinga vertinti užterštumą kitomis šiai šeimai priklausančiomis bakterijomis [54, 55]. *Enterobacteriaceae* šeimai priklauso tiek sveikatai nepavojingos rūšys, tiek žalingi patogenai, tokie kaip *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella*, *Shigella* ir kitos ligas sukeliančios bakterijos. Šios šeimos bakterijos gali būti aerobinės arba anaerobinės, todėl aptinkamos tiek sauso, tiek šlapio brandinimo mėsoje [55].

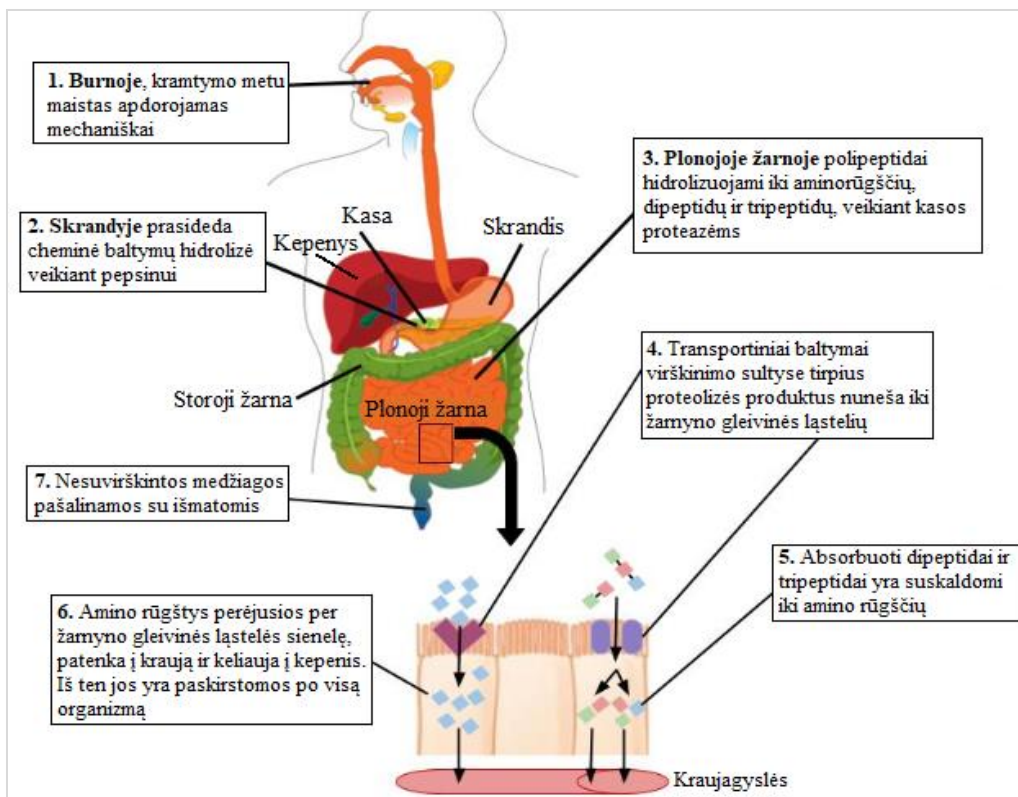
Pienarūgščių bakterijų buvimas maisto produktuose ne visada lemia prastesnę maisto produktų kokybę, bet kai kurios pienarūgščių bakterijų linijos lemia maisto gedimą. Šios bakterijos randamos dirvožemyje, augaluose, gyvūnų odoje, epitelyje, abiotiniuose paviršiuose ir maisto perdirbimo įmonėse, todėl ant mėsos atsiranda dėl kryžminės taršos [56]. Šlapio brandinimo mėsoje šių bakterijų aptinkama daugiau, nes pienarūgštės bakterijos yra fakultatyviniai anaerobai, tačiau jų randama ir sauso brandinimo mėsoje, kur mėsos paviršius nuolat kontaktuoja su oro deguonimi. Pienarūgštės bakterijos mėsoje gali būti obligavtyvinės heterofermentacinės arba fakultatyvinės heterofermentacinės. Pirmu atveju jos gamina pieno rūgštį, acto rūgštį, anglies dioksidą ir etanolį, o antruoju atveju – gamina pieno rūgštį ir gliukozę. Esant aerobinėms sąlygoms ir žemai gliukozės koncentracijai, mėsos gedimą lemiančios pienarūgštės bakterijos naudoja pieno rūgštį ir gamina acto rūgštį ir tai lemia rūgštų, acto skonį, kuris mėsoje yra nepageidaujamas [57].

Mėsoje dažniausiai aptinkamos šios mielės *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Phodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* ir *Trichosporon* [58]. Mėsos užterštumas mielėmis lemia jos skonio pablogėjimą, mėsa pasidaro gliuti, praranda spalvą, tai gali būti pavojinga žmonėms, turintiems alergiją mielėms [59].

Mėsoje dažniausiai aptinkami šie pelėsiniai grybai: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Monilia*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sporitrichum*, ir *Thamnidium*. Nustatyta, kad ant mėsos pelėsiniai gali augti, kai pH vertė yra nuo 2 iki 11, vandens aktyvumas nuo 0,62 iki 0,995, temperatūra nuo 1 °C iki maždaug 60 °C. Mėsos gedimas dėl pelėsių augimo pasireiškia riebalų skilimu, žalių dėmių, nebūdingo kvapo ir lipnumo atsiradimu. Taip pat, pelėsiniai į maistą dažnai išskiria mikotoksinus, kurie dažnai pasižymi kancerogeninėmis savybėmis [58].

1.5. Gyvūninės kilmės baltymų virškinamumo ypatumai

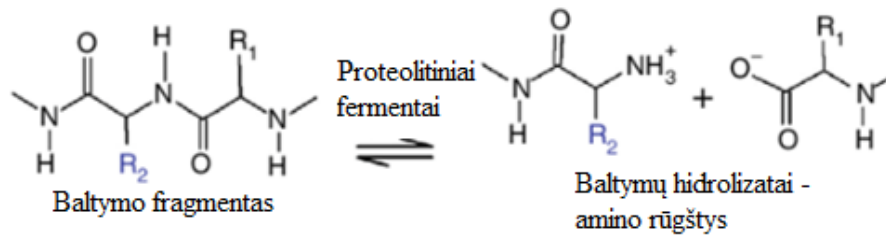
Virškinimas – procesas, kurio metu su maistu gaunamos medžiagos yra paverčiamos monomerinėmis, kurias organizmas ar ląstelė gali panaudoti tolesnei molekulių sintezei kaip žaliavą ar kaip energijos šaltinį. Žmogus turi gerai išsivysčiusią virškinimo organų sistemą, kurią sudaro virškinamasis traktas ir virškinimo liaukos (žr. 3 pav.). Liaukų pagaminti fermentai netirpiai maisto medžiagas paverčia tirpiomis, kurios yra absorbuojamos ir panaudojamos organizmo gyvybinei funkcijai palaikyti [60].



3 pav. Baltymų virškinimo sistema žmogaus organizme [61]

Burna yra pirmoji virškinamojo trakto dalis (žr. 3 pav.), susidedanti iš kelių struktūrų, kurios lemia virškinimo proceso pradžią [62]. Burnoje išskiriami fermentai baltymų molekulių nevirškina, todėl čia daug baltymų turintis maisto gumulėlis tik yra apdorojamas mechaniškai, sudrėkinamas ir toliau keliauja į skrandį [63].

Skrandyje prasideda baltymų virškinimas (žr. 3 pav.). Skrandis išskiria proteazes ir druskos rūgštį, kuri naikina arba slopina bakterijas, denatūruoja maiste esančius baltymus ir sudaro palankias sąlygas skrandžio fermentų veiklai. Skrandyje baltymai suskaidomi iki įvairaus ilgio peptidų, kurių mišinys vadinamas peptonu (žr. 4 pav.). Du svarbiausi skrandžio fermentai yra pepsinas ir gatriksinas, kurie sudaro apie 95% skrandžio sulčių proteolitinio aktyvumo [64]. Pepsinas – svarbiausias skrandyje esantis fermentas – suskaldo apie 20 proc. peptidinių jungčių, esančių suvartotuose baltymuose [65]. Šis fermentas efektyviausias skaldant peptidinius ryšius tarp hidrofobinių ir, pageidautina, aromatinių aminorūgščių, tokių kaip fenilalaninas, triptofanas ir tirozinas. Skaldymas dažniausiai prasideda nuo C polipeptidinės grandinės galo [66]. Pepsinas taip pat skaido sunkiai virškinamą, mėsoje esantį jungiamąjį baltymą kolageną [39].



4 pav. Fermentinės baltymų hidrolizės schema [67]

Žarnynas – organų sistema, kurioje vyksta maisto medžiagų virškinimas, suvirškintų, tirpių molekulių absorbcija ir šalutinių, nesuvirškintų medžiagų pašalinimas (žr. 3 pav.). Pagrindinės žarnyno dalys yra plonoji žarna ir storoji žarna. Plonoji žarna prasideda nuo dvylikapirštės žarnos ir joje vyksta paskutinė baltymų hidrolizės stadija. Anot Praškevičiaus ir kitų (2013) kasos sekretuojami fermentai yra neaktyvūs kol nepatenka į dvylikapirštę žarną ir yra aktyvuojami. Pagrindiniai baltymus hidrolizuojantys fermentai, esantys plonojoje žarnoje – tripsinas, chimotripsinas, karboksipeptidazės, elastazės ir aminopeptidazės. Tripsinas hidrolizuoja peptidinius ryšius, kuriuos sudarant dalyvauja Lys ir Arg aminorūgščių karboksigrupės. Chimotripsinas aktyviausiai hidrolizuoja peptidinius ryšius, kuriuos sudarant dalyvauja Phe, Tyr, Trp karboksigrupės. Fermentas karboksipeptidazė yra egzopeptidazė t.y. atskelia po vieną amino rūgštį nuo polipeptido C galo. Karboksipeptidazė A atskelia aromatinės aminorūgštis, o karboksipeptidazė B atskelia šarminės diamino rūgštis [68]. Elastazė skaldo elastiną, kuris kartu su kolagenu lemia jungiamojo audinio mechanines savybes [69].

Baltymų hidrolizė plonojoje žarnoje vyksta trimis lygiais: ertminiū, kai virškinimo fermentai veikia žarnų sultyse, membraniniū, kai fermentai veikia prie žarnos epitelio gaurelio membranos ir ląsteliniū, kai hidrolizę vykdo fermentai esantys pačiame enterocite [68]. Membraninis virškinimas vyksta sterilioje terpėje, nes mikroorganizmai yra per dideli, kad patektų tarp žarnyno kutikulės ir mikrogaurelių [70]. Iš plonosios žarnos spindžio amino rūgštys rezorbuojamos į enterocitų vidų, o po to į kraują. Rezorbuojama apie 98% amino rūgščių. Pro žarnyno gleivinę į ląsteles amino rūgštis perneša baltyminiai nešikliai kartu su Na⁺ jonais (pro mukozinę plazminę membraną).

Storajame žarnyne nesuvirškintas maistas beveik neskaidomas, nes čia nedaug fermentų, o su maistu patekusius plonosios žarnos fermentus suskaido mikroflora. Storajame žarnyne intensyviai vyksta baltymų puvimo ir rūgimo procesai. Nesuvirškintos maisto medžiagos kartu su išmatomis pašalinamos iš organizmo [61, 68].

1.5.1. Pieno baltymų virškinamumas

Remiantis baltymų virškinamumo, virškinimo produktų absorbcijos greičio (matuojama atsižvelgiant į aminorūgščių atsiradimą plazmoje) ir jų poveikio baltymų sintezei tyrimų

rezultatais, kazeinas vadinamas „lėtuju“ baltymu, o išrūgų baltymai – „greitaisiais“ baltymais [71].

Žinoma, kad į skrandį patekus maisto produktui su dideliu kazeino kiekiu (daugiau negu 50% viso baltymų kiekio), esant pH 2, kazeino baltymai koaguliuoja sudarydami kietą, tankios struktūros koaguliavusių baltymų sutrauką, todėl skrandyje esantys virškinimo fermentai negali pasiekti kazeino peptidinių ryšių ir hidrolizuoti baltymo molekules. Dėl to sulėtėja virškinimas, skrandis vėliau ištuštinamas ir lėtesnė aminorūgščių absorbcijos kinetika [72]. Fermentas chimozinas, geba nutraukti peptidinį ryšį išorinėje, hidrofilineje micelės dalyje, palikdamas hidrofobinę dalį viduje, kuri be „apsauginio“ sluoksnio koaguliuoja sudarydama kietą sutrauką. Taigi fermentas, skystį paversdamas kieta medžiaga, apsunkena kazeino baltymų virškinimą. Dėl šios priežasties kazeino molekules aminorūgštis atpalaiduoja iš lėto ir taip aprūpindamas organizmą reikalingomis medžiagomis palaipsniui [73].

Virškinant maisto produktus, kuriuose yra daugiau greitujų baltymų, atvirkščiai, susidaro vandenyje tirpūs baltymų agregatai, todėl skrandis greičiau ištuštinamas, medžiagų hidrolizė žarnyne didesnė ir greitesnė aminorūgščių absorbcija [72]. Išrūgų baltymus sudaro du pagrindiniai baltymai, t.y. β -laktoglobulinas (80%) ir α -laktalbuminas (20%). β -laktoglobulinas dėl savo susilanksčiusios struktūros yra atsparus pepsinui rūgštinėje skrandžio aplinkoje, tačiau kai kurie tretinės baltymo struktūros pakeitimai gali pagerinti molekules virškinamumą [74]. Apdorojimas aukšta temperatūra, aukštu slėgiu, emulsifikacija ir putojimu, gali lemti molekules išsilankstymą, dėl kurio peptidiniai ryšiai pepsinui tampa prieinami. Nepaisant to, β -laktoglobulinas gali būti hidrolizuojamas tiek tripsinu, tiek chimotripsinu, o α -laktalbuminas visais proteolizės fermentais, įskaitant ir pepsiną [75].

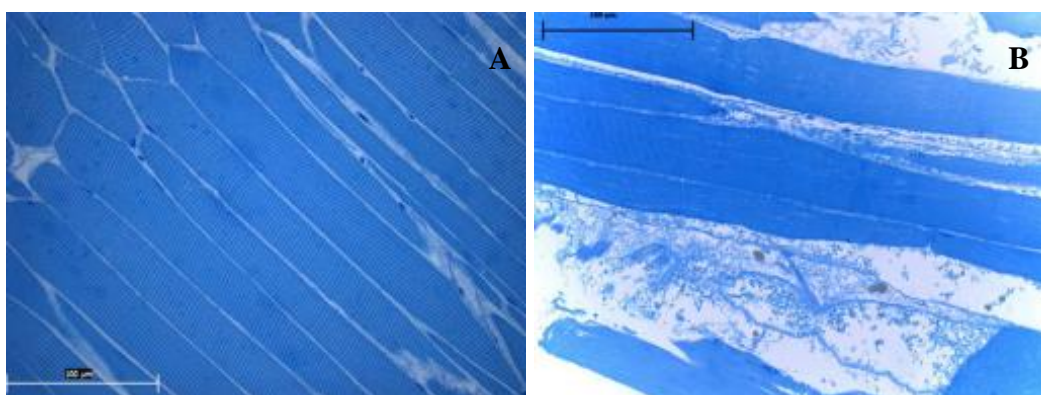
Pagrindinių pieno baltymų elgesio skrandyje skirtumą galima paaiškinti remiantis jų molekuline struktūra, fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis. Kazeinai yra netirpūs, kai pH 4,6 (izoelektriniame taške), o natūralūs išrūgų baltymai išlieka tirpūs, tačiau esant tokiam pH gali susikaupti, jeigu yra denatūruoti šiluma arba sujungti kartu su kazeiniais [76]. Vis dėlto supratimas apie mechanizmus, kontroliuojančius šių baltymų elgesį virškinimo trakto metu, yra labai ribotas [77].

1.5.2. Mėsos baltymų virškinamumas

Raumeninis audinys, susideda iš daugelio skirtingų baltymų iš kurių kiekvienas atlieka tam tikras funkcijas. Šie baltymai yra klasifikuojami į tris stambias grupes: miofibrilines, stromos ir sarkoplazmos baltymus [78]. Mėsoje randami tirpūs vandenyje sarkoplazmos baltymai, sudaro 11,5 proc. visos raumeninės masės, koncentruotuose druskų tirpaluose tirpūs miofibriniai baltymai, sudaro 5,5 proc. raumens. Likusi raumenyse esanti baltymų masė susideda iš jungiamojo audinio baltymų (kolageno ir elastino) bei organelėse esančių audinių baltymų.

Raumeninis audinys yra sudarytas iš skaidulų, dar vadinamų miofibrilėmis, kurios sudarytos iš miofibrilinių baltymų, iš kurių svarbiausi yra aktinas ir miozinas [78]. Kamin–Belsky ir kiti

(1996) savo darbuose aprašė miozino proteolizę keturiais skirtingais fermentais: pepsinu, tripsinu, chimotripsinu ir papainu [79]. Tačiau teigiama, kad miozino virškinamumo modelis negali atspindėti visų miofibrilinių baltymų virškinimo, nes daugumos miofibrilinių baltymų struktūra, dėl gebėjimo formuoti baltymas-baltymas arba baltymas-lipidas kompleksus, yra žymiai sudėtingesnė negu miozino, o tai gali turėti įtakos jų virškinamumui [80]. Nustatyta, kad miozino proteolizės procesas pagerėja, kai mėsa yra termiškai apdorota [81] ir pablogėja, kai dėl cheminės oksidacijos miozino molekulėje susidaro skersinių ryšių [79]. Efektyviausias miofibrilinių baltymų virškinimas buvo pasiektas taikant proteolizę pepsinu skrandžio fazėje ir chimotripsinu ir tripsinu žarnyno fazėje, tačiau apie patį miofibrilinių baltymų hidrolizės mechanizmą žmogaus organizme žinoma dar labai nedaug. 5 paveiksle pavaizduoti miofibrilių pokyčiai virškinimo metu [79].



5 pav. Termiškai apdorotos mėsos miofibrilių vaizdas per mikroskopą. A – prieš virškinimą; B – po virškinimo 180 min [82]

Kita labai svarbi mėsa sudaranti dalis - jungiamasis audinys.– Jį sudaro stromos baltymai: kolagenas, elastinas ir retikulinas [78]. Žmogaus virškinamajame trakte kolageno molekulės veikiant pepsinui beveik visiškai suhidrolizinos iki aminorūgščių ir oligopeptidų, kurių paviršius yra mažiau hidrofobiškas, todėl į organizmą gali būti absorbuojamos per plonųjų žarnų gaureliuose esančius limfinius kapiliarus – enterocitus [39]. Liang ir kiti (2014) nustatė, kad virškinant kolageną gaunama daug Gly-Pro-Met peptidų, kurie pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu. Terminis mėsos apdorojimas bent 60-65 °C temperatūroje lemia kolageno molekulės susiskaldymą, susitraukimą ir tirpimą, todėl kolageno turintys jungiamieji audiniai, kurie yra apgaubę raumeninio audinio skaidulas, suminkštėja ir taip pagreitinamas virškinimo procesas [83]. Elastazė – endopeptidazė, kuri skaido jungiamojo audinio baltymą elastiną, turintį daug Gly ir Ser. Geriausiai hidrolizuoja tuos peptidinius ryšius, kuriuos sudarant dalyvauja hidrofobinės aminorūgštys (Gly, Ala, Ser).

Saydas ir kiti (2016) tyrė virtos mėsos virškinimo metu susidariusius junginius. Iš viso buvo rasta 940 nesikartojančių peptidų skrandžio fazėje ir 989 žarnyno fazėje. Identifikuota, kad jie sudarė 71 skirtingų baltymų, iš kurių 43 buvo priskirti dvejoms virškinimo fazėms, 20 iš jų būdingi skrandžio fazei ir 8 būdingi žarnyno fazei. Sayd ir kiti (2016) teigia, kad baltymai susiję

su raumenų struktūra ir judėjimu buvo suhidrolizinti pirmiausia ir jų virškinimas daugiausia vyko plonojoje žarnoje, visi kiti baltymai virškinami maždaug po lygiai skrandžio ir žarnyno fazėse [84].

1.5.3. Gyvūninės kilmės baltymų virškinimo metu susidarantys peptidai ir jų biologinis aktyvumas

Biologiškai aktyvūs peptidai, kurie virškinimo metu dėl proteolizės susidaro iš maiste esančių baltymų, dėl savo sveikatinančių savybių, darosi vis populiariesni, kaip sudedamoji funkcinio maisto ir vaistų dalis [85]. Šie bioaktyvūs peptidai gali būti naudojami kaip prevencinė priemonė, siekiant kontroliuoti įvairias chroniškas ligas. Be to, kad šių peptidų tolimesnė hidrolizė suteikia organizmui reikalingos energijos bei aprūpina nepakeičiamomis aminorūgštimis, jie pasižymi antihipertenzinėmis, antioksidacinėmis, priešuždegiminėmis, antimikrobinėmis, osteoprotekcinėmis, imunomoduliacinėmis, opioidinėmis ir kitomis, organizmui naudingomis bioaktyviomis savybėmis [86]. Šie peptidai nėra aktyvūs, kai įeina į baltymo sudėtį, tačiau gali būti aktyvinami, kai atpalaiduojami fermentinės hidrolizės metu. Maisto baltymų fermentinė hidrolizė galima dviem atvejais – maisto gamybos metu, naudojant įvairias biotechnologines priemones, bei maisto virškinimo metu bei. Atliekami intensyvūs maisto kilmės biologiškai aktyvių peptidų tyrimai parodė, kad jų gausu ne tik žuvyje, kiaušiniuose, sojų pupelėse, žemės riešutuose, linų sėmenyse, įvairiose grūdinėse kultūrose, bet ir mėsoje bei pieno produktuose [85]. Dvi maisto mokslo daugiausiai tyrinėjamos biologiškai aktyvių peptidų savybės yra antihipertenzinės ir antioksidacinės savybės.

Vienas iš pagrindinių veiksnių žmogaus organizme, atsakingų už kraujo spaudimo kontrolę yra renino-angiotenzino-aldosterono sistema (RAAS). Trys pagrindiniai komponentai palaikantys šią sistemą yra reninas, angiotenzinas II ir aldosteronas [87]. Reninas katalizuoja angiotenzinogeno skilimo reakciją, kurios metu susidaro angiotenzinas I. Toliau veikia angiotenziną konvertuojantys fermentai (AKF), kurie biologiškai neaktyvų angiotenziną I paverčia angiotenzinu II, kuris skatina vazokonstrikciją, aldosterono ir vazopresino sekreciją, natrio jonų reabsorbciją inkstų kanalėliuose, oksidacinį stresą, mažina inkstų aprūpinimą krauju bei renino atpalaidavimą iš inkstų [88]. Sutrikusi RAAS funkcija sukelia inkstų, širdies ir kraujagyslių ligas: širdies nepakankamumą, miokardo infarktą, insultą, hipertenziją, širdies nepakankamumą, aterosklerozę [89]. Kadangi žalingo angiotenzino II susidarymą lemia renino ir AKF fermentai, šių fermentų slopinimas gali būti efektyvus metodas nuo RAAS priklausančių ligų kontroliavimui. Žinoma, kad tam tikri bioaktyvūs peptidai pasižymi šiomis inhibitorinėmis savybėmis.

Tagliazuchi ir kiti (2017) atliko tyrimus, kurių metu tyrė angiotenziną konvertuojančio fermento slopinimą biologiškai aktyviais peptidais, kurie atpalaiduojami po lieso ožkos pieno *in vitro* virškinimo. Tyrimo metu buvo identifikuota 18 skirtingų bioaktyvių peptidų, pasižyminčių AKF-slopinimo aktyvumu. Itin aukštu aktyvumu pasižymėjo tripeptidai valinas-prolinas-valinas

(VPV) ir izoleucinas-prolinas-prolinas (IPP), gauti β - ir κ -kazeino proteolizės metu. Suvirškintuose mėginiuose šių peptidų ir buvo rasta daugiausiai [90]. Hasan ir kitų (2006) atlikto mėsos *in vitro* virškinamumo tyrimo metu buvo identifikuoti ir išskirti du didžiausiu AKF-slopinimu pasižymintys peptidai HERDPHTHIKWGD ir PNRIKYGD. Taip pat nustatyta, kad po tolimesnės šių peptidų proteolizės, gauti fermentų fragmentai praranda savo bioaktyviasias savybes [91].

Oksidacija – tai cheminė reakcija, kurios metu susidaro laisvieji radikalai, katalizuojantys grandininės reakcijas, kurių metu pažeidžiamos gyvybiškai svarbios molekulės, tokios kaip lipidai, DNR ir baltymai. Šie pažeidimai sutrikdo ląstelių homeostazę, todėl pradeda vystytis įvairios ligos, tokios, kaip aterosklerozė ar vėžys [92]. Gyvuosiuose organizmuose yra išsivysčiusi kompleksinė apsauginė sistema, apsauganti organizmą nuo oksidacinio streso. Čia veikia fermentiniai ir nefermentiniai antioksidantai, kurie susijungdami su reaktyviosiomis dalelėmis sudaro stabilius junginius ir taip padeda organizmui išlaikyti oksidacinį balansą [93]. Bioaktyvūs peptidai, virškinimo metu susidarantys iš maiste esančių baltymų, yra vis labiau tyrinėjami dėl savo antioksidacinių savybių, siekiant sukurti naujus vaistus ir funkcionaliojo maisto ingredientus.

Li ir kiti (2020) atliko tyrimą, kurio metu buvo tiriami iš buivolės pieno, po *in vitro* virškinimo, gauti bioaktyvūs peptidai. Kaip patys svarbiausi, pasižymintys antioksidacinėmis savybėmis, išskirti FFVAPFPEVFGK, HIQKEDVPSEK ir YLGYLEQLLR, kurie yra α -kazeino proteolizės produktai [94]. Mora ir kiti (2017) tyrė virtos jautienos *in vitro* virškinimo metu atpalaiduotus biologiškai aktyvius peptidus. Šio tyrimo metu buvo identifikuoti 58 skirtingi bioaktyvūs peptidai, 3 iš jų pasižymėjo stipriomis antioksidacinėmis savybėmis: GIITNWDDMEK, VDDLEGSLEQEKK ir DDLEGSLEQEKK, kurie buvo suhidrolizinti iš aktino, miozino-3 ir miozino-4 atitinkamai [95].

2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI

Tiriamasis darbas buvo atliktas 2018-2020 metais Kauno Technologijos Universitete, cheminės technologijos fakultete, maisto technologijų katedroje. Peptidų išskyrimas ir analizė atlikti 2020 metais *Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, esančiame Valensijoje, Ispanijoje.

2.1. Medžiagos ir reagentai

Pieno ir jo produktų gamybai buvo naudojamos šios medžiagos:

- Lieso pieno milteliai *PPHU Laktopol* (Varšuva, Lenkija). Sudėtis: 34 proc. baltymų, 1,2 proc. riebalų, 52,5 proc. laktozės, 8,3 proc. pelenų ir 4,0 proc. vandens;
- Mikrobiologinė transglutaminazė (MTG) *Activa YG* (*Ajinomoto*, Mesnil-Saint-Nicaise, Prancūzija). Tai mikrobinės kilmės fermento preparatas iš *Streptoverticulum mobaraense*, ant pakuotės nurodytas aktyvumas - 100 %;
- Mezofilinės bakterijos pieno rauginimui *Flora Danica* (*CHR Hansen*, Danija). Tai liofilizuotas mezofilinis raugas, kurį sudaro *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconoctoc mesenteroides* subsp. *cremoris* bakterijos.

Mėsos paruošimui naudotos šios medžiagos:

- Kiaulienos nugarinė (*musculus longissimus dorsi*), gauta iš įmonės AB „Krekenavos Agrofirma“ šviežia, atšaldyta, praėjus 48 h po skerdimą, laikyta šaldytuve 0–4 °C temperatūroje;
- Mėsos brandinimo plėvelė PA / PE (*Supravis Group Spolka Akeyjna*, Novotorunskas, Lenkija);
- Mėsos brandinimo plėvelė PET / Alox (*AZ-pack*, Kaunas, Lietuva).

1 lentelė. Brandinimui naudotų plėvelių charakteristikos

Charakteristikos	PA / PE	PET / Alox
Storumas, μm	65	52
Laidumas (O ₂) cm ³ /m ² x24hxbar	110	5
Laidumas (H ₂ O) m ³ /m ² x24h	9	2
Gamintojas	<i>Supravis Group Spolka Akeyjna</i>	<i>AZ-Pack</i>

Produktų virškinimui in vitro naudoti reagentai:

Kiaulių pepsinas (P7012), lipazė (L3126), kiaulių tulžies druskų ekstraktas (B631), kalio chloridas (KCl), kalio dihidrofosfatas (KH₂PO₄), natrio hidrokarbonatas (NaHCO₃), natrio chloridas (NaCl), magnio chlorido heksahidratas (MgCl₂(H₂O)₆), amonio karbonatas ((NH₄)₂CO₃), kalcio chloridas (CaCl₂), druskos rūgštis (HCl), natrio hidroksidas (NaOH) ir kiti cheminiai komponentai, kurie buvo bendrai naudojamos laboratorinės medžiagos.

Produktų virškinimo metu susidariusių junginių tyrimui naudoti reagentai:

Kiaušinio baltymo albuminas (15378), Folio-Ciocalteau reagentas (F9252), angiotenziną konvertuojantis fermentas (AKF) (iš triušio plaučių A6778), N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-Phe-Gly-Gly (FAPGG) (F7131), Fluoresceinas (F9015), L-leucinas (L8000), AccQ fluor-borato buferis, AccQ fluor-reagentas, AccQ tag-eluentas (*Waters Corp.*, Milifordas, JAV), trifluoractorūgštis ($C_2HF_3O_2$) (T6508), acetonitrilas (C_2H_3N) (34851), cinko sulfato heptahidratas ($ZnSO_4 \times 7H_2O$), kalio ferocianidas ($K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$), NaK tartratas ($KNaC_4H_4O_6 \times 4H_2O$), citrinų rūgšties monohidratas ($C_6H_8O_7 \times H_2O$), trichloracto rūgštis ($C_2HCl_3O_2$), natrio hidrofosfatas ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$), natrio dihidrofosfatas ($NaH_2PO_4 \times H_2O$), butilintas hidroksitoluenas ($C_{15}H_{24}O$), natrio chloridas (NaCl), druskos rūgštis (HCl), natrio hidroksidas (NaOH), tris ($C_4H_{11}NO_3$), natrio karbonatas (Na_2CO_3), vario (II) sulfatas ($CuSO_4$), Boraksas ($Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$), bevandenis acetonas (C_3H_6O), kalio fericianidas ($K_3[Fe(CN)_6]$), geležies (III) chloridas ($FeCl_3$) ir kiti naudoti cheminiai komponentai, kurie buvo bendrai naudojamos laboratorinės medžiagos.

2.2. Tyrimo objektai, jų paruošimas

2.1.1. Pieno apdorojimas transglutaminaze ir produktų gamyba

Pieno produktų virškinamumo tyrimams buvo naudojami 3 produktai: atgamintas pienas, raugintas pienas ir varškė.

Atgamintas pienas (pH 6,4) gautas 130 g lieso pieno miltelių ištirpinus 870 g distiliuoto vandens. Taip paruoštas atgamintas pienas pasterizuojamas 85 °C 5 min. vonelėje *JB Nova (Grant Instruments, Devisesas, Jungtinė Karalystė)*, tada atvėsinaamas iki 40 °C. Į atgamintą pieną pridedami skirtingi MTG kiekiai, tada mėginiai su fermentu inkubuojami 40 °C temperatūroje 3 val. Fermentas inaktyvuojamas pasterizuojant mėginius 85 °C vandens vonioje 5 min, mėginiai atvėsinaami ir iki tolimesnio tyrimo laikomi prie 4 °C. Mėginiai užkoduojami:

- P1 – pienas nepaveiktas MTG;
- P2 – pienas paveiktas 0,5 g/l MTG;
- P3 – pienas paveiktas 1 g/l MTG.

Rauginto pieno mėginiai gauti rauginant atgamino lieso pieno mėginius sausu mezofiliniu pienarūgščių bakterijų raugu. Pasterizuoto ir MTG paveikto atgaminto pieno mėginiai (P1, P2 ir P3) pašildomi iki 28 °C temperatūros, į juos įdedama po 0,03 % sauso raugo, gerai išmaišoma ir mišinys rauginamas 26-28 °C temperatūroje 12–14 val., termostate *D-30938 (GFL, Burgvedelis, Vokietija)*, kol pasiekiamas pH 4,6. Mėginiai atitinkamai užkoduojami:

- R1 – raugintas pienas pagamintas iš pieno, nepaveikto MTG;
- R2 – raugintas pienas pagamintas iš pieno, paveikto 0,5 g/l MTG;
- R3 – raugintas pienas pagamintas iš pieno, paveikto 1 g/l MTG.

Varškės mėginiai gauti 600 ml rauginto pieno (R1, R2 ir R3) tolygiai šildant iki 55–60 °C temperatūros vandens vonelėje *JB Nova* (*Grant Instruments*, Devisesas, Jungtinė Karalystė), maišant iki išsiskiriančių skaidrių išrūgų. Varškės grūdeliai nusauginami, išpilant ant audinio. Visi varškės mėginiai užkoduojami atitinkamai:

- V1 – varškė, pagaminta iš rauginto pieno be MTG (I1 – išrūgos);
- V2 – varškė, pagaminta iš rauginto pieno su 0,5 g/l MTG (I2 – išrūgos);
- V3 – varškė, pagaminta iš rauginto pieno su 1 g/l MTG (I3 – išrūgos).

2.1.2. Mėsos paruošimas

Mėsos virškinamumo tyrimui naudota skirtingomis sąlygomis brandinta kiaulienos nugarinė. Mėsos brandinimą ir jos sudėties pokyčių tyrimus 2018 m. pavasarį atlikto KTU Maisto produktų technologijos programos magistrantas Aurimas Aleksišūnas. Šiame magistro baigiamajame darbe pristatomi tolesni brandintos mėsos virškinamumo tyrimai.

Gabalais (apie 300g) supjaustyta kiaulienos nugarinė neįvilкта / įvilкта į skirtingą plėvelę brandinta 3 °C temperatūroje 22 paras. Mėsos tyrimams buvo imami mėginiai praėjus 4, 8, 12 ir 22 paroms nuo brandinimo pradžios. Po brandinimo visi mėginiai buvo suvakuuoti, vakuuokliu *Vac Nany* (*VacuMIT*®, Burglengenfeldas, Vokietija), užkoduoti (žr. 2 lentelė) ir laikyti -18 °C temperatūroje, du mėnesius iki *in vitro* virškinimo.

Prieš virškinamumo tyrimus mėsos mėginiai buvo atšildyti laikant šaldytuve 4 °C temperatūroje, tada verdami 30 minučių vandens vonelėje *JB Nova* (*Grant Instruments*, Devizes, Jungtinė Karalystė) su visu vakuuminiu maišeliu, mėginio viduje esant 70 °C temperatūrai, kaip nurodyta Sayd, Chambon ir Santé-Lhoutellier (2016) aprašytoje metodikoje [84]. Po virimo mėginiai buvo atvėsinti ledo vonelėje, ištraukti iš vakuuminio maišelio ir suhomogenizuoti homogenizatoriumi *Ultra-Turrax* (*IKA*® *T-18 basic*, Štautfenas, Vokietija) kartu su visu sultiniu.

2 lentelė. Mėsos mėginių kodavimas

Mėginių pavadinimai		Brandinimo metodas		
		Be plėvelės (kontrolė)	PA / PE	PET / Alox
Brand. trukmė	1. 4 paros	1.1	1.2	1.3
	2. 8 paros	2.1	2.2	2.3
	3. 12 parų	3.1	3.2	3.3
	4. 22 paros	4.1	4.2	4.3

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Pieno produktų analizės metodai

Baltymų dalelių dydžio nustatymas

Atgaminto pieno baltymų vidutinis dalelių dydis ir jų pasiskirstymas buvo nustatytas lazerio difrakciniu spektrometru *Mastersizer 2000* (*Malvern Instruments Ltd*, Vusteršyras, Didžioji Britanija). Matavimų metu mėginiai disperguoti maišymo celėje distiliuotame vandenyje. Dalelių dydžio ir tirpiklio refrakciniai indeksai nustatyti atitinkamai 1,5 ir 1,33. Vidutinis dalelių dydis išreikštas vidutiniu paviršiaus (pagal plotą) diametru d_{32} . Išmatavus dalelių dydžius, grafiškai pavaizduojama dalelių dydžio pasiskirstymas. Aukščiausias kreivės taškas rodo kokio diametro dalelių mėginyje procentiškai yra daugiausia.

Reologinių savybių nustatymas

Rauginto pieno reologinių charakteristikų nustatymas atliktas reometru *Physica MCR 301* (*Anton Paar*, Gracas, Austrija) užrašant tekėjimo kreives, naudojant plokštelė-kūgis geometrinę sistemą (kūgio skersmuo – 50 mm, kampas – 2°, mėginio storis – 0,207 mm) ir joje palaikant 20 arba 37 °C temperatūrą. Matuojama klampa ir poslinkio įtempis, kintant poslinkio greičiui nuo 1 iki 100 1/s.

Varškės išėigos skaičiavimas

Praktinė varškės išėiga buvo paskaičiuota pagal gautos varškės ir rauginto pieno, panaudoto produkto gamybai, masių santykį pagal 1 formulę. Svėrimui naudotos svarstyklės *PLT 4500-2M* (Kernas, Vokietija).

$$\text{Išėiga} = \frac{m_{\text{varškės}}}{m_{\text{rauginto pieno}}} \times 100\% ; \% \quad (1)$$

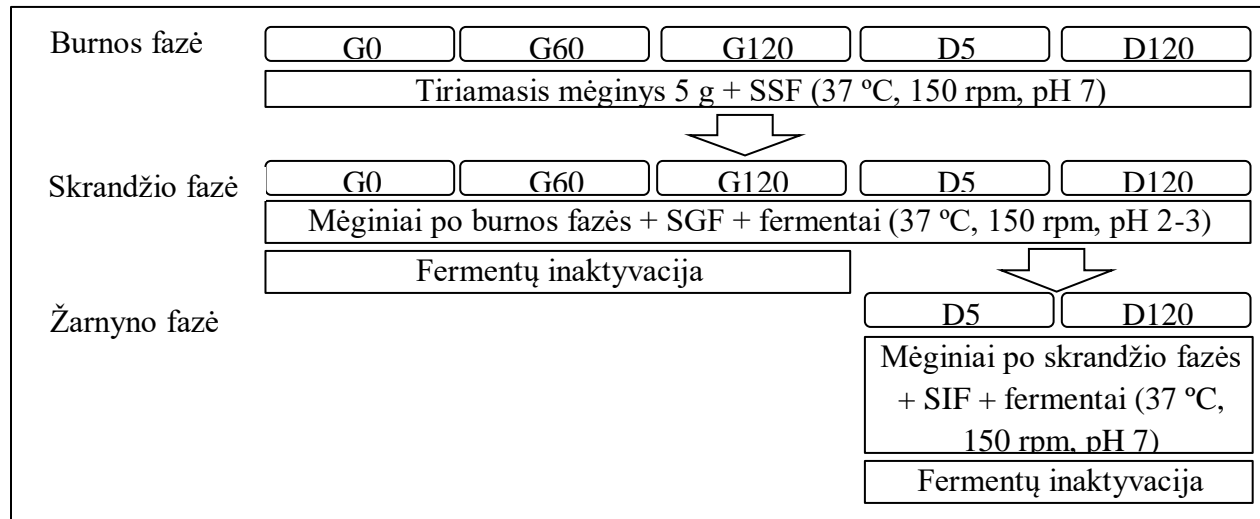
$m_{\text{varškės}}$ – varškės masė, g; $m_{\text{rauginto pieno}}$ – rauginto pieno masė, g.

Azoto junginių kiekio nustatymas Kjeldalio metodu

Baltymų kiekis pieno produktuose nustatytas Kjeldalio metodu, kuris pripažįstamas kaip tiksliausias, nustatant bendrąjį azoto junginių kiekį maisto produktuose. Azoto kiekio perskaičiavimo į pieno baltymų kiekį koeficientas – 6,38 [96]. Rezultatai pateikti baltymų kiekiu produkte procentais. Analizė pakartota du kartus, išvestas vidurkis su standartiniais nuokrypiais. Statistinis patikimumas vertinamas Studento t-testu. Skirtumai patikimi, kai ($p < 0,05$).

2.2.2. Virškinimas *in vitro* statinėje modelinėje sistemoje

Pieno produktų ir mėsos virškinamumo tyrimams naudotas statinis *in vitro* virškinimas, kuris atliekamas pagal INFOGEST protokolą [97]. Statinio virškinimo *in vitro* metodas yra plačiai naudojamas įvairiose maisto ir mitybos mokslo srityse, kaip alternatyva *in vivo* bandymams, kurie yra sunkiai prieinami, brangūs ir etiškai ginčytini. Statinio virškinimo metu naudojamų dirbtinių virškinamojo trakto sulčių paskirtis yra užtikrinti nekintamą, optimalią temperatūrą, pH ir terpę fermentams veikti bei imituoti natūralius žmogaus virškinamojo trakto judesius [97]. Viso virškinimo schema vienam mėginiui pavaizduota 6 paveiksle.



6 pav. *In vitro* virškinimo schema vienam mėginiui: SSF – dirbtinės seilių sultys; SGF – dirbtinės skrandžio sultys; SIF – dirbtinės plonosios žarnos sultys; G0, G60 ir G120 – mėginiai po virškinimo skrandyje 0, 60 ir 120 minučių, atitinkamai; D5, D120 – mėginiai po virškinimo žarnyne 5 ir 120 minučių, atitinkamai.

Virškinimo sulčių ir fermentų paruošimas

Virškinimo metu naudojamos dirbtinės seilių sultys (SSF); dirbtinės skrandžio sultys (SGF); dirbtinės plonosios žarnos sultys (SIF) – šių sulčių sudėtis ir ruošimo eiga nurodoma 3 lentelėje.

3 lentelė. Darbinių ir bazinių virškinamojo trakto sulčių sudėtis ir paruošimas (tęsinys 35 puslapyje)

			Darbiniai Virškinimo Tirpalai		
			SSF (pH 7) Burnos fazė	SGF (pH 3) Skrandžio fazė	SIF (pH 7) Žarnyno fazė
Druskų baziniai tirpalai (DBT)	DBT konc. (g/l)	DBT konc. (M)	DBT kiekiai, ml	DBT kiekiai, ml	DBT kiekiai, ml
KCl	46,7	0,6	10	28	5,4
KH ₂ PO ₄	68	0,5	20	0,9	0,8
NaHCO ₃	84	1	4	6,5* (2M)	42,5* (0,5M)

NaCl	116	2	1	10	8
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,15	1	2	1,1
pH koregavimui					
NaOH	39,99	1	4	-	0,5
HCl	36,46	1	1	3	0,3
Tirpalai praskiedžiami iki 500 ml ir užšaldomi -20 °C					

*Naudojama tokia druskų bazinių tirpalų koncentracija, kokia parašyta skliausteliuose

Virškinimo metu reikalingi tulžies druskų, fermentų, CaCl₂(H₂O)₂ tirpalai ir jų ruošimo eiga nurodyta 4 lentelėje.

4 lentelė. Druskų ir fermentų paruošimas virškinimui.

	Tulžies drusk.	Lipazė	Pepsinas	CaCl₂(H₂O)₂	Pankreatinas
Tirpalo konc.	10 mM	2000 U/ml	2000 U/ml	588 g/l	100 U/ml
Kur tirpinama	SIF	SIF	SGF	Dist. H ₂ O	SIF

Mėginių paruošimas virškinimui

Kietas virškinamas produktas (virta mėsa ir varškė) susmulkinamas iki vienodo dydžio dalelių – pertrinamas per sietelį arba susmulkinamas grūstuvėje. Jei virškinamas skystas mėginys (pienas ir raugintas pienas), tada papildomas ruošimas nereikalingas. Vienas mėginys atsveriamas į 5 mėgintuvėlius, po 5 g virškinamo produkto. Į kiekvieną mėgintuvėlį įdedami 2 g stiklinių rutuliukų, kurie virškinimo metu, įjungus 150 rpm maišymą, imituoja žmogaus virškinimo trakto peristaltinius judesius. Mėginiai pažymimi sutartiniais ženklais, nurodančiais produkto pavadinimą, ir išėmimo etapais. Šiam tyrimui buvo pasirinkti penki skirtingi taškai virškinimo proceso metu, kurių žymėjimas:

- G0 – mėginys po virškinimo skrandžio fazėje 0 minučių;
- G60 – mėginys po virškinimo skrandžio fazėje 60 minučių;
- G120 – mėginys po virškinimo skrandžio fazėje 120 minučių;
- D5 – mėginys po virškinimo žarnyno fazėje 5 minutes;
- D120 – mėginys po virškinimo žarnyno fazėje 120 minučių.

Burnos virškinimo fazė

Imituoiant virškinimo procesą burnoje, SSF maišomos su mėginiu ir virškinimas šiame etape vyksta 2 min. 37 °C temperatūroje (žr. 6 pav.) vandens vonioje D-30938 (GFL, Vokietija). Angliavandenius skaldantis fermentas amilazė nėra dedamas į dirbtines seilių sultis dėl nedidelio angliavandenių kiekio mėginiuose.

Skrandžio virškinimo fazė

Virškinimas skrandžio fazėje viso vyksta 120 min 37 °C. Į visus mėginius po burnos fazės pridedama SGF, CaCl₂(H₂O₂) tirpalo, pH sureguliuojamas iki būdingo žmogaus skrandžiui ir dedamas pepsinas – baltymus hidrolizuojantis fermentas (žr. 6 pav.).

Atitinkamame virškinimo skrandyje etape (po 1, 60, 120 min) paėmus mėginį, būtina inaktyvuoti SGF fermentus. Fermentas inaktyvuojamas koreguojant pH iki 7 su 1 M NaHCO₃ naudojantis pH-metru *GMH 3530 (Greisinger electronic, Vokietija)*. Fiksuojamas sunaudoto šarmo kiekis. Inaktyvavus fermentą, mėgintuvėlio turinys nukošiamas per sietelį į 50 ml centrifuginius mėgintuvėlius. Centrifuguojama centrifūgoje *MPW-260RH (MPW Instruments, Lenkija)* prie 4 °C, 10000 rpm, 20 min. Mėgintuvėlių turinys nufiltruojamas per filtrinį popierių. Mėginiai laikomi -20 °C iki analizės, jei reikia, nufiltruojami per 0,45 μm membraninį filtrą ir liofilizuojami.

Žarnyno virškinimo fazė

Po skrandžio fazės ir pepsno inaktyvavimo, į likusius mėgintuvėlius pridedama SIF, pH koreguojamas iki 7 (toks rūgštingumas būdingas žmogaus organizmui), pridedamas CaCl₂(H₂O₂), tulžies druskos, lipazė ir pankreatinas. Virškinimas žarnyno fazėje vykdomas 120 min. (žr. 6 pav.).

Žarnyno fermentai sustabdomi atšaldant mėginius. Žarnyno fazėje mėginiai imami praėjus 5 ir 120 min nuo šios fazės pradžios. Mėgintuvėlio turinį per sietelį nukošiamas į 50 ml centrifuginius mėgintuvėlius. Centrifuguojame centrifūgoje *MPW-260RH (MPW Instruments, Lenkija)* prie 4 °C, 10000 rpm, 20 min. Mėgintuvėlių turinys nufiltruojamas per filtrinį popierių. Mėginiai laikomi -20 °C iki analizės, jei reikia, nufiltruojami per 0,45 μm membraninį filtrą ir liofilizuojami.

2.2.3. Baltymų hidrolizės įvertinimo metodai

Baltymų hidrolizės produktai virškinimo metu nustatyti keliai metodais. Bendra peptidų koncentracija nustatyta Lowry metodu, o hidrolizės laipsnis pagal laisvų amino grupių kiekį – fluorescemininiu metodu. Baltymų hidrolizės produktų skaičiavimuose įvertinamas praskiedimo faktorius dėl mėginio skiedimo simuliuojamomis virškinamojo trakto sultimis, pH reguliavimo, pagal 2 formulę.

$$DF = (V_1 + V_2) / V_1; \quad (2)$$

DF – praskiedimo faktorius; V₁ – paimto tiriamojo mėginio tūris (šiuo atveju 200 μl); V₂ – skiedimui sunaudoto tirpalo tūris (šiuo atveju NaOH tūris mikrolitrais, sunaudotas pH koregavimui)

Baltymų virškinamumas pagal atpalaiduotų peptidų koncentraciją

Bendras peptidų kiekis nustatomas naudojantis Lowry metodu, kurį aprašė Lowry, Rosebrough, Farr ir Randall (1951) [98]. Divalentis varis sąveikauja su peptidiniais ryšiais, kurie paverčia jį vienvalečiu jonu šarminėje terpėje. Šie jonai sąveikauja su baltymuose esančių amino rūgščių (tirozino ir triptofano) fenolinėmis grupėmis ir Folio-Ciocalteau reagentu, taip sudarydami tamsiai mėlynos spalvos kompleksą. Spalvos intensyvumas, priklausantis nuo laisvų arba į baltymo sudėtį įeinančių aromatinių amino rūgščių kiekio, išmatuojamas, naudojantis spektrofotometru *Evolution 300 (Thermo Scientifics, Jungtinė Karalystė)* ir taip apskaičiuojamas bendras peptidų kiekis mėginyje pagal 3 formulę, kuri buvo gauta sudarius kalibracinę kreivę pagal žinomų koncentracijų kiaušinio baltymo albumino tirpalų spalvos intensyvumą.

$$y = 0,0775x + 0,0176 \quad (3)$$

x – peptidų koncentracija (mg/ml); y – optinis tankis

Baltymų hidrolizės laipsnio įvertinimas pagal laisvų amino grupių atpalaidavimą

Laisvų amino grupių pagal leuciną pokytis nustatomas fluorescemininiu metodu. Šio metodo esmė yra baltyminio substrato suskaidymas proteolitiniais fermentais ir nesuskaldytų baltymų pašalinimas nusodinant juos trichloracto rūgštimi. Kai fluoresceminas jungiasi su α -aminorūgštimis, junginys tampa fluorescuojančiu ir taip gali būti atpažintas [99]. Laisvų amino rūgščių kiekis apskaičiuojamas pagal formulę, kuri gaunama kiekvienos analizės metu sudarius kalibracinę kreivę, pagal žinomų koncentracijų leucino tirpalų fluorescenciją, išmatuotą *FLUOstar Omega (BMG Labtech Vokietija)*. Bendras amino rūgščių kiekis apskaičiuojamas tą patį metodą taikant rūgštiškai hidrolizuotiems mėginiams. Gavus rezultatus pagal 4 formulę, suskaičiuojamas hidrolizės laipsnis.

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100; \% \quad (4)$$

DH – hidrolizės laipsnis, %; h – peptidų koncentracija po tam tikro virškinimo etapo, mg/ml; h_{tot} – peptidų koncentracija hidrolizuotame mėginyje, mg/ml

2.2.4. Baltymų hidrolizės produktų biologinio aktyvumo nustatymas

Farmakologijoje biologinis aktyvumas apibūdina teigiamą arba neigiamą junginio poveikį gyviems organizmams. Kai vaistas yra sudėtingas cheminis mišinys, šį poveikį atlieka veiklioji medžiaga arba farmakoforas, tačiau jį gali modifikuoti kitos sudedamosios dalys. Tarp įvairių cheminių junginių savybių biologinis aktyvumas atlieka svarbų vaidmenį, nes tai parodo junginių perspektyvas medicinoje arba funkcionaliojo maisto gamyboje [100]. Šio tiriamojo darbo metu buvo nustatytos tokios virškinimo metu susidariusių baltymų hidrolizės produktų biologinės savybės: AKF slopinimas ir antioksidacinis aktyvumas.

AKF slopinimo nustatymas

Metodas remiasi junginio, kuris gaunamas substratą veikiant AKF fermentu, ir gali būti išmatuojamas spektrofotometriškai, susidarymu. Kai AKF yra slopinamas mėginyje esančiais peptidais, šio junginio susidaro mažiau ir matavimo metu gaunama mažesnė absorbcija. Prie tyrimo objektų pridedama Tris-HCl buferio, AKF tirpalo ir FAPGG substrato, po 60 min. inkubacijos spektrofotometru *Evolution 300 (ThermoFisher Scientific, Jungtinė Karalystė)* matuojama mėginių absorbcija. Tiriamųjų mėginių absorbcija lyginama su kontrolinio mėginio, kuris gautas sumaišius buferį, AKF ir FAPGG, absorbcija. AKF fermento slopinimas apskaičiuojamas procentais pagal 5 formulę.

$$AKF_{slopinimas} = \frac{(Abs_{kontrolė} - Abs_{bandinys})}{Abs_{kontrolė}} \times 100; \% \quad (5)$$

$Abs_{kontrolė}$ – kontrolinio mėginio (be AKF inhibitoriaus) absorbcija; $Abs_{bandinys}$ – tiriamojo mėginio absorbcija.

Antioksidcinių savybių nustatymas

Virškinimo metu, mėsoje esantys baltymai yra suskaldomi iki įvairaus dydžio peptidų. Kai kurie iš jų pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Antioksidacinės savybės nustatomos gebėjimą redukuoti geležies jonus.

Antioksidantiniai peptidai pasižymi savybe trivalentę geležį paversti divalente, taip pakeisdami tiriamojo tirpalo spalvą mėgintuvėlyje. Pagal šiuos spalvos pokyčius spektrofotometriškai gali būti nustatytas šių bioaktyvių peptidų kiekis mėginiuose [101]. Analizė buvo atlikta pagal Mora ir kitus (2014), su tam tikrais pakeitimais [102]. Teigiama kontrolė ruošama vietoj mėginio pridedant BHT (Butilinto hidroksitolueno) reagento, kuris pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis. Spektrometru matuojamas optinis tankis, kai bangos ilgis 700 nm. Gauta absorbcija lyginama su teigiamo kontrolinio mėginio absorbcija.

2.2.5. Aminorūgščių identifikacija

Mėginių derivatizacija ir kiekybinis įvertinimas atliktas pasitelkiant aukšto slėgio efektyviają skysčių chromatografiją, vadovaujantis *Waters AccQ Tag Chemistry Package Instruction Manual* aprašymu.

Laisvų aminorūgščių kiekio suvirškintame mėginyje nustatymui 1 ml mėginio įpilama į 100 ml matavimo kolbutę, užpilama 50 ml 0,1 M HCl. Įpilama po 1 ml 30 proc. $ZnSO_4 \times 7H_2O$ ir 15 proc. $K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$. Kruopščiai išmaišoma ir iki žymės skiedžiama 0,1 M HCl. Pernakt laikoma šaldytuve. Filtruojama per 0,22 μm AC membraninį filtrą. Bendro aminorūgščių kiekio nustatymui produkte, atliekama mėginio rūgštinė hidrolizė ir nufiltruojama per 0,22 μm membraninį filtrą. 10 μL paruošto ekstrakto imama amino rūgščių derivatizacijai. 10 μL paruošto ekstrakto sumaišoma su 70 μL *AccQ Fluor Borate Buffer*, pridedama 20 μL paruošto

AccQ Fluor reagento, nedelsiant kruopščiai išmaišoma, perpilama į chromatografinį buteliuką ir 10 min. patalpinama į laboratorinę krosnelę (55 °C).

Amino rūgščių darinių atskyrimui naudotas trijų komponentų gradientas: skiestas *AccQ Tag Eluent A Concentrate* (A), acetonitrilas (B) ir vanduo (C) (žr. 5 lentelė). Pasirinktas 1,000 ml/min debitas. Analizei imta 10 µL amino rūgščių derivatizacijos metu gauto darinio. Atskirtų amino rūgščių darinių signalai matuoti $E_x = 250$ nm, $E_m = 395$ nm bangose. Amino rūgščių dariniai atskirti naudojant chromatografinę kolonėlę Nova-Pak C18, 4 µm, 150 × 3.9 mm (*Waters Corp.*, Miliford, MA, JAV) esant 37 °C temperatūrai. Amino rūgščių analizei buvo naudojama žemo slėgio gradientinė sistema *Shimadzu* (*Shimadzu corp.*, Kyoto, Japonija).

5 lentelė. Gradientų programa pasirinkta aminorūgščių darinių atskyrimui

Laikas min.	A proc.	B proc.	C proc.
0	100	0	0
0,5	98	2	0
18,0	94	6	0
19,0	90	10	0
29,5	83	17	0
35,0	0	60	40
40,0	0	60	40
41,0	100	0	0
51,0	100	0	0

2.2.6. Peptidų profilio įvertinimas

Aukšto slėgio efektyvioji skysčių chromatografija

Mėsos brandinimo metu susidariusių baltymų skilimo junginių atskyrimui panaudotas atvirkščiosios fazės, aukšto slėgio skysčių chromatografijos metodas. Suvirškinti mėginiai buvo nufiltruojami, centrifūguojami, vėl filtruojami ir gauta skysta frakcija buvo liofilizuota. Tada analitinėmis svarstyklėmis *ENTRIS224i-1S* (*Sartorius*, Vokietija) atsveriami 0,1 g liofilizuoto mėginio ištirpinama 1 ml bidistiliuoto, dejonizuoto vandens (koncentracija 100 mg/ml) ir naudojama analizei.

Kaip mobiliosios fazės naudojami du solventai: A ir B. Solventas A yra trifluoroacto rūgštis (TFA) bidistiliuotame vandenyje (0,1 proc.) – 1 ml TFA praskiedžiamas bidistiliuotu vandeniu 1 litro matavimo kolboje. Solventas B – tai TFA (0,085 proc.) acetonitrilyje (ACN):MiliQ H₂O (60:40) – Prie 0,85 ml TFA pridedama 600 ml ACN ir praskiedžiama bidistiliuotu vandeniu 1 litro matavimo kolboje iki žymės. Abi fazės perfiltruojamos per 0,45 µm nailoninį filtrą ir degazuojamos prieš bet kokią analitinę veiksmą.

Atskyrimo metodas. Peptidai pirmiausia tirpinami 100 proc. A solvente 2 minutes. Tada, per 30 min solvento B didinama nuo 0 iki 50 proc., esant tėkmės srautui 1 ml/min. 35 minutę solvento B dalis – 100 proc. ( r. 6 lentelė). Separacija fiksuojama, kai bangos ilgis 214 nm. Analizei naudota HPLC sistema *Agilent 1100 Series* (JAV); kolon l  *Symmetry C18* (4.6×250 mm, 5  m) *Waters Co.* (Milfordas, JAV).

6 lentelė. Gradientų programa pasirinkta peptidų atskyrimui

Laikas, min	A proc.	B proc.
0	100	0
2-30	100-50	0-50
35	0	100

MALDI-TOF metodas

Mėsos brandinimo metu susidariusių baltymų skilimo junginių identifikavimui panaudotas MALDI TOF Analizatorius. Analizatoriaus veikimas pagrįstas naujausios kartos tandemine TOF technologija, kuri yra labai jautri, galinga ir kartu paprasta naudotis. Analizatorius yra tinkamas peptidų identifikavimui bei jų lygio med ziagoje / ląstelėje / audinyje, biožymenų nustatymui. Analiz  atlikta naudojantis įranga *TOF/TOF 5800* (*Ab Sciex*, Ispanija).

Peptidų ekstraktai santykiu 5:95 ištirpinami ACN:0.1% TFA tirpale. Pasigaminami kiekvieno analizuojamo mėginių standartiniai tirpalai iš kurių vėliau daromi skirtingi skiedimai: analitinėmis svarstyklėmis *ENTRIS224i-1S* (*Sartorius*, Vokietija) atsveriami 0,1 g liofilizuotos med ziagos ištirpinama 1 ml ACN:TFA, kad galutin  koncentracija būtų 100 mg/ml. Tada buvo atliekami skirtingi skiedimai:

- 1:10 (10 mg/ml). 10  l paruošto standartinio tirpalo + 90  l ACN:TFA;
- 1:100 (1 mg/ml). 5  l paruošto standartinio tirpalo + 495  l ACN:TFA.

2.2.7. Statistinė analiz 

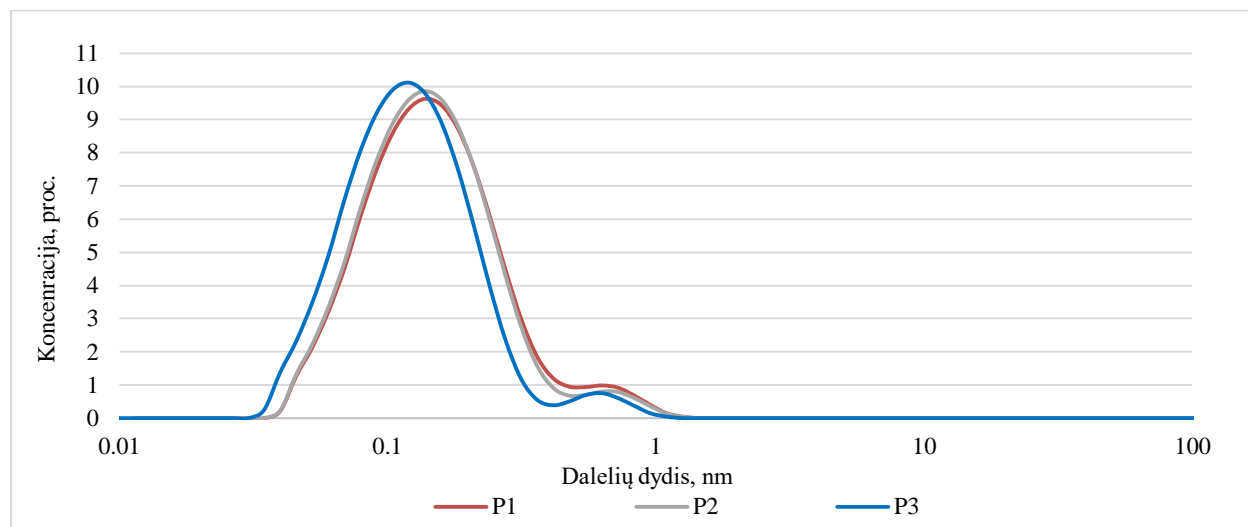
Rezultatai pateikti kaip mažiausiai 2 kartotinių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais. Statistinė duomenų analiz  atlikta SPSS 9.0 programa naudojant vienfaktorin s dispersinės analizės (ANOVA) metodą. Skirtumai tarp mėginių įvertinti taikant Stjudento t-testą ir statistiškai reikšmingais skirtumai tarp mėginių buvo laikomi, kai reikšmingumo lygmuo siek  $p < 0,05$

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Transglutaminaze paveiktų pieno baltymų virškinamumo tyrimai

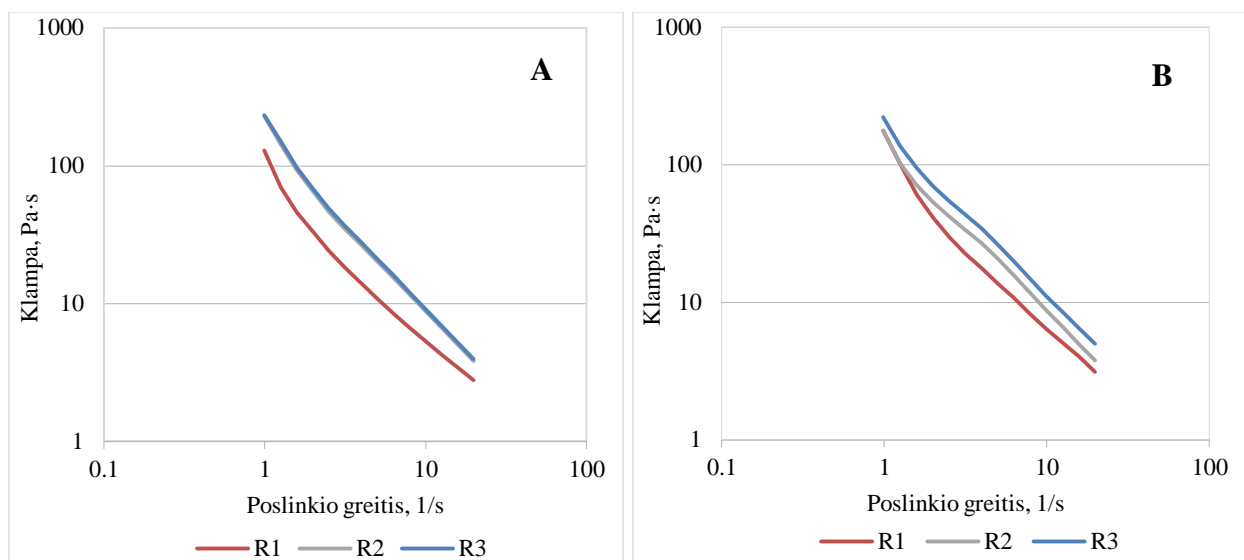
3.1.1. Transglutaminazės įtaka pieno produktų savybėms

Tiriant MTG įtaką pieno produktų savybėms pirmiausiai nustatėme, kaip keičiasi fermentu paveikto pieno savybės, kurias vertinome pagal vidutinį baltymų dalelių dydį ir jų pasiskirstymą. 7 paveiksle pateikti baltymų dalelių dydžio pasiskirstymo analizės rezultatai rodo, kad mums nepavyko nustatyti pastebimai didėjančio pieno baltymų dalelių dydžio dėl MTG formuojamų papildomų skersinių ryšių tarp baltymų molekulių. Tiek MTG paveiktam pienui (mėginiai P2 ir P3), tiek fermentu nepaveiktam pienui (mėginys P1), nustatytas polidispersinėms sistemoms būdingas baltymų dalelių pasiskirstymas, kai didžioji dauguma baltymų dalelių pasiskirstę diapazone nuo 0,04 nm iki 0,48 nm o mažesnė dalis diapazone nuo 0,48 nm iki 1,26 nm. Mažesnių dalelių vidutinis dydis, išreikštas vidutiniu paviršiaus diametru, yra 0,114 nm, 0,113 nm ir 0,110 nm atitinkamai mėginiams P1, P2 ir P3. Manome, kad tokie rezultatai gauti dėl terminio apdoravimo metu denatūravusių išrūgų baltymų, kurie lengviau susijungia į didesnes daleles tarpusavyje ir / arba su kazeinu po fermentinio modifikavimo [2]. Baltymų dalelių dydžiui įtakos turi ir dėl MTG veikimo naujai susidarę vidiniai arba tarpmolekuliniai skersiniai ryšiai. Mėginio P3 kreivės pasislinkimas į kairę pusę rodo, kad vidutinis dalelių dydis šiame mėginyje yra mažesnis. Tokį pokytį galėjo nulemti kazeino micelių tūrio sumažėjimas dėl MTG inicijuotų naujai susidariusių vidinių kovalentinių jungčių [103]. Visose kreivėse pastebimas dar vienas nedidelis pikas, kuris nurodo, kad mėginiuose yra maždaug 0,9 nm dydžio dalelių, kurių koncentracija apie 1 proc.



7 pav. Pieno baltymų dalelių dydžių pasiskirstymas atgamino pieno mėginiuose: P1, P2 ir P3 pieno mėginiai apdoroti 0, 0,5 ir 1 g/l MTG, atitinkamai

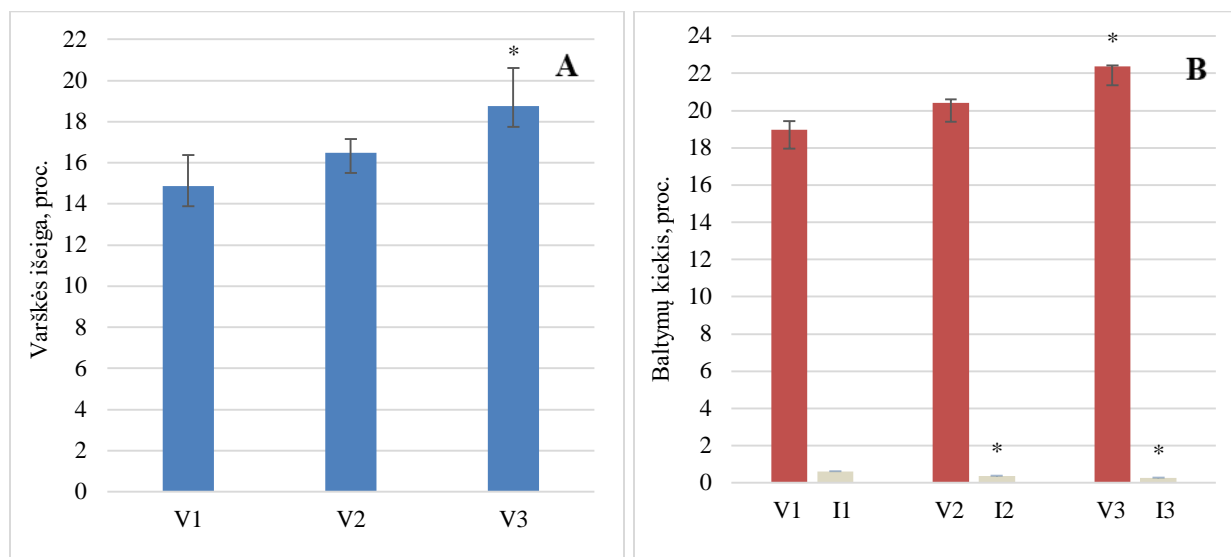
Mokslinėje literatūroje teigiama, kad pieno produktai, pagaminti iš MTG paveikto pieno sudaro stipresnius rūgštinius gelius, dėl to didėja jų klampa, mažėja sinerezė [104]. 8 paveiksle pateiktos rauginto pieno klamos kreivės patvirtino šį teiginį. Matome, kad rauginto pieno mėginių R2 ir R3, kurių gamybos metu į pieną buvo pridėta MTG, klamos kreivės buvo aukščiau, lyginant su kontrolinio mėginio, kurio gamyboje nenaudota MTG, klamos kreive. Visoms kreivėms būdingas pseudoplastinių sistemų pobūdis, kai didėjant poslinkio spartai, klampa mažėja. Temperatūros įtakos rauginto pieno klamos kreivėms nenustatėme.



8 pav. Rauginto pieno, pagaminto iš skirtingu MTG kiekiu, klamos kreivės esant 20 °C (A) ir 37 °C (B) temperatūrai: R1, R2 ir R3 rauginto pieno mėginiai pagaminti iš pieno, apdoroto 0, 0,5 ir 1 g/l MTG, atitinkamai

MTG įtaka varškės savybėms vertinome pagal produkto išėigą ir baltymų kiekį jame. Akivaizdu, kad varškės išėigos padidėjimas tiesiogiai susijęs su baltymų kiekio padidėjimu produkte. Šį teiginį patvirtina varškės ir išrūgų baltymų kiekio nustatymo bei išėigos skaičiavimo rezultatai, kurie pateikti 9 paveiksle. Rezultatai rodo, kad didinant pienui apdoroti panaudotos MTG kiekį, didėja varškės išėiga: mėginio V3 išėiga 4 proc. ($p < 0,05$), o V2 išėiga 2 proc. ($p > 0,05$) didesnė, lyginant su kontrolės mėginiu V1, kuriame nebuvo transglutaminazės. Taip pat pastebėta, kad didinant MTG kiekį, didėjo baltymų kiekis varškėje ir mažėjo baltymų kiekis išrūgose. Baltymų kiekis varškėje V2 1,07 karto ($p > 0,05$), o varškėje V3 1,18 kartų didesnis ($p < 0,05$), lyginant su V1. Baltymų kiekis išrūgose I2 1,73 karto ($p < 0,05$), o išrūgose I3 2,52 karto ($p < 0,05$) mažesnis lyginant su kontroliniu I1 mėginiu. Kryžminių jungčių susidarymui išrūgų baltymuose dėl MTG veikimo galėjo turėti įtakos lieso pieno terminis apdorojimas prieš fermentinę modifikaciją. Terminis pieno apdorojimas sukelia išrūgų baltymų denatūraciją ir taip skatina jų sąveiką su kazeino micelių paviršiumi. Analogiški rezultatai aprašomi Han ir kitų (2001) patentuotame varškės sūrio gamybos, naudojant transglutaminazę, protokole bei Mazuknaitės ir kitų (2013) atliktame tyrime [1, 105]. Denatūruoti išrūgų baltymai „užstringa“ gelio tinkle ir varškės gamybos metu lieka varškėje, neatsiskiria su išrūgom [2], todėl didinant

MTG kiekį, didėja ne tik varškės išeiga, bet ir baltymų kiekis varškėje, o išrūgose baltymų kiekis mažėja.



9 pav. MTG įtaka varškės išeigai (A) ir varškės bei išrūgų baltymų kiekiui (B): produktai V1, V2 ir V3 buvo gauti iš pieno apdoroto 0, 0,5 ir 1 g/l MTG, atitinkamai.

Vertės pateikiamos kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis; * rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant su kontroliniu mėginiu (V1 arba I1)

3.1.2. Transglutaminaze paveiktų pieno baltymų virškinamumo vertinimas skirtingų pieno produktų *in vitro* virškinimo metu

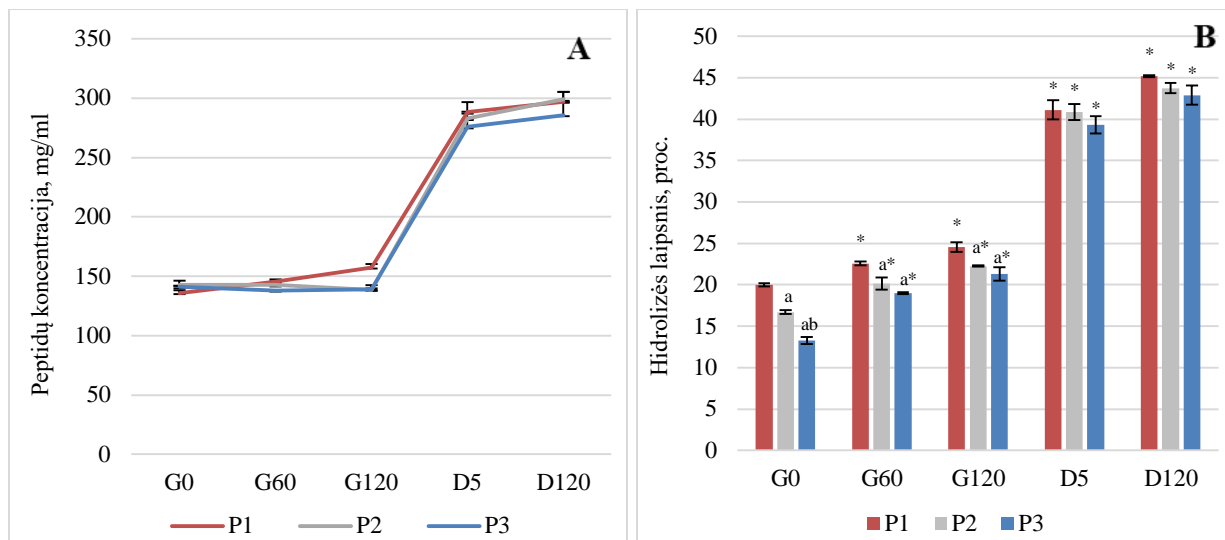
Nustačius, kad MTG paveikus pieno baltymus, raugintas pienas klampėja bei padidėja varškės išeiga, toliau vertinome iš transglutaminaze paveikto pieno pagamintų produktų virškinamumą, atliekant tyrimus *in vitro*. Imituojant pieno, rauginto pieno ir varškės virškinimą skrandžio ir žarnyno fazėse, skirtingais virškinimo etapais vertinami šie baltymų virškinamumo rodikliai: peptidų kiekis ir baltymų hidrolizės laipsnis pagal laisvų amino grupių kiekį.

Pieno virškinamumas

10 paveiksle A dalyje pateiktos peptidų koncentracija, MTG paveikto / nepaveikto atgaminto pieno atskiruose *in vitro* virškinimo etapuose, atspindinčios kreivės. Šių kreivių persiklojimas rodo, kad pieno baltymų paveikimas MTG neturi didelės įtakos pieno baltymų virškinamumui. Lyginant mėginių P2 ir P3 kreives su kontrolinio mėginio P1 kreive, galima pastebėti, kad kontrolinio mėginio kreivė išsidėsčiusi šiek tiek aukščiau, tačiau tarp skirtingu MTG kiekiu paveiktuose mėginiuose P2 ir P3 virškinimo metu atpalaiduotų peptidų koncentracijų nėra statistiškai patikimų skirtumų, lyginant su kontroliniu mėginiu P1 ($p > 0,05$). Visų mėginių virškinimo metu, peptidų koncentracija skrandžio fazėje, lyginant su G0 tašku ($p > 0,05$), nedidėjo. Galima manyti, kad šiame virškinimo etape pieno baltymai veikiant pepsinui buvo suvirškinti iki amino rūgščių ir didesnių polipeptidų, kurie Lowry metodu negali būti nustatyti.

Statistiškai reikšmingas peptidų koncentracijos padidėjimas žarnyno fazėje, lyginant su G0 tašku ($p < 0,05$), parodo, kad šiame virškinimo etape atsipalaidavo mažesni polipeptidai, kurie veikiant fermentui tripsinui buvo suskaldyti iš skrandyje susidariusių, anksčiau minėtų polipeptidų. Toliau žarnyne peptidai, veikiant kitiems kasos fermentams suvirškinami iki tripeptidų, dipeptidų ir atskirų aminorūgščių, kurios žmogaus organizme yra absorbuojamos [61]. Lowry metodas yra pakankamai jautrus užfiksuoti žarnyne atpalaiduotiems baltymų proteolizės produktams, tai paaiškina staigų ($p < 0,05$) peptidų koncentracijos šuolį D5 taške 10 paveikslo A dalyje.

Baltymų hidrolizės laipsnio rezultatai, pateikti 10 paveikslo B dalyje, patvirtino anksčiau aptartus pieno baltymų virškinamumo rezultatus. Statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) hidrolizės laipsnio didėjimas stebimas visuose atgaminto lieso pieno mėginiuose virškinimo proceso etapuose. Lyginant kiekvieną skrandžio ir žarnyno virškinimo etapą atskirai, galima teigti, kad MTG paveiktuose pieno mėginiuose P2 ir P3, lyginant su kontrole P1, suhidrolizuojama mažiau baltymų. Statistiškai reikšmingi hidrolizės laipsnio skirtumai lyginant MTG paveikto pieno virškinamumą su MTG nepaveikto pieno virškinamumu, pastebimi skrandžio virškinimo fazėje. G0, G60 ir G120 taškuose pieno P2 hidrolizės laipsnis 3,3 proc., 2,4 proc. ir 2,3 proc. ($p < 0,05$), o pieno P3 hidrolizės laipsnis 6,7 proc., 3,6 proc. ir 3,2 proc. ($p < 0,05$) mažesnis lyginant su kontroliniu P1 mėginiu, atitinkamai. Pastebimas nežymus, statistiškai nereikšmingas skirtumas ($p > 0,05$) tarp skirtingu MTG kiekiu paveikto pieno baltymų hidrolizės laipsnio kitimo virškinimo taškuose G60, G120, D5 ir D120 bei statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) skirtumas G0 virškinimo taške. Gauti rezultatai patvirtina rezultatus pateiktus mokslinėje literatūroje, kurioje nurodoma, kad pieno baltymai paveikti MTG yra lėčiau virškinami [5, 6]. Galima numanyti, kad iš visų P3 piene esančių baltymų, žmogus įsisavins maždaug 43 proc., proteolizės produktų, P2 – maždaug 44 proc., o suvirškinus pieną P1 žmogaus organizme bus absorbuota 45 proc, tačiau skirtumas tarp pieno baltymų paveiktų ir nepaveiktų MTG, hidrolizės laipsnio nėra statistiškai reikšmingas ($p > 0,05$). Nesuvirškinti, neabsorbuoti peptidai keliauja į storąją žarną, kur yra fermentuojami žarnyne esančių mikroorganizmų ir suskaldomi iki aminorūgščių [106]. Nors peptidų ir aminorūgščių absorbcija į kraują per storosios žarnos sieneles vis dar tiriama, kai kurių tyrimų su gyvūnais rezultatai parodo limituotą laisvų aminorūgščių absorbcijos laipsnį storąjoje žarnoje [107]. Naujausi tyrimai parodo, kad mikrobinė nesuvirškintų baltymų fermentacija storajame žarnyne gali pakeisti žarnyno mikrobiotą susidarant naujiems bioaktyviems junginiams. Nustatyta, kad šie metaboliniai produktai padidina uždegiminį atsaką, audinių pralaidumą, kolito riziką žarnyne bei yra susijusi su nutukimo, diabeto ir steatozės vystymusi [106].



10 pav. Peptidų koncentracijos (A) ir hidrolizės laipsnio (B) kitimas MTG paveiktų atgaminto pieno baltymų virškinimo metu: pienas P1, P2 ir P3 buvo apdoroti 0, 0,5 ir 1 g/l MTG, atitinkamai; G0, G60, G120 – virškinimo taškai skrandžio fazėje, D5 ir D120 – žarnyno fazėje.

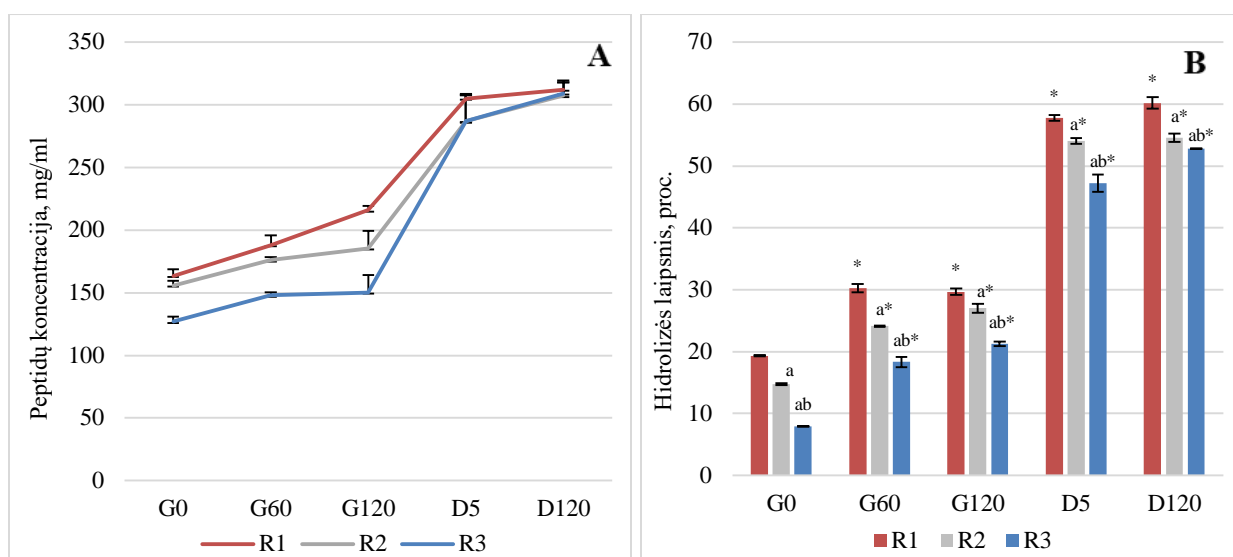
Vertės pateikiamos kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis; * rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant su tuo pačiu mėginiu G0 taške; raidės rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant mėginius tame pačiame virškinimo proceso taške.

Rauginto pieno virškinamumas

Pagal 11 paveikslo A dalyje pateiktus duomenis, peptidų koncentracija rauginto pieno mėginiuose *in vitro* virškinimo proceso metu, didėja. Čia R1 kreivė labiau atsiskyrusi nuo R2 ir R3, vadinasi virškinimo fermentai lengviau hidrolizuoja rauginto pieno baltymus, kurie nebuvo paveikti MTG. Tačiau atpalaiduotų peptidų koncentracija skirtingu kiekiu MTG paveiktuose mėginiuose R2 ir R3, virškinimo metu, nėra statistiškai skirtinga, lyginant su kontroliniu mėginiu P1 ($p > 0,05$) beveik visuose virškinimo taškuose. Statistiškai reikšmingi skirtumai ($p < 0,05$) stebimi tik tarp mėginių P1 ir P3 virškinimo taškuose G60 ir G120. Kuo didesnis MTG kiekis buvo įdėtas į pieną prieš rauginimą, tuo mažiau peptidų atpalaiduojama rauginto pieno virškinimo metu. Kadangi virškinamojo trakto sultyse tirpios maisto medžiagos yra absorbuojamos, galima numanyti, kad žmogaus organizmas įsisavins mažiau proteolizės produktų, kurie susidarė virškinant MTG paveiktus pieno baltymus. Visų mėginių *in vitro* virškinimo metu, peptidų koncentracija G120, D5 ir D120 taškuose, lyginant su G0 tašku ($p > 0,05$), statistiškai reikšmingai didėjo.

11 paveikslo B dalyje pavaizduoti rauginto pieno hidrolizės laipsnio rezultatai. Šių mėginių hidrolizės laipsnis statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) didėja viso virškinimo metu, lyginant su G0 tašku. Itin staigus hidrolizės laipsnio padidėjimas stebimas visų mėginių D5 virškinimo taške. Lyginant su paskutiniu skrandžio fazės virškinimo tašku G120, D5 taške mėginių R1, R2 ir R3 hidrolizės laipsnis paauga 1,95, 2,00 ir 2,22 karto ($p < 0,05$) atitinkamai. Tokiems rezultatams įtakos turi virškinimo fermentų pasikeitimas žarnyno fazėje. Skrandyje, veikiant pepsinui

baltymai suvirškinami iki stambių polipeptidų, žarnyne tripsinas polipeptidus suvirškina iki mažesnių polipeptidų, kurie lemia bendrą peptidų kiekio padidėjimą žarnyno virškinimo etape [61]. Ypač staigus hidrolizės laipsnio augimas stebimas mėginyje R1, kuriame nebuvo pridėta MTG, vadinasi šio tyrimo metu gautos tos pačios tendencijos, kaip ir stebint pieno virškinimą. Lengviausiai virškinami mėginiai, kurių baltymai nebuvo paveikti, o didinant transglutaminazės koncentraciją žaliavinėje medžiagoje – produkto virškinimas sulėtėja, t.y. proteolizės metu atpalaiduojama mažiau laisvų amino grupių. Visuose virškinimo taškuose statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$) stebimas ne tik R1 lyginant su R2 ir R3, bet ir lyginant R2 ir R3 mėginius tarpusavyje. Tai rodo, kad rauginto pieno baltymų virškinamumui įtakos turi ne tik MTG pridėjimas į žaliavinę medžiagą, bet ir pridėto fermento kiekis. Tokius rezultatus galėjo lemti tai, kad baltymai, kurie yra paveikti MTG, formuoja stipresnį gelį (žr. 2 pav.) – kietesnis produktas žmogaus organizme yra virškinamas lėčiau [108]. Galima numanyti, kad iš visų R3 raugintame piene esančių baltymų, po virškinimo žarnyne, žmogus įsisavins maždaug 53 proc., R2 – maždaug 55 proc., o suvirškinus raugintą pieną R1 žmogaus organizme bus absorbuota 60 proc. proteolizės produktų. Nesuvirškinti ir plonojoje žarnoje neabsorbuoti baltymų proteolizės produktai, storioje žarnoje sąveikauja su ten esančiais mikroorganizmais, sudarydami naujus junginius, kurių poveikis žmogaus organizmui dar nėra iki galo ištirtas [106].

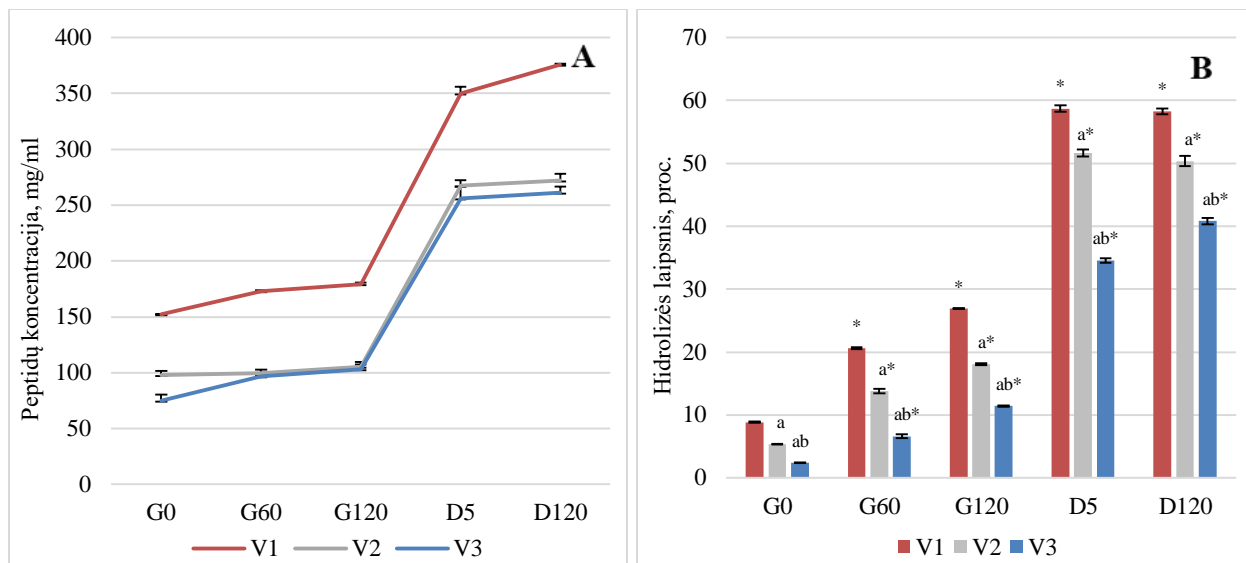


11 pav. Peptidų koncentracijos (A) ir hidrolizės laipsnio (B) kitimas MTG paveiktų rauginto pieno baltymų virškinimo metu: produktai R1, R2 ir R3 buvo gauti iš pieno apdoroto 0, 0,5 ir 1 g/l MTG, atitinkamai. G0, G60, G120 – virškinimo taškai skradžio fazėje, D5 ir D120 – žarnyno fazėje. Vertės pateikiamos kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis; * rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant su tuo pačiu mėginiu G0 taške; ^a rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant su R1 mėginiu tame pačiame virškinimo proceso taške; ^b rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant su R2 tame pačiame virškinimo taške.

Varškės virškinamumas

Didžiausia transglutaminazės įtaka pieno baltymų virškinamumui pastebėta atlikus varškės, pagamintos iš skirtingais MTG kiekiais apdoroto pieno, *in vitro* virškinamumo tyrimus. Tyrimo rezultatai pateikti 12 paveiksle. Iš 12 paveikslo A dalyje pateiktų rezultatų galime matyti, ypač staigų peptidų koncentracijos padidėjimą visuose mėginiuose, D5 taške. Tokius rezultatus lėmė fermentų pasikeitimas žarnyno virškinimo etape [61]. Mažiausia peptidų koncentracija atpalaiduota virškinant V2 ir V3 mėginius, kurių baltymai buvo paveikti skirtingais MTG kiekiais, o daugiausia peptidų atpalaiduota virškinant V1 mėginį, kurio baltymai nebuvo paveikti MTG (žr. 12 pav. A). Virškinant mėginį V1, į virškinamojo trakto sultis atpalaiduotų peptidų kiekis visuose virškinimo etapuose buvo didžiausias ir statistiškai skirtingas ($p < 0,05$), lyginant su kitais mėginiais V2 ir V3. Gautos tendencijos, analogiškos pieno ir rauginto pieno virškinamumo tyrimo metu gautiems rezultatams. Tokiems virškinamumo rezultatams įtakos galėjo turėti tai, kad transglutaminaze apdorotos varškės baltymų dalelės sumažėjo, dėl naujų skersinių ryšių susiformavimo baltymo molekulės viduje, taip pat sumažėjo tarpai tarp baltymų, dėl naujai susidariusių skersinių ryšių tarp atskirų baltymų molekulių. Tai lėmė suprastėjusią varškės sinerezę, gauto produkto konsistencija kietesnė, dėl to jis sunkiau virškinamas [105].

Didinant MTG kiekį, varškės baltymų hidrolizės laipsnis visuose virškinimo etapuose mažėja (žr. 12 pav. B). Visuose virškinimo taškuose stebimas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$) ne tik lyginant V1 varškės virškinamumą su V2 ir V3, bet ir lyginant V2 bei V3 mėginių hidrolizės laipsnius tarpusavyje. Vadinasi, MTG kiekis, kuriuo yra paveikta žaliavinė medžiaga, taip pat turi įtakos pieno produktų baltymų virškinamumui. Galima numanyti, kad dėl naujai susidariusių kovalentinių ryšių tarp baltymų molekulių ir jų viduje iš visų V3 varškėje esančių baltymų, žmogus įsisavins tik maždaug 41 proc., proteolizės produktų, V2 – maždaug 50 proc., o suvirškinus varškę V1, kurios baltymai nebuvo fermentiškai modifikuoti, žmogaus organizme bus absorbuota net maždaug 58 proc. varškėje esančių baltymų proteolizės produktų. Plonojoje žarnoje neabsorboti peptidai iš organizmo pašalinami kartu su išmatomis arba sąveikauja su storojoje žarnoje esančiais mikroorganizmais [61]. Analogiškus rezultatus apie MTG įtaką baltymų virškinamumui publikavo Xing ir kiti (2016), kurie tyrė tofu virškinamumą. Publikacijoje teigiama, kad baltymai apdoroti MTG, padeda kontroliuoti energijos pasisavinimą iš baltymų, dėl mažesnės jų hidrolizės produktų absorbcijos žmogaus organizme [30]. Juvonen ir kiti (2015) taip pat publikavo MTG paveikto kazeino, įeinančių į emulsijų sudėtį, virškinamumą. Tyrimo rezultatai analogiški mūsų gautiems rezultatams: MTG paveikto kazeino virškinimas, lyginant su MTG nepaveikto kazeino virškinimu yra lėtesnis [5]. Remiantis mūsų atlikto tyrimo ir užsienio literatūroje pateiktais duomenimis, galima reguliuoti mitybą ir esant poreikiui sumažinti kalorijų suvartojimą [6].



12 pav. Peptidų koncentracijos (A) ir hidrolizės laipsnio (B) kitimas MTG paveiktų varškės baltymų virškinimo metu: produktai V1, V2 ir V3 buvo gauti iš pieno apdoroto 0, 0,5 ir 1 g/l MTG, atitinkamai. G0, G60, G120 – virškinimo taškai skradžio fazėje, D5 ir D120 – žarnyno fazėje.

Vertės pateikiamos kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis; * rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant su tuo pačiu mėginiu G0 taške; ^a rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant su V1 mėginiu tame pačiame virškinimo proceso taške; ^b rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant su V2 tame pačiame virškinimo taške.

3.2. Kiaulienos nugarinės brandinimo sąlygų įtaka išvirtos mėsos baltymų virškinamumui

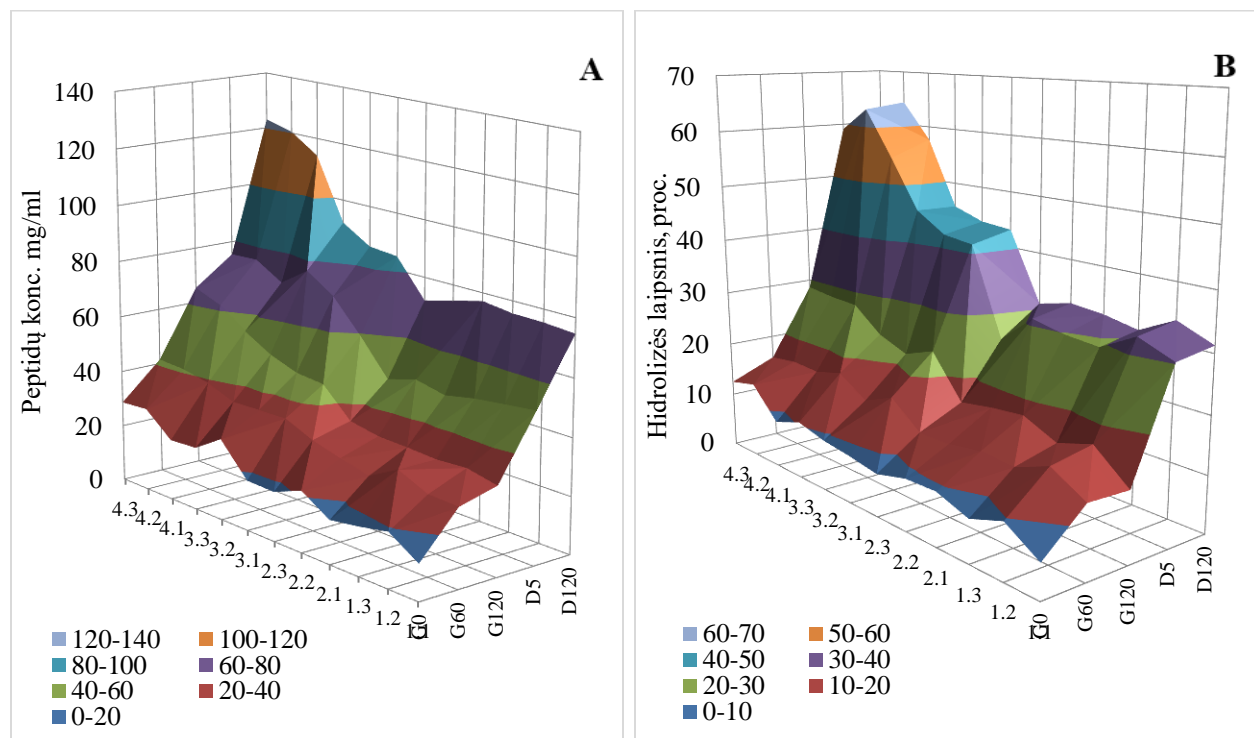
Šiame tyrimų etape tyrėme skirtingomis sąlygomis brandintos kiaulienos nugarinės baltymų virškinamumą. Mėsa buvo brandinta natūraliai (be plėvelės) ar įvilkta į skirtingo pralaidumo plėvelę. Mėsos mėginiai buvo imami skirtingais brandinimo trukmės intervalais: po 4, 8, 12 ir 22 parų. Prieš atliekant virškinamumo tyrimą mėginiai buvo išvirti.

Prieš tyrimą iškėlėme hipotezę, kad mėsos brandinimo būdas gali turėti teigiamos įtakos mėsos baltymų virškinamumui dėl mėsos brandinimo metu vykstančių proteolizės procesų. Iškeldami šią hipotezę rėmėmės anksčiau atliktais tyrimais, kurie parodė, kad mėsos baltymų hidrolizės intensyvumas priklausė nuo mėsos brandinimo būdo ir trukmės [48].

Mėsos baltymų virškinamumą vertinome keliais rodikliais: virškinimo sultyse ištirpusių peptidų kiekiu, baltymų hidrolizės laipsniu pagal susidariusį laisvų amino grupių kiekį ir atpalaiduotų amino rūgščių kiekį. Toliau, atlikome detalesnius susidariusių peptidų tyrimus, nustatydami brandinto mėsos virškinimo metus susidariusių peptidų profilius ir įvertindami peptidų savybes: AKF slopinimą ir antioksidacines savybes.

3.2.1. Skirtingomis sąlygomis brandintos kiaulienos baltymų hidrolizės vertinimas virtos mėsos *in vitro* virškinimo metu

Pirmiausiai mėsos baltymų virškinamumo dinamika buvo įvertinta, remiantis virškinimo metu susidariusių peptidų kiekio ir hidrolizės laipsnio nustatymu. 13 paveiksle pavaizduota visų ištirtų mėsos mėginių baltymų virškinamumo dinamika pagal šiuos du rodiklius. Dėl didelio mėginių skaičiaus, išvadas apie brandinimo trukmės ir brandinimo plėvelės įtaką mėsos baltymų virškinamumui daryti sunku. Aiškiai matosi, kad tiek peptidų koncentracija, tiek baltymų hidrolizės laipsnis virškinimo metu palaipsniui didėja visuose mėginiuose. Todėl toliau šiuos rodiklius pateiksime ir nagrinėsime atskirai vertindami mėsos brandinimo trukmės ir brandinimo būdo įtaką baltymų virškinamumui.



13 pav. Mėsos brandinimo trukmės ir plėvelės įtaka (A) susidariusių peptidų kiekiui virškinimo metu ir (B) baltymų hidrolizės laipsniui: 1.1, 1.2 ir 1.3 – 4 paras; 2.1, 2.2 ir 2.3 – 8 paras; 3.1, 3.2 ir 3.3 – 12 parų; 4.1, 4.2 ir 4.3 – 22 paras brandinta mėsa be plėvelės, su PA / PE ir PET / Alox. plėvelėmis atitinkamai. G0, G60, G120 – virškinimo taškai skradžio fazėje, D5 ir D120 – žarnyno fazėje.

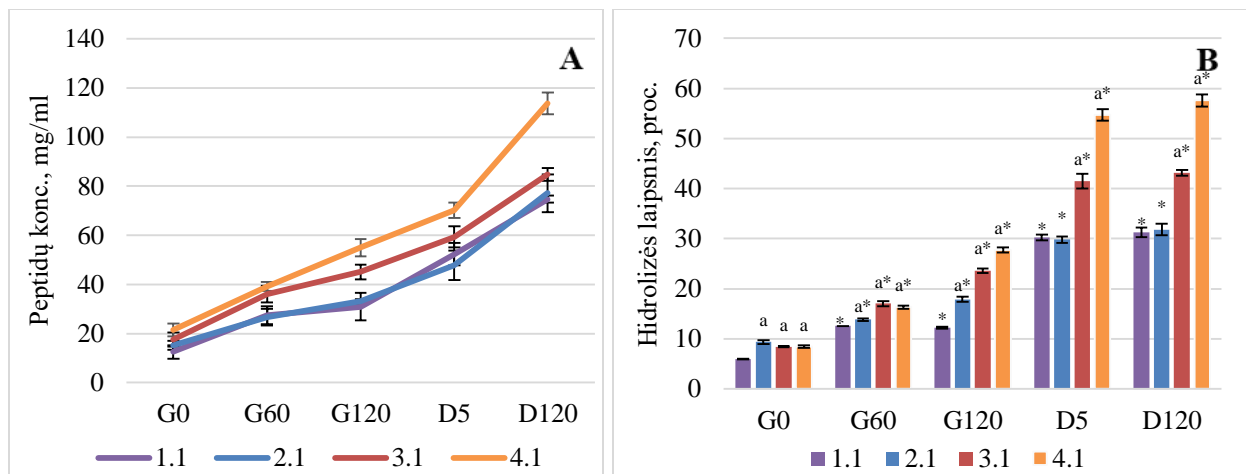
Brandinimo trukmės įtaka

Brandinimo trukmės įtaka natūraliai (be plėvelės) brandintos mėsos baltymų virškinimo dinamikai, pateikta 14 paveikslo A dalyje. Žemiausiai išsidėsčiusios 1.1 ir 2.1 mėginių kreivės rodo, kad trumpiausiai brandinta mėsa yra virškinama lėčiausiai, o šių kreivių persiklojimas parodo, kad 4 ir 8 paras brandintos mėsos baltymai virškinami beveik tokiu pat greičiu ir virškinimo sultyse ištirpusių peptidų kiekis visuose virškinimo taškuose nėra statistiškai

reikšmingas ($p > 0,05$). Brandinimo trukmės įtaka mėsos baltymų virškinamumui pradeda matytis nuo 12 brandinimo paros (3.1 mėginio kreivė) – kreivė išsidėsčiusi šiek tiek aukščiau, virškinimo metu atpalaiduojama daugiau peptidų, kurių kiekis G60, G120, D5 ir D120 virškinimo taškuose yra statistiškai patikimai didesnis ($p < 0,05$), lyginant su mėginiu 1.1, o virškinimo procesas greitesnis. Aukščiausiai išsidėsčiusi 4.1 mėginio peptidų dinamikos kreivė rodo, kad geriausiai virškinami mėsos mėginiai, kurie buvo brandinti ilgiausiai (22 paras) – susidariusių peptidų skaičius statistiškai patikimai ($p < 0,05$) didesnis visuose virškinimo taškuose, lyginant su mėginiu 1.1, kuris buvo brandintas trumpiausiai (4 paras). Remiantis šio tyrimo rezultatais galima daryti prielaidą, kad 8 mėsos brandinimo paros yra per trumpas laiko tarpas, jog brandinimas turėtų įtakos mėsos virškinimo greičiui, todėl mėsa turėtų būti brandinama mažiausiai 12 parų, kad taptų lengviau virškinama. Gauti rezultatai patvirtina Kim ir kitų (2018) brandintos jautienos virškinamumo tyrimo metu gautus duomenis – mėsos brandinimas turi teigiamos įtakos mėsos baltymų virškinamumui [109].

14 paveikslo B dalyje pavaizduota mėsos brandinimo trukmės įtaka mėsos baltymų hidrolizės laipsniui. Hidrolizės laipsnis virškinimo eigoje statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) didėja visuose mėginiuose. Ypač staigus hidrolizės laipsnio padidėjimas matomas perėjus į žarnyno virškinimo etapą, pasikeitus virškinimo fermentams iš pepsino į kasos fermentus, kurie mėsoje esančius baltymus virškina greičiau. Martini ir kitų (2019) publikacijoje pateikti analogiški kiaulienos baltymų virškinamumo rezultatai: daugiausia amino grupių atpalaiduojama žarnyno virškinimo etape [110].

Toliau stebimos atsikartojančios tendencijos – kuo ilgiau mėsa yra brandinama, tuo greitesnis jos baltymų virškinimas (žr. 14 pav. B). G0, G60 ir G120 virškinimo taškuose visų 2.1, 3.1 ir 4.1 mėginių hidrolizės laipsnis statistiškai patikimai didesnis ($p < 0,05$) lyginant su 1.1 mėginiu. D5 ir D120 virškinimo taškuose, statistiškai patikimas skirtumas ($p < 0,05$) stebimas tik 3.1 ir 4.1 mėginius lyginant su 1.1, tuose pačiuose virškinimo taškuose 2.1 mėginio hidrolizės laipsnis statistiškai reikšmingai nesiskiria ($p > 0,05$), lyginant su 1.1 mėginio hidrolizės laipsniu. Šie rezultatai patvirtina anksčiau aprašytus rezultatus (žr. 14 pav. A) – mėsa turi būti brandinama mažiausiai 12 parų, kad brandinimo trukmė turėtų įtakos mėsos baltymų virškinamumui. Tokius rezultatus paaiškina mėsos brandinimo metu veikiantys proteolitiniai fermentai, kurie veikia tokiu pat principu, kaip ir virškinimo fermentai ir skaldo mėsoje esančius baltymus, todėl mėsa pasidaro minkštesnė, greičiau virškinama [40]. Gauti rezultatai patvirtina mėsos brandinimo specialistų rekomendacijas, kurios nurodo, kad norint pasiekti pastebimų rezultatų mėsą rekomenduojama brandinti bent 14 dienų [111]. Galima manyti, kad dėl baltymų proteolizės, vykstančios mėsos brandinimo metu, po virškinimo žarnyne, iš visų 4 paras brandintoje mėsoje esančių baltymų, žmogus įsisavins tik maždaug 31 proc., 8 paras – 32 proc., 12 parų – 43 proc., o po 22 paras brandintos mėsos virškinimo, žmogaus organizme bus absorbuota net 58 proc. visų mėsoje esančių baltymų proteolizės produktų.



14 pav. Peptidų koncentracijos (A) ir hidrolizės laipsnio (B) kitimas skirtingą laiką tarpą brandintos mėsos virškinimo metu: 1.1, 2.1, 3.1 ir 4.1 – 4, 8, 12 ir 22 paras, atitinkamai, tradiciniu būdu brandintos mėsos mėginiai. G0, G60, G120 – virškinimo taškai skrandžio fazėje, D5 ir D120 – žarnyno fazėje.

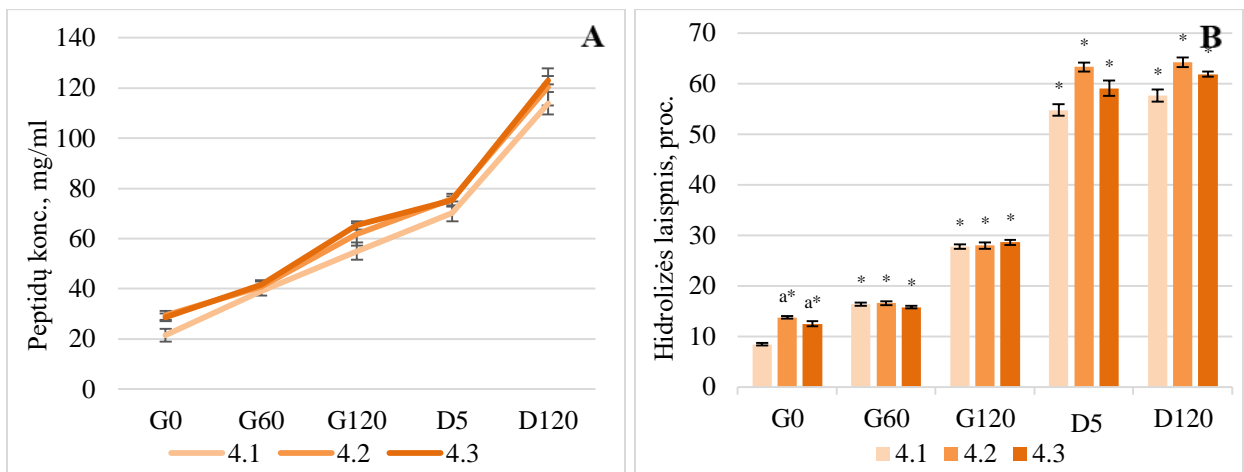
Vertės pateikiamos kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis; * rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą (p < 0,05) skirtumus lyginant su tuo pačiu mėginiu G0 taške; ^a rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą (p < 0,05) skirtumus lyginant su 1.1 mėginiu tame pačiame virškinimo taške.

Brandinimo plėvelės įtaka

Brandinimo plėvelės įtaka mėsos baltymų virškinimo dinamikai pavaizduota 15 paveiksle. Plėvelės įtaka lyginama praėjus 22 paroms nuo brandinimo pradžios. Paveikslo A dalyje matome, kad mėginio, kuris buvo brandintas be jokios plėvelės (4.1) virškinimo metu buvo atpalaiduota mažiau peptidų, tačiau skirtumas nėra statistiškai reikšmingas (p > 0,05). Galime numanyti, kad tradiciniu būdu brandinta mėsa, lyginant su mėsa, kuri yra brandinama naudojant specialią brandinimo plėvelę, virškinimas yra lėtesnis, tačiau skirtumas yra labai nežymus. Mėginių, kurie buvo brandinti naudojant skirtingas brandinimo plėveles, kreivės persidengusios, virškinimo sultyse ištirpusių peptidų kiekis nėra statistiškai skirtingas visuose virškinimo taškuose (p > 0,05), vadinasi peptidų, virškinimo metu atpalaiduotų iš mėsos baltymų, koncentracijai brandinimo plėvelės rūšis įtakos neturi. Visų mėginių mėsos virškinimo dinamika statistiškai reikšmingai (p < 0,05) didėja tiek skrandžio, tiek žarnyno virškinimo etapuose, lyginant su G0 tašku.

Mėsos baltymų hidrolizės laipsnio pagal atpalaiduotas laisvas amino grupes virškinimo metu rezultatai pateikti 15 paveikslo B dalyje. Mėsos brandinimo būdas baltymų hidrolizės laipsniui skrandžio fazėje statistiškai reikšmingą įtaką (p < 0,05) turi tik G0 taške, lyginant mėginius brandintus naudojant PA / PE ir PET / Alox. plėveles, su mėginiu, kurio brandinimui nebuvo naudota jokia plėvelė. Žarnyno virškinimo etape D5 ir D120 taškuose ši tendencija vėl išryškėja, tačiau rezultatai nėra statistiškai skirtingi (p > 0,05). Hidrolizės laipsniui žarnyno fazėje nežymią reikšmę turi ir brandinimo plėvelės pasirinkimas – čia su plėvele PA / PE brandintos mėsos (mėginys 4.2) virškinimo metu baltymų hidrolizės laipsnis yra didesnis negu mėsos brandintos

naudojant plėvelę PET / Alox (mėginys 4.3), tačiau skirtumas nėra statistiškai reikšmingas ($p > 0,05$). Parrish ir kitų (1991) publikacijoje nurodoma, kad brandintos jautienos nugarinė po brandinimo plėvelėje buvo žymiai minkštesnė, lyginant su jautienos nugarine, kuri buvo brandinta be plėvelės, tačiau anot Warren ir Kastner (1992), brandinimo būdas statistiškai patikimos įtakos mėsos minkštumui neturi [112, 113]. Remiantis šiais duomenimis galima numanyti, kodėl tradiciniu būdu, nenaudojant jokios plėvelės, mėsos virškinamumas buvo lėtesnis: kuo mėsa kietesnė, tuo lėčiau ji yra virškinama. Visų mėginių mėsos baltymų hidrolizės laipsnio dinamika statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) didėja skrandžio etape, o perėjus į žarnyno etapą hidrolizės laipsnis itin staigiai padidėja ($p < 0,05$) dėl proteolitinių virškinimo fermentų pasikeitimo. Analogiškai kiaulienos baltymų virškinamumo rezultatai paskelbti Martini ir kitų (2019) publikacijoje [110].



15 pav. Peptidų koncentracijos (A) ir hidrolizės laipsnio (B) kitimas skirtingomis sąlygomis brandintos mėsos virškinimo metu: 4.1, 4.2 ir 4.3 – 22 paras be plėvelės, su PA / PE ir PET / Alox. plėvelėmis, atitinkamai, brandintos mėsos mėginiai. G0, G60, G120 – virškinimo taškai skrandžio fazėje, D5 ir D120 – žarnyno fazėje.

Vertės pateikiamos kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis; * rodo reikšmingus pagal Studento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant su tuo pačiu mėginiu G0 taške; ^a rodo reikšmingus pagal Studento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant su 4.1 mėginiu tame pačiame virškinimo taške.

3.2.2. Skirtingomis sąlygomis brandintos kiaulienos aminorūgščių susidarymo vertinimas virtos mėsos *in vitro* virškinimo metu

Norėdami apibūdinti mėsos virškinimo metu susidariusių aminorūgščių biologinį prieinamumą, nustatėme laisvas aminorūgštis, išsiskiriančias į virškinimo trakto sultis imituojamo virškinimo plonajame žarnyne pabaigoje, t.y. D120 virškinimo taške. Šie duomenys pateikti kaip atskiro aminorūgščių kiekio, išsiskyrusio į virškinamojo trakto sultis dalis, palyginti su tos pačios aminorūgšties kiekiu mėsoje. Aminorūgščių identifikacija *in vitro* sąlygomis suvirškintuose skirtingai brandintos mėsos mėginiuose atlikta pasitelkiant aukšto slėgio efektyviąją skysčių chromatografiją.

Brandinimo trukmės įtaka

7 lentelėje laisvų amino rūgščių sudėtis, skirtingomis sąlygomis brandintos mėsos suvirškintuose mėginiuose, pateikta procentine dalimi nuo bendro amino rūgščių kiekio mėsoje. Lentelėje lyginama mėsos brandinimo trukmės įtaka laisvų, virškinimo sultyse ištirpusių, aminorūgščių sudėčiai po mėsos baltymų fermentinės hidrolizės. Lyginimui buvo pasirinkti kontroliniai mėginiai, brandinti be plėvelės.

Bendras laisvų amino rūgščių kiekis, ilgėjant mėsos brandinimo trukmei, statistiškai reikšmingai didėja nuo 12 brandinimo paros – po 8 paras brandintos mėsos virškinimo žarnyne atpalaiduojamų amino rūgščių skirtumas lyginant su 4 paras brandinta mėsa, skirtumas nėra statistiškai reikšmingas ($p > 0,001$), o po 12 ir 22 paras brandintos mėsos *in vitro* virškinimo žarnyne atpalaiduojama net 8,93 proc. ir 34,66 proc. ($p < 0,001$) daugiau visų amino rūgščių, lyginant su 4 paras brandinta mėsa, atitinkamai. Gauti rezultatai patvirtina anksčiau aptartus rezultatus (žr. 14 pav.), kad mėsa turėtų būti brandinama mažiausiai 12 parų, kad brandinimo trukmę turėtų įtakos mėsos baltymų virškinamumui. Rezultatai patvirtina Cempbelo ir kitų (2001) tyrimo metu gautus rezultatus: 14 dienų brandinta jautiena pasižymėjo lengvesne tekstūra, geresniu skoniu ir buvo sultingesnė, lyginant su nebrandinta arba 7 dienas brandinta jautiena [4]. Nacionalinė galvijienos ir jautienos asocijacija (angl. *National Cattlemen's Beef Association*) Jungtinėse Amerikos Valstijose pasidalino rekomendacija, jautieną brandinti 14 – 35 dienas, norint pasiekti pastebimų rezultatų [111]. Lee ir kiti (2017) atliko tyrimą, kuriame taip pat nurodė, kad jautienos brandinimas 28 paras, nenaudojant jokios plėvelės, daro teigiamą įtaką bendram laisvų aminorūgščių kiekiui brandintoje mėsoje [48].

Nuo 12 brandinimo paros statistiškai reikšmingai didėja ir bendras atpalaiduotų nepakeičiamų amino rūgščių kiekis ($p < 0,001$). Šios amino rūgštys yra reikalingos organizmo gyvybiniams procesams palaikyti ir nėra sintetinės žmogaus organizme, todėl jų būtina gauti su maistu. Didėjant brandinimo trukmei nuo 12 brandinimo paros statistiškai reikšmingai ($p < 0,001$) didėja ir bendras po *in vitro* virškinimo atpalaiduotų sieros turinčių (cisteino ir metionino) aminorūgščių kiekis. Šios aminorūgštys iš esmės prisideda prie ląstelių sistemų palaikymo ir vientisumo, veikdamos ląstelių redokso būseną ir gebėjimą detoksikuoti toksiškus junginius, laisvuosius radikalus ir reaktyviuosius deguonies radikalus [114]. Brandinimo trukmė taip pat turi statistiškai reikšmingos ($p < 0,001$) įtakos bendram po virškinimo žarnyne, atpalaiduotų šakotų aminorūgščių kiekiui (leucinui, izoleucinui ir valinui). Šios aminorūgštys ne tik padeda išvengti nuovargio, pagerina smegenų funkcijas, skatina kūno svorio kritimą, raumenų masės augimą, bet ir gali padėti išvengti kepenų ligų nei diabeto [115]. Gauti rezultatai patvirtina, kad brandinta mėsa žmogaus sveikatai naudinga ne tik dėl greitesnio virškinimo, bet ir po virškinimo išsiskyrusių, žmogaus sveikatai naudingų junginių.

Mūsų tyrime, *in vitro* suvirškinus brandintą kiaulienos nugarinę nepavyko nustatyti dviejų laisvų aminorūgščių: aspargino ir prolino, abi šios amino rūgštys yra pakeičiamosios. Iš gautų duomenų matome, kad brandinimo trukmė neturi įtakos nepakeičiamosios amino rūgšties – laisvojo

histidino kiekiui ir neigiamai paveikia laisvojo arginino kiekį. Daugiausia, po virškinimo, atpalaiduojama izoleucino, lizino, triptofano ir fenilalanino, kurios yra nepakeičiamos aminorūgštys. Kai kurių atpalaiduotų aminorūgščių kiekis viršijo 100 proc. Tokius rezultatus galėjo nulemti analizės netikslumai atsiradę dėl to, kad atsipalaidavusių aminorūgščių kiekiui apskaičiuoti, buvo analizuojami tiek suvirškinti mėginiai, tiek mėsa po rūgštinės hidrolizės.

7 lentelė. Mėsos brandinimo trukmės įtaka laisvų aminorūgščių sudėčiai tradiciniu būdu brandintos mėsos mėginiuose, po *in vitro* virškinimo žarnyne

Aminorūgštis	Atpalaiduotų aminorūgščių kiekis, proc.			
	4 paros	8 paros	12 parų	22 paros
Asparto rūgštis	4,01 (±0,12)	3,89 (±0,12)	11,04 (±0,34)*	49,3 (±1,51)*
Glutamo rūgštis	9,78 (±0,28)	9,85 (±0,28)	21,52 (±0,62)*	57,06 (±1,64)*
Asparginas	0,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)
Serinas	26,47 (±1,49)	25,93 (±1,46)	42,5 (±2,39)*	51,33 (±2,89)
Histidinas	39,17 (±2,05)	32,83 (±1,72)	36,91 (±1,94)	53,58 (±2,81)
Glicinas	10,52 (±0,31)	9,96 (±0,29)	19,2 (±0,56)*	31,33 (±0,91)*
Treoninas	29,38 (±0,75)	28,01 (±0,72)	40,33 (±1,04)*	67,1 (±1,72)*
Argininas	124,21 (±0,67)	106,33 (±0,57)*	130,08 (±0,7)*	3,54 (±0,02)*
Alaninas	37,96 (±1,62)	35,35 (±1,51)	52,61 (±2,24)*	81,09 (±3,46)*
Tirozinas	34,78 (±0,58)	32,94 (±0,55)*	22,44 (±0,38)*	66,11 (±1,11)*
Cisteinas	50,78 (±2,32)	50,22 (±2,29)	62,82 (±2,87)*	113,16 (±5,17)*
Valinas	54,27 (±4,04)	54,39 (±4,05)	67,36 (±5,02)	109,14 (±8,13)*
Metioninas	53,29 (±0,19)	46,05 (±0,17)*	67,06 (±0,24)*	92,64 (±0,34)*
Triptofanas	92,37 (±0,23)	80,88 (±0,2)*	97,96 (±0,24)*	131,94 (±0,32)*
Fenilalaninas	56,24 (±3,99)	50,31 (±3,57)	66,95 (±4,75)	107,33 (±7,62)*
Izoleucinas	68,7 (±0,67)	57,83 (±0,56)*	75,94 (±0,74)*	113,56 (±1,1)*
Leucinas	61,55 (±0,98)	49,67 (±0,79)*	66,25 (±1,05)*	97,91 (±1,55)*
Lizinas	62,63 (±2,81)	106,51 (±4,78)*	71,24 (±3,20)	102,3 (±4,59)*
Prolinas	0,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)	14,62 (±1,03)*	0,00 (±0,00)
Viso pakeičiamų aminorūgščių	17,89 (±0,65)	17,3 (±0,63)	27,73 (±1,01)*	58,08 (±2,11)*
Viso nepakeičiamų aminorūgščių	63,84 (±0,13)	61,9 (±0,13)*	71,92 (±0,15)*	93,37 (±0,19)*
Viso sieros turinčių aminorūgščių	52,12 (±1,01)	47,93 (±0,93)*	65,1 (±1,27)*	101,94 (±1,98)*
Viso šakotų aminorūgščių	63,13 (±0,21)	54,05 (±0,18)*	70,57 (±0,24)*	106,74 (±0,36)*
Viso:	41,68 (±0,79)	40,39 (±0,76)	50,61 (±0,96)*	76,34 (±1,44)*

*Reikšmingai skirtinga, lyginat su kontroliniu (1.1) mėginiu, pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,001$)

Brandinimo plėvelės įtaka

8 lentelėje pateikti duomenys apie amino rūgščių sudėtį skirtingose plėvelėse brandintos mėsos *in vitro* suvirškintuose mėginiuose. Lentelėje lyginama brandinimo plėvelės įtaka laisvų, virškinimo sultyse ištirpusių, aminorūgščių sudėčiai po mėsos baltymų fermentinės hidrolizės. Rezultatų analizei, dėl didžiausio hidrolizės laipsnio, buvo pasirinkti mėginiai po ilgiausio brandinimo – 22 paros.

Mažesnis laisvų amino rūgščių kiekis išsiskiria suvirškinus mėsą, kuri brandinta naudojant PA / PE ir PET / Alox plėveles – 57,23 proc. ir 63,57 proc., atitinkamai. Statistiškai reikšmingai ($p < 0,001$) daugiau laisvų amino rūgščių išsiskiria po mėsos, brandintos nenaudojant plėvelės – 76,34 proc. Analogiški rezultatai pateikti ir Lee ir kitų (2017) publikacijoje: po 28 parų jautienos brandinimo naudojant ir nenaudojant brandinimo plėvelę, didesnis amino rūgščių kiekis nustatytas mėsoje, kuri buvo brandinta sausuoju metodu [48].

Skirtingais būdais brandintos mėsos po *in vitro* virškinimo žarnyne mėginiuose visais atvejais mums nepavyko nustatyti asparagino kiekio. Iš 8 lentelėje pateiktų rezultatų galime spręsti, kad brandinimo metodas turi įtakos tiek bendram atpalaiduotų nepakeičiamų, tiek sieros turinčių, tiek šakotų amino rūgščių kiekiui. Daugiausia ($p < 0,001$) aminorūgščių iš visų šių grupių po *in vitro* virškinimo žarnyne atsipalaidavo iš mėsos, brandintos, nenaudojant jokios plėvelės, o mažiausia ($p < 0,001$) iš mėsos, brandintos naudojant plėvelę PA / PE. Kai kurių aminorūgščių atsipalaidavo daugiau negu 100 proc. Taip galėjo nutikti dėl analizės metu gautų paklaidų.

8 lentelė. Brandinimo plėvelės įtaka laisvų aminorūgščių sudėčiai 22 paras brandintos mėsos mėginiuose po *in vitro* virškinimo žarnyne (tęsinys 56 puslapyje)

Aminorūgštis	Atpalaiduotų aminorūgščių kiekis, proc.		
	Be plėvelės	PA / PE	PET / Alox
Asparto rūgštis	49,3 ($\pm 1,51$)	32,81 ($\pm 1,00$) ^{ab}	35,56 ($\pm 1,09$) ^{ab}
Glutamo rūgštis	57,06 ($\pm 1,64$)	39,15 ($\pm 1,12$) ^{ab}	42,5 ($\pm 1,22$) ^{ab}
Asparginas	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)
Serinas	51,33 ($\pm 2,89$)	32,24 ($\pm 1,81$) ^{ab}	39,58 ($\pm 2,23$) ^{ab}
Histidinas	53,58 ($\pm 2,81$)	41,55 ($\pm 2,18$) ^a	45,32 ($\pm 2,38$) ^b
Glicinas	31,33 ($\pm 0,91$)	24,56 ($\pm 0,71$) ^{ab}	27,56 ($\pm 0,8$) ^{ab}
Treoninas	67,1 ($\pm 1,72$)	52,11 ($\pm 1,34$) ^{ab}	58,72 ($\pm 1,51$) ^{ab}
Argininas	3,54 ($\pm 0,02$)	9,04 ($\pm 0,05$) ^{ab}	12,82 ($\pm 0,07$) ^{ab}
Alaninas	81,09 ($\pm 3,46$)	57,02 ($\pm 2,43$) ^{ab}	63,1 ($\pm 2,69$) ^{ab}
Tirozinas	66,11 ($\pm 1,11$)	58,24 ($\pm 0,98$) ^a	62,75 ($\pm 1,05$) ^{ab}
Cisteinas	113,16 ($\pm 5,17$)	73,35 ($\pm 3,35$) ^a	97,54 ($\pm 4,46$) ^{ab}
Valinas	109,14 ($\pm 8,13$)	79,71 ($\pm 5,94$)	88,44 ($\pm 6,59$) ^b
Metioninas	92,64 ($\pm 0,34$)	71,86 ($\pm 0,26$) ^{ab}	85,24 ($\pm 0,31$) ^{ab}

Triptofanas	131,94 ($\pm 0,32$)	102,99 ($\pm 0,25$) ^{ab}	109,5 ($\pm 0,27$) ^{ab}
Fenilalaninas	107,33 ($\pm 7,62$)	82,9 ($\pm 5,88$)	92,14 ($\pm 6,54$) ^b
Izoleucinas	113,56 ($\pm 1,10$)	86,84 ($\pm 0,84$) ^{ab}	93,99 ($\pm 0,91$) ^{ab}
Leucinas	97,91 ($\pm 1,55$)	76,17 ($\pm 1,21$) ^{ab}	82,07 ($\pm 1,30$) ^{ab}
Lizinas	102,3 ($\pm 4,59$)	89,54 ($\pm 4,02$)	92,91 ($\pm 4,17$) ^b
Prolinas	0,00 ($\pm 0,00$)	0 ($\pm 0,00$) ^{ab}	9,16 ($\pm 0,65$) ^{ab}
Viso pakeičiamų amino rūgščių	58,08 ($\pm 2,11$)	39,65 ($\pm 1,44$) ^{ab}	45,46 ($\pm 1,65$) ^{ab}
Viso nepakeičiamų amino rūgščių	93,37 ($\pm 0,19$)	73,62 ($\pm 0,15$) ^{ab}	80,45 ($\pm 0,17$) ^{ab}
Viso sieros turinčių amino rūgščių	101,94 ($\pm 1,98$)	72,5 ($\pm 1,41$) ^{ab}	90,79 ($\pm 1,77$) ^{ab}
Viso šakotų amino rūgščių	106,74 ($\pm 0,36$)	81,37 ($\pm 0,28$) ^{ab}	88,36 ($\pm 0,30$) ^{ab}
Viso:	76,34 ($\pm 1,44$)	57,23 ($\pm 1,08$) ^{ab}	63,57 ($\pm 1,20$) ^{ab}

^aReikšmingai skirtinga, lyginat su kontroliniu (4.1) mėginiu, pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,001$);

^bReikšmingai skirtinga, lyginat 4.2 ir 4.3 mėginius tarpusavyje, pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,001$).

3.2.3. Skirtingomis sąlygomis brandintos virtos kiaulienos nugarinės *in vitro* virškinimo metu susidariusių peptidų vertinimas

Paskutiniame tyrimų etape atlikome detalesnius mėsos virškinimo metu susidariusių peptidų tyrimus, nustatydami brandinto mėsos virškinimo metus susidariusių peptidų profilius ir įvertindami peptidų savybes: ATF slopinimą ir antioksidacines savybes.

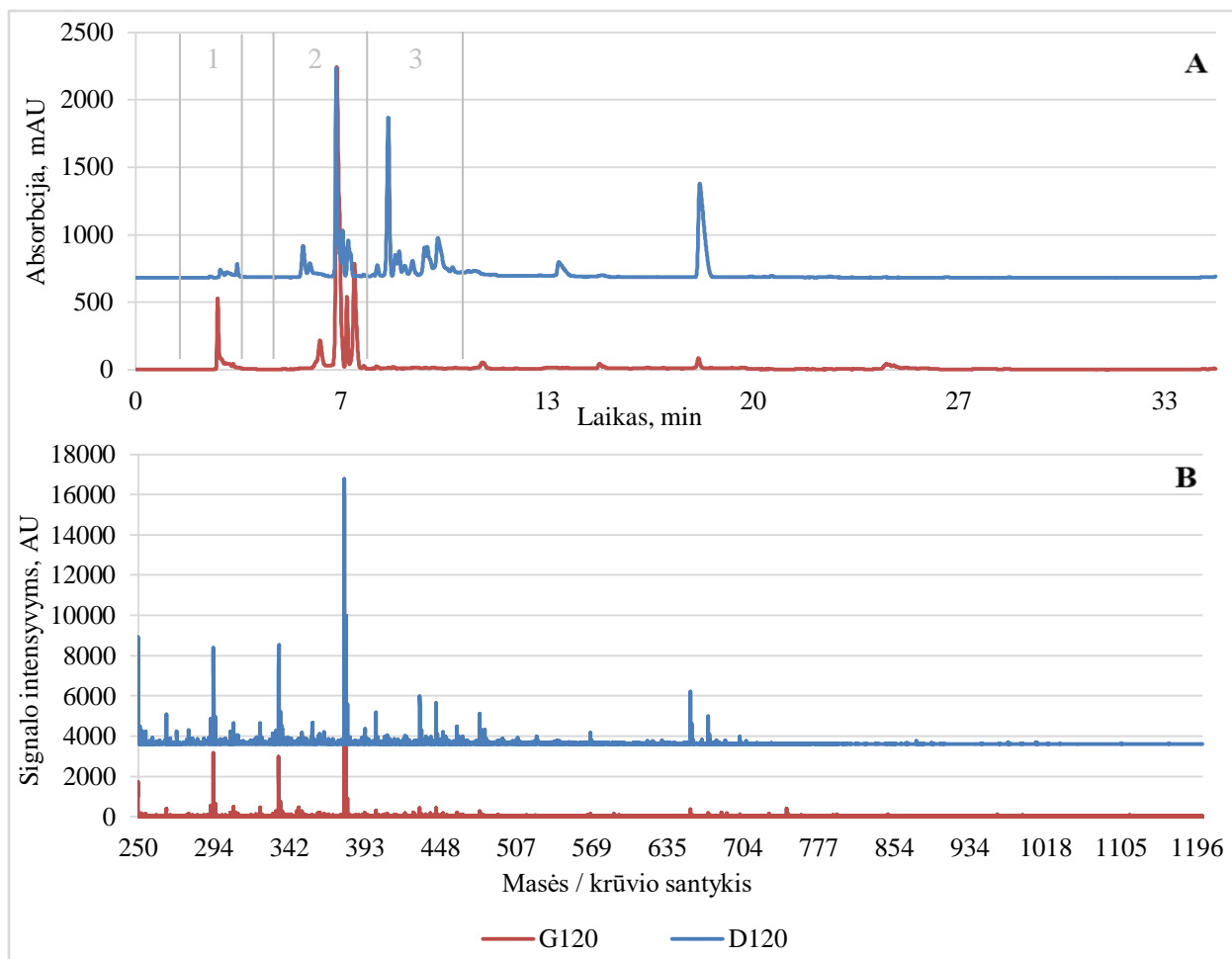
Virškinimo etapo įtaka suvirškintos mėsos peptidų profiliui

Pirmiausia, skirtingomis sąlygomis brandintos mėsos *in vitro* virškinimo metu išsiskyrusius peptidus įvertinome pasitelkiant aukšto slėgio efektyviosios skysčių chromatografijos metodą. Šiuo metodu įvertinome ir tarpusavyje lyginome tiriamųjų mėginių peptidų profilius. Mėsos brandinimo metu susidariusių baltymų skilimo junginių profilio nustatymui taip pat panaudotas MALDI-TOF analizatorius. Šiuo metodu buvo įvertinti ir tarpusavyje lyginami tiriamųjų mėginių peptidų profiliai.

16 paveikslo A dalyje pavaizduoti brandintos, virškintos mėsos aukšto slėgio efektyviosios skysčių chromatografijos peptidų profiliai, dviejuose virškinimo etapų taškuose (G120 ir D120). Lyginami be plėvelės brandinto mėsos po *in vitro* virškinimo atpalaiduotų peptidų profiliai. Pastebimi gana aiškūs skirtumai – skrandžio virškinimo etape smailių yra žymiai mažiau, tai reiškia, kad šiuose mėginiuose yra mažiau skirtingų peptidų, lyginant su peptidais atpalaiduotais žarnyno virškinimo etape. Trečioje chromatogramų sekcijoje matosi, kad D120 virškinimo taške atsiskyrė peptidai, kurie nerandami G120 taške. Tokie rezultatai buvo tikėtini, nes ankstesnių tyrimų rezultatai parodė, kad plonosios žarnos etapo pabaigoje baltymų hidrolizė buvo

didžiausia – vadinasi atpalaiduojama daugiau peptidų. Smailės esančios pirmojoje ir antrojoje chromatogramų sekcijoje, skrandžio fazėje yra aukštesnės negu žarnyno fazėje – didesnis smailių plotas nurodo, kad to pačio junginio mėginyje yra aptinkama daugiau. Šių smailių ploto sumažėjimas D120 taške parodo, kad peptidai, kurie susidarė skrandžio fazėje galėjo būti fermentiškai hidrolizuojami iki mažesnių peptidų, kurie atitinka smailes trečiojoje sekcijoje D120 chromatogramoje. Gauti rezultatai yra analogiški Gallego ir kitų (2020) atlikto, sausai brandinto kiaulienos kumpio baltymų virškinamumo tyrimo, rezultatams. Šiame, mokslininkų tyrime atlikta efektyviosios aukšto slėgio skysčių chromatografijos peptidų profilių analizė parodė, kad virškiname mėginyje, lyginant su nevirškintu mėginiu, peptidus atitinkančios smailės yra išsidėsčiusios aukščiau, vadinasi peptidų koncentracija didesnė, dėl proteolitinių fermentų veikimo ir peptidų atpalaidavimo iš mėsoje buvusių baltymų. To paties tyrimo metu nustatyta, kad šie peptidai dėl virškinimo fermentų veikimo susidarė daugiausia iš titino, miozino, kolageno ir aktino [116]. Galima daryti prielaidą, kad tokie patys arba panašūs peptidai susidarė ir mūsų atlikto mėsos virškinamumo tyrimo metu.

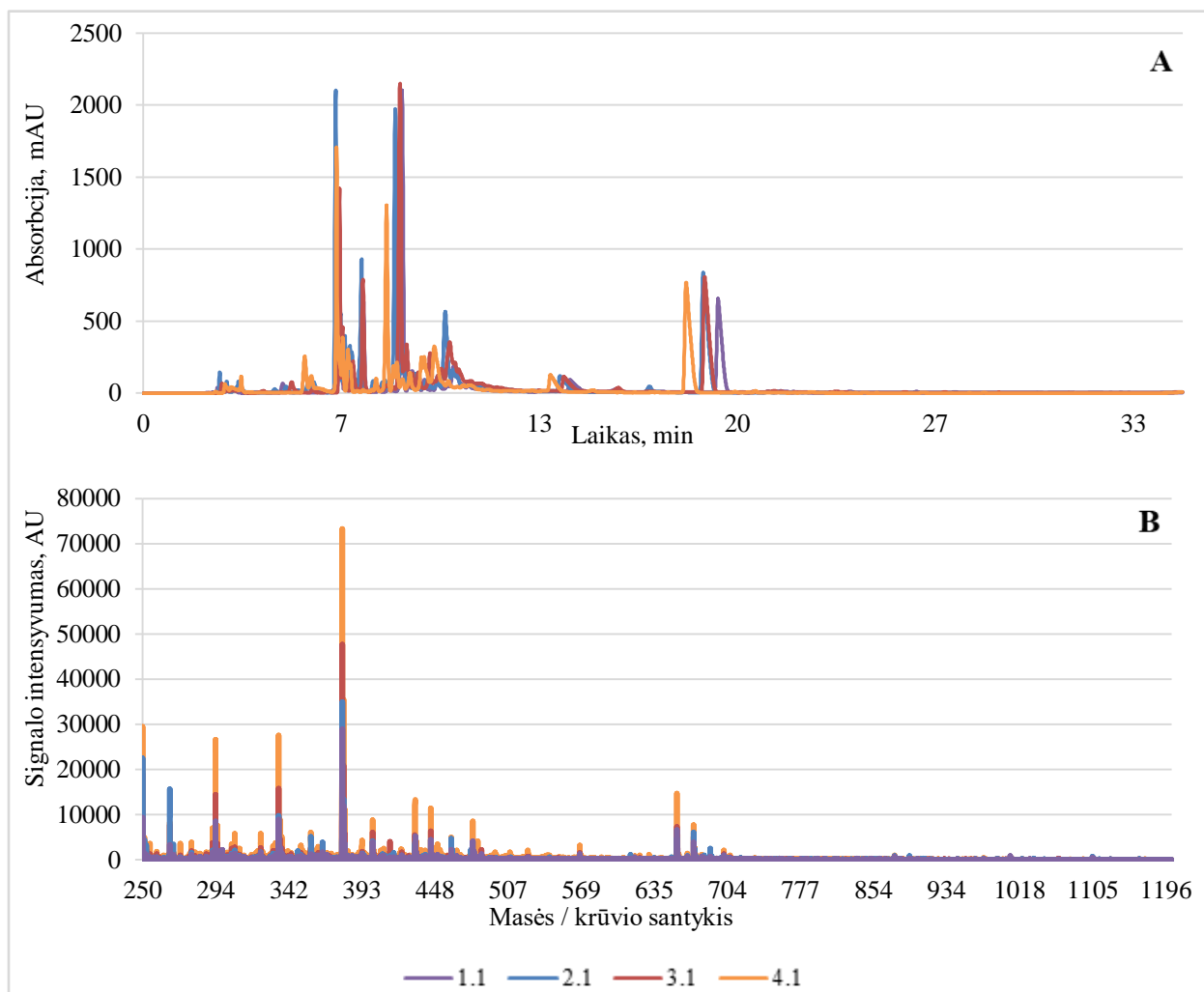
MALDI-TOF analizės metu gauta chromatograma, pavaizduota 16 paveikslo A dalyje, parodo analogiškus rezultatus. Mora ir kitų (2014) literatūroje pateiktas ispaniško sausai brandinto kumpio MALDI-TOF peptidų profilis panašus į mūsų atlikto tyrimo metu analizuotų mėginių peptidų profilį: didžiosios dalies peptidų masės / krūvio santykis yra maždaug nuo 250 iki 700, užsienio literatūroje nuo 400 iki 700. Šio tyrimo metu buvo nustatyta, kad 23 proc. visų šių peptidų proteolizės metu susidarė iš baltymo aktino, 20 proc. iš β -enolazės, 16 proc. iš miozino, 6 proc. iš elastino [102]. Galima manyti, kad mūsų atlikto tyrimo metu po brandintos mėsos *in vitro* virškinimo žarnyne, susidarė tie patys arba panašūs peptidai, pasižymintys panašiomis savybėmis.



16 pav. Aukšto slėgio efektyviosios skysčių chromatografijos (A) ir MALDI-TOF (B) peptidų profilių skirtumai po 22 parų be plėvelės brandintos mėsos (4.1) virškinimo skrandžio fazėje (G120) ir žarnyno fazėje (D120)

Brandinimo trukmės įtaka peptidų profiliui

17 paveiksle pateikti peptidų, atpalaiduotų skirtingą laiką tarpą brandintos mėsos virškinimo metu, profiliai. Rezultatų lyginimui buvo pasirinkti D120 virškinimo taško kontroliniai mėginiai, kurie buvo brandinti be plėvelės. Chromatogramose skirtingus peptidus atitinkančių smailių skaičius ir vieta yra panaši, todėl daroma prielaida, kad skirtinguose mėginiuose, po jų virškinimo, buvo identifikuoti tie patys peptidai. Įvertinus chromatogramų panašumus galima teigti, kad brandinimo trukmė neturi didelės įtakos po virškinimo atpalaiduojamų peptidų profiliui. MALDI-TOF chromatogramos, pavaizduotos 17 paveikslo B dalyje patvirtina, kad brandinimo trukmė neturi didelės įtakos skirtingų peptidų išsiskyrimui, tačiau parodo, kad ilginant brandinimo trukmę, tų pačių smailių signalas stiprėja. Tai gali, bet nebūtinai parodo peptidų koncentracijos didėjimą ilginant mėsos brandinimo laiką – signalo stiprumas priklauso ne tik nuo peptidų koncentracijos, bet ir nuo matricos bei daugelio kitų sąlygų [117].

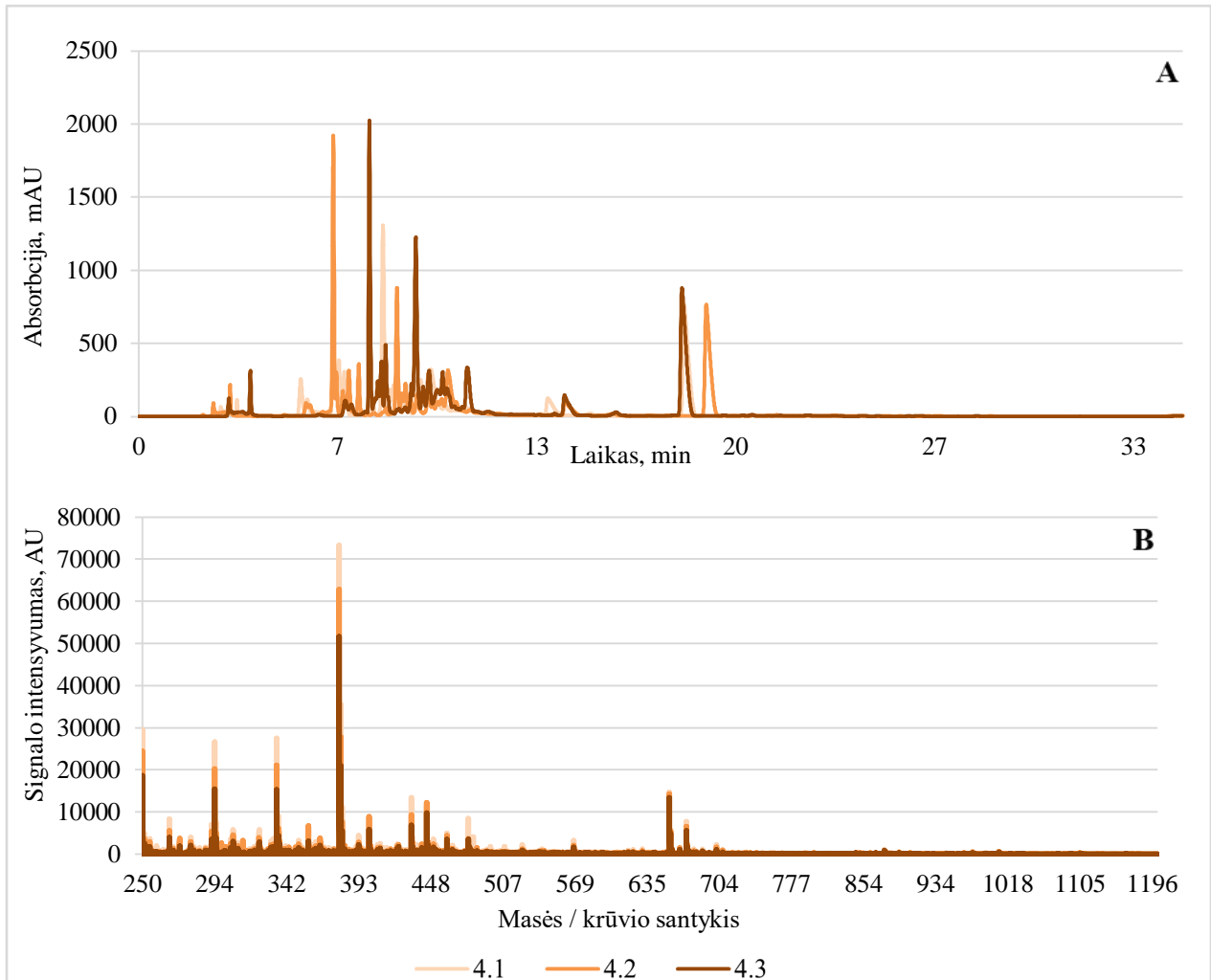


17 pav. Mėsos brandinimo trukmės įtaka po jos virškinimo žarnyne atpalaiduotų aukšto slėgio efektyviosios skysčių chromatografijos (A) ir MALDI-TOF (B) peptidų profiliui
 Čia: 1.1, 2.1, 3.1 ir 4.1 – 4, 8, 12 ir 22 paras, atitinkamai, tradiciniu būdu brandintos mėsos mėginiai.

Brandinimo plėvelės įtaka suvirškintos mėsos peptidų profiliui

Brandinimo tipo įtakos suvirškintos mėsos peptidų profilio lyginimui pasirinkome mėginius, kurių brandinimo trukmė buvo ilgiausia (22 paras), nes ankstesniuose tyrimuose nustatėme, kad didžiausią hidrolizės laipsnį šiuose mėginiuose. 18 paveiksle pavaizduoti skirtingose plėvelėse brandintos mėsos mėginių peptidų profilių skirtumai. Chromatogramos parodo, kad nors junginių atskyrimo laikas nežymiai skiriasi, visos smailės beveik identiškios – tai rodo, kad visuose lyginamuosiuose mėginiuose po virškinimo atpalaiduojami tie patys peptidai. Kreivės šiek tiek pasislinkusios į šoną, todėl daroma prielaida, kad tų pačių junginių atskyrimo laikas skiriasi, nes per naktį pakito temperatūra kolonėlėje. Galima teigti, kad brandinimo plėvelė taip pat neturi jokios reikšmingos įtakos peptidų profiliui suvirškintuose mėginiuose.

In vitro suvirškintų, brandintų mėsos mėginių peptidų MALDI-TOF profiliai (žr. 18 pav. B) patvirtina anksčiau pateiktus aukšto slėgio efektyviosios skysčių chromatografijos rezultatus. Kadangi skirtinguose mėginiuose, peptidus identifikuojančios smailės yra persiklojusios, galime teigti, kad brandinimo plėvelė neturi įtakos po *in vitro* virškinimo iš mėsos baltymų atpalaiduotų peptidų išsiskyrimui. Mėsos, brandintos nenaudojant plėvelės smailės iškilusios aukščiausiai, o mėsos, brandintos naudojant PET / Alox. plėvelę – žemiausiai. Tai gali, bet nebūtinai reiškia, kad po virškinimo žarnyne iš mėsos, brandintos nenaudojant jokios plėvelės, baltymų susidaro daugiausiai peptidų, kurie galimai pasižymi bioaktyviosiomis savybėmis [117].



18 pav. Mėsos brandinimo būdo įtaka po jos virškinimo žarnyne išsiskyrusių aukšto slėgio efektyviosios skysčių chromatografijos (A) ir MALDI-TOF (B) peptidų profiliui

Čia: 4.1, 4.2 ir 4.3 – 22 paras be plėvelės, su PA / PE ir PET / Alox. plėvelėmis, atitinkamai, brandintos mėsos mėginiai.

Atvirskčiosios fazės skysčių chromatografijos metu kaip mobilioji fazė buvo naudotas vandeninis acetonitrilo tirplalas, pirmiausia iš kolonėlės išplaunami hidrofiliniai peptidai, o vėliausiai hidrofobinėmis savybėmis pasižymintys peptidai. Remiantis 17 ir 18 paveiksle

pateiktais rezultatais, galime teigti, kad daugiausia peptidų aptinkama pirmoje chromatogramos dalyje, vadinasi daugiausia *in vitro* virškinimo metu iš mėsos baltymų atpalaiduotų peptidų, yra hidrofiliniai ir gerai tirpsta vandenyje.

MALDI-TOF analizės metu peptidai atskiriami pagal jų masės / krūvio santykį. Iš 17 ir 18 paveiksle pateiktų rezultatų galime teigti, kad *in vitro* virškinimo metu atpalaiduoti peptidai yra nedidelės molekulinės masės. Daugiausia peptidų identifikuota 0-700 masės / krūvio intervale. Remiantis Mora ir kitų (2017) atliktu keturias savaites brandintos kiaulienos virškinamumo tyrimu, galime teigti, kad identifikuoti peptidai *in vitro* virškinimo metu yra suhidrolizinami iš α -aktinino, aktino, kolageno, elastino, L-laktato dehidrogenazės, miomezino, miozino ir titino [95]. Tų pačių autorių darbe MALDI-TOF analizatoriumi sausai brandintame kumpyje buvo identifikuoti IGGSI, YELPDGQVI, ELPDGQVITIGNER peptidai, proteolizės metu susidarę iš aktino ir SIEDPFDQDD susidaręs iš β -enolazės [102].

3.2.4. Peptidų biologiškai aktyvių savybių vertinimas

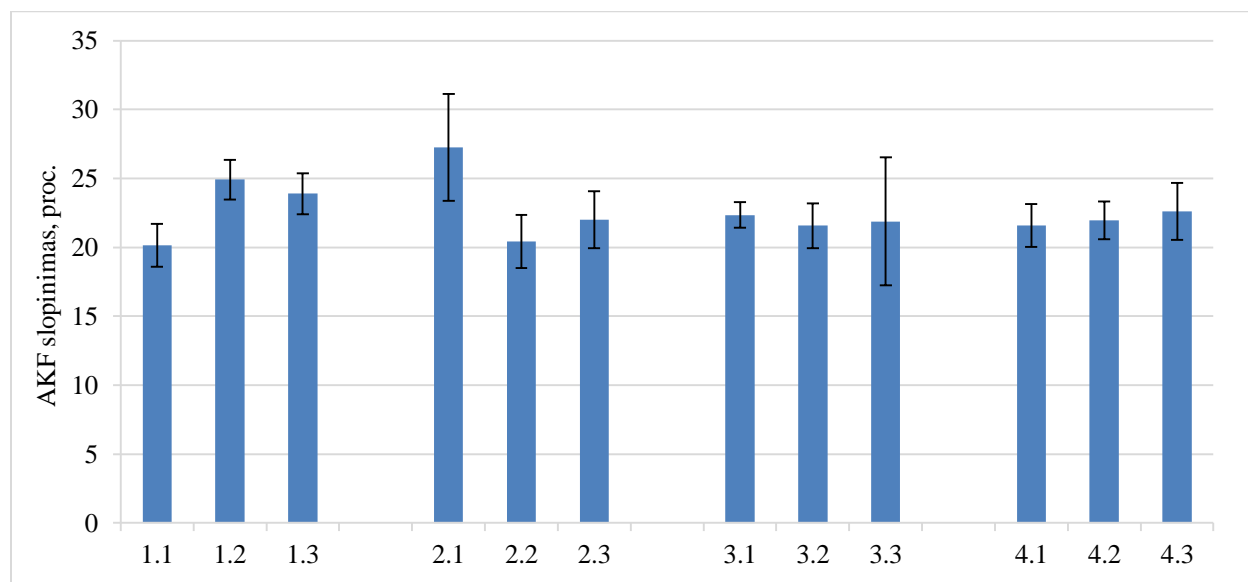
In vitro virškinimo metu atpalaiduotų peptidų bioaktyviosios savybės buvo vertinamos pagal jų AKF slopinimą ir antioksidacinę galią.

AKF slopinimas

Renino-angiotenzino-aldosterono sistema yra vienas iš svarbiausių veiksnių žmogaus organizme reguliuojančių kraujo spaudimą. Ši sistema yra labai priklausoma nuo angiotenziną konvertuojančio fermento, kuris neaktyvų angiotenziną I paverčia angiotenzinu II, kurio katalizuojamos reakcijos yra žalingos žmogaus organizmui [88]. AKF slopinimu pasižymi kai kurie bioaktyvūs peptidai, susidarantys mėsos baltymų virškinimo metu. Kuo daugiau šia bioaktyviaja savybe pasižyminčių peptidų išsiskiria, tuo stipriau slopinamos AKF katalizuojamos reakcijos, todėl susidaro mažiau žmogaus sveikatai kenksmingo angiotenzino II. Analizės metu buvo siekiama nustatyti koks šiomis savybėmis pasižyminčių peptidų aktyvumas.

AKF slopinimo aktyvumo nustatymo tyrimas remiasi AKF reakcija su specifiniu sintetiniu substratu. Jei reakcijoje dalyvaujantis mėginys turi aktyvių peptidų, reakcijos produkto susidarymas yra slopinamas. Mėginio su AKF inhibitoriumi absorbcijos vertė yra mažesnė nei mėginio be inhibitoriaus. Analizės metu AKF slopinimas buvo vertinamas *in vitro* suvirškintuose mėginiuose, t.y. D120 taške, gauti rezultatai pateikti 19 paveiksle. Gauti duomenys rodo, kad nei brandinimo trukmė, nei brandinimo plėvelė neturi statistiškai reikšmingos ($p > 0,05$) įtakos suvirškintų mėsos mėginių AKF fermento slopinimui. Šie rezultatai sutampa su Mora ir kitų (2017) atlikto tyrimo metu gautais rezultatais. Visuose mėginiuose esantys peptidai pasižymi panašiu aktyvumu, kuris svyruoja nuo 20 iki 27 proc. Tai paaiškina anksčiau gauti rezultatai (žr. 11 ir 12 pav.), parodantys, kad skirtinguose mėsos mėginiuose aptinkami tie patys peptidai, dėl šios priežasties ir AKF slopinimas visuose mėginiuose yra panašus. Galima teigti, kad brandintos mėsos baltymai *in vitro* virškinimo metu yra suskaldomi iki tokių peptidų, kurie pasižymi savybe slopinti AKF fermentą, kurio katalizuojama reakcija yra žalinga žmogaus organizmui.

Antihipertenzinėmis savybėmis pasižymintys, AKF fermentą inhibuojantys bioaktyvūs peptidai dažniausiai yra mažos molekulinės masės (< 10 kDa), kuriuos sudaro nuo 2 iki 20 aminorūgščių [118, 119]. Užsienio literatūroje dažniausiai minimi šie po maisto virškinimo išsiskybę peptidai: AHLL, FISNHAY, AAATP, LGL, SFTT, IIT, todėl tikėtina, kad tokie pat peptidai susidarė iš po brandinto mėsos baltymų virškinimo žarnyne [118].

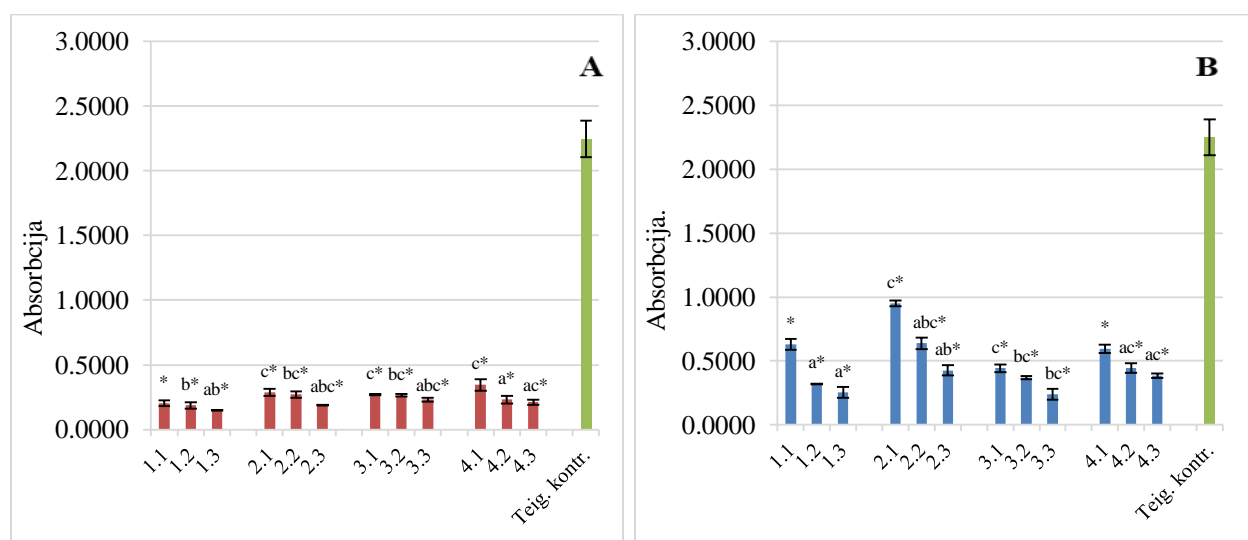


19 pav. Peptidų, gebančių inhibuoti AKF fermentą aktyvumas mėginiuose, po *in vitro* virškinimo žarnyne (D120 taškas): 1.1, 1.2 ir 1.3 – 4 paras; 2.1, 2.2 ir 2.3 – 8 paras; 3.1, 3.2 ir 3.3 – 12 parų; 4.1, 4.2 ir 4.3 – 22 paras brandinta mėsa be plėvelės, su PA / PE ir PET / Alox. plėvelėmis atitinkamai.

Antioksidacinės savybės

In vitro virškinimo metu iš mėsos baltymų atpalaiduotų peptidų antioksidacinės savybės buvo vertinamos geležies redukavimo galios metodu. Kuo daugiau geležies jonų redukuojama, tuo daugiau tiriamajame mėginyje yra antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių. Gauti rezultatai pateikti 20 paveiksle. Lyginant brandinimo trukmės įtaką peptidų, pasižyminčių didžiausiomis geležį redukuojančiomis / antioksidacinėmis savybėmis, išsiskyrimą po *in vitro* virškinimo (D120 taške), daugiausia bioaktyvių junginių atpalaiduojama suvirškinus mėsą, kuri brandinta 8 paras, o mažiausia – 12 parų brandintoje mėsoje. Tokius rezultatus galėjo lemti peptidų, pasižyminčių antioksidacinėmis savybėmis, savo sudėtyje turinčių hidrofobinių (Ala, Leu, Ile, Val, Pro, ...) arba aromatinių aminorūgščių (Trp, Tyr ir Phe), susidarymas [120]. Taip pat peptidų VDDLEGSLEQEKK ir DDLEGSLEQEKK atpalaidavimas iš miozino-3 ir -4 *in vitro* virškinimo metu, DHTKE, MPDAHL, FFGFN, RPNYTDA, TSQLLSDQ ir kitų peptidų, pasižyminčių antioksidacinėmis savybėmis, susidarymas [95, 118]. Svarbu paminėti ir tai, kad tiramuosiuose mėginiuose esančios laisvos aminorūgštys, druskos bei kiti junginiai, kuriems šis metodas yra jautrus, galėjo lemti tokius analizės rezultatus [121].

Lyginant brandinimo plėvelės įtaką antioksidantinių peptidų išsiskyrimui po virškinimo (D120 taške), daugiausia bioaktyvių peptidų atpalaiduojama suvirškinus mėsą, kuri buvo brandinta tradiciniu būdu, be plėvelės, o mažiausia – iš mėsos brandintos po PET / Alox plėvele. Brandinimo plėvelės įtaka bioaktyvių peptidų išsiskyrimui po virškinimo žarnyne, lyginant mėsą brandintą naudojant plėveles su mėsa brandinta be plėvelės, statistiškai reikšminga ($p < 0,05$), kai brandinimo trukmė yra 4, 8 ir 22 paras. Skirtingų brandinimo plėvelių įtaka bioaktyvių antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių peptidų išsiskyrimui po *in vitro* virškinimo yra statistiškai reikšminga ($p < 0,05$), kai mėsa brandinama 8 arba 12 parų. Analogiški rezultatai aprašyti ir Mora ir kitų (2017) atliktame tyrime, kur tiriamųjų brandintos kiaulienos mėginių, po virškinimo žarnyne, absorbcija, kai bangos ilgis 700 nm, taip pat svyravo nuo 0,6 iki 0,9 [95]. Po skrandžio virškinimo etapo (G120 taškas) atpalaiduojamų bioaktyvių peptidų kiekis kiekis yra labai mažas ir jam įtakos neturi nei brandinimo trukmė, nei brandinimo plėvelė ($p > 0,05$). Mažesnę antioksidacinę aktyvumą skrandžio fazėje galima paaiškinti tuo, kad šiame virškinimo etape susidarė didesnės molekulinės masės peptidai, kurie paprastai nepasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis, lyginant su mažos molekulinės masės (< 10 kDa) peptidais [118].



20 pav. Po *in vitro* virškinimo skrandyje (A) ir žarnyne (B) atpalaiduotų peptidų antioksidacinis aktyvumas pagal gebėjimą redukuoti geležies jonus (G120 ir D120 taškai atitinkamai): 1.1, 1.2 ir 1.3 – 4 paras; 2.1, 2.2 ir 2.3 – 8 paras; 3.1, 3.2 ir 3.3 – 12 parų; 4.1, 4.2 ir 4.3 – 22 paras brandinta mėsa be plėvelės, su PA / PE ir PET / Alox. plėvelėmis atitinkamai.

Vertės pateikiamos kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis; * rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant teigiamu kontroliniu mėginiu; ^a rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant su tiek pat laiko, be plėvelės brandinta mėsa; ^b rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant su tiek pat laiko, kitoje plėvelėje brandinta mėsa; ^c rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant . tokiu pat metodu, 4 paras brandinta mėsa.

IŠVADOS

1. Transglutaminazės pridėjimas į pieną lemia iš jo pagaminto rauginto pieno klamos padidėjimą ir turi statistiškai reikšmingos ($p < 0,05$) teigiamos įtakos varškės išėigos padidėjimui – tai yra tiesiogiai susiję su baltymų kiekio padidėjimu varškėje ir baltymų kiekio sumažėjimu išrūgose;
2. Transglutaminazės pridėjimas į pieną statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažino iš šio pieno pagamintų produktų baltymų hidrolizės laipsnį *in vitro* virškinimo metu. Pieno baltymai paveikti transglutaminaze yra atsparesni fermentinei hidrolizei pepsinu ir tripsinu;
3. Mėsos brandinimo trukmė yra kritinis parametras, lemiantis geresnį mėsos baltymų virškinamumą, kuris nustatytas pagal statistiškai reikšmingai didėjančią ($p < 0,05$) virškinimo sultyse ištirpusių peptidų, α -aminogrupių koncentraciją ir laisvų α -aminorūgščių koncentraciją, didėjant brandinimo trukmei. Didžiausias baltymų hidrolizės laipsnis nustatytas suvirškintos mėsos mėginiuose, kurie buvo brandinti ilgiausią laiko tarpą – 22 paras, o mažiausias - mėginiuose, kurie buvo brandinti 4 paras.
4. Mėsos brandinimas naudojant skirtingas plėveles ir nenaudojant plėvelės (kontrolė), neturi statistiškai reikšmingos ($p > 0,05$) įtakos mėsos baltymų hidrolizei virškinimo metu, pagal virškinimo sultyse ištirpusių peptidų, α -aminogrupių koncentraciją, bet turi statistiškai reikšmingos ($p < 0,05$) įtakos pagal laisvų α -aminorūgščių atsipalaidavimą į virškinimo sultis: *in vitro* virškinant be plėvelės brandintą mėsą, žarnyne atsipalaiduoja daugiau laisvų α -aminorūgščių negu virškinant plėvelėmis padengtą brandintą mėsą.
5. Peptidai, susidarę po brandintos mėsos *in vitro* virškinimo žarnyne pasižymi 20-27 proc. AKF slopinimu, nepriklausomai nuo brandinimo trukmės ir brandinimo būdo ($p > 0,05$), bei antioksidacinėmis savybėmis pagal gebėjimą redukuoti geležies jonus: daugiausiai ($p < 0,05$) bioaktyviųjų peptidų išsiskyrė po 8 paras be plėvelės brandintos mėsos virškinimo žarnyne.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. MAZUKNAITE, I., C. GUYOT, D. LESKAUSKAITE ir U. KULOZIK. Influence of transglutaminase on the physical and chemical properties of acid milk gel and cottage type cheese. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 2013, 11(3–4). ISSN 14590263.
2. TSEVDOU, M. S., E. G. ELEFThERIOU ir P. S. TAOUKIS. Transglutaminase treatment of thermally and high pressure processed milk: Effects on the properties and storage stability of set yoghurt. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* [interaktyvus]. 2013, 17. ISSN 14668564 [žiūrėta 2019-11-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.ifset.2012.11.004
3. LEE, H. J., J. CHOE, M. KIM, H. C. KIM, J. W. YOON, S. W. OH ir C. JO. Role of moisture evaporation in the taste attributes of dry- and wet-aged beef determined by chemical and electronic tongue analyses. *Meat Science* [interaktyvus]. 2019, 151. ISSN 03091740 [žiūrėta 2020-02-21]. Prieiga per: doi:10.1016/j.meatsci.2019.02.001
4. CAMPBELL, R. E., M. C. HUNT, P. LEVIS ir E. CHAMBERS IV. Dry-aging effects on palatability of beef longissimus muscle. *Journal of Food Science* [interaktyvus]. 2001, 66(2). ISSN 00221147 [žiūrėta 2020-02-21]. Prieiga per: doi:10.1111/j.1365-2621.2001.tb11315.x
5. JUVONEN, K. R., A. MACIERZANKA, M. E. LILLE, D. E. LAAKSONEN, H. M. MYKKÄNEN, L. K. NISKANEN, J. PIHLAJAMÄKI, K. A. MÄKELÄ, C. E.N. MILLS, A. R. MACKIE, P. MALCOLM, K. H. HERZIG, K. S. POUTANEN ir L. J. KARHUNEN. Cross-linking of sodium caseinate-structured emulsion with transglutaminase alters postprandial metabolic and appetite responses in healthy young individuals. *British Journal of Nutrition* [interaktyvus]. 2015, 114(3). ISSN 14752662 [žiūrėta 2019-11-15]. Prieiga per: doi:10.1017/S0007114515001737
6. BÖTTGER, F., D. DUPONT, D. MARCINKOWSKA, B. BAJKA, A. MACKIE ir A. MACIERZANKA. Which casein in sodium caseinate is most resistant to *in vitro* digestion? Effect of emulsification and enzymatic structuring. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2019, 88. ISSN 0268005X [žiūrėta 2019-11-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodhyd.2018.09.042
7. THERMO SCIENTIFICS. Easy molecular bonding crosslinking technology. Reactivity chemistries, applications and structure references. *Crosslinking Technical Handbook* [interaktyvus]. 2012, [žiūrėta 2019-11-16]. Prieiga per: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602163-Crosslinking-Reagents-Handbook.pdf>
8. GASPAR, A. L. C. ir S. P. DE GÓES-FAVONI. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 201, 171:315-322 [žiūrėta 2019-11-16]. ISSN 18737072. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.019
9. KIELISZEK, M. ir A. MISIEWICZ. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia microbiologica* [interaktyvus]. 2014, 59(3) [žiūrėta 2019-11-16]. ISSN 18749356. Prieiga per: doi:10.1007/s12223-013-0287-x
10. MACEDO, J. A., L. D. SETTE ir H. H. SATO. Purification and characterization of a new transglutaminase from streptomyces sp. isolated in brazilian soil. *Journal of Food*

- Biochemistry* [interaktyvus]. 2011, 35(4) [žiūrėta 2019-11-18]. ISSN 01458884. Prieiga per: doi:10.1111/j.1745-4514.2010.00456.x
11. SIMPSON, B. K., L. M.L. NOLLET, F. TOLDRÁ, S. BENJAKUL, G. PALIYATH ir Y. H. HUI. *Food Biochemistry and Food Processing: Second Edition* [interaktyvus]. Ames, Iowa, JAV: John Wiley & Sons, Inc , 2012 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per: doi:10.1002/9781118308035
 12. TAGHI GHARIBZAHEDI, S. M., M. KOUBAA, F. J. BARBA, R. GREINER, S. GEORGE ir S. ROOHINEJAD. Recent advances in the application of microbial transglutaminase crosslinking in cheese and ice cream products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [interaktyvus]. 2018;107(Pt B):2364-2374. ISSN 18790003 [žiūrėta 2019-11-18]. Prieiga per: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.115
 13. DUBE, M., C. SCHÄFER, S. NEIDHART ir R. CARLE. Texturisation and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase. *European Food Research and Technology* [interaktyvus]. 2007, 225(2) [žiūrėta 2019-11-18]. ISSN 14382377. Prieiga per: doi:10.1007/s00217-006-0401-2
 14. DE JONG, G. A.H. ir S. J. KOPPELMAN. Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food applications. *Journal of Food Science* [interaktyvus]. 2002, 67(8), 2798–2806 [žiūrėta 2019-11-18]. ISSN 00221147. Prieiga per: doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08819.x
 15. GAUCHE, C., J. T. C. VIEIRA, P. J. OGLIARI ir M. T. BORDIGNON-LUIZ. Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. *Process Biochemistry* [interaktyvus]. 2008, 43(7) [žiūrėta 2019-11-18]. ISSN 13595113. Prieiga per: doi:10.1016/j.procbio.2008.04.004
 16. WEN-QIONG, W., Z. LAN-WEI, H. XUE ir L. YI. Cheese whey protein recovery by ultrafiltration through transglutaminase (TG) catalysis whey protein cross-linking. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2017, 215 [žiūrėta 2019-11-18]. ISSN 18737072. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.057
 17. ANURADHA, S. N. ir V. PRAKASH. Altering functional attributes of proteins through cross linking by transglutaminase - A case study with whey and seed proteins. *Food Research International* [interaktyvus]. 2009, 42(9) [žiūrėta 2019-12-01]. ISSN 09639969. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodres.2009.06.012
 18. GHARIBZAHEDI, S. M. T. ir I. S. CHRONAKIS. Crosslinking of milk proteins by microbial transglutaminase: Utilization in functional yogurt products. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2018, 245, 620-632 [žiūrėta 2019-12-01]. ISSN 18737072. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.138
 19. NOGUEIRA, M. H., G. M. TAVARES, N. F. NOGUEIRA SILVA, F. CASANOVA, P. C. STRINGHETA, F. GAUCHERON, A. V. N. C. TEIXEIRA, I. T. PERRONE ir A. F. CARVALHO. Physico-chemical stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase as a function of acidic pH. *Food Structure* [interaktyvus]. 2019, 19 [žiūrėta 2019-12-01]. ISSN 22133291. Prieiga per: doi:10.1016/j.foostr.2018.100103
 20. AMIRDIVANI, S., N. KHORSHIDIAN, M. FIDELIS, D. GRANATO, M. R. KOUSHKI, M. MOHAMMADI, K. KHOSHATINAT ir A. M. MORTAZAVIAN. Effects of

- transglutaminase on health properties of food products. *Current Opinion in Food Science* [interaktyvus]. 2018, 22, 74-80 [žiūrėta 2019-12-01]. ISSN 22147993. Prieiga per: doi:10.1016/j.cofs.2018.01.008
21. RENZETTI, S., F. DAL BELLO ir E. K. ARENDT. Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. *Journal of Cereal Science* [interaktyvus]. 2008, 48(1) [žiūrėta 2019-12-01]. ISSN 07335210. Prieiga per: doi:10.1016/j.jcs.2007.07.011
 22. MOTOKI, M. ir Y. KUMAZAWA. Recent Research Trends in Transglutaminase Technology for Food Processing. *Food Science and Technology Research* [interaktyvus]. 2000, 6(3), 151-160. [žiūrėta 2019-11-01]. ISSN 13446606. Prieiga per: doi:10.3136/fstr.6.151
 23. LI, H., C. YANG, C. CHEN, F. REN, Y. LI, Z. MU ir P. WANG. The use of trisodium citrate to improve the textural properties of acid-induced, transglutaminase-treated micellar casein gels. *Molecules* [interaktyvus]. 2018, 23(7) [žiūrėta 2019-12-01]. ISSN 14203049. Prieiga per: doi:10.3390/molecules23071632
 24. FARIA D. D. S. Estudo Dos Efeitos Da Aplicação De Transglutaminase Em Bebida Láctea Fermentada. *Com Alto Conteúdo De Soro*. 2010, 2–3.
 25. GUO, J., Y. C. JIN, X. Q. YANG, S. J. YU, S. W. YIN ir J. R. QI. Computed microtomography and mechanical property analysis of soy protein porous hydrogel prepared by homogenizing and microbial transglutaminase cross-linking. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2013, 31(2) [žiūrėta 2019-12-01]. ISSN 0268005X. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodhyd.2012.10.023
 26. CHARCOSSET, C.. *Preparation of emulsions and particles by membrane emulsification for the food processing industry*. *Journal of Food Engineering* [interaktyvus]. 2009, 92(3), 241-249 [žiūrėta 2019-12-13]. ISSN 02608774. Prieiga per: doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.11.017
 27. SHARMA, R., M. ZAKORA ir K. B. QVIST. Characteristics of oil-water emulsions stabilised by an industrial α -lactalbumin concentrate, cross-linked before and after emulsification, by a microbial transglutaminase. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2002, 79(4) [žiūrėta 2019-12-16]. ISSN 03088146. Prieiga per: doi:10.1016/S0308-8146(02)00225-X
 28. BRAUN, D. B. ir M. R. ROSEN. *Rheology Modifiers Handbook* [interaktyvus]. New York: Interactive Consulting Inc. East Norwichm 1999 [žiūrėta 2019-12-16]. Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-8155-1441-1.50007-3
 29. HONG, G. P. ir K. B. CHIN. Effects of microbial transglutaminase and sodium alginate on cold-set gelation of porcine myofibrillar protein with various salt levels. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2010, 24(4) [žiūrėta 2020-03-22]. ISSN 0268005X. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodhyd.2009.11.011
 30. XING, G., X. RUI, M. JIANG, Y. XIAO, Y. GUAN, D. WANG ir M. DONG. *In vitro* gastrointestinal digestion study of a novel bio-tofu with special emphasis on the impact of microbial transglutaminase. *PeerJ* [interaktyvus]. 2016, 2016(12) [žiūrėta 2020-03-22]. ISSN 21678359. Prieiga per: doi:10.7717/peerj.2754

31. RUI, X., Y. FU, Q. ZHANG, W. LI, F. ZARE, X. CHEN, M. JIANG ir M. DONG. A comparison study of bioaccessibility of soy protein gel induced by magnesiumchloride, glucono- δ -lactone and microbial transglutaminase. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2016, 71 [žiūrėta 2020-03-22]. ISSN 00236438. Prieiga per: doi:10.1016/j.lwt.2016.03.032
32. VILLAS-BOAS, M. B., M. A. FERNANDES, R. d. L. ZOLLNER ir F. M. NETTO. Effect of polymerization with transglutaminase on *in vitro* digestion and antigenicity of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal* [interaktyvus]. 2012, 25(2) [žiūrėta 2020-03-22]. ISSN 09586946. Prieiga per: doi:10.1016/j.idairyj.2012.02.007
33. KIM, Y. H. B., R. KEMP ir L. M. SAMUELSSON. Effects of dry-aging on meat quality attributes and metabolite profiles of beef loins. *Meat Science* [interaktyvus]. 2016, 111 [žiūrėta 2020-03-22]. ISSN 03091740. Prieiga per: doi:10.1016/j.meatsci.2015.09.008
34. DEGEER, S. L., M. C. HUNT, C. L. BRATCHER, B. A. CROZIER-DODSON, D. E. JOHNSON ir J. F. STIKA. Effects of dry aging of bone-in and boneless strip loins using two aging processes for two aging times. *Meat Science* [interaktyvus]. 2009, 83(4) [žiūrėta 2020-03-22]. ISSN 03091740. Prieiga per: doi:10.1016/j.meatsci.2009.08.017
35. AHNSTRÖM, M. L., M. SEYFERT, M. C. HUNT ir D. E. JOHNSON. Dry aging of beef in a bag highly permeable to water vapour. *Meat Science* [interaktyvus]. 2006, 73(4) [žiūrėta 2020-03-22]. ISSN 03091740. Prieiga per: doi:10.1016/j.meatsci.2006.03.006
36. LASTER, M. A., R. D. SMITH, K. L. NICHOLSON, J. D.W. NICHOLSON, R. K. MILLER, D. B. GRIFFIN, K. B. HARRIS ir J. W. SAVELL. Dry versus wet aging of beef: Retail cutting yields and consumer sensory attribute evaluations of steaks from ribeyes, strip loins, and top sirloins from two quality grade groups. *Meat Science* [interaktyvus]. 2008, 80(3) [žiūrėta 2020-03-22]. ISSN 03091740. Prieiga per: doi:10.1016/j.meatsci.2008.03.024
37. KHAN, M. I., S. JUNG, K. C. NAM ir C. JO. Postmortem aging of beef with a special reference to the dry aging. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* [interaktyvus]. 2016 [žiūrėta 2020-03-23]. ISSN 2234246X. Prieiga per: doi:10.5851/kosfa.2016.36.2.159
38. LI, X., Ja. BABOL, A. WALLBY ir K. LUNDSTRÖM. Meat quality, microbiological status and consumer preference of beef gluteus medius aged in a dry ageing bag or vacuum. *Meat Science* [interaktyvus]. 2013, 95(2) [žiūrėta 2020-03-23]. ISSN 03091740. Prieiga per: doi:10.1016/j.meatsci.2013.05.009
39. LI, X., J. BABOL, W. L.P. BREDIE, B. NIELSEN, J. TOMÁNKOVÁ ir K. LUNDSTRÖM. A comparative study of beef quality after ageing longissimus muscle using a dry ageing bag, traditional dry ageing or vacuum package ageing. *Meat Science* [interaktyvus]. 2014, 97(4) [žiūrėta 2020-03-23]. ISSN 03091740. Prieiga per: doi:10.1016/j.meatsci.2014.03.014
40. KEMP, C. M., P. L. SENSKY, R. G. BARDSLEY, P. J. BUTTERY ir T. PARR. Tenderness - An enzymatic view. *Meat Science* [interaktyvus]. 2010, 84(2) [žiūrėta 2020-03-23]. ISSN 03091740. Prieiga per: doi:10.1016/j.meatsci.2009.06.008
41. KOOHMARAIE, M., J. E. SCHOLLMEYER ir T. R. DUTSON. Effect of Low-Calcium-

- Requiring Calcium Activated Factor on Myofibrils under Varying pH and Temperature Conditions. *Journal of Food Science* [interaktyvus]. 1986, 51(1) [žiūrėta 2020-03-23]. ISSN 17503841. Prieiga per: doi:10.1111/j.1365-2621.1986.tb10828.x
42. EDMUNDS, T., P. A. NAGAINIS, S. K. SATHE, V. F. THOMPSON ir D. E. GOLL. Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular* [interaktyvus]. 1991, 1077(2) [žiūrėta 2020-03-23]. ISSN 01674838. Prieiga per: doi:10.1016/0167-4838(91)90059-9
 43. XIONG, Y. L. The Storage and Preservation of Meat. *Lawrie's Meat Science* [interaktyvus]. 2017 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per: doi:10.1016/b978-0-08-100694-8.00007-8
 44. OUALI, A., N. GARREL, A. OBLED, C. DEVAL, C. VALIN ir I. F. PENNY. Comparative action of cathepsins D, B, H, L and of a new lysosomal cysteine proteinase on rabbit myofibrils. *Meat Science* [interaktyvus]. 1987, 19(2) [žiūrėta 2020-03-23]. ISSN 03091740. Prieiga per: doi:10.1016/0309-1740(87)90014-3
 45. ASGHAR, A. ir A. R. BHATTI. Endogenous Proteolytic Enzymes in Skeletal Muscle: Their Significance in Muscle Physiology and During Postmortem Aging Events in Carcasses. *Advances in Food Research* [interaktyvus]. 1988, 31(C) [žiūrėta 2020-03-23]. ISSN 00652628. Prieiga per: doi:10.1016/S0065-2628(88)60169-X
 46. ROBERT, N., M. BRIAND, R. TAYLOR ir Y. BRIAND. The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat Science* [interaktyvus]. 1999, 51(2) [žiūrėta 2020-03-23]. ISSN 03091740. Prieiga per: doi:10.1016/S0309-1740(98)00113-2
 47. HERRERA-MENDEZ, C. H., S. BECILA, A. BOUDJELLAL ir A. OUALI. Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2006, 17(8), 394–405 [žiūrėta 2020-03-23]. ISSN 09242244. Prieiga per: doi:10.1016/j.tifs.2006.01.011
 48. LEE, H. J., J. CHOE, K. T. KIM, J. OH, D. G. LEE, K. M. KWON, Y. I. CHOI ir C. JO. Analysis of low-marbled Hanwoo cow meat aged with different dry-aging methods. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* [interaktyvus]. 2017, 30(12) [žiūrėta 2020-03-23]. ISSN 19765517. Prieiga per: doi:10.5713/ajas.17.0318
 49. MARTINAUD, A., Y. MERCIER, P. MARINOVA, C. TASSY, P. GATELLIER ir M. RENERRE. Comparison of Oxidative Processes on Myofibrillar Proteins from Beef during Maturation and by Different Model Oxidation Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 1997, 45(7) [žiūrėta 2020-04-08]. ISSN 00218561. Prieiga per: doi:10.1021/jf960977g
 50. SKOVGAARD, N.. Lawrie's Meat Science. *International Journal of Food Microbiology* [interaktyvus]. 2004 [žiūrėta 2020-04-08]. ISSN 01681605. Prieiga per: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.003
 51. MOTTRAM, D. S. Flavour formation in meat and meat products: A review. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 1998, 62(4) [žiūrėta 2020-04-08]. ISSN 03088146. Prieiga per: doi:10.1016/S0308-8146(98)00076-4

52. KAWAI, M. Taste Enhancements Between Various Amino Acids and IMP. *Chemical Senses* [interaktyvus]. 2002, 27(8) [žiūrēta 2020-04-08]. ISSN 0379-864X. Available at: doi:10.1093/chemse/27.8.739
53. FAUSTMAN, C., Q. SUN, R. MANCINI ir S. P. SUMAN. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science* [interaktyvus]. 2010, 86(1), 86-94 [žiūrēta 2020-04-08]. ISSN 03091740. Prieiga per: doi:10.1016/j.meatsci.2010.04.025
54. MOSSEL, D. A. The presumptive enumeration of lactose negative as well as lactose positive Enterobacteriaceae in foods. *Applied microbiology* [interaktyvus]. 1957, 5(6) [žiūrēta 2020-04-15]. ISSN 00036919. Prieiga per: doi:10.1128/aem.5.6.379-381.1957
55. STILES, M. E. ir L. K. NG. Enterobacteriaceae associated with meats and meat handling. *Applied and Environmental Microbiology* [interaktyvus]. 1981, 41(4) [žiūrēta 2020-04-15]. ISSN 00992240. Prieiga per: doi:10.1128/aem.41.4.867-872.1981
56. POTHAKOS, V., F. DEVLIEGHERE, F. VILLANI, J. BJÖRKROTH ir D. ERCOLINI. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Science* [interaktyvus]. 2015, 109 [žiūrēta 2020-04-15]. ISSN 03091740. Prieiga per: doi:10.1016/j.meatsci.2015.04.014
57. ALADAME, N. Bergey's manual of systematic bacteriology. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie* [interaktyvus]. 1987 [žiūrēta 2020-04-15]. ISSN 07692609. Prieiga per: doi:10.1016/0769-2609(87)90099-8
58. FUNG, D. Y. C. Microbiological safety of meat | Yeasts and Molds. *Encyclopedia of Meat Sciences* [interaktyvus]. 2014 [žiūrēta 2020-04-15]. Prieiga per: doi:10.1016/b978-0-12-384731-7.00043-x
59. FLEET, G.. Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology* [interaktyvus]. 1992, 12(1-2) [žiūrēta 2020-04-15]. ISSN 07388551. Prieiga per: doi:10.3109/07388559209069186
60. KONG, F. ir R. P. SINGH. Disintegration of solid foods in human stomach. *Disintegration of Food Science* [interaktyvus]. 2008, 73(5), R67-R80 [žiūrēta 2020-04-15]. ISSN 00221147. Available at: doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x
61. CALABRESE A., C. GIBBY, B. MEINKE, M. K. F. REVILLA ir A. TITCHENAL. Human nutrition. [interaktyvus]. 2018 [žiūrēta 2020-04-15]. Prieiga per: <http://pressbooks-dev.oer.hawaii.edu/humannutrition/>
62. MATON, A., J. HOPKINS, C. W. MCLAUGHLIN, S. JOHNSON, M. Q. WARNER, D. LAHART, J. D. WRIGHT. *Human Biology and Health*. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall, 1993.
63. POCOCK, GILLIAN. *No Title Human Physiology*. 3-asis leid. oxford: Oxford University Press, 2006.
64. GORE, R. ir LEVINE, M. *Textbook of Gastrointestinal Radiology: Expert Consult*. 2015. ISBN 0323278116.
65. NELSON ir COX. *Principles of Biochemistry Lehninger* [interaktyvus]. 2011 [žiūrēta 2020-05-03]. ISSN 16720415. Prieiga per: doi:10.1007/s11655-011-0820-1
66. DUNN, B. M. Overview of Pepsin-like Aspartic Peptidases. *Current Protocols in Protein*

- Science* [interaktyvus]. 2001, 25(1) [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN 1934-3663. Prieiga per: doi:10.1002/0471140864.ps2103s25
67. PROCHON, M. Influence of modified biopolymers on thermal properties and biodegradation processes of carboxylated nitrile-butadiene (XNBR) nanocomposites. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [interaktyvus]. 2020 [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN 15882926. Prieiga per: doi:10.1007/s10973-020-09355-x
68. PRAŠKEVIČIUS A., IVANOVIEŅĖ L., STASIŪNIENĖ N. *Biochemija: bendrasis vadovėlis*. Kaunas: Kauno medicinos universiteto leidykla, 2003.
69. BIETH, J. G. *The elastases* [interaktyvus]. 2001 [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN 12950661. Prieiga per: doi:10.1051/jbio/2001195020173
70. GAULT, C. R., L. M. OBEID ir Y. A. HANNUN. An overview of sphingolipid metabolism: From synthesis to breakdown. *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules*. [interaktyvus]. 2010, 1-23 [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN 00652598. Prieiga per: doi:10.1007/978-1-4419-6741-1_1
71. BOIRIE, Y., M. DANGIN, P. GACHON, M. P. VASSON, J. L. MAUBOIS ir B. BEAUFRÈRE. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [interaktyvus]. 1997, 94(26) [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN 00278424. Prieiga per: doi:10.1073/pnas.94.26.14930
72. MULET-CABERO, A. I., A. TORCELLO-GÓMEZ, S. SAHA, A. R. MACKIE, P. J. WILDE ir A. BRODKORB. Impact of caseins and whey proteins ratio and lipid content on *in vitro* digestion and ex vivo absorption. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2020, 319 [žiūrėta 2020-05-03]. ISSN 18737072. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2020.126514
73. BENDTSEN, L. Q., J. K. LORENZEN, N. T. BENDSEN, C. RASMUSSEN ir A. ASTRUP. Effect of Dairy Proteins on Appetite, Energy Expenditure, Body Weight, and Composition: a Review of the Evidence from Controlled Clinical Trials. *Advances in Nutrition* [interaktyvus]. 2013, 4(4) [žiūrėta 2020-05-05]. ISSN 2161-8313. Prieiga per: doi:10.3945/an.113.003723
74. MACKIE, A. ir A. MACIERZANKA. *Colloidal aspects of protein digestion* [interaktyvus]. 2010 [žiūrėta 2020-05-05]. Prieiga per: doi:10.1016/j.cocis.2009.11.005
75. SAH, B. N. P., A. J. MCAINCH ir T. VASILJEVIC. Modulation of bovine whey protein digestion in gastrointestinal tract: A comprehensive review. *International Dairy Journal* [interaktyvus]. 2016, 62, 10-18 [žiūrėta 2020-05-05]. ISSN 09586946. Prieiga per: doi:10.1016/j.idairyj.2016.07.003
76. ALTING, A. C., H. H. J. DE JONGH, R. W. VISSCHERS ir J. W. F. A. SIMONS. Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2002, 50(16) [žiūrėta 2020-05-05]. ISSN 00218561. Prieiga per: doi:10.1021/jf011657m
77. MULET-CABERO, A. I., A. R. MACKIE, P. J. WILDE, M. A. FENELON ir A. BRODKORB. Structural mechanism and kinetics of *in vitro* gastric digestion are affected by

- process-induced changes in bovine milk. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2019, 86 [žiūrėta 2020-05-05]. ISSN 0268005X. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodhyd.2018.03.035
78. AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. *Does muscle tissue contain different typer of protein?* [interaktyvus]. 2015 [žiūrėta 2020-05-05]. Prieiga per: <https://meatscience.org/students/meat-judging-program/meat-judging-news/article/2015/07/31/does-muscle-tissue-contain-different-types-of-protein>
 79. KAMIN-BELSKY, N., A. A. BRILLON, R. ARAV ir N. SHAKLAI. Degradation of myosin by enzymes of the digestive system: comparison between native and oxidatively cross-linked protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 1996, 44(7) [žiūrėta 2020-05-05]. ISSN 00218561. Prieiga per: doi:10.1021/jf950413x
 80. MORZEL, M., P. GATELLIER, T. SAYD, M. RENERRE ir E. LAVILLE. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Science* [interaktyvus]. 2006, 73(3) [žiūrėta 2020-05-11]. ISSN 03091740. Prieiga per: doi:10.1016/j.meatsci.2006.02.005
 81. SANTÉ-LHOUELIER, V., T. ASTRUC, P. MARINOVA, E. GREVE ir P. GATELLIER. Effect of meat cooking on physicochemical state and *in vitro* digestibility of myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2008, 56(4) [žiūrėta 2020-05-11]. ISSN 00218561. Prieiga per: doi:10.1021/jf072999g
 82. KAUR, L., E. MAUDENS, D. R. HAISMAN, M. J. BOLAND ir H. SINGH. Microstructure and protein digestibility of beef: The effect of cooking conditions as used in stews and curries. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2014, 55(2) [žiūrėta 2020-05-11]. ISSN 00236438. Prieiga per: doi:10.1016/j.lwt.2013.09.023
 83. TARTÉ, R.. Meat-derived protein ingredients. *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications* [interaktyvus]. 2009 [žiūrėta 2020-05-11]. Prieiga per: doi:10.1007/978-0-387-71327-4_7
 84. SAYD, T., C. CHAMBON ir V. SANTÉ-LHOUELIER. Quantification of peptides released during *in vitro* digestion of cooked meat. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2016, 197 [žiūrėta 2020-05-11]. ISSN 18737072. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.020
 85. LIU, L., S. LI, J. ZHENG, T. BU, G. HE ir J. WU. Safety considerations on food protein-derived bioactive peptides. *Thends ir Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2020 [žiūrėta 2020-05-11]. ISSN 09242244. Prieiga per: doi:10.1016/j.tifs.2019.12.022
 86. LIAO, W., F. JAHANDIDEH, H. FAN, M. SON ir J. WU. Egg Protein-Derived Bioactive Peptides: Preparation, Efficacy, and Absorption. *Advances in Food and Nutrition Research* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-05-11]. ISSN 10434526. Prieiga per: doi:10.1016/bs.afnr.2018.02.001
 87. LIU, J., Y. ZHOU, Y. LIU, L. LI, Y. CHEN, Y. LIU, Y. FENG, I. V. YOSYPIV, R. SONG ir H. PENG. (Pro)renin receptor regulates lung development via the wnt/ β -catenin signaling pathway. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* [interaktyvus]. 2019, 317(2) [žiūrėta 2020-05-11]. ISSN 15221504. Prieiga per: doi:10.1152/ajplung.00295.2018

88. ESTERAS, R., M. V. PEREZ-GOMEZ, L. RODRIGUEZ-OSORIO, A. ORTIZ ir B. FERNANDEZ-FERNANDEZ. Combination use of medicines from two classes of renin–angiotensin system blocking agents: Risk of hyperkalemia, hypotension, and impaired renal function. *Therapeutic Advances in DRug Safety* [interaktyvus]. 2015, 6(4), 166-176 [žiūrėta 2020-05-11]. ISSN 20420994. Prieiga per: doi:10.1177/2042098615589905
89. FERRARIO, C. M. ir W. B. STRAWN. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Proinflammatory Mediators in Cardiovascular Disease. *The American Journal of Cardiovascular Disease* [interaktyvus]. 2006 , 98(1), 121-128 [žiūrėta 2020-05-12]. ISSN 00029149. Prieiga per: doi:10.1016/j.amjcard.2006.01.059
90. TAGLIAZUCCHI, D. S. SHAMSIA, A. HELAL ir A. CONTE. Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by *in vitro* gastro-intestinal digestion. *International Dairy Journal* [interaktyvus]. 2017, 71 [žiūrėta 2020-05-12]. ISSN 09586946. Prieiga per: doi:10.1016/j.idairyj.2017.03.001
91. HASAN, F., Y. KUMADA, N. HASHIMOTO, T. KATSUDA, M. TERASHIMA ir S. KATOH. Fragmentation of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from bonito meat under intestinal digestion conditions and their characterization. *Food and Bioprocess Technology* [interaktyvus]. 2006, 84(2C) [žiūrėta 2020-05-12]. ISSN 09603085. Prieiga per: doi:10.1205/fbp.05152
92. LOBO, V., A. PATIL, A. PHATAK ir N. CHANDRA. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* [interaktyvus]. 2010, 4(8), 118 [žiūrėta 2020-05-12]. ISSN 09737847. Prieiga per: doi:10.4103/0973-7847.70902
93. LORENZO, J. M., P. E. S. MUNEKATA, B. GÓMEZ, F. J. BARBA, L. MORA, C. PÉREZ-SANTAESCOLÁSTICA ir Fidel TOLDRÁ. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends In Food Science And Technology* [interaktyvus]. 2018, 79, 136-147 [žiūrėta 2020-05-12]. ISSN 09242244. Prieiga per: doi:10.1016/j.tifs.2018.07.003
94. LI, S., Qi HU, C. CHEN, J. LIU, G. HE, L. LI, J. WU ir D. REN. Formation of bioactive peptides during simulated gastrointestinal digestion is affected by α s1-casein polymorphism in buffalo milk. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2020, 313 [žiūrėta 2020-05-11]. ISSN 18737072. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2020.126159
95. MORA, L. T. BOLUMAR, A. HERES ir F. TOLDRÁ. Effect of cooking and simulated gastrointestinal digestion on the activity of generated bioactive peptides in aged beef meat. *Food and Function* [interaktyvus]. 2017, 8(12) [žiūrėta 2020-05-12]. ISSN 2042650X. Prieiga per: doi:10.1039/c7fo01148b
96. PAULAUSKIENĖ A. *Maisto Chemija: Laboratorinių darbų aprašas* [interaktyvus]. Akademija: Aleksandro Stulginskio universiteto Leidybos centras, 2012 [žiūrėta 2020-05-12]. Prieiga per: <http://dspace.lzuu.lt/handle/1/2076>
97. MINEKUS, M., M. ALMINGER, P. ALVITO, S. BALLANCE, T. BOHN, C. BOURLIEU, F. CARRIÈRE, R. BOUTROU, M. CORREDIG, D. DUPONT, C. DUFOUR, L. EGGER, M. GOLDING, S. KARAKAYA, B. KIRKHUS, S. LE FEUNTEUN, U. LESMES, A. MACIERZANKA, A. MACKIE, S. MARZE, D. J. MCCLEMENTS, O. MÉNARD, I.

- RECIO, C. N. SANTOS, R. P. SINGH, G. E. VEGARUD, M. S.J. WICKHAM, W. WEITSCHIES ir A. BRODKORB. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function* [interaktyvus]. 2014 [žiūrėta 2020-05-12]. ISSN 2042650X. Prieiga per: doi:10.1039/c3fo60702j
98. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ir R. J. RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* [interaktyvus]. 1951, 193(1) [žiūrėta 2019-04-10]. ISSN 00219258. Prieiga per: doi:10.1016/0922-338X(96)89160-4
99. UDENFRIEND, S., S. STEIN, P. BÖHLEN, W. DAIRMAN, W. LEIMGRUBER ir M.WEIGELE. Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *American Association for the Advancement of Science* [interaktyvus]. 1972, 178(4063), 871-872 [žiūrėta 2020-05-19]. ISSN 00368075. Prieiga per: doi:10.1126/science.178.4063.871
100. MILLER-KEANE Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health. *Gastroenterology Nursing* [interaktyvus]. 1993, 15(6), 258 [žiūrėta 2020-05-19]. ISSN 1042-895X. Prieiga per: doi:10.1097/00001610-199306000-00012
101. HUANG, S. J., S. Y. TSAI ir J. L. MAU. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agrocybe cylindracea*. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2006, 39(4), 379-387 [žiūrėta 2020-05-19]. ISSN 00236438. Prieiga per: doi:10.1061/(ASCE)1084-0702(2006)11:3(378.2)
102. MORA, L., E. ESCUDERO, P. D. FRASER, M. C. ARISTOY ir F. TOLDRÁ. Proteomic identification of antioxidant peptides from 400 to 2500Da generated in Spanish dry-cured ham contained in a size-exclusion chromatography fraction. *Food Research International* [interaktyvus]. 2014, 56, 68–76 [žiūrėta 2020-05-19]. ISSN 09639969. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodres.2013.12.001
103. RAAK, N., H. ROHM ir D. JAROS. Cross-linking with microbial transglutaminase: Isopeptide bonds and polymer size as drivers for acid casein gel stiffness. *International Dairy Journal* [interaktyvus]. 2017, 66, 49-55 [žiūrėta 2020-05-19]. ISSN 09586946. Prieiga per: doi:10.1016/j.idairyj.2016.10.015
104. BÖNISCH, M. P., M. HUSS, S. LAUBER ir U. KULOZIK. Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2007, 21(4), 585-595 [žiūrėta 2020-05-19]. ISSN 0268005X. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodhyd.2006.07.002
105. HAN, P., LINCOURT, S. Process for making a cheese product using transglutaminase [interaktyvus]. US 6,572901 B2. 2001 . Northfield, Ilinojus, USA [žiūrėta 2020-05-19]. Prieiga per:
<https://patentimages.storage.googleapis.com/ee/c4/dd/22c020202c525d/US6572901.pdf>
106. DIETHER, N. E. ir B. P. WILLING. Microbial fermentation of dietary protein: An important factor in diet–microbe–host interaction. *Microorganisms* [interaktyvus]. 2019, 7(1), 19 [žiūrėta 2020-05-19]. ISSN 20762607. Prieiga

per: doi:10.3390/microorganisms7010019

107. VAN DER WIELEN, N., P. J MOUGHAN ir M. MENSINK. Amino Acid Absorption in the Large Intestine of Humans and Porcine Models. *The Journal of Nutrition* [interaktyvus]. 2017, 147(8), 1493-1498 [žiūrėta 2020-05-19]. ISSN 0022-3166. Prieiga per: doi:10.3945/jn.117.248187
108. MAHMOOD, K.. Effect of Microbial Transglutaminase Addition on Some Physical, chemical and Sensory Properties of Goat's Milk yogurt. *Zanco Journal of Pure and Applied Sciences*. 2016, (March), 27. 19-30.
109. KIM, J. H., H. J. LEE, D. M. SHIN, T. K. KIM, Y. B. KIM ir Y. S. CHOI. The dry-aging and heating effects on protein characteristics of beef longissimus dorsi. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* [interaktyvus]. 2018, 38(5), 1101-1108 [žiūrėta 2020-05-19]. ISSN 2234246X. Prieiga per: doi:10.5851/kosfa.2018.e43
110. MARTINI, S., A. CONTE ir D. TAGLIAZUCCHI. Comparative peptidomic profile and bioactivities of cooked beef, pork, chicken and turkey meat after *in vitro* gastro-intestinal digestion. *Journal of Proteomics* [interaktyvus]. 2019, 208(August), 103500 [žiūrėta 2020-05-19]. ISSN 18767737. Prieiga per: doi:10.1016/j.jprot.2019.103500
111. NATIONAL CATTLEMEN'S BEEF ASSOCIATION. *Dry-Ageing of beef. Executive Summary* [interaktyvus]. 2008 [žiūrėta 2020-05-20]. Prieiga per: <https://www.beefresearch.org/CMDocs/BeefResearch/Dry Aging of Beef.pdf>
112. PARRISH, F. C., J. A. BOLES, R. E. RUST ir D. G. OLSON. Dry and Wet Aging Effects on Palatability Attributes of Beef Loin and Rib Steaks from Three Quality Grades. *Journal of Food Science* [interaktyvus]. 56(3), 601–603 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 17503841. Prieiga per: doi:10.1111/j.1365-2621.1991.tb05338.x
113. WARREN, K. E. ir C. L. KASTNER. A Comparison Of Dry-Aged And Vacuum-Aged Beef Strip Loins. *Journal of Muscle Foods* [interaktyvus]. 1992, 3(2), 151-157 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 17454573. Prieiga per: doi:10.1111/j.1745-4573.1992.tb00471.x
114. TOWNSEND, D. M., K. D. TEW ir H. TAPIERO. Sulfur containing amino acids and human disease. *Biomed Pharmacother* [interaktyvus]. 2004;58(1):47-55 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 07533322. Prieiga per: doi:10.1016/j.biopha.2003.11.005
115. WONG, C. The Benefits of Branched-Chain Amino Acids. *Very Well Fit* [interaktyvus]. 2020 [žiūrėta 2020-05-20]. Prieiga per: <https://www.verywellfit.com/benefits-of-branched-chain-amino-acids-89425>
116. GALLEGO, M., L. MAURI, M. C. ARISTOY, F. TOLDRÁ ir L. MORA. Antioxidant peptides profile in dry-cured ham as affected by gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods* [interaktyvus]. 2020, 69 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 17564646. Prieiga per: doi:10.1016/j.jff.2020.103956
117. VORM, O., P. ROEPSTORFF ir M. MANN. Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Analytical Chemistry* [interaktyvus]. 1994, 66 (19), 3281–3287 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 15206882. Prieiga per: doi:10.1021/ac00091a044

118. BANAN-MWINE DALIRI, E., D. H. OH ir B. H. LEE. Bioactive Peptides - Review. *Foods* [interaktyvus]. 2017, 6(32) [žiūrėta 2020-05-20]. Prieiga per: doi:10.3390/foods6050032 www.
119. MORA, L., M. GALLEGO, M. C. ARISTOY ir F. TOLDRÁ. Protein oxidation. *Encyclopedia of Food Chemistry* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 0077-8923. Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.21676-4
120. ACQUAH, C., E. D. STEFANO ir C. C. UDENIGWE. Role of hydrophobicity in food peptide functionality and bioactivity. *Journal of Food Bioactives* [interaktyvus]. 2018, 4, 88-98 [žiūrėta 2020-05-20]. ISSN 2637-8752. Prieiga per: doi:10.31665/jfb.2018.4164
121. APAK, R., E. CAPANOGLU ir F. SHAHIDI. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity Functional Food Science and Technology series. Recent Trends and Applications*. Oxford, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2018. ISBN 9781119135357.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei prof. dr. Daivai Leskauskaitei už kantrybę, skirtą laiką ir suteiktas galimybes atlikti magistro baigiamąjį darbą. Didi vadovės patirtis, įžvalgos ir ilgametis darbas maisto mokslo srityje padėjo nuosekliai ir tiksliai atlikti norimus darbus.

Taip pat dėkoju doc. dr. Mildai Keršienei už nuoširdžią pagalbą atliekant virškinamumo tyrimus ir rašant magistro baigiamąjį darbą. Už bendradarbiavimą, suteiktą galimybę peptidų analizės tyrimus atlikti savo laboratorijoje ir suteiktas žinias dėkoju dr. Leticia Mora bei prof. dr. Fidel Toldrá.