



**Kauno technologijos universitetas**  
Cheminės technologijos fakultetas

# **Pieno baltymų alerginio aktyvumo ir jų modifikavimo taikant biotechnologinius metodus vertinimas**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Aušrinė Žiūkaitė**

Projekto autorė

**doc. dr. Jonas Damašius**

Vadovas

---

Kaunas, 2020



**Kauno technologijos universitetas**  
Cheminės technologijos fakultetas

# **Pieno baltymų alerginio aktyvumo ir jų modifikavimo taikant biotechnologinius metodus vertinimas**

Baigiamasis magistro projektas  
Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Aušrinė Žiūkaitė**

Projekto autorė

**doc. dr. Jonas Damašius**

Vadovas

**dr. Dovilė Sinkevičiūtė**

Recenzentė

---

Kaunas, 2020



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Aušrinė Žiūkaitė

## **Pieno baltymų alerginio aktyvumo ir jų modifikavimo taikant biotechnologinius metodus vertinimas**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Aušrinės Žiūkaitės, baigiamasis projektas tema „Pieno baltymų alerginio aktyvumo ir jų modifikavimo taikant biotechnologinius metodus vertinimas“ 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.

---

Aušrinė Žiūkaitė

---

(parašas)

Žiūkaitė, Aušrinė. Pieno baltymų alerginio aktyvumo ir jų modifikavimo taikant biotechnologinius metodus vertinimas. Magistro baigiamasis projektas, vadovas doc. dr. Jonas Damašius; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: pieno baltymai, alergija pienui, alerginis aktyvumas, ultrafiltracija, fermentinė hidrolizė.

Kaunas, 2020. 58 p.

### **Santrauka**

Alergija pienui bei pieno produktams yra viena dažniausiai pasitaikančių alergijų pasaulyje ir stipriausiai pasireiškia vaikystėje. Siekiant sumažinti pieno baltymų alerginį aktyvumą yra atliekamos įvairios modifikacijos, kurios gali pilnai arba iš dalies paveikti pieno alergenų ir jų aktyvumą. Todėl baigiamasis magistro projektas yra skirtas pieno baltymų alerginio aktyvumo vertinimo ir jų modifikavimo būdams analizuoti, o projekto objektas yra pieno baltymai.

Magistro baigiamojo projekto metu atliktas pieno baltymų tokių kaip lieso pieno baltymų, išrūgų baltymų ir micelinio kazeino modifikavimas taikant šiuos biotechnologinius metodus: ultrafiltraciją ir fermentinę hidrolizę. Ultrafiltracijos procesui laboratorinėmis sąlygomis atlikti naudotos 30 kDa membranos, o fermentinės hidrolizės metu naudotos bakterinės kilmės proteazės kaip everlazė, esperazė bei savinazė išskirtos iš *Bacillus* rūšies mikroorganizmų ir gyvūninės kilmės fermentas tripsinas. Nemodifikuotų ir modifikuotų pieno baltymų alerginiam aktyvumui įvertinti naudotas imuno chromatografinis testas.

Ultrafiltracijos proceso metu įvertinta šio proceso pritaikymo galimybės pieno baltymų modifikacijai analizuojant retanto ir permeato susidarymo santykį. Fermentinės hidrolizės metu fiksuotos maksimalios hidrolizės laipsnio reikšmės ir jų pokytis reakcijos metu. Gauti rezultatai parodė, kad ultrafiltracijos procesas yra geriausiai pritaikomas išrūgų baltymams modifikuoti, o fermentas tripsinas efektyviausiai hidrolizuoja lieso pieno baltymus lyginant su kitais baltymais.

Magistro baigiamojo projekto metu atliktas nemodifikuotų ir fermentinės hidrolizės būdu modifikuotų pieno baltymų alerginio aktyvumo įvertinimas. Atlikta rezultatų analizė parodė, kad naudotos bakterinės proteazės geba pilnai suskaldyti kazeinus, taip sumažindamos šių baltymų alerginį aktyvumą.

Apibendrinant magistro baigiamojo projekto rezultatus gautos išvados, kad biotechnologiniai metodai kaip ultrafiltracija ir fermentinė hidrolizė yra tinkami pieno baltymams modifikuoti. Fermentinė hidrolizė naudojant proteazes yra veiksmingas metodas siekiant tik iš dalies sumažinti pieno baltymų alerginį aktyvumą.

Žiūkaitė, Aušrinė. Evaluation of Milk Proteins Allergenic Activity and Their Modification by Using Biotechnological Methods. Master's Final Degree Project, supervisor assoc. prof. Jonas Damašius; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological sciences.

Keywords: milk proteins, milk allergy, allergenic activity, ultrafiltration, enzymatic hydrolysis.

Kaunas, 2020. 58 p.

### **Summary**

Allergy to milk and dairy products is one of the most common allergies in the world and mostly diagnosed for children. In order to reduce the allergenic activity of milk proteins, various modifications are made that may completely or partially affect milk allergens and their activity. Therefore, the final master's thesis aims at describing and analysing the methods of assessing the allergic activity of milk proteins and their modification. The object of the project is milk proteins.

During the final project, the modification of milk proteins such as skim milk proteins, whey proteins and micellar casein was performed by using the following biotechnological methods: ultrafiltration and enzymatic hydrolysis. 30 kDa membranes were used for the ultrafiltration process under laboratory conditions. Bacterial proteases such as everlase, esperase, and savinase isolated from *Bacillus* species and the animal origin enzyme trypsin were used in enzymatic hydrolysis. An immunochromatographic assay was done to evaluate the allergenic activity of milk proteins before and after modification.

The applicability of the ultrafiltration process its effect to milk protein modification was evaluated by analyzing the ratio of retant and permeate formation. During enzymatic hydrolysis, the values of the maximum degree of hydrolysis and their change during the reaction were recorded. The results obtained showed that the ultrafiltration process is best suited for modifying whey proteins. Therefore, it was observed that enzyme trypsin most efficiently hydrolyzed skim milk proteins compared to other proteins.

The evaluation of the allergic activity of unmodified and enzymatically hydrolysed milk proteins was performed during final project. Analysis of the results showed that the bacterial proteases were capable of completely breaking down caseins, thus reducing the allergic activity of these proteins.

Summarizing the results of the master's final project, it was concluded that biotechnological methods such as ultrafiltration and enzymatic hydrolysis are suitable for the modification of milk proteins. Enzymatic hydrolysis while using proteases is an appropriate method to partly reduce the allergic activity of milk proteins.

## Turinys

<b>Santrumpų ir terminų sąrašas.....</b>	<b>8</b>
<b>Įvadas.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Literatūros apžvalga.....</b>	<b>10</b>
1.1. Pieno baltymai.....	10
1.1.1. $\alpha$ -laktoalbuminas (Bos d 4).....	11
1.1.2. $\beta$ -laktoglobulinas (Bos d 5).....	12
1.1.3. Serumo albuminas (Bos d 6).....	12
1.1.4. $\alpha_{S1}$ -kazeinas (Bos d 8-9).....	13
1.1.5. $\alpha_{S2}$ -kazeinas (Bos d 10).....	14
1.1.6. $\beta$ -kazeinas (Bos d 11).....	15
1.1.7. $\kappa$ -kazeinas (Bos d 12).....	15
1.2. Baltymų alerginis aktyvumas.....	16
1.2.1. Alergija pienui ir pieno produktams.....	17
1.3. Alergenų alerginio aktyvumo mažinimas.....	19
1.3.1. Terminis apdorojimas.....	19
1.3.2. Poveikis aukštu slėgiu.....	20
1.3.3. Cheminė hidrolizė.....	20
1.3.4. Ultragarsas.....	21
1.3.5. Kombinuoti būdai.....	22
1.4. Baltymų modifikavimo biotechnologiniai būdai.....	22
1.4.1. Fermentinė hidrolizė.....	22
1.4.2. Ultrafiltracija.....	23
1.5. Literatūros apžvalgos apibendrinimas.....	23
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....</b>	<b>24</b>
2.1. Medžiagos.....	24
2.2. Tyrimo objektai.....	25
2.3. Tyrimų metodai.....	26
2.3.1. Pradinių tirpalų paruošimas.....	26
2.3.2. Fermentų aktyvumo nustatymas.....	26
2.3.3. Fermentinė hidrolizė.....	27
2.3.4. Fermentinės hidrolizės laipsnio nustatymas.....	28
2.3.5. Ultrafiltracija.....	28
2.3.6. Liofilizacija.....	30
2.3.7. ELISA metodas.....	31
2.3.8. Imuno chromatografinis testas alergenų nustatymui.....	32
2.3.9. Specifinių IgE nustatymas kraujo serume.....	32
2.3.10. Statistinis duomenų apdorojimas.....	33
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....</b>	<b>34</b>
3.1. Fermentų aktyvumo įvertinimas.....	34
3.2. Fermentinės hidrolizės įvertinimas.....	35
3.2.1. Fermentų įtakos lieso pieno baltymų hidrolizei įvertinimas.....	36
3.2.2. Fermentų įtakos išrūgų baltymų hidrolizei įvertinimas.....	37
3.2.3. Fermentų įtakos micelinio kazeino hidrolizei įvertinimas.....	38

3.2.4. Fermentų tinkamumo pieno baltymams modifikuoti įvertinimas.....	39
3.3. Ultrafiltracijos proceso pieno baltymų modifikavimui įvertinimas.....	41
3.4. Liofilizacijos proceso įtakos bandinių savybėms įvertinimas.....	42
3.5. Alerginio aktyvumo įvertinimas.....	44
3.5.1. Nemodifikuotų pieno baltymų alerginio aktyvumo įvertinimas.....	45
3.5.2. Modifikuotų pieno baltymų alerginio aktyvumo įvertinimas.....	46
<b>4. Rekomendacijų dalis.....</b>	<b>49</b>
<b>Išvados.....</b>	<b>51</b>
<b>Literatūros sąrašas.....</b>	<b>52</b>

## Santrumpų ir terminų sąrašas

$\beta$ -LG –  $\beta$ -laktoglobulinas

ALA –  $\alpha$ -laktoalbuminas

BSA – baltymo serumo albuminas

HCl – druskos rūgštis

HIB – hidrolizuoti išrūgų baltymai

HL – hidrolizės laipsnis

Ig – imunoglobulinas

IBI – išrūgų baltymų izoliatas

IgE – imunoglobulinas E

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – dikaliohidrofosfato trihidratas

LSB – lieso pieno baltymai

MKB – micelinis kazeinas

$Na_2CO_3$  – natrio karbonatas

NaOH – natrio hidroksidas

Permeatas – po ultrafiltracijos proceso gautas filtratas

PRB – pieno rūgšties bakterijos

Retantas – po ultrafiltracijos proceso gautas koncentratas



## Įvadas

Pastaraisiais metais alergija maistui yra skelbiama kaip viena iš dažniausiai diagnozuojamų ligų Europos gyventojams [1]. Alerginės ligos yra pasaulinė sveikatos problema, kuri paveikia apie vieną milijardą žmonių ir prognozuojama, kad iki 2050 m. paplitimas turėtų didėti iki keturių milijardų [2]. Mokslininkų teigimu, alerginiai susirgimai turi ekonominį poveikį Europos sąjungai. Paskaičiuota, kad sveikatos priežiūros išlaidos alerginėms ligoms gydyti svyruoja nuo 55 iki 151 mlrd. eurų per metus [3]. Nepaisant alerginės ligos maistui rimtumo, šiuo metu nėra nei vaistų, nei gydymo, o pacientams yra siūloma griežtai vengti alergenų [4].

Alergija karvės pienui yra labiausiai paplitęs alerginis sutrikimas vaikų grupėje, kuris įvardinamas kaip svarbi problema, ypač pramoninėse šalyse. Tai gali lemti keletas veiksnių iš kurių pagrindiniu yra traktuojamas pilnai nesubrendusio vaikų žarnyno alerginė reakcija į pieno baltymus [5]. Alerginiu poveikiu pasižyminčių baltymų struktūroje yra dalis (epitopas), kuri reaguoja su žmogaus organizmu. Todėl siekiant sumažinti pieno baltymų alerginį aktyvumą yra atliekamos modifikacijos, kurios gali paveikti alerginę baltymų dalį.

Alerginiu aktyvumu pasižymi karvės pieno sudėtyje esantys baltymai:  $\alpha$ -laktoalbuminas,  $\beta$ -laktoglobulinas, serumo albuminas,  $\alpha_{S1}$ -kazeinas,  $\alpha_{S2}$ -kazeinas,  $\beta$ -kazeinas ir  $\kappa$ -kazeinas. Siekiant sumažinti jų alerginį aktyvumą yra taikomi biotechnologiniai procesai, tokie kaip ultrafiltracija ir fermentinė hidrolizė. Membraninės technologijos yra naudojamos maisto pramonėje dėl nesudėtingo veikimo principo ir pritaikomumo galimybių. Fermentinė hidrolizė yra taikoma siekiant gauti biologiniu aktyvumu pasižyminčius ingredientus, kurie vėliau yra panaudojami kaip funkciniai priedai maisto produktuose. Šio proceso metu yra naudojami baltymus skaldantys fermentai proteazės, siekiant gauti mažesnius baltymų fragmentus. Kai baltymas praranda jam būdingą struktūrą, tikėtina, kad sumažėja ir jo alerginis aktyvumas.

Atlikus technologines modifikacijas, reikia įvertinti jų įtaką baltymo alerginiam aktyvumui. Baltymų analizė dažniausiai atliekama imunologiniais ar fizikocheminiais metodais. Norint pasirinkti metodą, pirmiausia reikia nustatyti tikslinių analitų identifikavimą ir parinkimą. Keletas metodų nukreipia į konkretų alerginį baltymą arba daugybę alerginių baltymų, esančių maiste (tiesioginė analizė), o kiti nukreipia DNR kaip alerginio ingrediento žymeklį (netiesioginė analizė) [6].

**Baigiamojo magistro projekto tikslas** – įvertinti pieno baltymų alerginį aktyvumą prieš ir po modifikavimo taikant biotechnologinius metodus.

Šiam tikslui pasiekti išskelti tokie **projekto uždaviniai**:

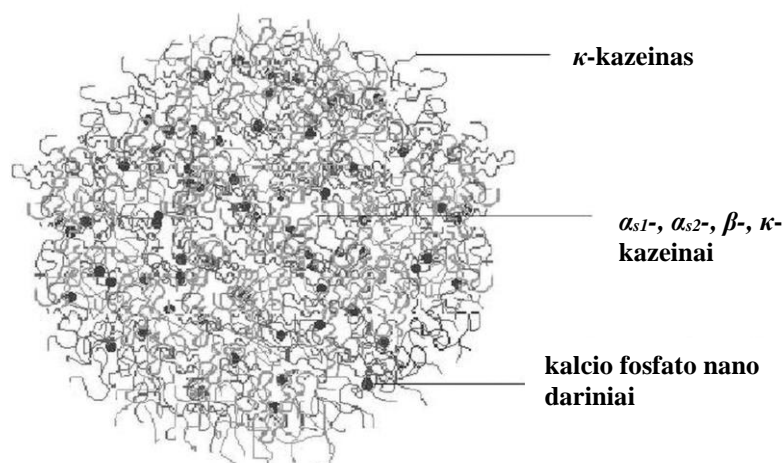
1. apžvelgti ir įvertinti biotechnologinius metodus pieno baltymų modifikavimui, siekiant sumažinti jų alerginį aktyvumą;
2. nustatyti nemodifikuotų pieno baltymų (kazeinų ir išrūgų) alerginį aktyvumą;
3. atlikti pieno baltymų modifikavimą taikant membraninės filtracijos metodus;
4. modifikuoti pieno baltymus taikant fermentinę hidrolizę;
5. įvertinti pieno baltymų po modifikavimo alerginį aktyvumą;
6. pateikti rekomenduojamą principinę biotechnologinio produkto gamybos aparatūrinę schemą.

## 1. Literatūros apžvalga

Šioje dalyje bus apžvelgta mokslinėje literatūroje ir baltymų duomenų bazėje pateikiama informacija apie pieno baltymus. Taip pat bus pateikta informacija apie baltymų alerginį aktyvumą ir galimus baltymų modifikavimo būdus siekiant sumažinti jų alerginį poveikį.

### 1.1. Pieno baltymai

Pienas yra skysta medžiaga, kurią išskiria visų rūšių žinduolių pieno liaukos ir jis yra skirtas palikuonių mitybos poreikiams palaikyti. Pienas ir pieno produktai yra baltymų, riebalų, mineralų ir vitaminų šaltiniai svarbūs kasdienėje žmonių mityboje [7].



1.1 pav. Karvės pieno kazeino micelės sandara [8]

Baltymas, proteinas – gamtinis polimeras, sudarytas iš  $\alpha$ -aminorūgščių liekanų, susijungusių peptidiniais ryšiais [9]. Baltymų kiekis karvių piene vidutiniškai yra apie 3,3 %, tačiau gali svyruoti nuo 2 iki 5 %. Karvės pieno baltymai yra skirstomi į kazeinus (1.1 pav.) ir išrūgų baltymus [10]. Visi karvės pieno baltymai ir jų rodikliai yra pateikti 1.1 lentelėje.

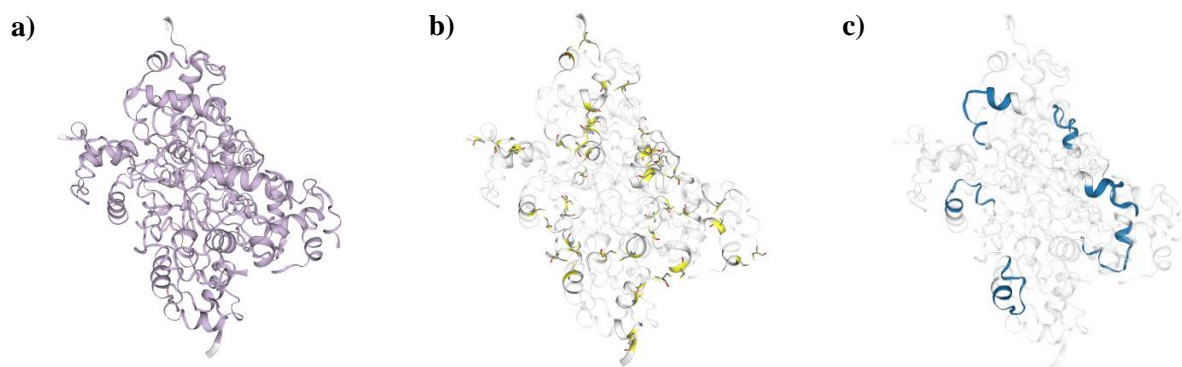
1.1 lentelė. Karvės pieno baltymų rodikliai [10]

Baltymas		Rodiklis		
		Kiekis, % (bendro baltymų kiekio)	Molekulinė masė, Da	Izoelektrinis taškas, pH
Kazeinai	$\alpha_{s1}$ -kazeinas	45–55	22 000–24 000	4,1
	$\alpha_{s2}$ -kazeinas	9–10	25 000–26 000	4,1
	$\beta$ -kazeinas	25–35	24 000	4,5
	$\kappa$ -kazeinas	8–15	19 000	4,1
	$\gamma$ -kazeinas	3–7	12 000–21 000	5,8–6,0
Išrūgų baltymai	$\alpha$ -laktoalbuminas	2–5	14 000	4,2–4,5
	$\beta$ -laktoglobulinas	7–12	18 000	5,3
	serumo albuminas	0,7–1,3	69 000	4,7
	imunoglobulinai	1,9–3,3	150 000–163 000	5,5–6,8
	proteozopeptonai	2–6	40 000–41 000	3,3–3,7

### 1.1.1. $\alpha$ -laktoalbuminas (Bos d 4)

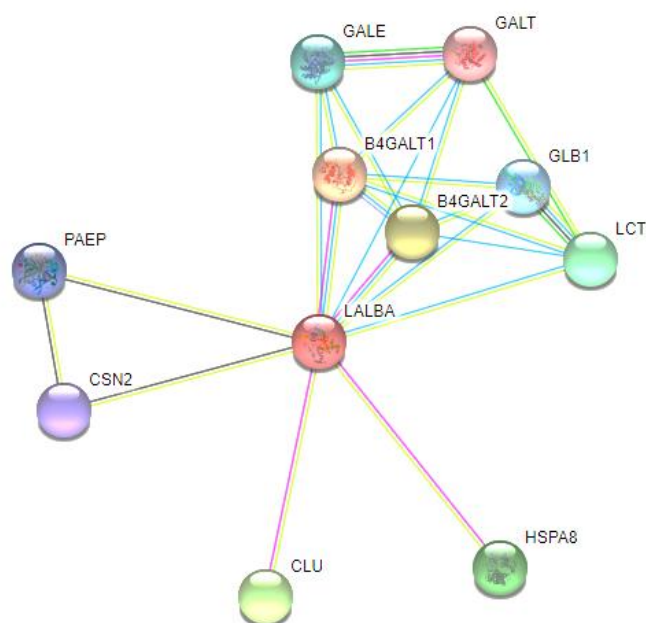
Pieno baltymas  $\alpha$ -laktoalbuminas (ALA) priklauso lizocimų šeimai. Jo molekulinė masė yra 14,2 kDa ir jį sudaro 123 aminorūgščių liekanos [11]. Gali būti vadinamas laktozės sintazės B baltymu arba Bos d 4. Taksonominio identifikatoriaus numeris yra 9913, o genas – LALBA [12]. ALA molekulės vaizdas yra pateiktas 1.2 paveiksle, a.

Išsamiau nagrinėjamas P00711 baltymas – LALBA\_BOVIN. Baltymo molekulėje yra keturios disulfidinės jungtys tarp aminorūgščių: 25–139, 47–130, 80–96, 92–110 (1.2 pav., b). Prie 64 amino rūgšties glikolizacija, *N*-prijungtas asparaginas [12].



**1.2 pav.** ALA 1F6R kristalo struktūra: a) bendras vaizdas, b) išryškinti disulfidinės jungtys ir c) išryškintos kalcio pririšimo vietos [13]

Baltymas ALA kaip molekulė pasižymi kalcio jonų surišimu (1.2 pav., c), baltymo–baltymo sąveika [14] ir laktozės sintazės aktyvumu. Galimi ryšiai tarp ALA baltymo ir kitų baltymų yra pavaizduoti 1.3 paveiksle.



Paiškinimai:

B4GALT1 –  $\beta$ -1,4-galaktoziltransferazė 1

B4GALT2 –  $\beta$ -1,4-galaktoziltransferazė 2

CLU – klusterinas

HSPA8 – tremostabilus 71 kDa baltymas

LCT – *Bos Taurus* laktazė

GALE – UDP-gliukozil 4-epimerazė

GLB1 –  $\beta$ -galaktozidazė

PAEP –  $\beta$ -laktoglobulinas

CSN2 –  $\beta$ -kazeinas

GALT – *Bos taurus* galakto-1-fosfato uridililtransferazė

**1.3 pav.** Galimi baltymo–baltymo ryšiai tarp ALA ir kitų baltymų [15]

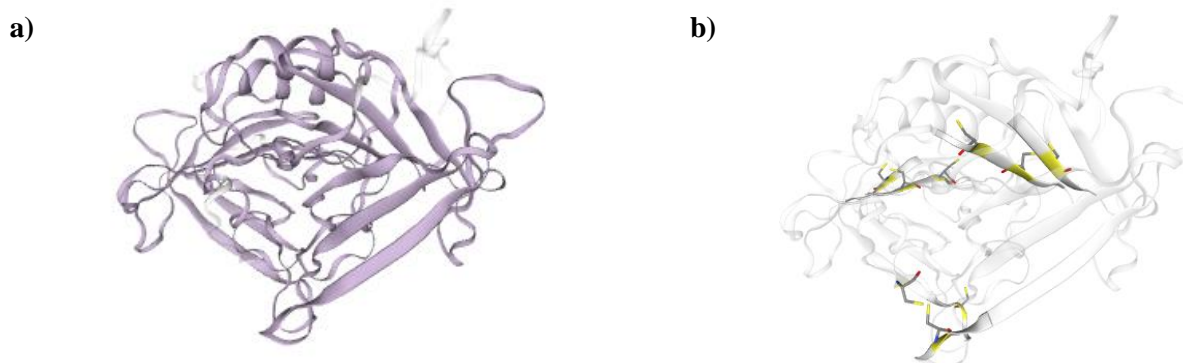
\* Šviesiai mėlynos ir violetinės spalvos linijos rodo jau žinomus ryšius. Žalios, raudonos ir tamsiai mėlynos spalvos linijos rodo nuspėjamus ryšius. Kitos spalvos rodo kitus galimus variantus.

Baltymo ALA biologinės funkcijos yra tokios: gynybinis atsakas į gramneigiamas bakterijas ir gynybinis atsakas į gramteigiamas bakterijas [16].

### 1.1.2. $\beta$ -laktoglobulinas (Bos d 5)

Pieno baltymas  $\beta$ -laktoglobulinas, sutrumpintai  $\beta$ -LG dar gali būti vadinamas Bos d 5. Jo molekulinė masė yra 18,3 kDa ir jį sudaro 162 aminorūgščių liekanos [17]. Taksonominio identifikatoriaus numeris yra 9913, o genas – LGB [18]. Baltymo molekulės vaizdas yra pateiktas 1.4 paveiksle, a.

Išsamiau nagrinėjamas P02754 baltymas – LAVB\_BOVIN. Baltymo molekulėje yra trys disulfidinės jungtys tarp aminorūgščių: 82–176, 122–137 ir 122–135 (1.4 pav., b) [18].

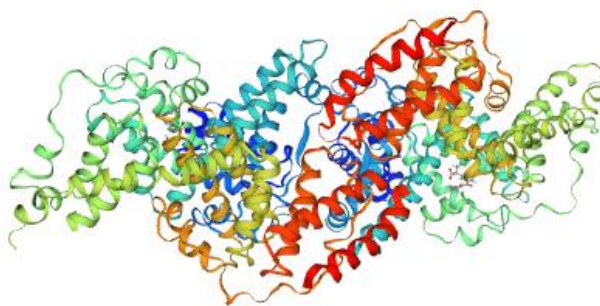


**1.4 pav.**  $\beta$ -LG 2Q39 (mažos drėgmės) kristalo struktūra: a) bendras vaizdas ir b) išryškinti disulfidinės jungtys [19]

Baltymas  $\beta$ -LG kaip molekulė pasižymi baltymo-baltymo sąveika, ilgų grandinių riebalų rūgščių surišimu ir retinolio surišimu [20–21]. Jis yra pirminis išrūgų komponentas, suriša retinolį ir gali būti atsakingas už jo transportavimą [18].

### 1.1.3. Serumo albuminas (Bos d 6)

Pieno baltymas serumo albuminas yra pagrindinis plazmos baltymas. Sutrumpintai dar gali būti vadinamas BSA arba Bos d 5. Jo molekulinė masė yra 67 kDa ir jį sudaro 583 aminorūgščių liekanos [17]. Taksonominio identifikatoriaus numeris yra 9913, o genas – ALB [22]. Baltymo molekulės vaizdas yra pateiktas 1.5 paveiksle.

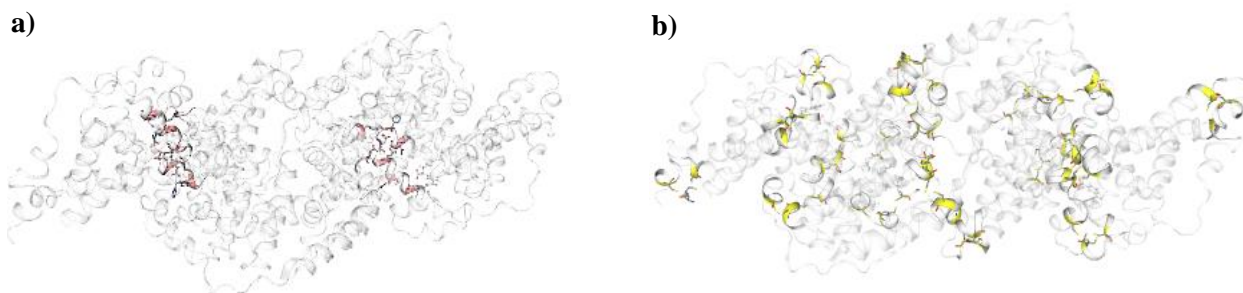


**1.5 pav.** Baltymo serumo albumino 6qs9 struktūros molekulės vaizdas [23]

BSA pasižymi vandens,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , riebalų rūgščių, hormonų, bilirubino ir vaistų surišimo geba. Pagrindinė jo funkcija yra koloidinio kraujo osmosinio slėgio reguliavimas. BSA yra pagrindinis

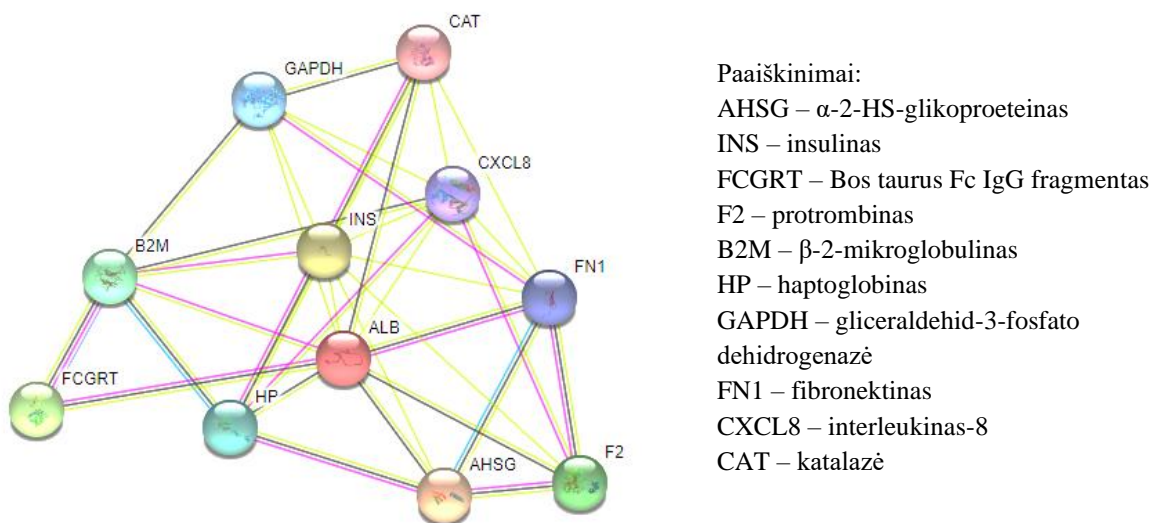
kalcio ir magnio pernešėjas plazmoje. Paprastai suriša apie 80% viso plazmos cinko (pagal panašumą) [24]. Metalų surišimo vietas baltymo molekulėje yra paryškintos ir pateiktos 1.6 paveiksle, a.

Išsamiau nagrinėjamas P02769 baltymas – ALBU\_BOVIN. Baltymo molekulėje yra 17 disulfidinių jungčių tarp aminorūgščių: 77–86, 99–115, 114–125, 147–192, 191–200, 223–269, 268–276, 288–302, 301–312, 339–384, 383–392, 415–461, 460–471, 484–500, 499–510, 537–582 ir 581–590 (1.6 pav., b) [22].



**1.6 pav.** BSA 6qs9 kristalo struktūra ir išryškintos vietos: a) metalų prijungimo ir b) disulfidinės jungtys [23]

Baltymas BSA pasižymi baltymo-baltymo sąveika [25]. Galimi ryšiai tarp šio baltymo ir kitų baltymų yra pavaizduoti 1.7 paveiksle.



**1.7 pav.** Galimi baltymo-baltymo ryšiai tarp BSA ir kitų baltymų [25]

#### 1.1.4. $\alpha$ <sub>S1</sub>-kazeinas (Bos d 8-9)

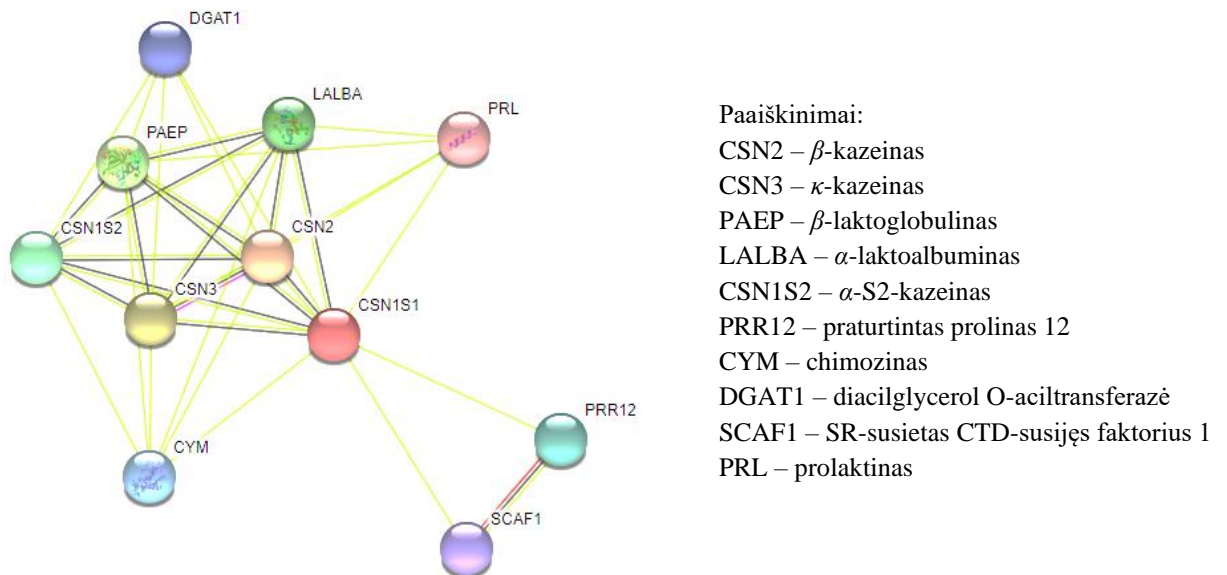
Pieno baltymas kazeinas yra antioksidantas. Jo molekulinė masė yra 23,6 kDa ir jį sudaro 199 aminorūgščių liekanos [17]. Gali būti vadinamas  $\alpha$ <sub>S1</sub> kazeinas arba Bos d 8. Taksonominio identifikatoriaus numeris yra 9913, o genas – CSN1S1 [26]. Baltymo molekulės vaizdas yra pateiktas 1.8 paveiksle.

Išsamiau nagrinėjamas P02662 baltymas – CASA1\_BOVIN. Stiprus alergenai, turi 6 didelius ir 3 mažus IgE surišimo regionus. Tai sukelia alergiją karvės pienui [26].



**1.8 pav.** Baltymo  $\alpha_{S1}$ -kazeino molekulės vaizdas [27]

Baltymas  $\alpha_{S1}$ -kazeinas kaip molekulė pasižymi baltymo-baltymo sąveika (1.9 pav.) antioksidacinėmis funkcijomis ir amiloido beta surišimu [28]. Svarbi funkcija piene yra kalcio fosfato pernešimas [29].



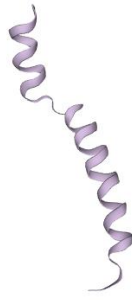
**1.9 pav.** Galimi baltymo-baltymo ryšiai tarp  $\alpha_{S1}$ -kazeinas ir kitų baltymų [30]

### 1.1.5. $\alpha_{S2}$ -kazeinas (Bos d 10)

Pieno baltymas  $\alpha_{S2}$ -kazeinas yra kaip antibiotikas. Jo molekulinė masė yra 25,2 kDa ir jį sudaro 207 aminorūgščių liekanos [17]. Gali būti vadinamas  $\alpha_{S2}$ -kazeinas arba Bos d 10. Taksonominio identifikatoriaus numeris yra 9913, o genas – CSN1S2 [31]. Baltymo molekulės vaizdas yra pateiktas 1.10 paveiksle.

Išsamiau nagrinėjamas P02663 baltymas – CASA2\_BOVIN [32]. Gali būti suskaidomas iki Kazocidinas-1., kuris inhibuoja *E.coli* ir *S.carnosus* augimą. Taip pat yra svarbus kalcio fosfato pernešime piene.

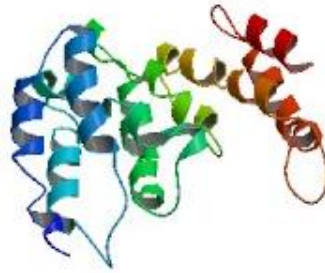
Baltymas  $\alpha_{S2}$ -kazeinas kaip molekulė pasižymi baltymo homodimerizacijos aktyvumu ir zymogeno surišimu [32].



**1.10 pav.** Baltymo  $\alpha_{s2}$ -kazeino molekulės vaizdas [33]

#### **1.1.6. $\beta$ -kazeinas (Bos d 11)**

Pieno baltymas  $\beta$ -kazeinas yra antioksidantas, hipotenzinis agentas (mažina kraujo spaudimą), metalų fermentų inhibitorius, metalo proteazių inhibitorius ir proteazių inhibitorius. Jo molekulinė masė yra 24 kDa ir jį sudaro 209 aminorūgščių liekanos [17]. Taksonominio identifikatoriaus numeris yra 9913, o genas – CSN2 [34]. Baltymo molekulės vaizdas yra pateiktas 1.11 paveiksle.



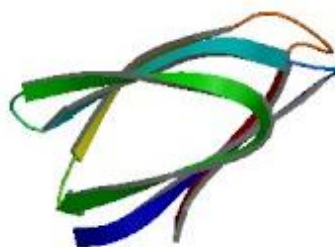
**1.11 pav.** Baltymo  $\beta$ -kazeino molekulės vaizdas [35]

Išsamiau nagrinėjamas P02666 baltymas – CASB\_BOVIN. Šis baltymas yra svarbus nustatant kazeino micelių paviršiaus savybes. [34]. Gali skilti iki 3 grandinių: kazoparano, antioksidacinio peptido ir kazohipotenzino.

#### **1.1.7. $\kappa$ -kazeinas (Bos d 12)**

Pieno baltymas  $\kappa$ -kazeino molekulinė masė yra 19 kDa ir jį sudaro 169 aminorūgščių liekanos [17]. Taksonominio identifikatoriaus numeris yra 9913, o genas – CSN3 [36]. Baltymo molekulės vaizdas yra pateiktas 1.12 paveiksle.

Išsamiau nagrinėjamas P02666 baltymas – CASK\_BOVIN. Svarbus baltymas stabilizuojant micelių formavimąsi, išvengiant kazeino nusėdimo. Gali skilti iki 5 grandinių: kazoksin-C, kazoksin-6, kazoksin-A, kazoksin-B ir kazoplatelino [36].



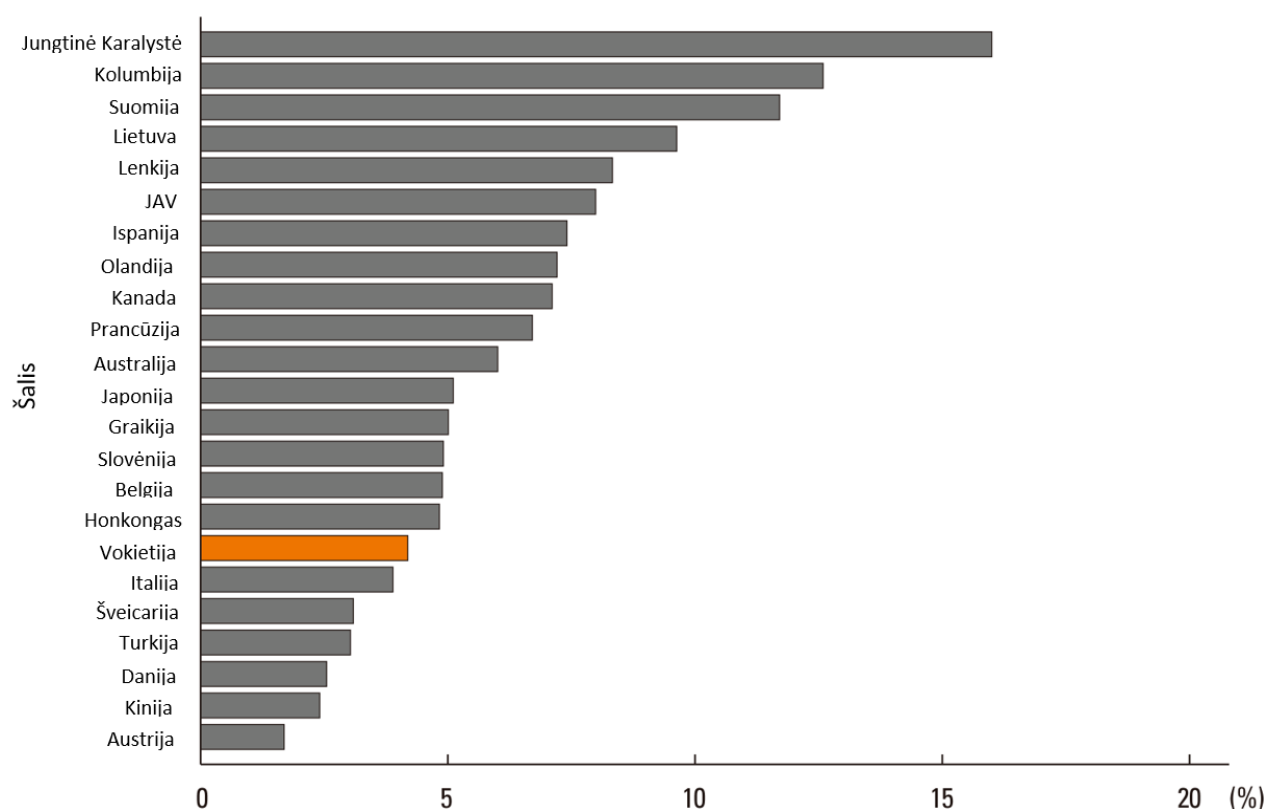
**1.12 pav.** Baltymo  $\kappa$ -kazeino molekulės vaizdas [37]

## 1.2. Baltymų alerginis aktyvumas

Alergija maistui – tai nepageidaujamas poveikis sveikatai, atsirandantis dėl tam tikro imuninio atsako, kuris pasireiškia kas kartą dirginant organizmą tam tikru maistu. Dauguma maisto alergenų yra baltymai iš kurių I klasės maisto alergenai yra 10–70 kDa gyvuliniai arba augaliniai glikoproteinai, kurie yra atsparūs perdirbimui ir fermentiniam virškinimui [38].

Dažniausiai pasitaikantis maisto alergijos mechanizmas yra imunoglobulino (Ig) E-tarpininkaujančios reakcijos. Tokios reakcijos pasireiškia, kai prisitaikanti imuninė sistema nesugeba toleruoti maisto baltymų, o vietoj to sukuria IgE antikūnus, nukreiptus prieš alerginius epitopus (antigeno molekulės fragmentas, sužadinantis imuninį atsaką su jam būdingu specifiskumu) [39–40].

Maisto alergija dažniausiai pasireiškia kūdikiams ir mažiems vaikams dėl žarnyno ir imuninės sistemos nesubrendimo šiose amžiaus grupėse [38]. Maisto alergijos paplitimas tarp vaikų įvairiose šalyse yra pateiktas 1.13 paveiksle.



**1.13 pav.** Įvairaus amžiaus vaikų (0–18 m.), kuriems pasireiškė alergija, paplitimas (oranžinė spalva rodo kliniškai įrodytą rezultatą, o pilka – tėvų pranešimai) [41]

Europos maisto ir saugos tarnybos direktyvoje 2003 / 89 / EB IIIa priede yra nurodyti maisto produktai ir žaliavos, kurie pasižymi alerginiu poveikiu, tokie kaip: javai, kurių sudėtyje yra glitimo, pienas ir pieno produktai, kiaušiniai, riešutai, žemės riešutai, soja, žuvis, vėžiagyviai, moliuskai, salierai, lubinai, sezamai, garstyčios ir sulfitai [42]. Visų išvardintų maisto produktų sudėtyje randami alergenai yra baltymai.

Apibendrinti duomenys dažniausiai vartojamų maisto produktų pagrindiniai alergenai ir jų bendriniai kodai yra pateikti 1.2 lentelėje.



**1.2 lentelė.** Pagrindiniai populiariausių maisto produktų alergenai [39,43]:

Maisto produktas	Alergeno pavadinimas	Alergeno bendrinis kodas
Karvės pienas	$\alpha$ -laktoalbuminas	Bos d 4
	$\beta$ -laktoglobulinas	Bos d 5
	Kazeinai ( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\kappa$ -)	Bos d 8
Vištos kiaušinis	Ovomukoidas	Gal d 1
	Ovalbuminas	Gal d 2
	Ovotransferinas	Gal d 3
	Lizocimas	Gal d 4
Žemės riešutai	Kupinas, 7S globulinas	Ara h 1
	Konglutinas, 2S albuminas	Ara h 2
	Kupinas, 11S globulinas	Ara 3
	Konglutinas, 2S albuminas	Ara h 6
	Bet v 1 homologas	Ara h 8
	LTP	Ara h 9
Lazdyno riešutai	PR-10 baltymas	Cor a 1
	LTP	Cor a 8
	11S sėklas saugantis globulinas	Cor a 9
	2S albuminas	Cor a 14
Krevetės	Tropomiozinas	Lit v 1
	Sarkoplazminis kalcij surišantis baltymas	Lit v 4
Sojų pupelės	7S globulinas	Gly m 5
	11S globulinas	Gly m 6
	2S albuminas	Gly m 8

Siekiant įvertinti alergenų poveikį organizmui atliekami pirmos eilės medicininiai testai kaip odos dūrio testas ir specifinių IgE nustatymas kraujyje. Po to, esant poreikiui gali būti atlikti ir provokaciniai testai [43].

### 1.2.1. Alergija pienui ir jo produktams

Alergija pienui ir kiaušiniams yra dažniausiai pasitaikanti alergija vaikams ankstyvame amžiuje Jungtinėje Karalystėje, JAV, Australijoje, Azijoje ir daugelyje šalių Europoje (atlika keturiasdešimt tyrimų nuo 1982 m. iki 2012 m. įvairiose amžiaus grupėse) [41,44]. Alergija pienui yra neigiamas imunologinis atsakas į skirtingų rūšių žinduolių pieno baltymus, o ypač į karvės, ožkos ir avies [45].

Žinoma, kad santykinai mažas pieno alergenų kiekis alergiškiems asmenims gali sukelti alergines reakcijas kaip pavyzdys mažiausiai 0,1 mg pieno baltymų dozė vienam produkto vartotojui būtų pakankamas pagrindas maisto gamintojams taikyti alergenų atsargumo ženklumą [46].

Įvairių rūšių žinduolių pieno kaip karvės, buivolo, avių, ožkų ir žmogaus, baltymai yra panašūs savo struktūrinėmis, funkcinėmis ir biologinėmis savybėmis, o sudėties pokyčiai gali būti pastebimi tik žindymo metu [42]. Žinomi pieno alergenai yra pateikti 1.3 lentelėje.

### 1.3 lentelė. Pieno alergenai [17]

Baltymo pavadinimas	Alergeno kodas	Molekulinė masė, kDa	Aminorūgščių kiekis
$\alpha$ -laktoalbuminas	Bos d 4	14,2	123
$\beta$ -laktoglobulinas	Bos d 5	18,3	162
Serumo albuminas	Bos d 6	67	583
Imunoglobulinas	Bos d 7	160	–
Kazeinai (Bos d 9 – Bos d 12)	Bos d 8	20–30	–
$\alpha_{s1}$ -kazeinas	Bos d 9	23,6	199
$\alpha_{s2}$ -kazeinas	Bos d 10	25,2	207
$\beta$ -kazeinas	Bos d 11	24	209
$\kappa$ -kazeinas	Bos d 12	19	169

Daugeliui kūdikių pasireiškia odos, virškinimo trakto, kvėpavimo takų ir sisteminių anafilaksinių simptomų karvės pieno alerginiams baltymams [47]. Elizur'as, et al. [48] nustatė, kad reakcija į karvės pieno baltymus pasireiškė vidutiniškai  $1,67 \pm 1,67$  dienos po pradinio poveikio.

Nors alergija karvės pienui gali išnykti pirmaisiais gyvenimo metais, tačiau 15 % paveiktų vaikų lieka alergiški. Dabartinės pieno alergijos prevencijos ir valdymo priemonės priklauso nuo visiško pieno vartojimo pašalinimo iš kasdienės mitybos. Tačiau karvės pieno baltymų vengimas gali sukelti mitybos nepakankamumą, o tai gali turėti įtakos kūdikių ir vaikų augimui bei vystymuisi [47].

Rinkoje galima rasti komercinių testų, kurie suteikia galimybę įvertinti alergenų kiekį maisto produktuose. Didžioji dalis tokių įprastinių komercinių maisto alergenų analizei skirtų rinkinių remiasi imunologiniais metodais. Su fermentais susieto imunosorbento tyrimo (ELISA) metodas yra plačiausiai naudojamas, nes tai yra jautrus ir specifiškas alergenams metodas [42]. Kaip pavyzdys išnagrinėti komerciniai rinkiniai skirti  $\beta$ -LG nustatymui ir jų sąrašas yra pateiktas 1.4 lentelėje. Taip pat rinkoje yra ir kitiems pieno alerginiams baltymams pritaikytų analizės rinkinių.

### 1.4 lentelė. Komerciniai pieno alergeno $\beta$ -LG nustatymo rinkiniai [46]

Rinkinio pavadinimas	Testo formatas	Tiksliniai baltymai	Aptikimo riba	Trukmė
Reveal for Total Milk Allergen (Neogen)	LFD*	Kazeinai ir išrūgos	5 g/ml	5 min
Beta Lactoglobulin Residue ELISA (Oxoid)	ELISA	$\beta$ -LG	0,1 $\mu$ g/ml	45 min
Alert for Total Milk Allergen (Neogen)	ELISA	Pieno baltymai	5 g/ml	30 min
Veratox for Total Milk Allergen (Neogen)	ELISA	Pieno baltymai	5 g/ml	30 min
Beta-lactoglobulin ELISA Kit (Crystal Chem)	ELISA	$\beta$ -LG maiste	0,3 $\mu$ g/g	–
AgraQuant® ELISA $\beta$ -Lactoglobulin (Romer Labs)	ELISA	$\beta$ -LG maiste	1,5 ng/ml	60 min
ELISA Kit for Beta-Lactoglobulin (Biomatik)	ELISA	$\beta$ -LG	<0,073 ng/ml	4,5 val.

\*LFD – greitojo tyrimo imunochromatografinės juostelės

### 1.3 Alergenų alerginio aktyvumo mažinimas

Maisto alerginis aktyvumas gali sumažėti, išlikti nepakitęs ar net padidėti po maisto produkto ar žaliavos apdorojimo. Daugelis maisto produktų apdorojimo būdų, tokių kaip terminis apdorojimas, poveikis aukštu slėgiu, poveikis spinduliuote, fermentinė hidrolizė ir fermentacija, sumažina baltymų IgE jungimosi gebą [49]. Dahdah'as, et al. [50] nustatė, kad pieno ir kiaušinių baltymų sąveika su maisto produktų matrica, pvz., kviečiais, taip pat sumažina IgE atpažinimą.

Atsižvelgiant į alergiško baltymų, esančių maiste įvairovę, ir tai, kad skirtingi baltymai gali būti skirtingai paveikti naudojant tą patį apdorojimo būdą, yra sunku numatyti alergizuojančių maisto produktų bei ingredientų struktūrinės ir alerginės savybės. Be to, alergizuojančių baltymų modifikavimo procesas perdirbimo metu priklauso nuo keletos veiksnių kaip: proceso tipo ir jo sąlygų, perdirbamų baltymų struktūros ir maisto produkto matricos struktūros [42].

Maisto pramonėje dažniausiai patys maisto produktai ar žaliavos, iš kurių jie yra gaminami, pirmiausia yra paveikiami fiziko-cheminiais procesais, tokiais kaip: terminis apdorojimas, poveikis aukštu slėgiu ar cheminė hidrolizė. Vykdomi fizikiniai reiškiniai, kurių metu gali įvykti cheminiai pokyčiai proceso metu veikiama medžiagai. Rahaman'as, et al. [51] atliko skirtingų fiziko-cheminių apdorojimo būdų įtakos pieno baltymui  $\beta$ -LG įvertinimą, o gauti duomenys yra pateikti 1.5 lentelėje.

1.5 lentelė. skirtingų apdorojimo būdų įtaka  $\beta$ -laktoglobulinai [51]

Apdorojimo būdas	Struktūros pokyčiai	Virškinamumas ir alerginis aktyvumas
Sterilizacija	Išsiskleidimas, po kurio seka kovalentinė agregacija ir Maillardo reakcija	Padidėjęs jautrumas peptinei hidrolizei ir sumažėjęs alergiškumas
Pasterizacija	Konformacinių epitopų poveikis	Geresnis išsavinimas per epitelį su padidėjusiu alergiškumu
Kaitinimas kviečių matricoje	Kompleksinės struktūros susidarymas tarp kviečių ir $\beta$ -laktoglobulino	Sumažėjęs virškinamumas ir biologinis prieinamumas imuninei sistemai
Aukštas slėgis	Baltymų molekulių atplėšimas su skilimo vietos ekspozicija	Geresnis virškinamumas ir sumažėjęs alergiškumas
Radiacija	Baltymų aglomeracija	Nepakitęs
Ultragarsas	Oligomerų perėjimas iš $\beta$ klosčių į $\alpha$ spiralę	Padidėjęs virškinamumas, bet alergiškumas nekinta

Toliau detaliau aptariami terminio apdorojimo, poveikio aukštu slėgiu, cheminės hidrolizės ir ultragarso procesų įtaka pieno baltymams.

#### 1.3.1. Terminis apdorojimas

Terminis apdorojimas yra svarbus procesas pieno produktų gamyboje. Šio proceso metu vyksta svarbūs struktūriniai ir cheminiai baltymų pokyčiai, tokie kaip denatūracija, agregacija ir Majero reakcija su kitomis molekulėmis. Tokie pokyčiai gali turėti didelį poveikį pieno baltymų alergenų antigeniškumui [52].

Lyginant pieno baltymus tarpusavyje, kazeinas yra termostabilus, o globuliniai išrūgų baltymai yra jautrūs terminiam poveikiui tokia seka: imunoglobulinas < galvijų serumo albuminas <  $\beta$ -laktoglobulinas <  $\alpha$ -laktoalbuminas. Kaip pavyzdys terminio apdorojimo metu, kai pienas kaitinamas

120 °C temperatūroje 15 min., tai nepaveikia kazeino antigeniškumo, tačiau BSA ir Ig praranda antigeniškumą 70–80 arba 100 °C temperatūroje [53].

Terminis apdorojimas kepimo metu gali sumažinti keletos baltymų alerginių aktyvumą maiste, nes keičiasi karščiui atsparių baltymų konformacija ir tokiu būdu sumažėja alergeninių epitopų skaičius. Pieno baltymų alergenų modifikavimui terminiu būdu įtakos turi daug veiksnių, tokių kaip: pieno sudėtis, perdirbimo sąlygas ir poveikio vartotojui aplinkybės. Todėl, norint sukurti hipoalerginius pieno produktus, būtina kontroliuoti terminio apdorojimo sąlygas [52].

### **1.3.2. Poveikis aukštu slėgiu**

Poveikis aukštu slėgiu gali sukelti struktūrinius pieno baltymų pokyčius, tokius kaip denatūravimas ir agregatų susidarymas. Šie pokyčiai gali turėti įtakos pieno baltymų alergiškumui, o didelio slėgio sukeltų baltymų konformacijos pokyčiai gali palengvinti fermentinį virškinimą [52].

Pieno baltymai yra įvairūs kompleksai, kuriuos skirtingai veikia slėgis. Pagrindinę baltymų struktūrą palaiko kovalentiniai ryšiai, o vandeniliniai ryšiai, elektrostatinė ir hidrofobinė sąveikos palaiko antrinę bei tretinę baltymo struktūras. Skirtingų ryšių jautrumas aukštam slėgiui eilės tvarka išsidėsto taip: hidrofobinė sąveika > elektrostatinė sąveika > vandeniliniai ryšiai > kovalentiniai ryšiai [54].

Pieno baltymai kazeinai yra atsparesni ekstremaliam aplinkoms poveikiui dėl jų micelinės struktūros, kurią palaiko vandeniliniai ryšiai, hidrofobinė sąveika ir koloidinio kalcio fosfato sąveika. Paveikiant kazeinus aukštu slėgiu hidrofobinė sąveika išyra kazeino micelės viduje ir vanduo įsiskverbia į micelių struktūrą, vyksta hidratacija [54].

Globulinis išrūgų baltymas  $\beta$ -LG yra jautrus slėgiui [54]. Goyal'as, et al. [55] apibendrina ankstesnius tyrimus atliktus siekiant įvertinti slėgio įtaką  $\beta$ -LG ir padarė išvadą, kad šio baltymo molekulė išsilanksto veikiamą 100–400 MPa slėgiu. Wu, et al. [56] teigia, kad poveikis aukštu slėgiu gali padidinti  $\beta$ -LG alergiškumą.

Pieno išrūginis baltymas ALA turi griežtesnę struktūrą lyginant su  $\beta$ -LG. Mokslininkų atlikti tyrimai parodė, kad tik apie 10% ALA baltymų piene denatūruoja veikiant 600 MPa slėgiu 30 min. Pakėlus slėgį iki 800 MPa denatūruoja didesnis kiekis – beveik 50 % [54].

Pieno baltymas BSA gali atlaikyti slėgį iki 600 MPa, dėl didelio skaičiaus disulfidinių jungčių ir aukšto lygio spiralės struktūros [54].

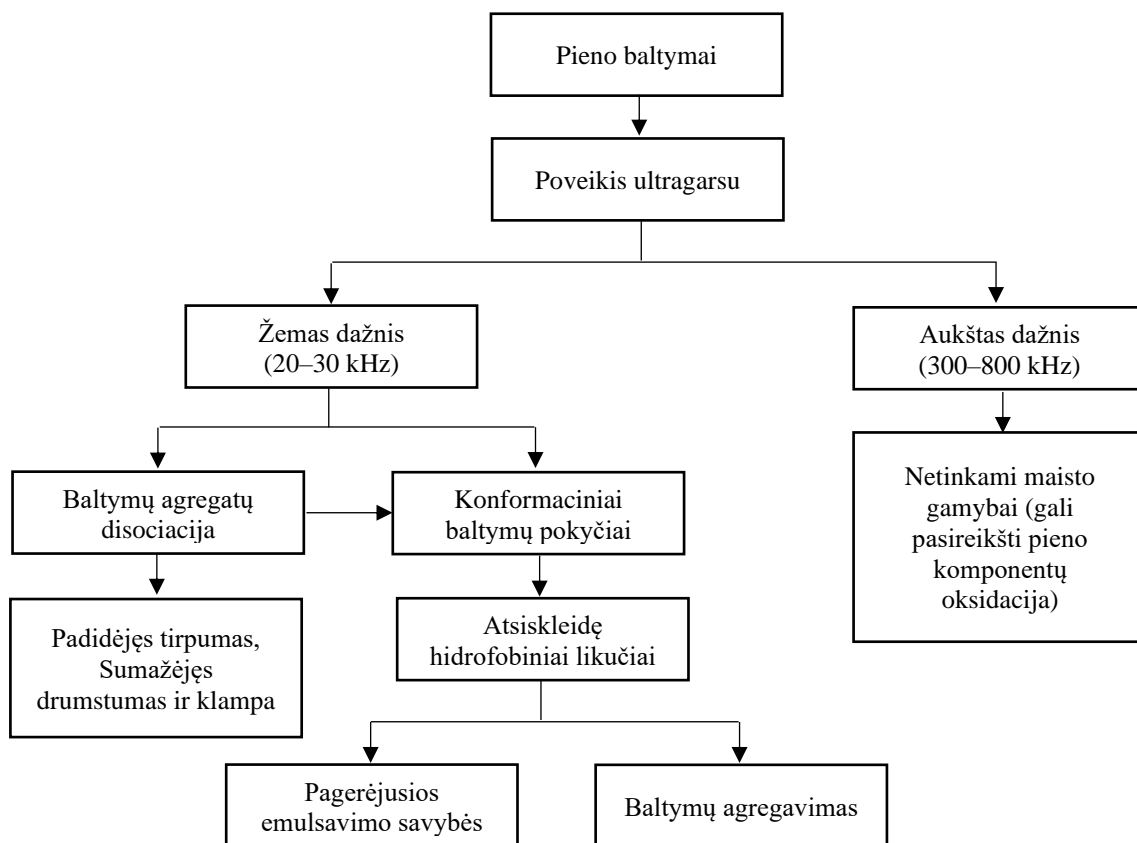
### **1.3.3. Cheminė hidrolizė**

Cheminė hidrolizė rūgštinėse ar šarminėse sąlygose yra retai naudojama pramonėje, bet jei taikoma tai kartu su terminiu apdorojimu ir poveikiu aukštu slėgiu. Kaip pavyzdys, tokiu būdu gauti kviečių baltymų hidrolizatai yra parduodami. Po hidrolizės gauti peptidai gali pasižymėti mažesniu alergeniniu aktyvumu nei pats baltymas [42].

Pieno baltymų alergiškumas gali būti sumažintas konjuguojant baltymus su sacharidais kontroliuojamoje Majero reakcijoje [52]. Pieno baltymų alergiškumo sumažinimas pritaikant Majero reakciją priklauso nuo sacharidų kiekio, konjuguoto prie baltymų, ir nuo sacharidų molekulinio dydžio. Hattori, et al. [57] nustatė, kad  $\beta$ -LG – KMD (karboksilmetildekstranas) dariniai su didesniu sacharido kiekiu pasižymi nedideliu alergeniniu aktyvumu (vertinimui naudotas komercinis ELISA rinkinys ir pelių antiserumas).

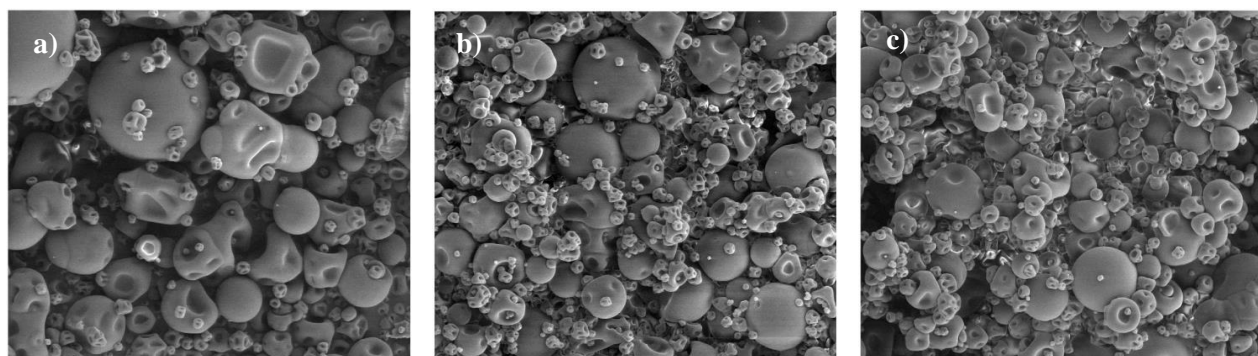
### 1.3.4. Ultragarsas

Ultragarsinių bangų poveikis baltymams yra labai sudėtingas procesas [58]. Ultragarsas ne tik suardo baltymus, bet gali papildomai paveikti baltymus, kaip: a) jau denatūruotų baltymų agregatų dezintegracija suspensijoje dėl šlyties jėgų, kurios susidaro dėl didelės galios žemo dažnio ultragarso, ir (b) cheminis baltymų skaidymas dėl radikalų, kurie susidaro mažos galios aukšto dažnio ultragarso metu [54]. Apibendrintas ultragarso poveikio įtakos pieno baltymams vaizdas yra pateiktas 1.14 paveiksle.



1.14 pav. Aukšto ir žemo dažnio ultragarso poveikio įtaka pieno baltymams [54]

Ultragarso pritaikymas pieno sistemoje yra pakankamai naujas procesas. Liu, et al. [59] nustatė, kad paveikus pieną 20 kHz ultragarsu 15 min aukštos vertės pH aplinkoje, o vėliau neutralizavus, gaunamos pažeistos kazeino micelės. Pieno baltymų, paveiktų ultragarsu, vaizdas gautas naudojant skenuojantį elektroninį mikroskopą (SEM) yra pateiktas 1.15 paveiksle.



1.15 pav. SEM pieno baltymų koncentrato paveikto 20 kHz ultragarsu a) 0 min, b) 0,5 min ir c) 5 min nuotraukos [60]

### 1.3.5. Kombinuoti būdai

Paprastai praktikoje yra naudojamos įvairių būdų kombinacijos siekiant gauti geriausią rezultatą modifikuojant baltymus. Poveikis aukštu slėgiu dažniausiai yra naudojamas siekiant palengvinti hidrolizės procesą. Kaip pavyzdys,  $\beta$ -LG galima efektyviai hidrolizuoti įvairiais fermentais, esant aukštam slėgiui. Gauti hidrolizatai gali turėti mažesnę alerginį aktyvumą ir IgE surišimą. Tokia pieno baltymų hidrolizė yra veiksminga hipoalerginių išrūgų hidrolizatų gamybos strategija [52].

Deaminimas yra pramoninis būdas keisti baltymų struktūrą, siekiant padidinti tirpumą cheminei hidrolizei. Kaip pavyzdys, gliutininiai baltymai yra deaminami, kad būtų padidintas jų tirpumas. Tuomet atlikus cheminę hidrolizę gaunami peptidai, kurie galimai turi mažesnę alerginį aktyvumą [61].

Paveikus baltymus ultragarsu, baltymų hidrolizės jautrumas gali padidėti arba mažėti, priklausomai nuo pirminio apdorojimo sąlygų ir intensyvumo, taip pat nuo naudojamos proteazės ar baltymo pobūdžio [58]. Stefanović'ius, et al. [62] mano, kad didelio intensyvumo ultragarso naudojimas gali keisti baltymų konformaciją, paveikdamas vandenilinius ryšius ir hidrofobines sąveikas dėl kavitacijos reiškinio, todėl padidėja hidrolizės laipsnis ir funkcionalumas.

### 1.4. Baltymų modifikavimo biotechnologiniai būdai

Siekiant sumažinti įvairių baltymų alerginį aktyvumą, vis dažniau naudojami biotechnologiniai procesai. Vienas populiariausių pramonėje pritaikomų biotechnologinių sprendinių yra membraninės technologijos, kurios populiaros dėl savo nesudėtingo veikimo principo ir plačių pritaikymo galimybių. Kitas populiarus biotechnologinis procesas yra fermentinės hidrolizės taikymas, kurio metu baltymai yra veikiami proteazėmis siekiant paveikti baltymo struktūrą, t.y., jį suskaldant į mažesnius fragmentus.

#### 1.4.1. Fermentinė hidrolizė

Fermentinė hidrolizė yra labiausiai paplitęs procesas, naudojamas pramoniniu būdu, siekiant sumažinti baltymų alergiškumą. Fermentinės hidrolizės metu baltymai gali būti suskaldyti į mažas peptidų molekules ir aminorūgštis [42].

Wróblewska, et al. [53] savo tyrime atliko dviejų pakopų fermentinę hidrolizę naudodama alkalazę ir papainą. Mokslininkai nustatė, kad šis hidrolizės procesas buvo veiksmingiausias mažinant pieno išrūgų baltymų alerginį aktyvumą, nors ir liko alerginių epitopų.

Fermentinės hidrolizės derinimas su terminiu apdorojimu padidina pagrindinio pieno baltymo (ALA ir  $\beta$  triptinę ir peptinę hidrolizę ir taip gali sumažinti pieno alergiškumą. O apdorojimas mikrobangomis esant 200 W pagreitina  $\beta$ -LG hidrolizę naudojant pepsiną ir žymiai sumažina baltymo alerginį aktyvumą [52].

Ne visi po hidrolizės gauti peptidai pasižymi mažesniu antigeniškumu. Kai kurie iš dalies hidrolizuojami peptidai išlieka alergiški, nes juose yra likę alerginiai epitopai arba jie gali sudaryti alerginius junginius [63].

Li, et al. [49] pateikė fermentinės hidrolizės pavyzdį su *Aspergillus oryzae* bakterijomis. Jos produkuoja polisacharidų hidrolazes tokias kaip gliukoamilazė,  $\alpha$ -amilazė,  $\alpha$ -gliukozidazė ir proteazes. Gautų proteazių gamyba hidrolizuoja maisto baltymus ir keičia jų IgE jungimosi gebą.

Proteolitiniai fermentai gali išsiskirti vykdant fermentaciją su pieno rūgšties bakterijomis (PRB) [64]. Pieno baltymų hidrolizė naudojant *Lactobacillus* bakterijas fermentacijos metu gali turėti didelį poveikį pieno virškinamumui ir bioaktyvių peptidų gamybai. Mokslininkų atlikti tyrimai parodė, kad *Lactobacillus* fermentacija gali paskatinti pieno alerginių baltymų skaidymą. Nustatyta, kad PRB fermentacija gali susilpninti  $\beta$ -LG antigeniškumą nugriebtame piene ir saldžiose išrūgose [52], o kombinuotos *Lactobacillus helveticus* ir *Streptococcus thermophilus* padermės yra veiksmingos mažinant alerginį aktyvumą pieno baltymų ALA (slopinimas 87%) ir  $\beta$ -LG (slopinimas 95 %) [65].

#### 1.4.2. Ultrafiltracija

Ultrafiltracija daugiausiai naudojama peptidų frakcionavimui, taip pat baltymų ir kitų makromolekulių pašalinimui pagal jų molekulinį dydį [66]. Svarbu žinoti, kad baltymų frakcionavimas naudojant ultrafiltraciją labai priklauso nuo proceso metu esamų fizikinių ir cheminių sąlygų, todėl procesas turi būti labai tiksliai sureguliuotas, kad būtų galima veiksmingai atskirti baltymus [67].

Pieno pramonėje ultrafiltracijos procesas yra taikomas pieno baltymų koncentravimui. Šio proceso tikslas yra padidinti sausųjų medžiagų kiekį nuo maždaug 37 % iki 80 % (ar daugiau) pašalinant vandenį ir kitus mažamolekulinius junginius. Pieno baltymų koncentratams gaminti pramonėje dažniausiai naudojamos 10–30 kDa porų dydžio membranos [68].

Holland'as, et al. [69] nustatė, kad pieno baltymas ALA geba prasiskverbti pro 100 kDa nemodifikuotą membraną, o kiti baltymai yra sulaikomi. Šio tyrimo tikslas buvo ištirti srauto padidėjimą pieno baltymų koncentratų gamyboje naudojant plačių porų dydžio, neigiamai įkrautas, tangentiško srauto ultrafiltravimo membranas

#### 1.5. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Literatūros apžvalgos skyriuje supažindinta su pieno baltymais ir pateikta detali informacija apie kiekvieną pieno baltymą, pasižyminti alerginiu aktyvumu:  $\alpha$ -laktoalbuminą (Bos d 4),  $\beta$ -laktoglobuliną (Bos d 5), serumo albuminą (Bos d 6),  $\alpha_{S1}$ -kazeiną (Bos d 8-9),  $\alpha_{S2}$ -kazeiną (Bos d 10),  $\beta$ -kazeiną (Bos d 11) ir  $\kappa$ -kazeiną (Bos d 12). Skyriuje paaiškinta, kas yra baltymų alerginis aktyvumas ir plačiau išanalizuota alergija pienui bei pieno produktams.

Apžvelgus pieno baltymų alerginio aktyvumo potencialą ir įvertinus pieno bei jo produktų alergijos mastą pasaulyje, išnagrinėti pieno baltymų modifikavimo būdai pateikti mokslinėje literatūroje, tokie kaip terminis apdorojimas, poveikis aukštu slėgiu, cheminė hidrolizė, ultragarsas bei šių būdų kombinacijos.

Literatūros apžvalgos skyrių užbaigia išanalizuotos baltymų modifikavimo biotechnologiniais būdais galimybės taikant fermentinės hidrolizės ir ultrafiltracijos metodus.

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Šiame skyriuje bus pateiktos baigiamojo magistro darbo eksperimentams naudotos medžiagos, detalizuoti tyrimo objektai ir aprašytos tyrimams naudotos metodikos.

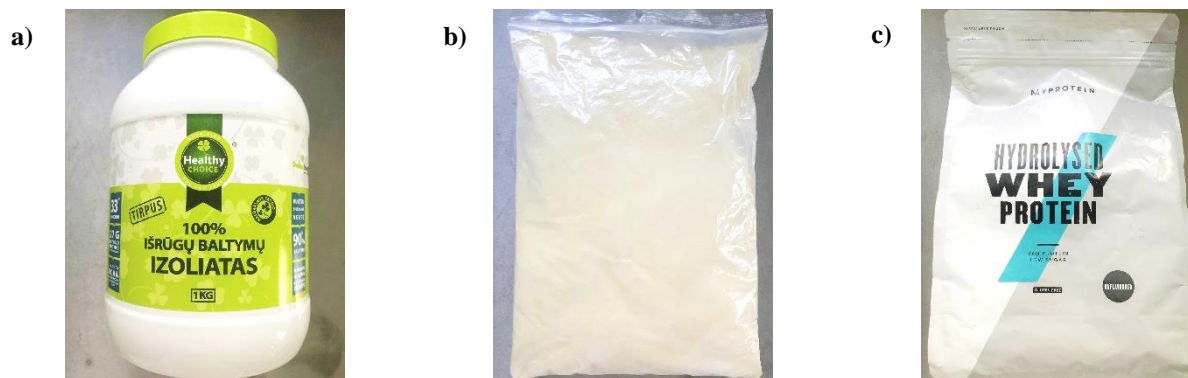
### 2.1. Medžiagos

Baigiamojo projekto tyrimams naudoti įvairių koncentracijų tirpalai pagaminti iš medžiagų, kurios yra pateiktos 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Eksperimentams naudotų medžiagų duomenys

Medžiaga	Grynumas	Gamintojas	Šalis
Pienas 3,2 % riebumo	100 %	AB „Pieno žvaigždės“	Lietuva
IBI	90 %	UAB „Sveika Energija“	Lietuva
MKB	85 %	AB „Pienas LT“	Lietuva
HIB	80 %	Myprotein	Jungtinė Karalystė
NaOH	99 %	Reachem s.r.o.	Slovakija
HCl	37 %	Sigma-Aldrich	Vokietija
Distiliuotas vanduo	100 %	–	–
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	99 %	Reachem s.r.o.	Slovakija
Trichloracto rūgštis	99 %	Sigma-Aldrich	Vokietija
Folin-Ciocalteu reagentas	–	Sigma-Aldrich	Vokietija
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	99 %	Sigma-Aldrich	Vokietija

Fermentinei hidrolizei ir ultrafiltracijai naudoti komerciniai IBI, MKB ir HIB milteliai, kurių vaizdas yra pateiktas 2.1 paveiksle.



2.1 pav. Komercinių pieno baltymų pakuotės: a) IBI; b) MKB ir c) HIB

Fermentinei hidrolizei atlikti naudotos bakterinės *Bacillus* rūšies ir gyvūninės kilmės proteazės. Naudotų fermentų charakteristikos yra pateiktos 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Ekperimentui naudotų fermentų duomenys

Pavadinimas	Fermento numeris	Aktyvumas	Šaltinis	Gamintojas
Everlazė	232-752-2	≥16 U/g	<i>Bacillus</i> rūšies bakterijos	Novozyme Corp.
Esperazė	232-752-2	≥8 U/g	<i>Bacillus</i> rūšies bakterijos	Novozyme Corp.
Savinazė	232-752-2	≥16 U/g	<i>Bacillus</i> rūšies bakterijos	Novozyme Corp.
Tripsinas	3.4.21.4	6048 U/g	Galvijų kasa	Sigma-Aldrich

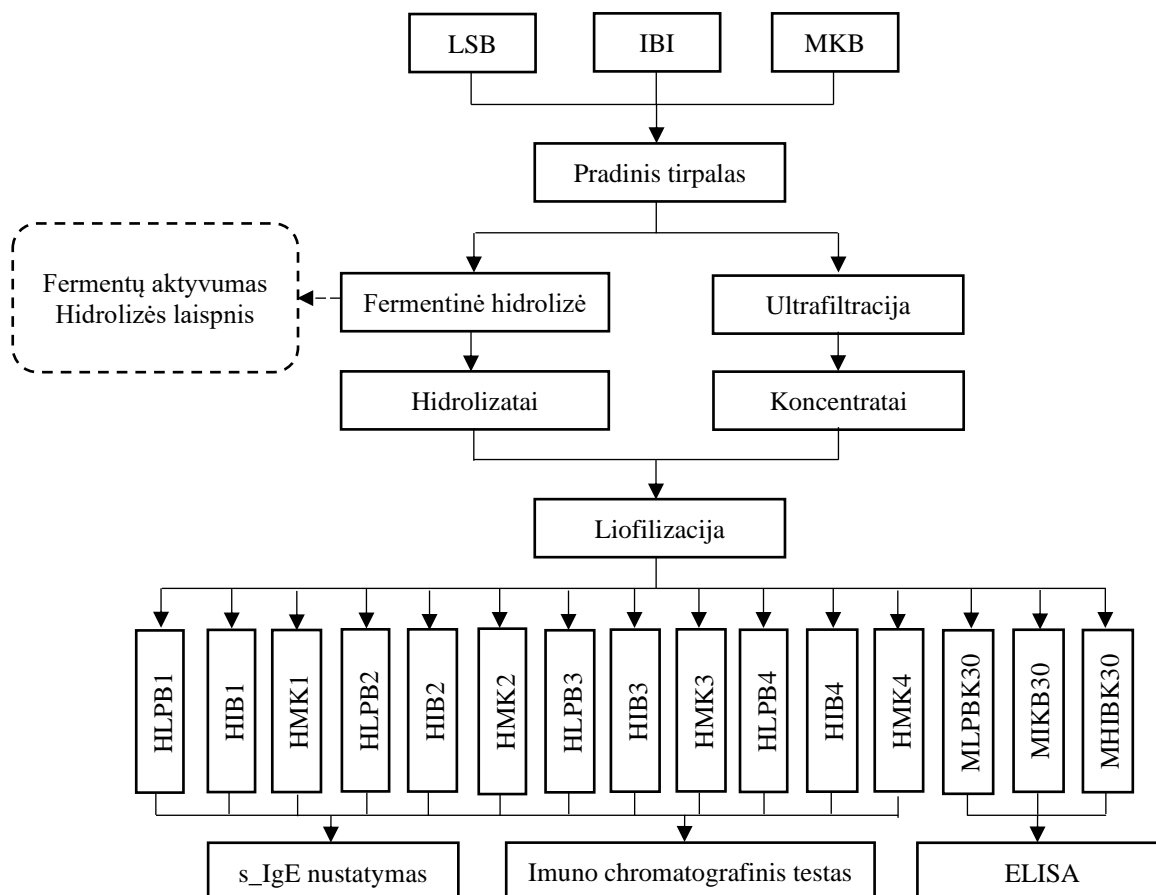


## 2.2. Tyrimo objektai

Tyrimų objektai yra nemodifikuoti ir modifikuoti pieno baltymų milteliai:

- 1) Lieso pieno baltymų milteliai (LSB)
- 2) Išrūgų baltymų izoliato milteliai (IBI)
- 3) Micelinio kazeino baltymų milteliai (MKB)
- 4) Modifikuoti lieso pieno baltymų (30 kDa) koncentrato milteliai (MLPBK30)
- 5) Modifikuoti išrūgų baltymų (30 kDa) koncentrato milteliai (MIBK30)
- 6) Modifikuoti hidrolizuoti išrūgų baltymų (30 kDa) koncentrato milteliai (MHIBK30)
- 7) Hidrolizuoti (I fermentas) lieso pieno baltymų milteliai (HLPB1)
- 8) Hidrolizuoti (I fermentas) išrūgų baltymų milteliai (HIB1)
- 9) Hidrolizuoti (I fermentas) micelinio kazeino milteliai (HMK1)
- 10) Hidrolizuoti (II fermentas) lieso pieno baltymų milteliai (HLPB2)
- 11) Hidrolizuoti (II fermentas) išrūgų baltymų milteliai (HIB2)
- 12) Hidrolizuoti (II fermentas) micelinio kazeino milteliai (HMK2)
- 13) Hidrolizuoti (III fermentas) lieso pieno baltymų milteliai (HLPB3)
- 14) Hidrolizuoti (III fermentas) išrūgų baltymų milteliai (HIB3)
- 15) Hidrolizuoti (III fermentas) micelinio kazeino milteliai (HMK3)
- 16) Hidrolizuoti (IV fermentas) lieso pieno baltymų milteliai (HLPB4)
- 17) Hidrolizuoti (IV fermentas) išrūgų baltymų milteliai (HIB4)
- 18) Hidrolizuoti (IV fermentas) micelinio kazeino milteliai (HMK4)

Apibendrinta eksperimentinių tyrimų schema yra pateikta 2.2 paveiksle.



2.2 pav. Eksperimentinių tyrimų schema

## 2.3. Tyrimų metodai

Šiame skyrelyje aprašomi tyrimams naudoti metodai.

### 2.3.1. Pradinių tirpalų paruošimas

#### Ultrafiltracija

Ultrafiltracijai naudotas liesas pienas kaip pateikta Gavazzi-April, et al. [70] eksperimente. Lieso pieno baltymai buvo gautas iš 3,2 % riebumo AB „Pieno žvaigždžių“ pieno. Riebus pienas buvo pašildytas iki optimalios seperavimo temperatūros, kuri yra 35–45 °C ir seperuotas naudojant seperatorių *Milky FJ 130 ERR* (Janschitz GMBH, Austrija). Po seperavimo gautas liesas pienas ir grietinėlė. Dalis lieso pieno buvo užšaldyta –20 °C temperatūroje ir liofilizuota alerginiams tyrimams.

Išrūgų baltymų izoliato 6,5 % ir hidrolizuotų išrūgų baltymų 6,5 % tirpalai buvo paruošti ištirpinant IBI ir HIB distiliuotame vandenyje. Gauti tirpalai buvo filtruojami pro filtrinį popierių siekiant pašalinti neištirpusias daleles ir toliau naudoti ultrafiltracijai.

#### Hidrolizė

Liesas pienas skirtas hidrolizei buvo naudojamas toks pats kaip ir ultrafiltracijai. Išrūgų baltymų izoliato ir micelinio kazeino tirpalai skirti hidrolizei buvo paruošti pagal Kristoffersen'o, et al. [71] pateiktą metodiką. IBI ir MKB milteliai buvo ištirpinti distiliuotame vandenyje sudarant 3 % tirpalus.

### 2.3.2. Fermentų aktyvumo nustatymas

Fermentų išskirtų iš *Bacillus* rūšies bakterijų aktyvumas nustatytas pagal Tsuchida, et al. [72] pateiktą metodiką su keleta modifikacijų. Kaip substratas naudotas 0,65 % kazeino tirpalas. Kiekvienam fermentui naudota po du mėgintuvėlius su substratu: tuščias ir tiriamasis mėginiai. Pirmiausia mėgintuvėliai su substratu pašildyti iki 50 °C termostatuojamoje vandens vonelėje *Ultratherm BWT-U* (SIA Biosan, Ryga, Latvija), kadangi tai yra optimali fermentų esperazės, everlazės ir savinzės veikimo temperatūra. Substratui pasiekus 50 °C temperatūrą į pirmąjį mėgintuvėlį įpilta tiriamojo fermento ir mėgintuvėliai vėl termostatuoti toje pačioje temperatūroje 10 min. Fermentinė reakcija sustabdyta įpylus 0,11 M trichloracto rūgšties į visus mėgintuvėlius. Po to, tik į antrąjį mėgintuvėlį įpilta fermento tirpalo ir visi mėgintuvėliai inkubuoti 50 °C temperatūroje 30 min. Po inkubacijos visi mėgintuvėliai centrifuguoti 5 min 5000 aps./min. Į gautus filtratus įpilta 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tirpalo ir 1,1 mM Folin-Ciocalteu reagento tirpalo. Mėgintuvėliai inkubuoti 50 °C temperatūroje 30 min. Po to mėginiai pakartotinai centrifuguoti 5 min 5000 aps./min. Išmatuota gautų bandinių 660 nm bangos ilgio šviesos spindulio sugertis naudojant *Shimadzu UV – 1280* (Shimadzu Corporation, Japonija) spektrofotometrą.

Fermentų aktyvumui apskaičiuoti sudaryta L-tirozino standartinė kreivė su tokiomis tirozino koncentracijomis: 0,055; 0,111; 0,221; 0,442 ir 0,553 μmol. Fermentų aktyvumas apskaičiuotas pagal pateiktą formulę:

$$AV/ml = \frac{TEV \cdot V_B}{V_F \cdot t \cdot V_K} \quad (2.1)$$

čia: *TEV* – L-tirozino ekvivalento vertė, μmol; *V<sub>B</sub>* – bendras reakcijos tūris, ml; *V<sub>F</sub>* – fermento tūris, ml; *t* – fermentinės reakcijos trukmė, min; *V<sub>K</sub>* – kolimetriniame nustatyme naudotas tūris, ml.

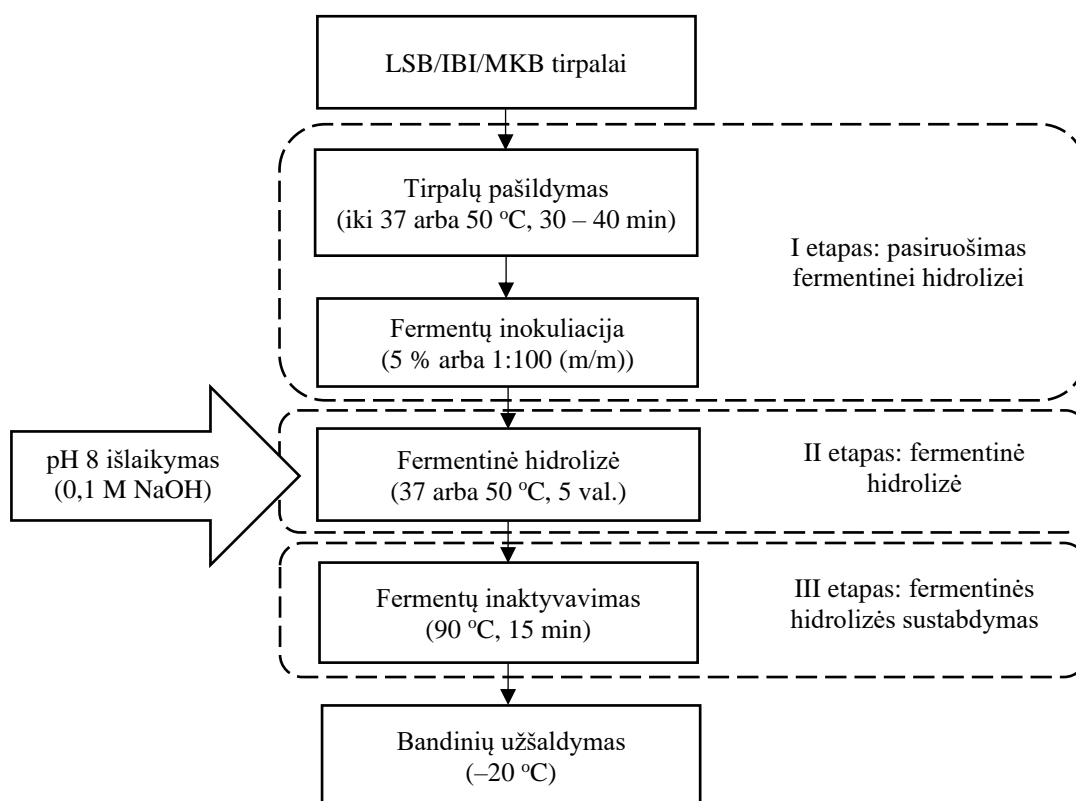
### 2.3.3. Fermentinė hidrolizė

Fermentinė hidrolizė buvo atlikta 250 ml talpos kūginėse kolbose, o pradiniai IBI, MKB ir LSB tirpalai po 100 ml paruošti pagal 2.3.1. skyrelyje aprašytą metodiką. Gautų tirpalų pH vertės sureguliuotos iki 8 naudojant 0,1 M NaOH tirpalą. Prieš inokuliuojant fermentus tirpalai pašildyti termostate *Binder* (Tuttlingenas, Vokietija) iki optimalios fermentų veikimo temeperatūros, kurios yra pateiktos 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. Fermentinės hidrolizės sąlygos pagal fermentus

Fermento pavadinimas	Žymėjimo kodas	Veikimas	pH	Temperatūra, °C
Everlazė	I	Baltymų skaidymas į aminorūgštis	8	50
Esperazė	II		8	50
Savinazė	III		8	50
Tripsinas	IV		8	37

IBI, MKB ir LSB fermentinė hidrolizė naudojant I, II ir III fermentus vykdyta pagal Kristoffersen'o, et al. [71] ir Shu, et al. [73] pateiktas metodikas su modifikacijomis. Pašildyti tirpalai inokuliuoti 5 % fermento substrato kiekiui ir termostatuoti 50 °C temperatūroje termostate *Binder* (Tuttlingenas, Vokietija) 5 val. Fermentinės hidrolizės metu matuota tirpalų pH vertės ir prireikus papildomai įlašinta 0,1 M NaOH tirpalo siekiant išlaikyti vienodas reakcijos sąlygas. Baigus fermentinę hidrolizę fermentai termiškai inaktyvuoti bandinius kaitinant 90 °C temperatūroje 15 min termostate *Binder* (Tuttlingenas, Vokietija). Inaktyvuoti bandiniai atvėsinti iki kambario temperatūros ir pH vertės sureguliuotos iki 7 naudojant 0,1 M HCl tirpalą. Bandiniai užšaldyti šaldymo kameroje iki –20 °C temperatūros ir liofilizuoti. Apibendrinta fermentinės hidrolizės schema yra pateikta 2.3 paveiksle.



2.3 pav. Apibendrinta fermentinės hidrolizės schema

IBI, MKB ir LSB fermentinė hidrolizė naudojant IV fermentą vykdyta pagal Deng'o, Gruppen'o and Wierenga [74] pateiktą metodiką su modifikacijomis. Paruoštas vandeninis 10 mg/ml IV fermento tirpalas, kuris inokuliuotas į pašildytus tirpalus fermento substrato santykiu 1:100 (m/m). Fermentinė hidrolizė vykdyta 37 °C temperatūroje termostate *Binder* (Tuttlingenas, Vokietija) 5 val. Reakcijos mišinių pH vertės išlaikytos naudojant 0,1 M NaOH ir 0,1 M HCl tirpalus. Fermentinė hidrolizė sustabdyta termiškai 90 °C temperatūroje 15 min termostate *Binder* (Tuttlingenas, Vokietija). Gauti bandiniai atvėsinti iki kambario temperatūros, užšaldyti –20 °C temperatūroje ir liofilizuoti.

### 2.3.4. Fermentinės hidrolizės laipsnio nustatymas

Fermentinės hidrolizės laipsnis (HL) nustatytas naudojant pH-stat metodą pateiktą Eberhardt'o, et al. [75] moksliniame darbe. Vykdamas fermentines hidrolizes palaikytos pastovios reakcijos tirpalų pH vertės naudojant 0,1 M NaOH tirpalą. Reakcijos mišinių pH reguliuotos po 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 ir 300 min. Kiekvienu atveju sunaudotas 0,1 M NaOH tirpalo kiekis buvo fiksuotas ir pritaikytas hidrolizės laipsnio skaičiavimams pagal pateiktą formulę:

$$HL, \% = \frac{B \cdot Mb}{\alpha \cdot M_p \cdot h_{tot}} \cdot 100 \%, \quad (2.2)$$

čia:  $B$  – sunaudoto 0,1 M NaOH kiekis, ml;  $Mb$  – NaOH tirpalo koncentracija, mol;  $\alpha$  – vidutinis  $\alpha$ -amino grupių disociacijos laipsnis (kazeino – 0,442; išrūgų – 0,44);  $M_p$  – baltymo masė, g;  $h_{tot}$  – bendras peptidinių jungčių skaičius substrate (liesas pienas – 8,29 mmol/g, išrūgos – 8,8 mmol/g, kazeinas – 8,2 mmol/g).

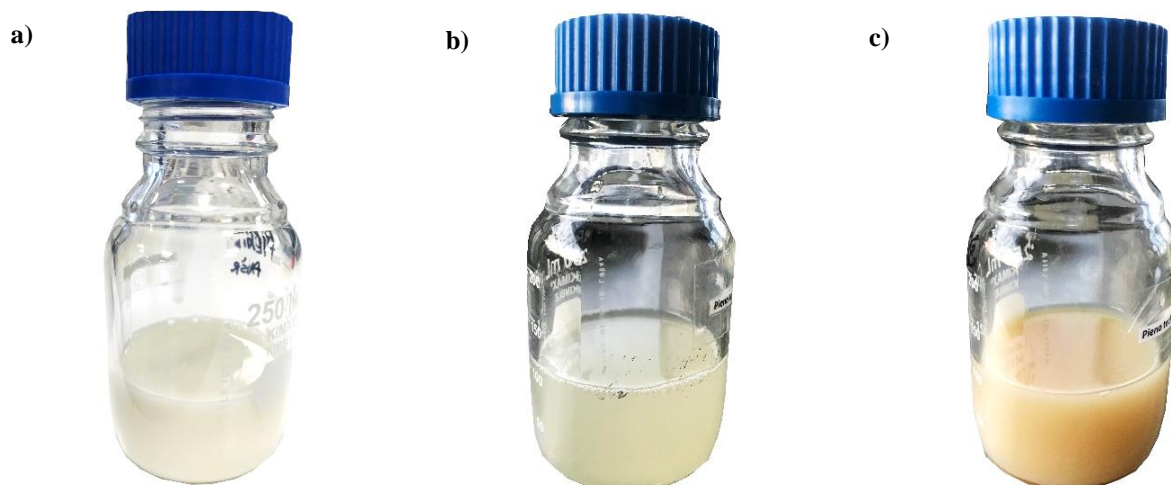
### 2.3.5. Ultrafiltracija

Ultrafiltracijos procesas įvykdytas pagal Gavazzi-April, et al. [70] aprašytą eksperimentą ir pagal įrangos gamintojo pateiktas rekomendacijas. Procesui atlikti naudoti firmos Millipore Amicon® Ultra - 15 mėgintuvėliai su 30 kDa membranomis ir jų vaizdas yra pateiktas 2.4 paveiksle.



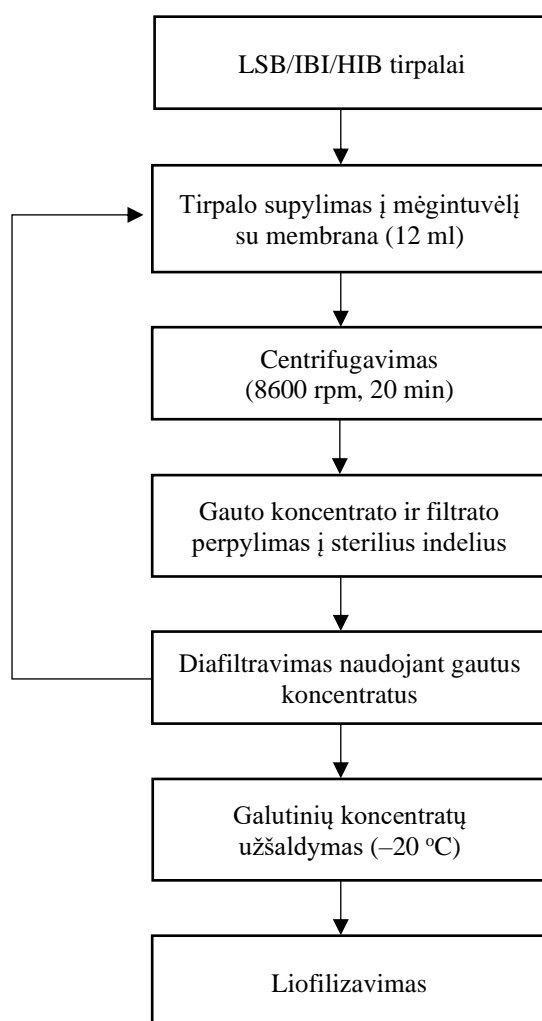
2.4 pav. Amicon® Ultra – 15 mėgintuvėliai

Pradiniai LSB, IBI ir HIB tirpalai po 100 ml paruošti pagal 2.3.1. skyrelyje aprašytą metodiką, o jų vaizdas yra pateiktas 2.5 paveiksle.



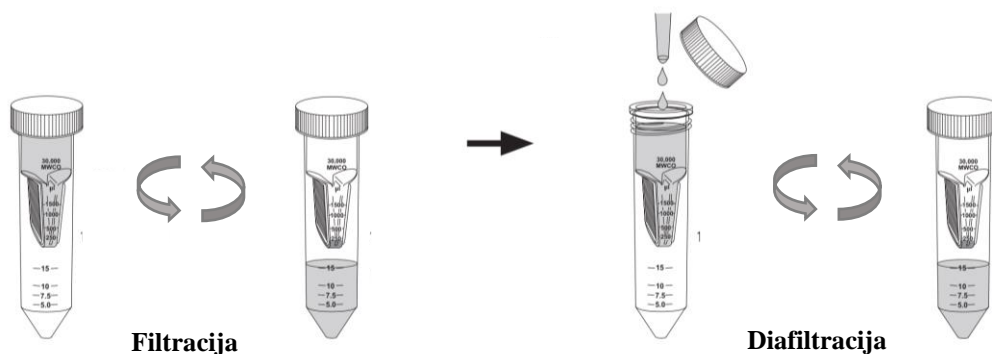
**2.5 pav.** Pradinių tirpalų vaizdas: a) LSB; b) IBI; c) HIB

Pradiniai tirpalai įpilti į Amicon® Ultra – 15 mėgintuvėlius su 30 kDa membranomis po 12 ml ir centrifuguoti 20 min 8600 rpm greičiu (centrifugavimo parametrai pasirinkti pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas) naudojant centrifugą „Universal 320 R“ (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingenas, Vokietija). Diafiltruota su gautų pradinių tirpalų koncentratais. Gauti galutiniai koncentratai užšaldyti šaldymo kameroje iki  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūros ir liofilizuoti. Atliktos ultrafiltracijos apibendrinta proceso schema yra pateikta 2.6 paveiksle.



**2.6 pav.** Apibendrinta ultrafiltracijos laboratorinėmis sąlygomis schema

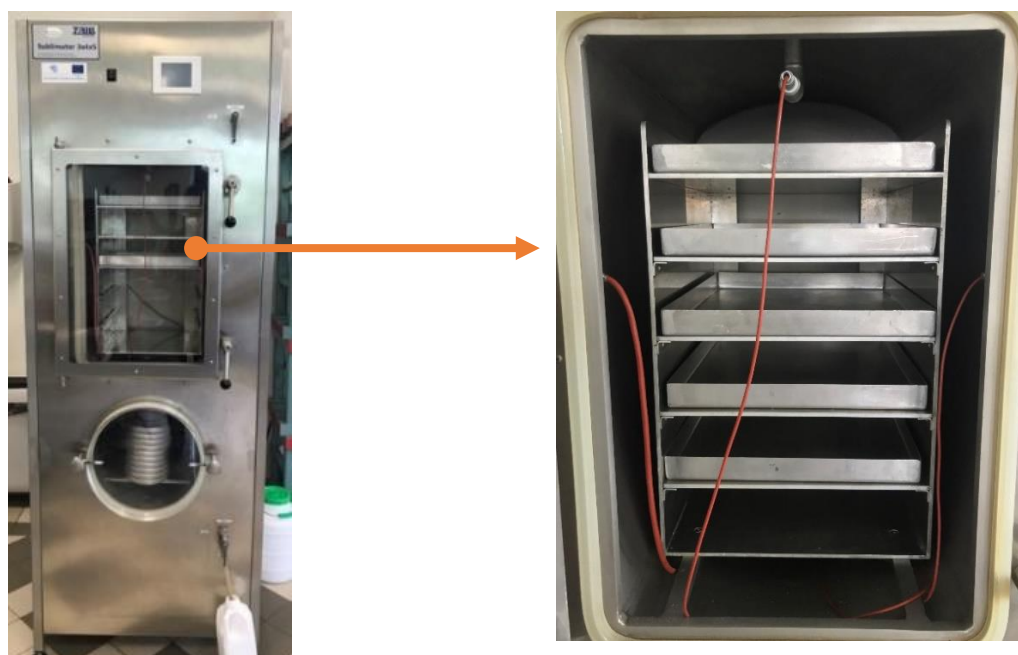
Ultrafiltracijos laboratorinėmis sąlygomis naudojant Amicon® Ultra – 15 mėgintuvėlius su 30 kDa membranomis schematinis vaizdas yra pateiktas 2.7 paveiksle.



2.7 pav. Amicon® Ultra – 15 mėgintuvėlių veikimo principinė schema

### 2.3.6. Liofilizacija

Liofilizacija / sublimacija atlikta siekiant gauti bandinius miltelių pavidalu. Po fermentinės hidrolizės ir ultrafiltracijos gauti bandiniai užšaldyti šaldymo kameroje iki  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūros ir liofilizuoti sublimatoriuje / liofilizatoriuje *Freeze Drying Plant Sublimator 3x4x5* (Zirbus Technology, Vokietija), kurio vaizdas yra pateiktas 2.8 paveiksle.



2.8 pav. Sublimatoriaus / liofilizatoriaus vaizdas

Sublimatoriaus / liofilizatoriaus *Freeze Drying Plant Sublimator 3x4x5* (Zirbus Technology, Vokietija) techninės džiovinimo kameros charakteristikos yra pateiktos 2.4 lentelėje.

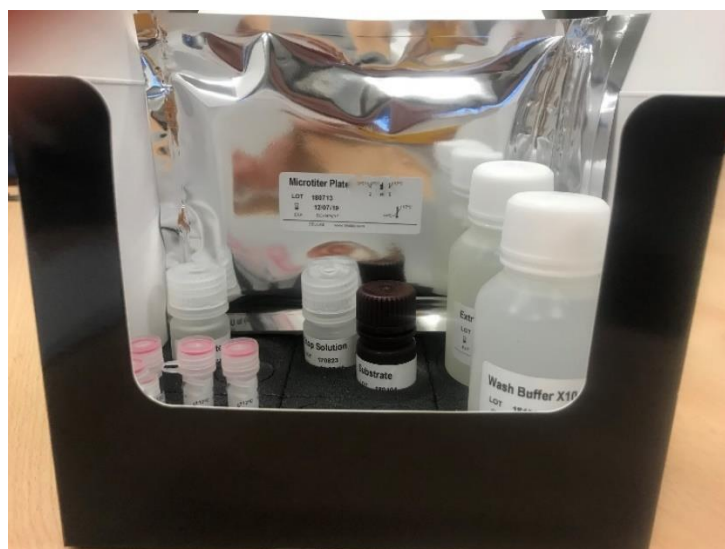
2.4 lentelė. Sublimatoriaus / liofilizatoriaus *Freeze Drying Plant Sublimator 3x4x5* džiovinimo kameros charakteristikos

Išmatavimai (A x H x B)	350 x 550 x 550 mm
Lentynos išmatavimai	300 x 400 mm
Lentynų temperatūra	$-40/ < -55\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$

### 2.3.7. ELISA metodas

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) – biocheminis metodas, dažniausiai naudojamas imunologijos srityje, siekiant nustatyti antikūnių ar antigeno buvimą mėginyje. Gali būti naudojama įvairių pramonės sektorių kokybės kontrolės procesuose.

Siekiant įvertinti po ultrafiltracijos laboratorinėmis sąlygomis naudojant 30 kDa membranas gautus permeatus ir retantus buvo naudotas ELISA rinkinys *Proteon Milk TR* (ZEULAB, Zaragoza, Ispanija), kuris yra paremtas  $\beta$ -laktoglobulino reakcija į tiriamuosius mėginius. Naudoto rinkinio bendras vaizdas yra pateiktas 2.9 paveiksle.



2.9 pav. ELISA testo *Proteon Milk TR* rinkinio vaizdas

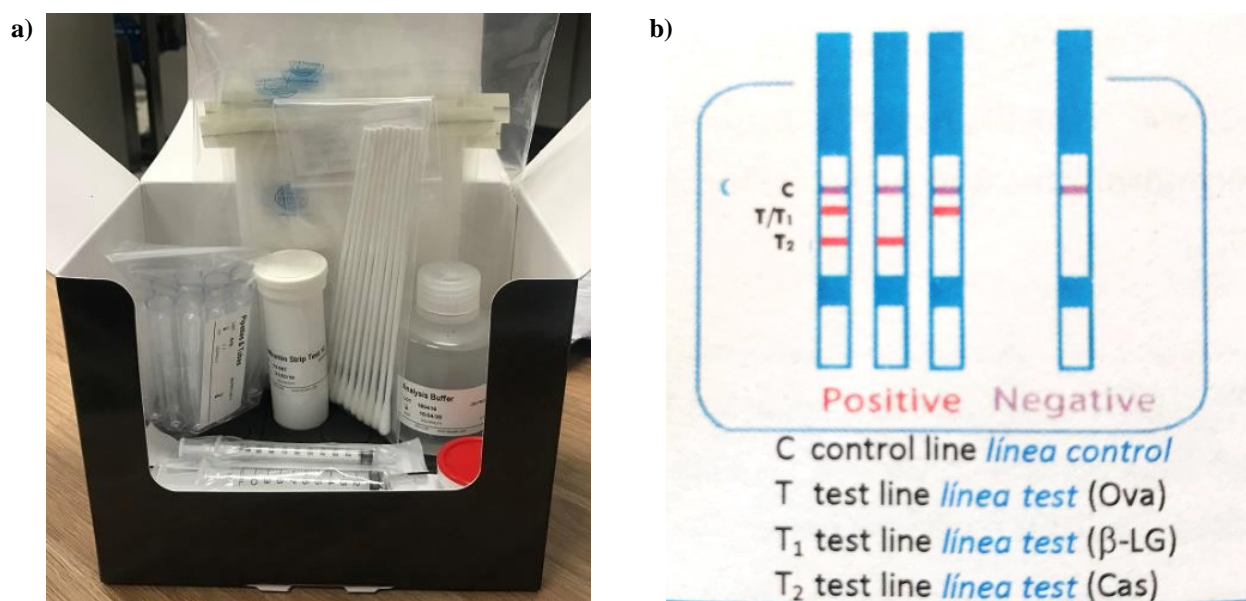
ELISA testas buvo atliktas tokia tvarka:

- 1) Pasiruoštas tiriamasis mėginys: 2 g bandinio ištirpinta 20 ml ekstrakcijos buferio. Tuomet mėginiai inkubuoti 15 min  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  temperatūroje termostate *Binder* (Tuttlingenas, Vokietija). Po inkubacijos mėginiai filtruoti.
- 2) Po 0,1 ml pasiruošto mėginio ar standarto įpilta į šulinėlius. Švelniai pamaišyta ir inkubuota kambario temperatūroje ( $20\text{--}24^\circ\text{C}$ ) 30 min termostate *Binder* (Tuttlingenas, Vokietija).
- 3) Šulinėliai ištuštinti juos apverčiant. Tušti šulinėliai praplauti į kiekvieną šulinėlį įpilant po 0,3 ml plovimo buferio. Tai kartota tris kartus. Po to šulinėliai apverstai ant filtrinio popieriaus, kad pašalinti perteklinę drėgmę.
- 4) Po 0,1 ml conjugate antikūno įpilta į išplautus ir išsausintus šulinėlius. Švelniai pamaišyta ir inkubuota kambario temperatūroje ( $20\text{--}24^\circ\text{C}$ ) 30 min termostate *Binder* (Tuttlingenas, Vokietija).
- 5) Šulinėliai praplauti kartojant 3 žingsnį.
- 6) Po 0,1 ml substrato įpilt į išplautus ir išsausintus šulinėlius. Švelniai pamaišyta ir inkubuota kambario temperatūroje ( $20\text{--}24^\circ\text{C}$ ) 30 min termostate *Binder* (Tuttlingenas, Vokietija). Šio žingsnio metu šulinėliai nusidažė mėlyna spalva.
- 7) Įpilta po 0,05 ml stop tirpalo į kiekvieną šulinėlį ir švelniai pamaišyta.
- 8) Matuota mėginių sugertis 450 nm bangos ilgyje naudojant mikrolėkštelių skaitytuvą spektrofotometrą *FLUOstar Omega BMG* (Labtech, Vokietija).

### 2.3.8. Imuno chromatografinis testas alergenų nustatymui

Imuno chromatografinis testas *Proteon Duo Milk Express* (ZEULAB, Zaragoza, Ispanija) yra greitasis alergenų tyrimų rinkinys skirtas nustatyti alergenų, šiuo atveju pieno, maiste ir ant darbinių paviršių. Rinkinys pagrįstas kokybiniu (teigiamu / neigiamu) rezultatu per kelias minutes (2.10 pav., b).

Dėl paprastumo ir greitumo toks rinkinys yra tinkama priemonė alergenų valdymo ir gerosios gamybos praktikos patikrinimui, kryžminio užterštumo kontrolei ar pramoninėms gamybos linijoms. Rinkinį sudaro tepinėlių pakuotė, sterilūs homogenizavimo maišeliai, sterlios pipetės su mėgintuvėliais, 10 ml sterilus švirkštas, 1 ml sterilus švirkštas, testinių juostelių pakuotė ir buferis skirtas analizei. Viso rinkinio vaizdas yra pateiktas 2.10 paveiksle, a.



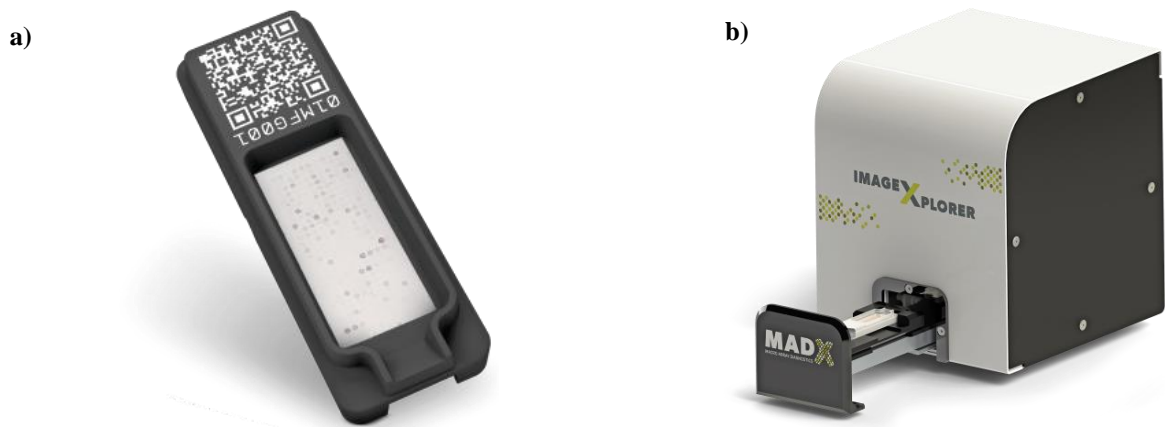
**2.10 pav.** Imuno chromatografinio testo *Proteon Duo Milk Express* rinkinio vaizdas (a) ir testo rezultatų interpretavimo pavyzdys (b)

Pasverta 1 g tiriamųjų miltelių ir suberta į sterilų homogenizavimo maišelį. Įpilta 10 ml analizei skirtu buferio su 10 ml steriliu švirkštu ir mišinys homogenizuotas apie 1–2 min. Naudojant sterilią pipetę į mėgintuvėlį sulašinti 6 lašai homogenizuoto mišinio. Testinė juostelė pamerkta į mėgintuvėlį su bandiniu ir palikta ramiai 10 min kambario temperatūroje (15–25 °C). Gauti rezultatai interpretuoti pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas. Apibendrinta imuno chromatografinio testo atlikimo schema yra pateikta 2.11 paveiksle.

### 2.3.9. Specifinių IgE nustatymas kraujo serume

Specifinių IgE nustatymas kraujo serume yra paremtas *in vitro* analize, kurios metu nustatoma, kaip stipriai reaguoja alergiško pienui žmogaus kraujo serumas su modifikuotais pieno milteliais. Pilnam tyrimo atlikimui taip pat naudojama klinikinė ALEX diagnostinė sistema (MACRO ARRAY DIAGNOSTICS, Austrija), kurios vaizdas yra pateiktas 2.11 paveiksle. Ši sistema leidžia tiksliai nustatyti, kokie baltymai ir kaip stipriai reaguoja su kraujo serumu.





**2.11 pav.** ALEX diagnostinės sistemos plokštelė (a) ir plokštelės skaitytuvas (b) [93]

Pirmiausia, modifikuoti pieno milteliai ištirpinti fosfatiniame buferyje ir gautas tirpalas sumaišytas su standartizuotu pienu alergiško paciento kraujo serumu. Gauta galutinė modifikuotų baltymo miltelių koncentracija kraujo serume parinkta  $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pasiekus tinkamą koncentraciją inkubuota 1 val. Po inkubacijos atliktas pienui ir jo molekuliniais alergenams specifinių IgE (s\_IgE) nustatymas naudojant klinikinę ALEX diagnostinę sistemą.

### **2.3.10. Statistinis duomenų apdorojimas**

Statistinis duomenų apdorojimas, diagramų sudarymas, fermentų aktyvumo ir hidrolizės laipsnio skaičiavimai atlikti naudojant MS „Excel“ programinę įrangą. Rezultatų patikimumui užtikrinti eksperimentiniai tyrimai kartoti 3 kartus.

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Šiame skyriuje pateikiami atliktų baigiamojo magistro projekto eksperimentinių tyrimų rezultatai, jų analizė ir aptarimas. Įvertinta eksperimentinės pieno baltymų alerginio aktyvumo mažinimo perspektyvos lyginant mokslininkų atliktais bandymais.

#### 3.1. Fermentų aktyvumo įvertinimas

Proteazės – tai fermentai, kurie suskaldo baltymus į mažesnius darinius tokius kaip polipeptidai ir aminorūgštys nutraukdami peptidinius ryšius. Minėti fermentai yra laikomi vieni iš pagrindinių fermentų klasių dėl jų plataus panaudojimo tiek mokslinėje, tiek komercinėje srityse. Proteazės gali būti gyvūninės, grybelinės ar bakterinės kilmės ir lyginant jas tarpusavyje būtent išskirtos iš bakterijų proteazės yra reikšmingiausios. Tarp bakterijų *Bacillus* rūšies mikroorganizmai yra plačiausiai naudojami proteazėms gaminti ir išskirti [76]. Todėl ir baigiamojo projekto metu naudoti komerciniai fermentai everlazė, esperazė ir savinazė išskirti iš *Bacillus* rūšies mikroorganizmų.

Iš mikroorganizmų išskirti fermentai yra bioaktyvūs, todėl jų fermentinis aktyvumas gali susilpnėti po tam tikro sandėliavimo laiko. Dėl šios savybės prieš pradėdant eksperimentus su biofermentais būtina įvertinti naudojamų fermentų aktyvumą. Atliekant tokį įvertinimą, reikia atsižvelgti į analizuojamų fermentų pateiktas charakteristikas kaip optimali fermentų veikimo temperatūra bei substrato terpės pH vertė. Tirtų fermentų charakteristikos pateiktos 2 skyriuje 2.3 lentelėje. Gauti tyrimo rezultatai yra pateikti 3.1 paveiksle.



3.1 pav. Fermentų aktyvumo duomenys

Atlikus 3.1 paveiksle pateiktų duomenų analizę nustatyta, kad baigiamojo projekto metu naudotos iš *Bacillus* mikroorganizmų išskirtos komercinės proteazės yra aktyvios. Apskaičiuotas fermentų esperazės ir savinazės aktyvumas yra  $0,26 \pm 0,18$  AV/ml, o everlazės  $0,017 \pm 0,16$  AV/ml. Tokie rezultatai rodo, kad fermento everlazės reikia naudoti beveik 15 kartų daugiau nei esperazės ar savinazės. Proteazės everlazės susilpnėjusį aktyvumą galėjo lemti sandėliavimo laikas ir sąlygos, mikrobiologinis užterštumas ar pačio fermento specifiškumas susijęs su fermento aktyvumo stabilumu.

Apibendrinant gautus duomenis galima daryti išvadą, kad bakterinės proteazės esperazė, everlazė bei savinazė yra aktyvios ir tinkamos tolimesniems tyrimams vykdyti.

### 3.2. Fermentinės hidrolizės įvertinimas

Perdirbant ar papildomai modifikuojant maisto žaliavas galima pasiekti teigiamą poveikį maisto produktų maistinei vertei ar funkcinėmis savybėmis. Tai apima pagerintą virškinamumą, juslinės kokybės (tokios kaip tekstūra ar skonis) pakeitimus ir naudą sveikatai, pavyzdžiui, antioksidantų kiekio didinimą arba alergeninių junginių sumažinimą. Tokias modifikacijas galima pasiekti atliekant baltymų fermentinę hidrolizę naudojant specifines proteazes [77].

Baltymų hidrolizė paprastai vyksta išsiskiriant  $H^+$  jonams, kurie kaupiasi terpėje ir dėl to hidrolizės metu terpės pH mažėja. Norint palaikyti optimalų hidrolizės greitį, reikia vengti per mažų pH verčių, kurios gali inaktyvuoti proteazes. Taigi įprastai baltymų hidrolizės metu išsilaisvinusių  $H^+$  jonų neutralizavimui ir terpės pH grąžinimui į optimalų arba pradinį lygį naudojama bazė (paprastai NaOH) [78].

Atliekant fermentinę hidrolizę yra svarbu palaikyti optimalias reakcijos sąlygas kaip temperatūrą ir reakcijos terpės pH. Optimalios pH vertės išlaikymas naudojant bazę suteikia galimybę stebėti ir apskaičiuoti fermentinės hidrolizės laipsnį. Šis rodiklis parodo, iki kokio laipsnio pavyko suskaldyti baltymus įvykdžius eksperimentą. Daugeliui baltymų reikia aukšto hidrolizės laipsnio, kad alerginis aktyvumas būtų pakeistas [77].

Hidrolizės laipsnis yra apibrėžiamas kaip suskaidytų peptidinių jungčių procentinė dalis, o apibendrinta HL skaičiavimo išraiška yra tokia [79]:

$$HL = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100 \%, \quad (3.1)$$

čia:  $h$  – hidrolizuotų jungčių skaičius;  $h_{tot}$  – bendras peptidinių jungčių skaičius baltymo ekvivalente (priklauso nuo hidrolizuojamos žaliavos aminorūgčių sudėties).

Priklausomai nuo hidrolizės laipsnio, hidrolizuoti pieno baltymai yra naudojami arba gydyti esamą alergiją karvės pienui (pilnai hidrolizuoti), arba užkirsti kelią alerginių simptomų vystymuisi (iš dalies hidrolizuoti) [80].

Mokslinėje literatūroje pateikiami keletas metodų, skirtų hidrolizės laipsnio nustatymui, tokie kaip pH-stat, osmometrinis, trinitrobenzensulfono rūgštis (TNBS) ir kiti [79]. Baigiamojo projekto metu fermentinės hidrolizės laipsniams įvertinti naudotas pH-stat metodas.

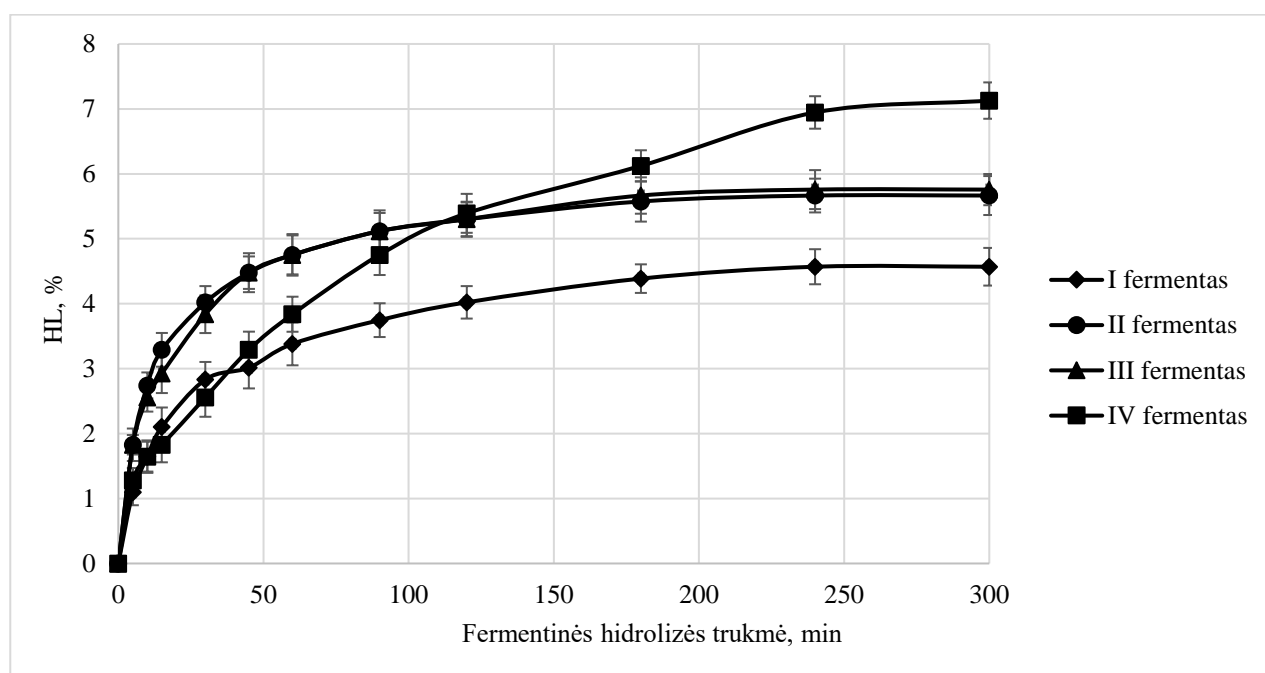
Siekiant gauti kuo tikslesnes hidrolizės laipsnio kitimo kreives, fermentinės hidrolizės metu reakcijos mišinių pH vertės koreguotos vienuolika kartų po 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 ir 300 min. Tokia imtis pasirinkta atsižvelgiant į mokslinėse publikacijose pateiktas hidrolizės laipsnio nustatymo rezultatus [71, 73–74].

Gauti rezultatai detaliau aptariami 3.2.1. – 3.2.4. skyriuose.

### 3.2.1. Fermentų įtakos lieso pieno baltymų hidrolizei įvertinimas

Karvės piene yra gausu baltymų, kuriuos galima hidrolizuoti naudojant proteazes. Būtent tiriamąjį bandinį LSB sudaro kazeinai ir išrūgų baltymai, kurie yra detaliai pateikti 1 skyriuje 1.1 lentelėje. Fermentinė tiriamojo bandinio hidrolizė atlikta naudojant bakterinės kilmės proteazes kaip everlazę, esperazę, savinazę ir gyvūninės kilmės proteazę tripsiną.

Siekiant įvertinti naudotų fermentų įtaką LSB fermentinei hidrolizei buvo stebimas hidrolizės laipsnio pokytis reakcijos metu. Gauti rezultatai yra pavaizduoti 3.2 paveiksle.



3.2 pav. LSB fermentinės hidrolizės laipsnio pokytis naudojant keturias skirtingas proteazes

Eksperimento metu naudotos proteazės, išskyrus tripsiną, yra retai naudojamos pieno baltymų hidrolizei, todėl mokslinėje literatūroje eksperimentų su identiškais fermentais nerasta. Pateikti rezultatai 3.2 paveiksle rodo, kad II ir III fermentas beveik identišškai veikė LSB ir atitinkamai pasiekė maksimalias hidrolizės laipsnio reikšmes 5,66 ir 5,75 %. Prasčiausi rezultatai gauti naudojant I fermentą, o nustatytas maksimalus hidrolizės laipsnis atitinkamai 4,57 %. Kristoffersen'as, et al. [71] pieno baltymų hidrolizei naudojo proteazes alkalazę ir flavorzymą. Mokslininkai fermentinę hidrolizę vykdė 180 min ir atitinkamai pasiekė maksimalias reikšmes 13 ir 23 %.

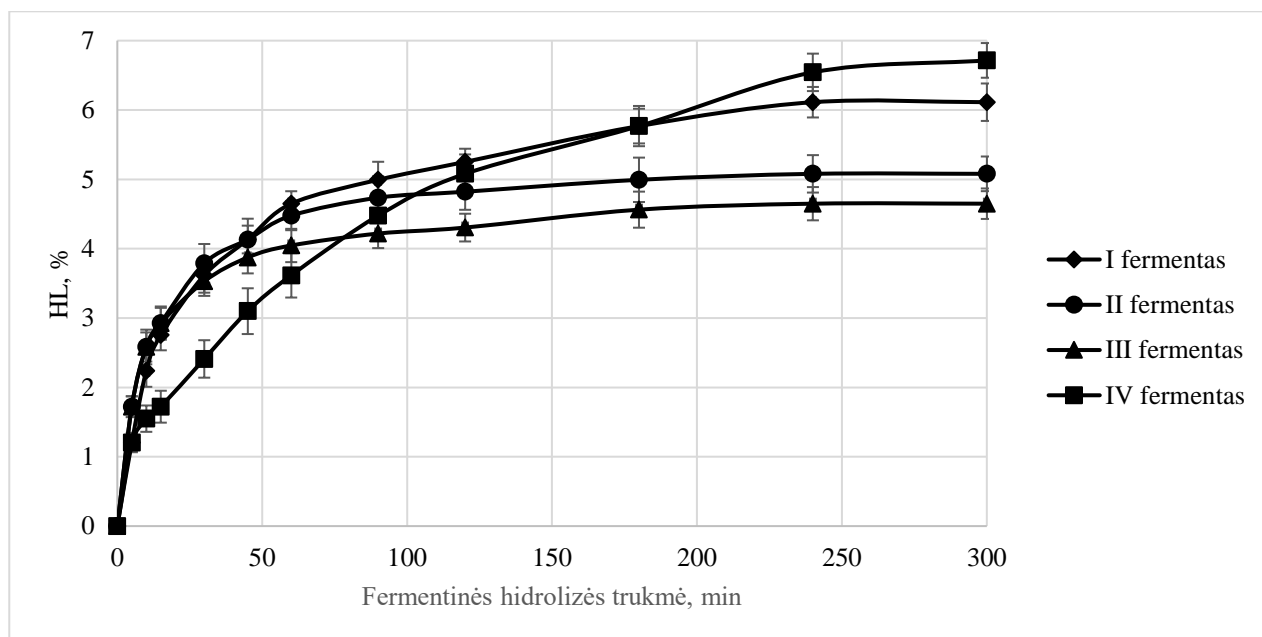
Shu, et al. [73] moksliniame darbe lieso pieno baltymų hidrolizė atlikta naudojant tripsiną (IV fermentą). Mokslininkai sudarė hidrolizės laipsnio kitimo kreives ir nustatė, kad su tripsinu yra galimybė pasiekti 17,2 % hidrolizės laipsnį. Toks rezultatas yra beveik 10 % didesnis už baigiamojo darbo metu gautą rezultatą, kuris tesiekia 7,12 %.

Apibendrinant gautus LSB fermentinės hidrolizės rezultatus galima daryti išvadą, kad tinkamiausias fermentas LSB hidrolizei yra tripsinas, kurį naudojant pasiekta aukščiausia hidrolizės laipsnio vertė 7,12 %. Naudojant visas proteazes gauti pakankamai maži hidrolizės laipsniai lyginant su moksline literatūra. Tam įtakos galėjo turėti fermentų sandėliavimo laikas ar neteisingai parinktas fermento kiekis.

### 3.2.2. Fermentų įtakos išrūgų baltymų hidrolizei įvertinimas

Pieno baltymų milteliai kaip išrūgų baltymų koncentratas ar izoliatas yra plačiai naudojami ir pritaikomi maisto pramonėje, siekiant suteikti maisto produktams papildomas maistines bei funkcines savybes. Pasirinktas tiriamasis bandinys IBI, kurį sudaro išrūgų baltymai tokie kaip  $\alpha$ -laktoalbuminas,  $\beta$ -laktoglobulinas, serumo albuminas, imunoglobulinai ir proteozopeptonai. Taip pat, IBI sudėtyje gali būti randama ir glikomakropeptidų [81]. Tiriamojo bandinio IBI fermentinė hidrolizė atlikta naudojant keturias skirtingas proteazes, kurios yra pateiktos 2 skyriuje 2.3 lentelėje.

Siekiant įvertinti naudotų fermentų įtaką IBI fermentinei hidrolizei buvo stebimas hidrolizės laipsnio pokytis reakcijos metu. Gauti rezultatai yra pavaizduoti 3.3 paveiksle.



3.3 pav. IBI fermentinės hidrolizės laipsnio pokytis naudojant keturias skirtingas proteazes

Atlikus 3.3 paveiksle pateiktų duomenų analizę nustatyta, kad aukščiausias IBI hidrolizės laipsnis 6,71 % buvo pasiektas naudojant IV fermentą. Šis rezultatas yra beveik 2 % mažesnis už Fernandez'o and Kelly [82] gautą rezultatą. Mokslininkai naudojo tą patį fermentą IBI hidrolizei, kurią vykdė 360 min.

Nustatyta, kad I fermento maksimalus hidrolizės laipsnis buvo 0,6 % mažesnis už IV fermento rezultatą. Naudojant II ir III fermentus atitinkamai pasiekti maksimalūs hidrolizės laipsniai buvo 5,08 ir 4,65 %. Fernandez'as and Kelly [82] savo eksperimente naudojo komercinį *Bacillus* rūšies bakterijų proteazių mišinį ir nustatė maksimalią hidrolizės laipsnio reikšmę IBI ~ 8 %. Kiti mokslininkai, kaip Kristoffersen'as, et al. [71] išrūgų baltymų koncentrato hidrolizei naudojo proteazes alkalazę ir flavorzymą. Mokslininkai fermentinę hidrolizę vykdė 180 min ir atitinkamai pasiekė maksimalias hidrolizės laipsnio reikšmes 15 ir 27 %. Udenchukwu, et al. [83] atliko IBI hidrolizę naudodami proteazes esperazę, savinazę ir everlazę, tačiau hidrolizės laipsnio nenustatė.

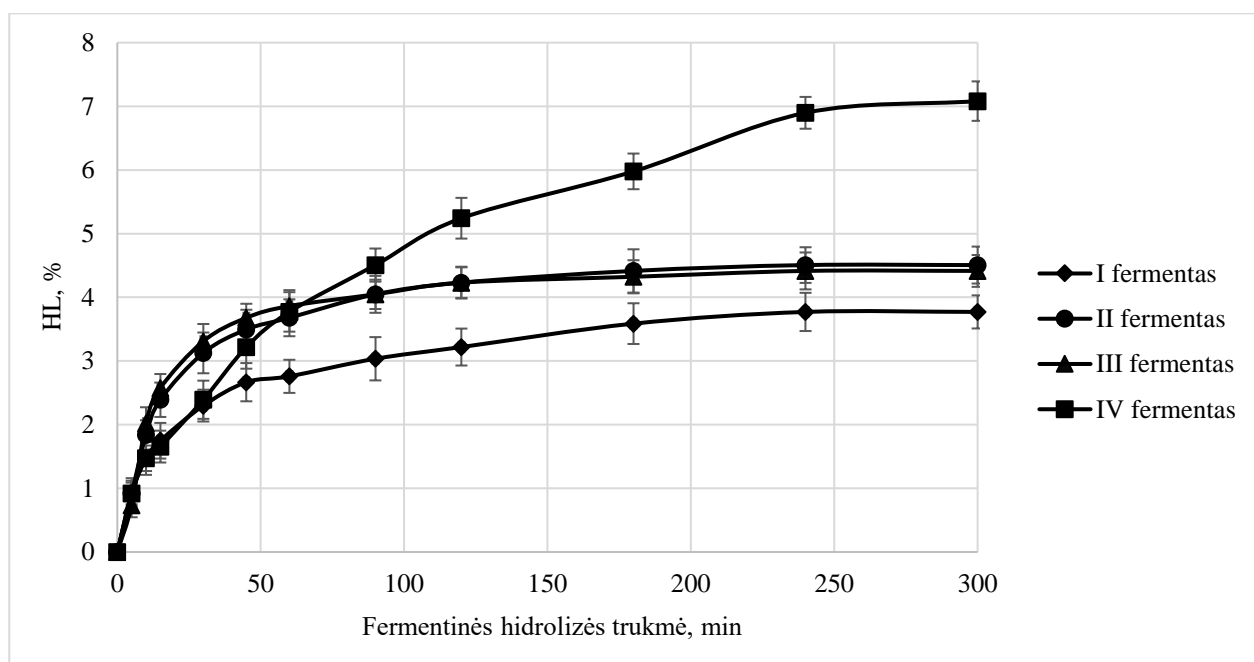
Apibendrinant gautus IBI fermentinės hidrolizės rezultatus galima daryti išvadą, kad tinkamiausias fermentas IBI hidrolizei yra IV, kurį naudojant pasiekta aukščiausia hidrolizės laipsnio vertė 6,71 %. Nustatyta, kad fermentinei IBI hidrolizei netinkamiausias buvo III fermentas.

### 3.2.3. Fermentų įtakos micelinio kazeino hidrolizei įvertinimas

Viena iš pagrindinių karvės pieno baltymų grupių yra kazeinai, kuriuos sudaro  $\alpha_{s1}$ -kazeinas,  $\alpha_{s2}$ -kazeinas,  $\beta$ -kazeinas,  $\kappa$ -kazeinas ir  $\gamma$ -kazeinas. Tarpusavyje jie skiriasi pirminės struktūros ir posttransliacinės modifikacijos tipo bei laipsnio atžvilgiu [84].

Kazeinai yra netirpūs baltymai, todėl didesnio susidomėjimo maisto pramonėje, siekiant naudoti šiuos baltymus maisto produktų maistinėms bei funkcinėms savybėms pagerinti, sulaukia miceliniai (tirpūs) kazeinai [10]. Todėl pasirinktas tiriamasis bandinys MKB, kurio fermentinė hidrolizė atlikta naudojant keturias skirtingas proteazes pateiktas 2 skyriuje 2.3 lentelėje.

Siekiant įvertinti naudotų fermentų įtaką MKB fermentinei hidrolizei buvo stebimas hidrolizės laipsnio pokytis reakcijos metu. Gauti rezultatai yra pavaizduoti 3.4 paveiksle.



3.4 pav. MKB fermentinės hidrolizės laipsnio pokytis naudojant keturias skirtingas proteazes

Išanalizavus 3.4 paveiksle pateiktus rezultatus matoma, kad geriausias MKB fermentinės hidrolizės rezultatas gautas naudojant IV fermentą. Nustatyta maksimali hidrolizės laipsnio reikšmė 7,08 %. Deng'as, Gruppen'as and Wierenga [74] atliko  $\beta$ -kazeino fermentinę hidrolizę naudodami tripsiną ir pasiekė maksimalią hidrolizės laipsnio reikšmę 4 %.

Naudojant I, II ir III fermentus pasiekti beveik 3 % mažesni rezultatai lyginant su IV fermentu. Žemiausias hidrolizės laipsnis 3,77 % buvo nustatytas MKB hidrolizei naudojant I fermentą. Norris, et al. [85] atliko  $\beta$ -kazeino fermentinę hidrolizę naudodami proteazę išskirtą iš *Aspergillus niger* ir maksimalų hidrolizės laipsnį, kuris buvo 6,62 %, pasiekė po 240 min. Mokslininkai Srinivas and Prakash'as [86] savo eksperimente naudojo bakterinę proteazę išskirtą iš *Streptomyces griseus* mikroorganizmų. Jie atliko  $\alpha$ -kazeino fermentinę hidrolizę ir nustatė maksimalų hidrolizės laipsnį, kuri buvo ~ 4 %.

Apibendrinant gautus MKB fermentinės hidrolizės rezultatus galima daryti išvadą, kad tinkamiausias fermentas MKB hidrolizei yra IV, kurį naudojant pasiekta aukščiausia hidrolizės laipsnio vertė 7,08 %. Nustatyta, kad kitos proteazes I, II ir III nėra tinkamos MKB hidrolizei dėl prastų rezultatų.

### 3.2.4. Fermentų tinkamumo pieno baltymams modifikuoti įvertinimas

Iš *Bacillus* rūšies mikroorganizmų gautas proteazės galima naudoti maisto pramonėje, norint gauti bioaktyvius peptidus ir perdirbti įvairius maisto produktus. Daugelį baltymų galima ribotai hidrolizuoti, todėl gaunami peptidai, dar vadinami baltymų hidrolizatais, pasižymi biologiniu aktyvumu kaip pavyzdžiui, antihipertenziniu, imunostimuliuojančiu, antimikrobiniu ir antioksidaciniu aktyvumu. Tokie peptidai gali būti gauti naudojant proteazės pieno (kazeino ir išrūgų) baltymams hidrolizuoti [87].

Mokslininkai Udenchukwu, et al. [83] atliko išrūgų baltymų izoliato hidrolizę naudodami proteazės esperazę, savinazę bei everlazę ir nustatė aminorūgščių sudėtį hidrolizatų, gautų naudojant everlazę. Gauti mokslininkų rezultatai parodė, kad didžiausią kiekį visų nustatytų aminorūgščių sudarė glutamo rūgštis, glutaminas, leucinas ir lizinas. Tai patvirtina teiginį, kad fermentinės hidrolizės metu gauti hidrolizatai gali tapti funkciniais maisto produktų priedais.

Baigiamojo darbo eksperimento metu bandinių LSB, IBI ir MKB fermentinei hidrolizei buvo panaudotos bakterinės proteazės, tokios kaip everlazė (I fermentas), esperazė (II fermentas) bei savinazė (III fermentas) ir gyvūninė proteazė tripsinas (IV fermentas). Visi minėti fermentai yra tinkami pieno baltymų hidrolizei, kadangi juos naudojant buvo įvykdytas hidrolizės procesas t.y. pasiektas atitinkamas hidrolizės laipsnis. Tačiau, kiekvienas fermentas skirtingai veikė tuos pačius baltymus, todėl įvertinta atitinkamos proteazės galimybės hidrolizuoti pieno baltymus. Vertinimui naudoti duomenys yra pateikti 3.5 paveiksle.

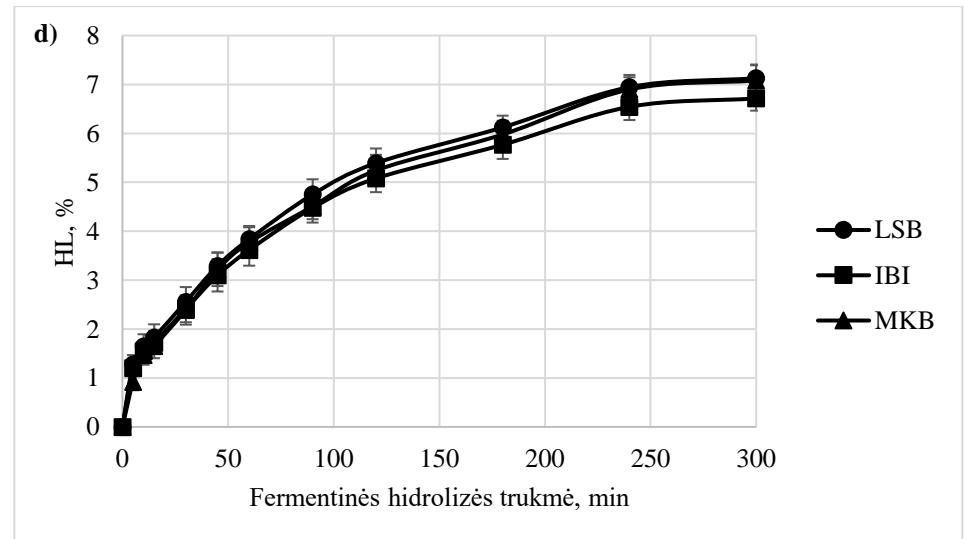
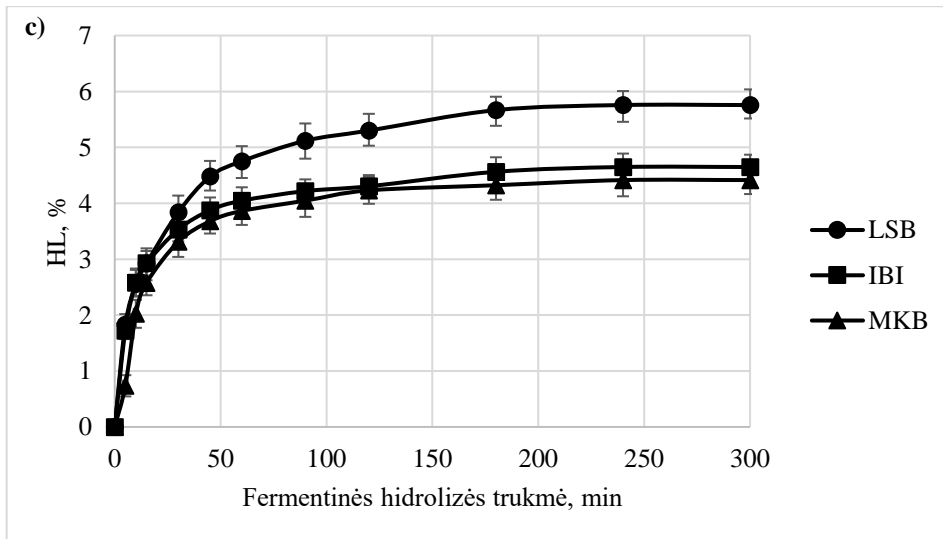
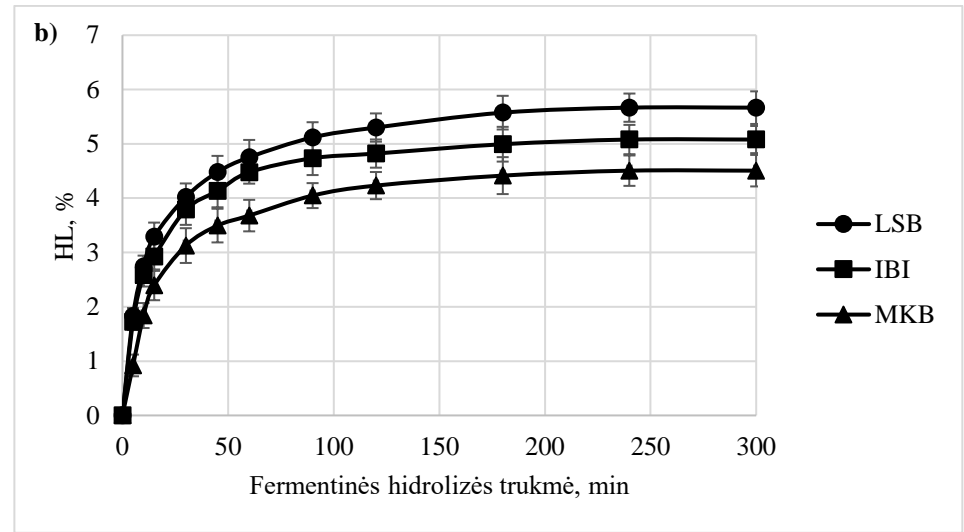
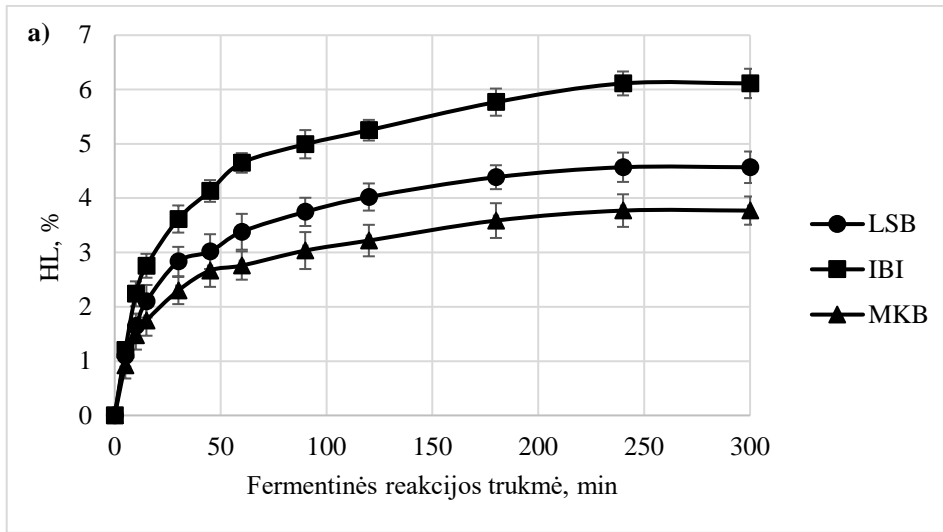
Atlikus I fermento hidrolizės efektyvumo įvertinimą, nustatyta, kad šis fermentas yra tinkamiausias IBI fermentinei hidrolizei (3.5 pav., a). Pasiektas maksimalus hidrolizės laipsnis buvo 6,11 % ir šis rezultatas beveik 2 % didesnis už kitų bandinių.

Išanalizavus tyrimo rezultatus nustatyta, kad II fermentas efektyviausiai hidrolizavo LSB bandinį, o pasiektas maksimalus hidrolizės laipsnis buvo 5,66 %. Kitus bandinius šis fermentas hidrolizavo silpniau nei LSB beveik 0,5 – 1 % (3.5 pav., b).

Iš pateiktų duomenų 3.5 paveiksle (c) matoma, kad III fermentas yra tinkamiausias LSB hidrolizei lyginant su kitais bandiniais. Naudojant šį fermentą pasiektas maksimalus LSB hidrolizė laipsnis buvo 5,76 %.

Įvertinus gautus hidrolizės duomenis su IV fermentu, nustatyta, kad šis fermentas efektyviausiai hidrolizavo LSB ir MKB bandinius. Pasiektos maksimalios hidrolizės laipsnio reikšmės atitinkamai buvo 7,13 ir 7,08 % (3.5 pav., d).

Apibendrinant I, II, III ir IV fermentų tinkamumą pieno baltymams modifikuoti taikant fermentinę hidrolizę nustatyta, kad efektyviausiai visus bandinius hidrolizuoja IV fermentas (tripsinas). Naudojant šį fermentą pasiekti maksimalūs hidrolizės laipsniai buvo tokie: 7,13 % (LSB), 7,08 % (MKB) ir 6,71 % (IBI). Nustatyta, kad kitų fermentų efektyvumas buvo 1–2 % mažesnis lyginant su IV fermentu. Prastesnius bakterinių proteazių rezultatus galėjo lemti šių fermentų sandėliavimo įtaka jų aktyvumui, pačių fermentų kiekis ir jų specifiškumas hidrolizuojant pieno baltymus. Mokslinėje literatūroje nerandama pavyzdžių minėtų proteazių taikymo pieno baltymų hidrolizei, todėl gali būti, kad šios proteazės nėra tinkamos pieno baltymų hidrolizei.



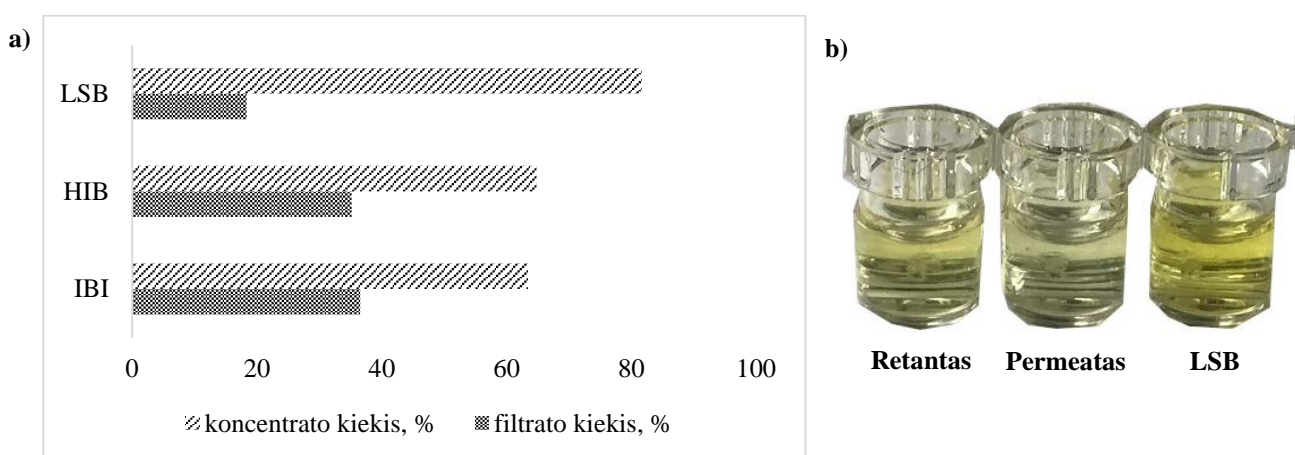
3.5 pav. Hidrolizės laipsnio pokytis substratui priklausomai nuo naudojamo fermento: a) I fermentas; b) II fermentas; c) III fermentas; d) IV fermentas



### 3.3. Ultrafiltracijos proceso pieno baltymų modifikavimui įvertinimas

Liesas pienas yra koloidinė kazeino micelių ir išrūgų baltymų suspensija, kurią sudaro kalcio, magnio, kalio ir cinko, taip pat chlorido, fosfato ir citrato anijonai. Ultrafiltruojant pieną, siekiant sukcentruoti pieno baltymus, keičiasi pieno sudėtis t.y. padidinamas baltymų bei koloidinių mineralų kiekis ir mažinamas vandens, tirpių mineralų, laktozės bei nebaltyminio azoto kiekis retante. Prasiskverbianti medžiaga pereina per membraną į permeatą [88]. Pieno pramonėje taikant ultrafiltracijos procesą dažniausiai naudojamos membranos, kurių dydis siekia nuo 10 kDa iki 30 kDa [68].

Baigiamojo projekto metu naudoti Millipore Amicon® Ultra – 15 mėgintuvėliai su 30 kDa membranomis, kurių aktyvusis filtravimo plotas – 7,6 cm<sup>2</sup>. Ultrafiltracija atlikta šiems bandiniams: hidrolizuotiems išrūgų baltymams (HIB), IBI ir LSB. Gauti bandinių ultrafiltravimo duomenys yra pateikti 3.6 paveiksle, a.



3.6 pav. Bandinių ultrafiltravimo duomenys (a) ir ELISA metodo LSB rezultatų pavyzdys (b)

Atlikus LSB, HIB ir IBI bandinių ultrafiltraciją laboratorinėmis sąlygomis, įvertinta šio proceso galimybės siekiant modifikuoti pieno baltymus. Nustatyta, kad HIB ir IBI bandinius pavyko sukcentruoti beveik 1,5 karto, o LSB 1,2 karto. Taip pat buvo atlikta MKB ultrafiltracija, kuri nepavyko, nes bandinys visas prasiskverbė pro membranas. Toks rezultatas leidžia daryti prielaidą, kad kazeinai nesudaro aglomeratų, kadangi nesikcentruoja naudojant 30 kDa mebranas, o kazeinų masė yra 12–26 kDa (1.1 lentelė).

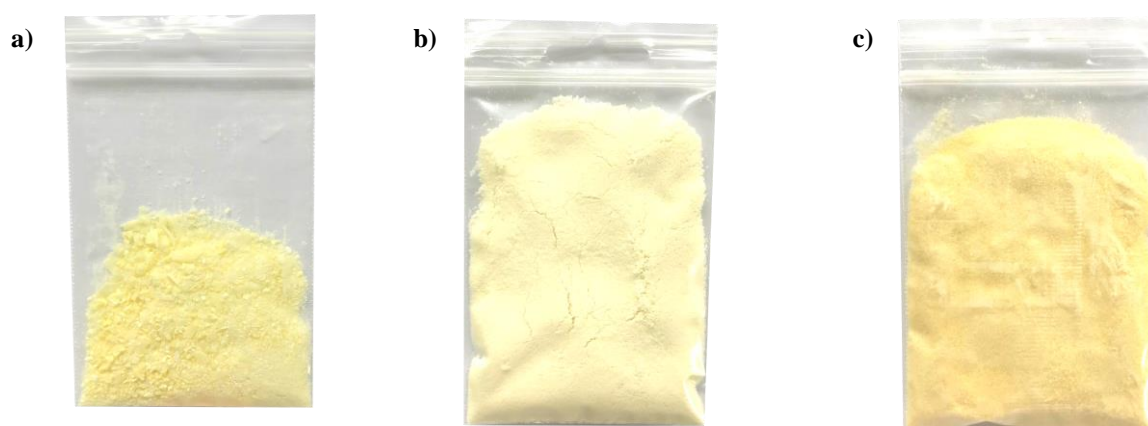
Gauti bandiniai buvo įvertinti naudojant ELISA rinkinį. Atlikus rezultatų analizę paaiškėjo, kad dalis baltymų prasiskverbia pro 30 kDa membranas, o kita dalis lieka retante. Tai rodo, kad taikant ultrafiltraciją naudojant tokias membranas nėra galimybės pilnai išfrakcionuoti  $\beta$ -laktoglobulino. LSB bandinio ELISA rezultatų vaizdas yra pateiktas 3.6 paveiksle, b. Šis pavyzdys rodo, kad ryškiausia spalva gauta pradiniam bandinyje t.y. didžiausia  $\beta$ -laktoglobulino koncentracija. Permeate ir koncentrate matyti sumažėjusi šio baltymo alergeno koncentracija lyginant su pradiniu bandiniu, tačiau nepavyko pasiekti rezultato, kad baltymas pilnai pereitų į permeatą.

Apibendrinant gautus rezultatus galima daryti išvadą, kad ultrafiltracijos procesas yra tinkamas pieno baltymams modifikuoti. Nustatyta, kad 30 kDa membraną galima pritaikyti LSB, HIB ir IBI pieno baltymams ultrafiltruoti, tačiau ELISA gauti rezultatai rodo, kad tokia membrana nėra tinkama siekiant pilnai pašalinti pieno baltymą alergoną  $\beta$ -laktoglobuliną iš pradinio tirpalo.

### 3.4. Liofilizacijos proceso įtakos bandinių savybėms vertinimas

Džiovinimas šalčiu arba liofilizacija yra džiovinimo procesas, pagrįstas sublimacijos reiškiniu ir skirtas ilgalaikiam karščiui jautrių maisto produktų bei kitų biologinių medžiagų išsaugojimui. Toks džiovinimo būdas yra tinkamiausias aukštai temperatūrai jautrių medžiagų dehidratacijai ir išsaugo didžiąją dalį pradinių žaliavų savybių, tokių kaip forma, išvaizda, spalva, skonis, tekstūra bei biologinis aktyvumas. Liofilizaciją sudaro 4 pagrindinės stadijos, tokios kaip 1) užšaldymas, 2) sublimacija, 3) desorbcija ir 4) sandėliavimas [89].

Tyrimų metu gauti hidrolizatai HLPB1, HIB1, HMK1, HLPB2, HIB2, HMK2, HLPB3, HIB3, HMK3, HLPB4, HIB4, HMK4 ir koncentratai MLPBK30, MIBK30, MHIBK30 buvo liofilizuoti siekiant išsaugoti jų biologines savybes. Po džiovinimo šalčiu gauti bandiniai palyginti su pradiniais LSB, IBI ir MKB bandiniais, kurių vaizdas yra pateiktas 3.7 paveiksle.



**3.7 pav.** Pradinių bandinių vaizdas: a) LSB; b) IBI; c) MKB

Baigiamojo darbo metu po fermentinės hidrolizės gautų ir liofilizuotų bandinių vaizdas yra pateiktas 3.1 lentelėje. Atlikus liofilizuotų bandinių išvaizdos ir spalvos analizę, nustatyta, kad LSB hidrolizatai yra gelsvos spalvos ir birūs. Šie hidrolizatai savo spalva išsiskyrė iš kitų bandinių.

Išanalizavus gautus rezultatus įvertinta, kad II fermentas nėra tinkamas IBI ir MKB fermentinei hidrolizei, kadangi gauti hidrolizatai buvo rudos spalvos, lipnūs ir trapūs. Bandiniai su tokiais savybėmis nėra tinkami tolimesniems alerginio aktyvumo tyrimams ir tokius bandinius būtų sunku pritaikyti maisto produktų gamyboje.

Įvertinus likusių bandinių išvaizdos ir spalvos savybes, nustatyta, kad jie visi yra birūs ir silpnai baltos spalvos, išskyrus I fermentu paveiktą MKB bandinį, kurio spalva oranžinė. Tokios bandinių savybės yra tinkamos tolimesniems tyrimams.

Apibendrinant gautus rezultatus, galima daryti išvadą, kad liofilizacija arba džiovinimas šalčiu yra tinkamas džiovinimo būdas baigiamojo projekto metu gautiems bandiniams ir suteikia galimybę išsaugoti jų biologinį aktyvumą. Nustatyta, kad bandiniai buvo birūs ir baltos arba gelsvos spalvos. Įvertinta, kad visi bandiniai, išskyrus II fermentu paveiktus IBI ir MKB bandinius, yra tinkami tolimesniems alerginio aktyvumo tyrimams.

3.1 lentelė. Liofilizuotų hidrolizatų vaizdas

Bandinys Fermentas	LSB	IBI	MKB
I fermentas			
II fermentas			
III fermentas			
IV fermentas			

### 3.5. Alerginio aktyvumo įvertinimas

Pienas yra pirmasis pašalinių antigenų šaltinis, kurį kūdikiai gauna dideliais kiekiais, todėl būtent alergija karvės pieno baltymams dažniausiai pasireiškia vaikams ankstyvame amžiuje, o ne suaugusiems [90]. Baltymai pasižymintis alerginiu aktyvumu turi epitopus, kurie atpažįsta IgE. Prisijungus IgE prie epitopų organizme yra sukeliama alerginė reakcija [77].

Pilnai ar iš dalies hidrolizuojant baltymus, fermentai modifikuoja substratus į mažesnius darinius t.y. trumpesnius peptidus. Tokiu būdu sumažėja konformacinių epitopų skaičius ir taip sumažinamas alerginis baltymų aktyvumas. Po fermentinės baltymų hidrolizės dažnai susidaro kartaus ar rūgštaus skonio peptidai. Į tai būtina atsižvelgti kuriant naujas maisto produktų receptūras su pieno baltymų hidrolizatais [91].

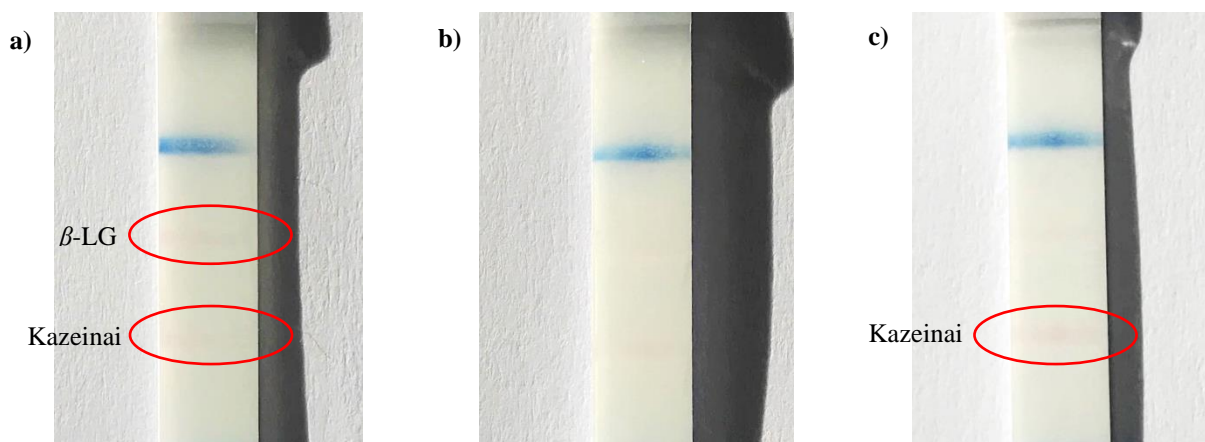
Mokslininkė Cabana [92] atliko hidrolizuotų pieno baltymų analizę, vertinant jų sąryšį su alerginėmis reakcijomis. Ji teigia, kad dalinai hidrolizuotų išrūgų ir pilnai hidrolizuotų kazeinų dariniai gali sumažinti kūdikiams, kuriems pasireiškia alergija karvės pieno baltymams, riziką susirgti egzema.

Taigi, baltymų alerginį aktyvumą galima pakeisti modifikuojuant pačius baltymus siekiant paveikti jų epitopines dalis. Baigiamojo magistro projekto metu pieno baltymų modifikavimui pasirinkti biotechnologiniai procesai: ultrafiltracija ir fermentinė hidrolizė. Pradiniai nemodifikuoti ir po apdorojimo gauti modifikuoti bandiniai buvo įvertinti naudojant imuno chromatografinę testą *Proteon Duo Milk Express* ir atliktas specifinių IgE nustatymas. Toliau skyriuje nagrinėjami šių bandinių alerginio aktyvumo rezultatai.

#### 3.5.1. Nemodifikuotų pieno baltymų alerginio aktyvumo įvertinimas

Karvės pieno baltymai pasižymi stipriu alerginiu aktyvumu, kuris ypatingai pasireiškia vaikams. Dėl sukeltų stiprių alerginių reakcijų, kurios pasireiškia kaip odos sudirginimas ar kitų vidaus organų sutrikimai, alergiškų vaikų tėvai yra priversti ieškoti kitų karvės pieno alternatyvų [90]. Tačiau, sunku rasti pakaitalą, kuris būtų atitinkamai maistingas, savo sudėtyje turėtų platų spektrą baltymų ir būtų malonaus skonio. Tai lemia įvairių sprendinių paiešką, siekiant sumažinti karvės baltymų alerginį aktyvumą.

Taigi, baigiamojo darbo metu, prieš modifikuojuant karvės pieno baltymus, buvo atliktas nemodifikuotų pieno baltymų alerginis vertinimas. Atliktų nemodifikuotų LSB, IBI ir MKB tyrimo rezultatų, naudojant imuno chromatografinę testą, vaizdas yra pateiktas 3.8 paveiksle.



3.8 pav. Nemodifikuotų pieno baltymų testinių juostelių vaizdas: a) LSB; b) IBI; c) MKB

Išanalizavus 3.8 paveiksle pateiktus rezultatus matoma, kad visų bandinių testinėse juostelėse yra ryški kontrolinė linija. Bandinio LSB testinė juostelė rodo šviesiai rausvas linijas, kurios priskiriamos  $\beta$ -laktoglobulinui ir kazeinams (3.8 pav., a). Taip pat MKB rezultatas rodo, kad bandinyje yra kazeinų (3.8 pav., c). Šis rezultatas patvirtina, kad juostelės yra tinkamos alergenams bandiniuose įvertinti. Įvertinus IBI rezultatą, galima daryti prielaidą, kad šiame bandinyje nėra  $\beta$ -laktoglobulino ir kazeino (3.8 pav., b). Toks rezultatas leidžia daryti prielaidą, kad komercinis IBI pasižymi sumažintu alerginiu aktyvumu.

Po imuno chromatografinio testo rezultatų analizės atliktas s\_IgE nustatymas. Gauti rezultatai yra pateikti 3.2 lentelėje.

**3.2 lentelė.** Nemodifikuotų bandinių specifinių IgE koncentracijos nustatymo kraujyje rezultatai

Bandinio kodas	s_IgE koncentracija (kU/l)							Alerginis aktyvumas
	Bos d 4	Bos d 5	Bos d 6	Bos d 8-9	Bos d 10	Bos d 11	Bos d 12	
LSB	70	73	0,37	68	70	75	71	Aukštas
IBI	67	65	0,4	34	45	40	42	Aukštas
MKB	32	41	0,5	81	78	80	75	Aukštas

Apžvelgus 3.2 lentelėje pateiktus rezultatus, galima daryti išvadą, kad visi trys pradiniai nemodifikuoti pieno baltymų bandiniai pasižymi aukštu alerginiu aktyvumu. Kadangi karvės piene yra aptinkamas didelis skaičius alergenų, vienuose bandiniuose dominuoja vieni alergenai, o kituose kiti.

Apibendrinant gautus rezultatus, galima daryti išvadą, kad nemodifikuoti LSB, IBI ir MKB pasižymi alerginiu aktyvumu. Tai patvirtino imuno chromatografinis testas (tik IBI rezultatas gautas netikslus) ir s\_IgE nustatymas kraujyje. Silpnoms alerginių baltymų juostelių spalvoms įtakos galėjo turėti alerginių baltymų koncentracija bandiniuose.

### 3.5.2. Modifikuotų pieno baltymų alerginio aktyvumo įvertinimas

Vienintelis būdas siekiant sumažinti karvės baltymų alerginį aktyvumą yra jų modifikavimas. Baltymų struktūros pokyčius galima pasiekti taikant įvairius apdorojimo būdus kaip terminis apdorojimas, poveikis aukštu slėgiu, cheminė ar fermentinė hidrolizė, ultrafiltravimas ir kiti. Baigiamojo darbo metu baltymų modifikacijai taikyti du biotechnologiniai procesai kaip ultrafiltravimas ir fermentinė hidrolizė. Atliktas gautų bandinių alerginis vertinimas ir bendras gautų rezultatų vaizdas yra pateiktas 3.9 paveiksle.

Fermentinė hidrolizė yra laikoma vienu iš perspektyviausių būdų siekiant mažinti karvės baltymų alerginį aktyvumą. Cabana [92] teigia, kad kai kurie tyrimai rodo, jog hidrolizuotos receptūros gali sumažinti alerginės ligos riziką, palyginti su nehidrolizuotomis formulėmis. Mokslininkė rašo, kad bent 3 faktoriai tokie kaip baltymų šaltinis, hidrolizės būdas ir hidrolizės laipsnis, gali turėti įtakos galimam hidrolizuotos formulės alerginio aktyvumo sumažinimui. Pastebėta, kad hidrolizės laipsnis ne visuomet koreliuoja su klinikinių tyrimų rezultatais [92]. Taigi, tai rodo, kad ne visada pilnai hidrolizuotas baltymų mišinys pasižymės mažesniu alerginiu aktyvumu lyginant su iš dalies hidrolizuotais baltymais.

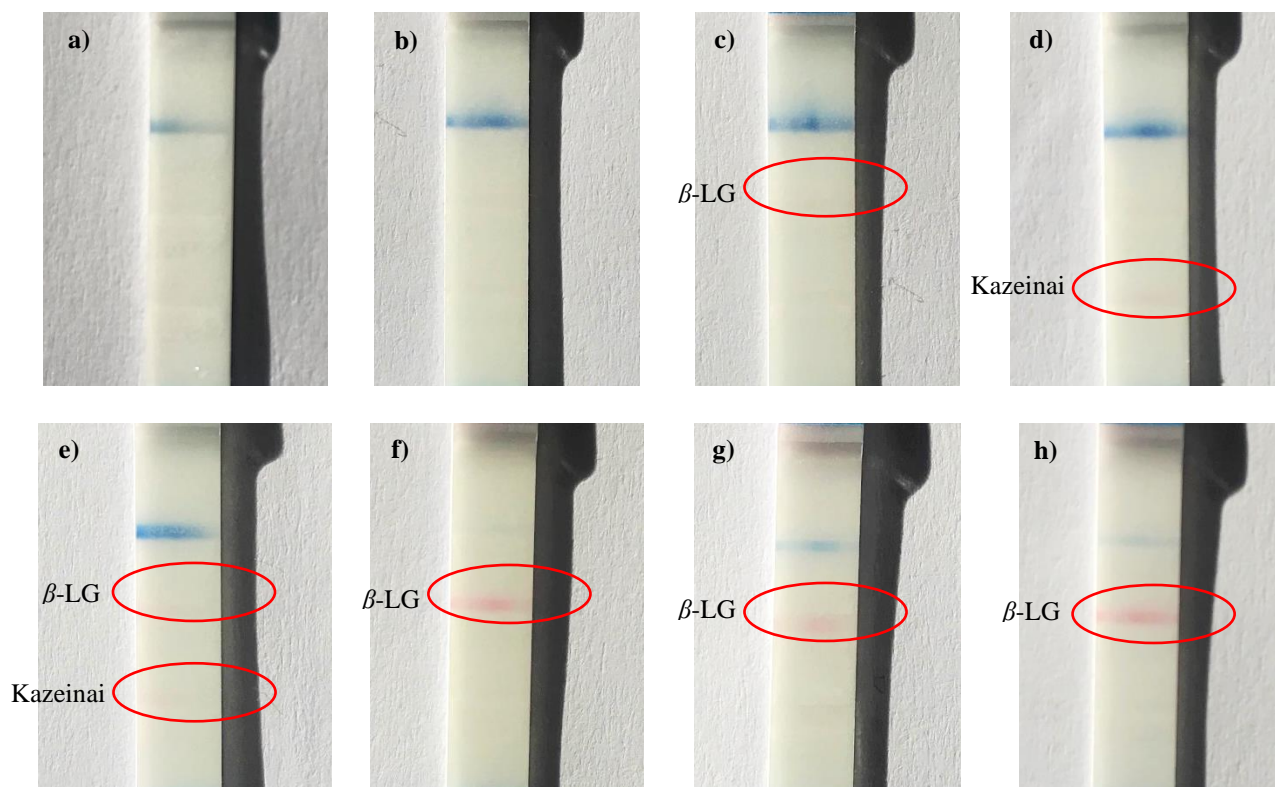
El-salam'as and El-shibiny [90] apžvelgė mokslininkų darbus išrūgų baltymų fermentinės hidrolizės srityje. Vieni mokslininkai panaudojo proteazę išskirtą iš *Bacillus licheniformis* ir hidrolizavo išrūgų

baltymų koncentratą naudodami membraninį bioreaktorių su 3 kDa membranomis. Nustatyta, kad gautus hidrolizatus vidutiniškai sudarė po 4 amino rūgštis ir baltymų antigeniškumas buvo sumažintas 99,97 %. Kiti mokslininkai tripsinu paveikė liofilizuotus išrūgų baltymus sudarydami 100–300 MPa slėgį. Nustatyta, kad gauti hidrolizatai pasižymėjo mažesniu alerginiu aktyvumu.



**3.9 pav.** Bendras nemodifikuotų ir modifikuotų pieno baltymų imuno chromatografinio testo rezultatų vaizdas

Baigiamojo projekto metu alerginis aktyvumas įvertintas hidrolizatų, kurie parodė aukščiausius hidrolizės laipsnio rezultatus. Gautas testinių juostelių vaizdas yra pateiktas 3.10 paveiksle.



**3.10 pav.** Modifikuotų pieno baltymų imuno chromatografinio testo rezultatų vaizdas: a) neigiama kontrolė; b) HLPB4; c) HIB4; d) HMK4; e) teigiama kontrolė (LSB); f) HLPB2; g) HIB1; h) HLPB3

Išanalizavus 3.10 paveiksle pateiktus rezultatus galima daryti išvadą, kad IV fermentas (tripsinas) teigiamai paveikė LSB baltymus sumažindamas jų alerginį aktyvumą. Šio bandinio testinė juostelė rodo neigiamą rezultatą (3.10 pav., b). Naudojant tą patį fermentą IBI ir MKB bandiniams visiškai sumažinti alerginio aktyvumo nepavyko. Rezultatai rodo, kad HIB4 yra likę  $\beta$ -laktoglobulino (3.10 pav., c), o HMK4 turi kazeinų likučių (3.10 pav., d), kurie demonstruoja silpną alerginį aktyvumą. Mokslinėje literatūroje yra pateiktas pavyzdys, kai tripsinas buvo naudotas išrūgų baltymų izoliatui hidrolizuoti. Nustatytas ryškus  $\alpha$ -laktoalbumino ir  $\beta$ -laktoglobulino alerginio aktyvumo sumažėjimas [90].

Fermentinei pieno baltymų hidrolizei naudojant proteazes gautas teigiamas poveikis kazeinams. Naudoti I, II ir III fermentai pilnai suskaldė kazeinus, tačiau nepaveikė alergeno  $\beta$ -laktoglobulino (3.12 pav., f, g, h). Gauti rezultatai rodo, kad naudotos proteazės yra tinkamos norint sumažinti kazeinų alerginį aktyvumą. Mokslininkai atliko bandymą siekdami palyginti fermentų imobilizavimo įtaką baltymų alerginio aktyvumo mažinimui. Laisva ir imobilizuota proteaze alkalaze buvo hidrolizuotas išrūgų baltymų izoliatas. Gauti rezultatai parodė, kad imobilizuotiems fermentams nepavyko sumažinti alerginio baltymų aktyvumo taip kaip laisviems fermentams [90].

Taigi, atlikus imuno chromatografinę testą ir įvertinus gautus rezultatus, toliau analizuojami modifikuotų pieno baltymų bandinių specifinių IgE tyrimo rezultatai, kurie yra pateikti 3.3 lentelėje. Tyrimo metu nustatytos Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 8-9, Bos d 10, Bos d 11 ir Bos d 12 s\_IgE koncentracijos.

**3.3 lentelė.** Modifikuotų bandinių specifinių IgE koncentracijos nustatymo kraujyje rezultatai

Bandinio kodas	s_IgE koncentracija (kU/l)							Alerginis aktyvumas
	Bos d 4	Bos d 5	Bos d 6	Bos d 8-9	Bos d 10	Bos d 11	Bos d 12	
HLPB1	55	62	<0,35	58	64	45	50	Aukštas
HIB1	40	52	<0,35	23	29	25	31	Aukštas
HMK1	44	48	<0,35	34	30	27	29	Aukštas
HLPB2	53	58	<0,35	50	58	52	50	Aukštas
HIB2	33	35	<0,35	36	31	35	41	Aukštas
HMK2	42	45	<0,35	43	40	38	40	Aukštas
HLPB3	48	50	<0,35	51	48	43	45	Aukštas
HIB3	38	40	<0,35	30	34	31	37	Aukštas
HMK3	40	42	<0,35	28	35	24	40	Aukštas
HLPB4	15	18	<0,35	25	31	15	20	Aukštas
HIB4	20	23	<0,35	30	36	32	28	Aukštas
HMK4	32	29	<0,35	15	21	18	23	Aukštas

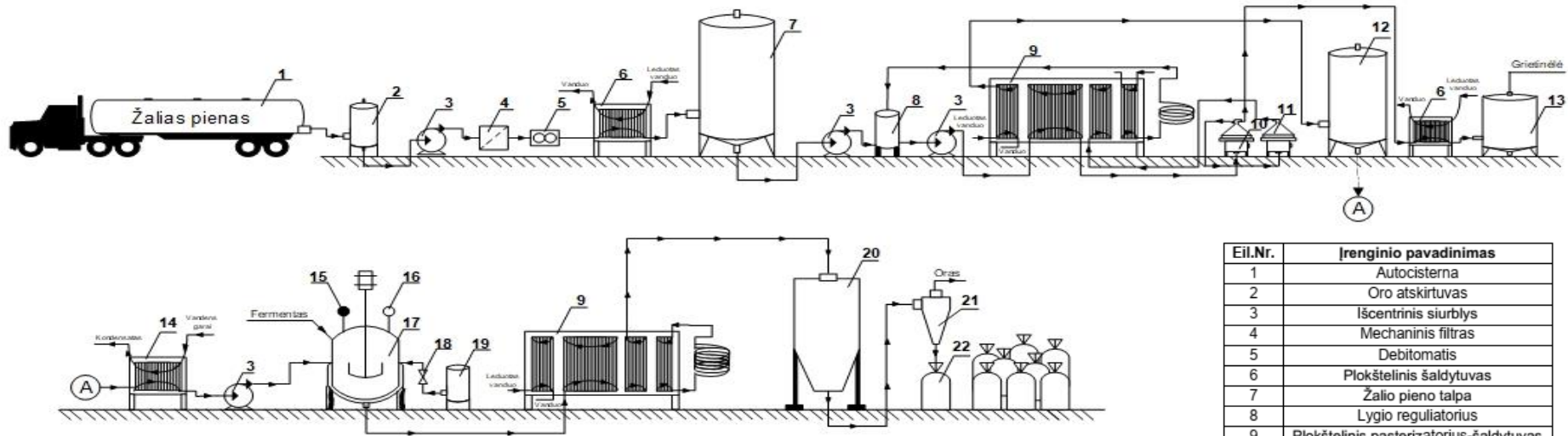
Mokslinėje literatūroje pateikiama, kad s\_IgE koncentracija mažesnė už 0,35 rodo, kad alergijos pieno baltymams nėra [94]. Wang'a, et al [95] atliko mokslinį tyrimą su žmonėmis turinčiais įvairaus stiprumo alergijas pienui. Mokslininkai nustatė, kad alergiškų pieno baltymams žmonių s\_IgE gali svyruoti nuo 0,77 iki 100 kU/l. Taigi, išanalizavus 3.3 lentelėje pateiktus duomenis galima daryti išvadą, kad pieno baltymų modifikavimas taikant fermentinę hidrolizę iš dalies pakeitė s\_IgE prisijungimo gebą, tačiau tai nenulėmė ryškaus alerginio aktyvumo sumažėjimo. Taip pat iš pateiktų rezultatų matyti, kad silpniausiu alerginiu aktyvumu pasižymi Bos d 6 alergenai.

Apibendrinant gautus modifikuotų pieno baltymų alerginio aktyvumo rezultatus galima daryti išvadą, kad fermentinė hidrolizė yra tinkamas metodas siekiant iš dalies sumažinti baltymų alerginį aktyvumą. Gauti rezultatai rodo, kad IV fermentas yra tinkamiausias pieno baltymų alerginio aktyvumo mažinimui, o naudotos iš *Bacillus* rūšies mikroorganizmų išskirtos bakterinės proteazės yra tinkamos karvės pieno baltymų kazeinų skaldymui.



## 4. Rekomendacijų dalis

### Hidrolizuotų lieso pieno baltymų miltelių gamybos aparatūrinė schema



Eil.Nr.	Įrenginio pavadinimas
1	Autocisterna
2	Oro atskirtuvas
3	Įscentinis siurblys
4	Mechaninis filtras
5	Debitomatis
6	Plokštelinis šaldytuvas
7	Žalio pieno talpa
8	Lygio reguliatorius
9	Plokštelinis pasterizatorius-šaldytuvas
10	Separatorius
11	Baktofūga
12	Pasterizuoto pieno talpa
13	Grietinės talpa
14	Plokštelinis šilumokaitis
15	Temperatūros daviklis
16	pH daviklis
17	Fermentacijos talpa su maišykle
18	Vožtuvas
19	Natrio hidroksido talpa
20	Purkštuvinė džiovykla
21	Ciklonas
22	Maišas milteliams laikyti

4.1 pav. Principinė hidrolizuotų lieso pieno baltymų miltelių gamybos aparatūrinė schema

Išanalizavus gautus modifikuotų pieno baltymų alerginio aktyvumo rezultatus suprojektuota rekomenduojama principinė hidrolizuotų lieso pieno baltymų miltelių gamybos aparatūrinė schema, kuri yra pateikta 4.1 paveiksle.

Žalias pienas iš autocisternos 1 per oro atskirtuvą 2 išcentrinu siurbliu 3 tiekiamas į mechaninį filtrą 4 ir pratekęs per debitomatį 5 yra atšaldomas plokšteliame šaldytuve 6 ir sukaupiamas žalio pieno talpoje 7. Iš žalio pieno talpos 7 išcentrinu siurbliu 3 pienas yra tiekiamas į lygio reguliatorių 8. Toliau išcentrinu siurbliu 3 iš lygio reguliatoriaus 8 pienas yra tiekiamas į plokštelinį pasterizatorių-šaldytuvą 9. Čia pienas pašildomas iki separavimui tinkamos temperatūros ir tiekiamas į separatorių 10. Separavimo metu atsiskirta grietinėlė yra atšaldoma plokšteliame šaldytuve 6 ir sukaupiamą grietinėlės talpoje 13, o liesas pienas tiekiamas į baktofūgą 11, kurioje iš pieno yra pašalinamos bakterijos. Po baktofūgavimo liesas pienas yra tiekiamas atgal į plokštelinį pasterizatorių-šaldytuvą 9 ir pasterizuojamas. Pasterizuotas pienas atšaldomas plokšteliame pasterizatoriuje-šaldytuve 9 ir sukaupiamas pasterizuoto pieno talpoje 12. Tokiu būdu gaunamas pasterizuotas liesas pienas A.

Toliau gautas pasterizuotas liesas pienas A yra pašildomas iki 37 °C fermentinei hidrolizei tinkamos temperatūros plokšteliame šilumokaityje 14. Tuomet išcentrinu siurbliu 3 liesas pienas tiekiamas į fermentacijos talpą su maišykle 17. Užpildžius šią talpą yra įdedamas fermentas tripsinas. Fermentinės hidrolizės reakcijos tirpalo temperatūra yra sekama naudojant temperatūros daviklį 15, o reakcijos mišinio pH vertė reguliuojama stebint pH daviklio 16 duomenis. Pasikeitus pH vertėms atidaromas vožtuvas 18 ir tiekiamas natrio hidroksido tirpalas iš talpos 19 į fermentacijos talpą su maišykle 17. Baigus fermentinę hidrolizę, tirpalas iš fermentacijos talpą su maišykle 17 yra tiekiamas į plokštelinį pasterizatorių-šaldytuvą 9. Fermentai yra inaktyvuojami išlaikant tirpalą 90 °C temperatūroje 15 min. Po to, hidrolizuotas liesas pienas yra atšaldomas iki 65–70 °C ir tiekiamas į purkštuvinę džiovyklą 20. Toliau gauti milteliai yra tiekiami į cikloną 21 ir iš šio ciklono tiekiami fasuoti į maišus, skirtus milteliams laikyti 22. Tokiu būdu yra pagaminami hidrolizuoti lieso pieno baltymų milteliai.

## Išvados

1. Baigiamajame magistro projekte apžvelgti ir įvertinti pieno baltymų modifikavimui, siekiant sumažinti jų alerginį aktyvumą, naudojami biotechnologiniai metodai tokie kaip ultrafiltravimas ir fermentinė hidrolizė.
2. Atliktas nemodifikuotų pieno baltymų alerginio aktyvumo vertinimas naudojant imuno chromatografinę testą, skirtą pieno alergenams identifikuoti. Nustatyta, kad nemodifikuoti lieso pieno baltymai ir komercinis kazeinas pasižymi alerginiu aktyvumu, kadangi jų testas buvo teigiamas, o s\_IgE tyrimas patvirtino, kad šie baltymai pasižymi stipriu alerginiu aktyvumu.
3. Įvykdytas pieno baltymų modifikavimas taikant membraninės filtracijos procesą ultrafiltraciją naudojant 30 kDa membranas. Nustatyta, kad toks būdas yra tinkamas naudoti išrūgų baltymų izoliatui ir hidrolizuotų išrūgų baltymų koncentratui, nes ultrafiltruojant šiuos bandinius susidarė didžiausias permeato kiekis, o ELISA testas patvirtino, kad per šias membranas prasiskverbia baltymai.
4. Atliktas lieso pieno baltymų, išrūgų baltymų ir micelinio kazeino modifikavimas taikant fermentinę hidrolizę naudojant proteazes everlazę, esperazę, savinazę ir tripsiną. Nustatyta, kad maksimalios hidrolizės laipsnio reikšmės pasiektos naudojant fermentą tripsiną, o gauti rezultatai atitinkamai buvo tokie: 7,13 %, 6,71 % ir 7,08 %. Tai rodo, kad tripsinas yra tinkamiausias fermentas siekiant hidrolizuoti pieno baltymus.
5. Įvertintas fermentinės hidrolizės būdu modifikuotų pieno baltymų alerginis aktyvumas taikant imuno chromatografinę testą. Iš gautų rezultatų nustatyta, kad proteazės everlazė, esperazė ir savinazė yra tinkamos pieno baltymams kazeinams skaldyti, bet netinkamos išrūgų baltymams modifikuoti. Atliktas įvertinimas rodo, kad naudotos proteazės geba iš dalies sumažinti pieno baltymų alerginį aktyvumą.
6. Pateikta rekomenduojama principinė hidrolizuotų lieso pieno baltymų naudojant fermentą tripsiną gamybos aparatūrinė schema.

## Literatūros sąrašas

1. WRÓBLEWSKA, B., et al. Increased prevalence of eating disorders as a biopsychosocial implication of food allergy. *PLoS One* [interaktyvus]. 2018, 13, 1-19 [žiūrėta 2019-09-10]. Prieiga per doi: [10.1371/journal.pone.0198607](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198607).
2. European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Global Atlas of Allergy [interaktyvus]. 2014 [žiūrėta 2019-09-10]. Prieiga per: <http://www.eaaci.org/GlobalAtlas/GlobalAtlasAllergy.pdf>
3. ZUBERBIER, T., et al. Economic burden of inadequate management of allergic diseases in the European Union: a GA(2) LEN review. *Allergy* [interaktyvus]. 2014, 69, 1275-1279 [žiūrėta 2019-09-10]. Prieiga per doi: [10.1111/all.12470](https://doi.org/10.1111/all.12470).
4. ABBRING, S., et al. Raw cow's milk consumption and allergic diseases – The potential role of bioactive whey proteins. *European Journal of Pharmacology* [interaktyvus]. 2019, 843, 55-65 [žiūrėta 2019-09-10]. Prieiga per doi: [10.1016/j.ejphar.2018.11.013](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.11.013).
5. CANANI, R.B., et al. Gut Microbiome as Target for Innovative Strategies Against Food Allergy. *Frontiers in Immunology* [interaktyvus]. 2019, 10, 191 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.3389/fimmu.2019.00191](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00191).
6. MONACI, L. ir kt. Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends in Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2010, 21, 272-283 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.1016/j.tifs.2010.02.003](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.02.003).
7. DAREWICZ, M., DZIUBA, B., MINKIEWICZ, P. and J. DZIUBA. The preventive potential of milk and colostrum proteins and protein fragments. *Food Reviews International* [interaktyvus]. 2011, 27, 357-388 [žiūrėta 2019-09-10]. Prieiga per doi: [10.1080/87559129.2011.563396](https://doi.org/10.1080/87559129.2011.563396).
8. HRISTOV, P., et al. Measurement of Casein Micelle Size in Raw Dairy Cattle Milk by Dynamic Light Scattering. *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects*. 2016, 2, 19-32 [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per doi: [10.5772/62779](https://doi.org/10.5772/62779).
9. DAUKŠAS, Kazys, et al. *Chemijos terminų aiškinamasis žodynas*. Mokslo ir enciklopedijų leidybos institutas. Vilnius: Spindulys, 2003. 659 p. ISBN 5420015102.
10. GUDONIS, Aloyzas. *Pieno gaminių technologija vadovėlis*. Kaunas: Technologija, 2014. 345 p. ISBN 9786090206966.
11. LI, X., et al. Identification of IgE and IgG epitopes on native Bos d 4 allergen specific to allergic children. *Food & Function* [interaktyvus]. 2016, 7, 2996-3005 [žiūrėta 2019-09-10]. Prieiga per doi: [10.1039/c6fo00416d](https://doi.org/10.1039/c6fo00416d).
12. *UniProtKB - P00711 (LALBA\_BOVIN)* [interaktyvus]. 2019\_08 versija [žiūrėta 2019-09-10]. Prieiga per: [uniprot.org/uniprot/P00711](http://uniprot.org/uniprot/P00711).
13. *P00711 (LALBA\_BOVIN) Bos taurus (Bovine)* [interaktyvus]. 2000 [žiūrėta 2019-09-10]. Prieiga per: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P00711?csm=810CDB1145901405>.
14. WYATT, A.R., et al. Protease-activated alpha-2-macroglobulin can inhibit amyloid formation via two distinct mechanisms. *FEBS Lett* [interaktyvus]. 2013, 587, 398-403 [žiūrėta 2019-09-13]. Prieiga per doi: [10.1016/j.febslet.2013.01.020](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.020).
15. *Bos taurus String* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2019-09-13]. Prieiga per: <https://string-db.org/network/9913.ENSBTAP00000007701>.
16. GAUDET, P., et al. Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in Bioinformatics* [interaktyvus]. 2011, 12, 449-462 [žiūrėta 2019-09-13]. Prieiga per doi: [10.1093/bib/bbr042](https://doi.org/10.1093/bib/bbr042).

17. MATSUO, H., YOKOOJI, T. and T.TAOGOSHI. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergology International* [interaktyvus]. 2015, 64, 332-343 [žiūrėta 2019-09-13]. Prieiga per doi: [10.1016/j.alit.2015.06.009](https://doi.org/10.1016/j.alit.2015.06.009).
18. *UniProtKB - P02754 (LACB\_BOVIN)* [interaktyvus]. 2019\_08 versija [žiūrėta 2019-09-13]. Prieiga per: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02754>.
19. *P02754 (LACB\_BOVIN) Bos taurus (Bovine)* [interaktyvus]. 2008 [žiūrėta 2019-09-13]. Prieiga per: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P02754?csm=225F10A78C63A6B2>.
20. NIEMI, M., et al. Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the beta-lactoglobulin allergen. *Structure* [interaktyvus]. 2007, 15, 1413-1421 [žiūrėta 2019-09-16]. Prieiga per doi: [10.1016/j.str.2007.09.012](https://doi.org/10.1016/j.str.2007.09.012).
21. WU, S.Y., et al. Beta-lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *Journal of Biological Chemistry* [interaktyvus]. 1999, 274, 170-174 [žiūrėta 2019-09-16]. Prieiga per doi: [10.1074/jbc.274.1.170](https://doi.org/10.1074/jbc.274.1.170).
22. *UniProtKB - P02769 (ALBU\_BOVIN)* [interaktyvus]. 2019\_08 versija [žiūrėta 2019-09-16]. Prieiga per: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02769>.
23. *P02769 (ALBU\_BOVIN) Bos taurus (Bovine)* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2019-09-16]. Prieiga per: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P02769>.
24. MAJOREK, K.A., et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology* [interaktyvus]. 2012, 52 (3-4), 174-182 [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per doi: [10.1016/j.molimm.2012.05.011](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011).
25. *Bos taurus String* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2019-09-13]. Prieiga per: <https://string-db.org/network/9913.ENSBTAP00000022763>.
26. *UniProtKB - P02662 (CASA1\_BOVIN)* [interaktyvus]. 2019\_08 versija [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02662>.
27. *ModBase: Database of Comparative Protein Structure Models* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per: [https://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase/cgi/model\\_details.cgi?queryfile=1567596023\\_2241&searchmode=default&displaymode=moddetail&referer=yes&snpflag=&](https://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase/cgi/model_details.cgi?queryfile=1567596023_2241&searchmode=default&displaymode=moddetail&referer=yes&snpflag=&)
28. CARROTTA, R., et al. Inhibiting effect of  $\alpha_{s1}$ -casein on  $\alpha\beta_{1-40}$  fibrillogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [interaktyvus]. 2012, 1820, 124-132 [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per doi: [10.1016/j.bbagen.2011.11.010](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.11.010).
29. GUPTA, A., et al. Antioxidant peptides isolated from cheddar cheese made with adjunct culture *Lactobacillus casei* ssp. *Casei* 300. *Milchwissenschaft* [interaktyvus]. 2010, 65, 396-399 [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per: ResearchGate.
30. *Bos taurus String* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per: <https://string-db.org/network/9913.ENSBTAP00000010119>.
31. *UniProtKB - P02663 (CASA2\_BOVIN)* [interaktyvus]. 2019\_08 versija [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02663>.
32. HEEGAARD, C.W., RASMUSSEN, L.K. and P.A. ANDREASAN. The plasminogen activation system in bovine milk: differential localization of tissue-type plasminogen activator and urokinase in milk fractions is caused by binding to casein and urokinase receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [interaktyvus]. 1994, 1222 (1), 45-55 [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per doi: [10.1016/0167-4889\(94\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90023-X).
33. *P02663 (CASA2\_BOVIN) Bos taurus (Bovine)* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P02663?csm=81E7408AF1C12F7C>.

34. UniProtKB - P02666 (CASB\_BOVIN) [interaktyvus]. 2019\_08 versija [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02666>.
35. ModBase: Database of Comparative Protein Structure Models [interaktyvus]. 2011 [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per: [https://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/model\\_details.cgi?queryfile=1567600538\\_2928&searchmode=default&displaymode=moddetail&referer=yes&snpflag=&](https://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/model_details.cgi?queryfile=1567600538_2928&searchmode=default&displaymode=moddetail&referer=yes&snpflag=&)
36. UniProtKB - P02668 (CASK\_BOVIN) [interaktyvus]. 2019\_08 versija [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02668>.
37. ModBase: Database of Comparative Protein Structure Models [interaktyvus]. 2015 [žiūrėta 2019-09-20]. Prieiga per: [https://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/model\\_details.cgi?queryfile=1567600652\\_4741&searchmode=default&displaymode=moddetail&referer=yes&snpflag=&](https://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/model_details.cgi?queryfile=1567600652_4741&searchmode=default&displaymode=moddetail&referer=yes&snpflag=&)
38. NOWAK-WEGRZYN, A., et al. Food allergy and the gut. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* [interaktyvus]. 2017, 14, 241-257 [žiūrėta 2019-09-23]. Prieiga per doi: [10.1038/nrgastro.2016.187](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.187).
39. SATO, S., et al. How to diagnose food allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* [interaktyvus]. 2018, 18, 214-221 [žiūrėta 2019-09-23]. Prieiga per doi: [10.1097/ACI.0000000000000441](https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000441).
40. NACHSHON, L., et al. Food allergy to previously tolerated foods: course and patient characteristics. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* [interaktyvus]. 2018, 121, 77-81 [žiūrėta 2019-09-23]. Prieiga per doi: [10.1016/j.anai.2018.04.012](https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.04.012).
41. THAM, E.H. and Y.M.D. LEUNG. How Different Parts of the World Provide New Insights Into Food Allergy. *Allergy, Asthma and Immunology Research* [interaktyvus]. 2018, 10, 290-299 [žiūrėta 2019-09-23]. Prieiga per doi: [10.4168/aaair.2018.10.4.290](https://doi.org/10.4168/aaair.2018.10.4.290).
42. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal* [interaktyvus]. 2014, 12 (11), 1-286 [žiūrėta 2019-09-23]. Prieiga per doi: [10.2903/j.efsa.2014.389](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.389).
43. KIM, F.J., et al. Diagnostic accuracy, risk assessment, and cost-effectiveness of component-resolved diagnostics for food allergy: A systematic review. *Allergy* [interaktyvus]. 2018, 73, 1609-1621 [žiūrėta 2019-09-23]. Prieiga per doi: [10.1111/all.13399](https://doi.org/10.1111/all.13399).
44. UNIVERSITY OF PORTSMOUTH. Literature searches and reviews related to the prevalence of food allergy in Europe. EFSA supporting publication 2013:EN-506, 343 p.
45. BERNI CANANI R., et al. The diagnosis of food allergy in children. *Current Opinion in Pediatrics* [interaktyvus]. 2008, 20, 584-589 [žiūrėta 2019-09-23]. Prieiga per doi: [10.1097/MOP.0b013e32830c6f02](https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32830c6f02).
46. ASHLEY, J., et al. Development of a  $\beta$ -Lactoglobulin Sensor Based on SPR for Milk Allergens Detection. *Biosensors. Biosensors (Basel)* [interaktyvus]. 2018, 8 (32), 1-11 [žiūrėta 2019-09-23]. Prieiga per doi: [10.3390/bios8020032](https://doi.org/10.3390/bios8020032).
47. BU, G., et al. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Science and Technology* [interaktyvus]. 2013, 93, 211-223 [žiūrėta 2019-09-23]. Prieiga per doi: [10.1007/s13594-013-0113-x](https://doi.org/10.1007/s13594-013-0113-x).
48. ELIZUR, A., et al. Natural course and risk factors for persistence of IgE-mediated cow's milk allergy. *Journal of Pediatrics* [interaktyvus]. 2012, 161, 482-487 [žiūrėta 2019-09-26]. Prieiga per doi: [10.1016/j.jpeds.2012.02.028](https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.02.028).

49. LI, S., et al. *Aspergillus oryzae* reduces IgE binding ability of allergenic egg white proteins. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering* [interaktyvus]. 2018, 5, 373-381 [žiūrėta 2019-09-26]. Prieiga per doi: [10.15302/J-FASE-2018210](https://doi.org/10.15302/J-FASE-2018210).
50. DAHDAH, L., et al. How to predict and improve prognosis of food allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* [interaktyvus]. 2018, 18, 228-233 [žiūrėta 2019-09-26]. Prieiga per doi: [10.1097/ACI.0000000000000446](https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000446).
51. RAHAMAN, T., VASILJEVIC, T. and L.RAMCHANDRAN. Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. *Trends in Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2016, 49, 24-34 [žiūrėta 2019-09-26]. Prieiga per doi: [10.1016/j.tifs.2016.01.001](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.001).
52. BU, G., et al. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Science and Technology* [interaktyvus]. 2013, 93, 211-223 [žiūrėta 2019-09-26]. Prieiga per doi: [10.1007/s13594-013-0113-x](https://doi.org/10.1007/s13594-013-0113-x).
53. KLEBER, N., MAIER, S. and J. HINRICHS. Antigenic response of bovine  $\beta$ -lactoglobulin influenced by ultrahigh pressure treatment and temperature. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [interaktyvus]. 2007, 8, 39-45 [žiūrėta 2019-09-26]. Prieiga per doi: [10.1016/j.ifset.2006.05.001](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.05.001).
54. MUNIR, M., et al. Effects of high pressure, microwave and ultrasound processing on proteins and enzyme activity in dairy systems — A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* [interaktyvus]. 2019, 57, 1-14 [žiūrėta 2019-09-26]. Prieiga per doi: [10.1016/j.ifset.2019.102192](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102192).
55. GOYAL, A., et al. High pressure processing and its impact on milk proteins: A review. *Research & Reviews: Journal of Dairy Science and Technology* [interaktyvus]. 2018, 2 (1), 12-20 [žiūrėta 2019-09-26]. ISSN: 2319-3409.
56. WU, X., et al. Reducing the allergenic capacity of  $\beta$ -lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2018, 256, 427-434 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2018.02.158](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.158).
57. HATTORI, M., et al. Reduced immunogenicity of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran. *Bioconjugate Chemistry* [interaktyvus]. 2000, 11, 84-93 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.1021/bc990096q](https://doi.org/10.1021/bc990096q).
58. CHIU, H-C., LIN, C-W. and S-Y. SUEN. Isolation of lysozyme from hen egg albumen using glass fiber-based cation-exchange membranes. *Journal of Membrane Science* [interaktyvus]. 2007, 290, 259-266 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.1016/j.memsci.2006.12.042](https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.12.042).
59. LIU, Z., et al. Ultrasound improves the renneting properties of milk. *Ultrasonics Sonochemistry* [interaktyvus]. 2014, 21(6), 2131-2137 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.1016/j.molimm.2012.05.011](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011).
60. YANJUN, S., et al. Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate. *Journal of Food engineering* [interaktyvus]. 2014, 124, 11-18 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.1016/j.jfoodeng.2013.09.013](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.09.013).
61. DENERY-PAPINI, S., et al. Allergy to deamidated gluten in patients tolerant to wheat: specific epitopes linked to deamidation. *Allergy* [interaktyvus]. 2012, 67, 1023-1032 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.1111/j.1398-9995.2012.02860.x](https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02860.x).
62. STEFANOVIĆ, A.B., et al. Influence of ultrasound probe treatment time and protease type on functional and physicochemical characteristics of egg white protein hydrolysates. *Poultry Science* [interaktyvus]. 2018, 97, 2218-2229 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.3382/ps/pey055](https://doi.org/10.3382/ps/pey055).

63. PASCHKE, A. Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Molecular Nutrition and Food Research* [interaktyvus]. 2009, 53, 959-962 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.1002/mnfr.200800187](https://doi.org/10.1002/mnfr.200800187).
64. EL-GHAISH, S., et al. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2011, 22, 509–516 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.1016/j.tifs.2011.05.003](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.05.003).
65. BU, G., et al. Effects of fermentation by lactic acid bacteria on the antigenicity of bovine whey proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [interaktyvus]. 2010, 90, 2015- 2020 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.1002/jsfa.4046](https://doi.org/10.1002/jsfa.4046).
66. MAQUEDA-MARTINEZ, D., et al. Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion. *Proteomics in Foods* [interaktyvus]. 2012 , 2, 21-50 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.1007/978-1-4614-5626-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5626-1_2).
67. DATTA, D., et al. Separation of ovalbumin from chicken egg white using two-stage ultrafiltration technique. *Separation and Purification Technology* [interaktyvus]. 2009, 66, 353-361 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.1016/j.seppur.2008.12.016](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.12.016).
68. ARUNKUMAR, A. and M.R.ETZEL. Milk Protein Concentration Using Negatively Charged Ultrafiltration Membranes. *Foods* [interaktyvus]. 2018, 134, 1-10 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.3390/foods7090134](https://doi.org/10.3390/foods7090134).
69. HOLLAND, B., KACKMAR, J. and M.CORREDIG. Isolation of a whey fraction rich in  $\alpha$ -lactalbumin from skim milk using tangential flow filtration. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2012, 95, 5604–5607 [žiūrėta 2019-09-30]. Prieiga per doi: [10.3168/jds.2012-5399](https://doi.org/10.3168/jds.2012-5399).
70. GAVAZZI-APRIL, C., et al. Preparation of milk protein concentrates by ultrafiltration and continuous diafiltration: Effect of process design on overall efficiency. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2018, 101, 9670-9679 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.3168/jds.2018-14430](https://doi.org/10.3168/jds.2018-14430).
71. KRISTOFFERSEN, K.A., et al. Average molecular weight, degree of hydrolysis and dry-film FTIR fingerprint of milk protein hydrolysates: Intercorrelation and application in process monitoring. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2020, 310, 125800 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2019.125800](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125800).
72. TSUCHIDA, O., et al. An Alkaline Proteinase of an Alkalophilic *Bacillus* sp. *Current Microbiology* [interaktyvus]. 1986, 14, 7-12 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.1007/BF01568094](https://doi.org/10.1007/BF01568094).
73. SHU, G., et al. Effect of Different Proteases on the Degree of Hydrolysis and Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory Activity in Goat and Cow Milk. *Biomolecules* [interaktyvus]. 2018, 8, 101 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.3390/biom8040101](https://doi.org/10.3390/biom8040101).
74. DENG, Y., GRUPPEN, H. and P.A.WIERENGA. Comparison of Protein Hydrolysis Catalyzed by Bovine, Porcine, and Human Trypsins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2018, 66, 4219-4232 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.1021/acs.jafc.8b00679](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00679).
75. EBERHARDT, A., et al. Influence of the degree of hydrolysis on the bioactive properties of whey protein hydrolysates using Alcalase®. *International Journal of Dairy Technology* [interaktyvus]. 2019, 72, 573-584 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.1111/1471-0307.12606](https://doi.org/10.1111/1471-0307.12606).
76. BORKAR, P.S. Purification and immobilization of thermostable serine alkaline protease from *Bacillus subtilis*. *The Pharma Innovation Journal* [interaktyvus]. 2018, 7, 622-626 [žiūrėta 2020-02-03]. ISSN 2349-8242.



77. TAVANO, O.L. Review. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [interaktyvus]. 2013, 90, 1-11 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.1016/j.molcatb.2013.01.011](https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011).
78. ALUKO, R.E. Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. *Proteins in Food Processing (Second Edition)*. Woodhead Publishinh Series in Food Science, Technology and Nutrition. 2018, 15, 389-412. Prieiga per doi: [10.1016/B978-0-08-100722-8.00016-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00016-4).
79. NIELSEN, P.M., PETERSEN, D. and C.DAMBMANN. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology* [interaktyvus]. 2006, 66, 642-646 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x).
80. KIEWET, M.B.G., et al. Partially hydrolyzed whey proteins prevent clinical symptoms in a cow's milk allergy mouse model and enhance regulatory T and B cell frequencies. *Molecular Nutrition & Food Research* [interaktyvus]. 2017, 61, 1700340 [žiūrėta 2020-02-03]. Prieiga per doi: [10.1002/mnfr.201700340](https://doi.org/10.1002/mnfr.201700340).
81. YADAV, J.S.S., et al. Research review paper. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances* [interaktyvus]. 2015, 33, 756-774 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per doi: [10.1016/j.biotechadv.2015.07.002](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002).
82. FERNANDEZ, A. and P.KELLY. pH-stat vs. free-fall pH techniques in the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2016, 199, 409-415 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2015.12.043](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.043).
83. UDENCHUKWU, M.C., et al. Influence of structural and surface properties of whey-derived peptides on zinc-chelating capacity, and in vitro gastric stability and bioaccessibility of the zinc-peptide complexes. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2018, 240, 1227-1232 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2017.08.063](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.063).
84. WANG, J., et al. Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. *Chemistry Central Journal* [interaktyvus]. 2013, 7, 62 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per doi: [10.1186/1752-153X-7-62](https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-62).
85. NORRIS, R., et al. Characterisation of the hydrolytic specificity of *Aspergillus niger* derived prolyl endoproteinase on bovine  $\beta$ -casein and determination of ACE inhibitory activity. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2014, 156, 29-36 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodchem.2014.01.056](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.056).
86. SRINIVAS, S. and V.PRAKASH. Bioactive Peptides from Bovine Milk  $\alpha$ -Casein: Isolation, Characterization and Multifunctional properties. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* [interaktyvus]. 2010, 16, 7-15 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per doi: [10.1007/s10989-009-9196-x](https://doi.org/10.1007/s10989-009-9196-x).
87. CONTESINI, F.J., de MELO, R.R. and H.H. SATO. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology* [interaktyvus]. 2018, 38, 321-334 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per doi: [10.1080/07388551.2017.1354354](https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354).
88. LI, Y. and M.CORREDIG. Calcium release from milk concentrated by ultrafiltration and diafiltration. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2014, 97, 5294-5302 [žiūrėta 2020-02-10]. Prieiga per doi: [10.3168/jds.2013-7567](https://doi.org/10.3168/jds.2013-7567).
89. RAY, S., et al. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience* [interaktyvus]. 2016, 13, 76-83 [žiūrėta 2020-02-10]. Prieiga per doi: [10.1016/j.fbio.2015.12.009](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009).

90. EL-SALAM, M.H. and S. EL-SHIBINY. Reduction of Milk Protein Antigenicity by Enzymatic Hydrolysis and Fermentation. A Review. *Food Reviews International* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2020-02-10]. Prieiga per doi: [10.1080/87559129.2019.1701010](https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1701010).
91. MASLIN, K., et al. Palatability of hypoallergenic formulas for cow's milk allergy and healthcare professional recommendation. *Food Allergy & Anaphylaxis* [interaktyvus]. 2018, 29, 857-862 [žiūrėta 2020-02-10]. Prieiga per doi: [10.1111/pai.12979](https://doi.org/10.1111/pai.12979).
92. CABANA, M. The Role of Hydrolyzed Formula in Allergy Prevention. *Annals of Nutrition & Metabolism* [interaktyvus]. 2017, 70, 38-45 [žiūrėta 2020-02-10]. Prieiga per doi: [10.1159/000460269](https://doi.org/10.1159/000460269).
93. MADX Macro Array Diagnostics [interaktyvus]. 2020, [žiūrėta 2020-02-10]. Prieiga per: <https://www.macroarraydx.com/alex>
94. CHATCHATEE, P., et al. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on  $\alpha_{s1}$ -casein: Differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [interaktyvus]. 2001, 107, 379-383 [žiūrėta 2020-02-10]. Prieiga per doi: [10.1067/mai.2001.112372](https://doi.org/10.1067/mai.2001.112372).
95. WANG, J., et al. Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [interaktyvus]. 2010, 125, 695-702 [žiūrėta 2020-02-10]. Prieiga per doi: [10.1016/j.jaci.2009.12.017](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.017).