

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Justinas Tamulionis

**RŪGŠČIŲ IŠRŪGŲ BALTYMŲ KOMPLEKSŲ SU
POLISACHARIDAIŠ SUDARYMAS IR SAVYBĖS**

Baigiamasis magistro darbas

Vadovas

Prof. dr. Daiva Leskauskaitė

KAUNAS, 2015

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS
MAISTO MOKSLO IR TECHNOLOGIJOS KATEDRA**

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(parašas) Doc. dr. Loreta Bašinskienė

(data)

**RŪGŠČIŲ IŠRŪGŲ BALTYMŲ KOMPLEKSŲ
SU POLISACHARIDAIŠ SUDARYMAS IR
SAVYBĖS**

Baigiamasis magistro darbas

Maisto produktų technologijos programa (kodas M1026L21)

Vadovas

(parašas) Prof. dr. Daiva Leskauskaitė

(data)

Recenzentas

(parašas) Doc. dr. Jonas Damašius

(data)

Projektą atliko

(parašas) Justinas Tamulionis

(data)



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Justinas Tamulionis

(Studento vardas, pavardė)

Maisto produktų technologijos programa, 621E40002

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

Baigiamojo projekto „Pavadinimas“
AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 15 m. birželio 02 d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano **Justino Tamulionio** baigiamasis projektas „Rūgščių išrūgų baltymų kompleksų su polisacharidais sudarymas ir savybės“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Tamulionis J. Rūgščių išrūgų baltymų kompleksų su polisacharidais sudarymas ir savybės. Magistro baigiamasis projektas / vadovas *prof. dr. Daiva Leskauskaitė*; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, Maisto mokslo ir technologijos katedra.

Kaunas, 2015. 61 psl.

SANTRAUKA

Šio darbo tikslas – nustatyti rūgščių išrūgų baltymų pokyčius išrūgų laikymo metu ir išanalizuoti jų išgavimo iš išrūgų galimybes kompleksuojant su polisacharidais.

Tyrimų metu atlikta: a) rūgščių išrūgų po varškės gamybos azoto junginių sudėties bei mikrobiologinių rodiklių pokyčių analizė, laikant skirtingose aplinkos temperatūrose (6°C ir 18°C); b) išrūgų baltymų ir anijoninio bei katijoninio polisacharido tirpalų mišinių termodinaminio nesuderinamumo tyrimai, esant skirtingam išrūgų baltymų šaltiniui, biopolimerų santykiui mišiniuose ir mišinio pH, siekiant nustatyti sąlygas, kuriomis išrūgų baltymai ir polisacharidai sudaro kompleksus; c) rūgščių išrūgų baltymų – polisacharidų kompleksų analizė elektroforezės metodu ir užrašant vidutinio ilgio IR absorbcijos spektrus; d) rūgščių išrūgų baltymų – polisacharidų kompleksų tirpumo ir jų gebėjimo stabilizuoti A/V emulsijas analizė.

Nustatyta, kad per pirmas 24 rūgščių išrūgų laikymo valandas vyko intensyvi baltymų hidrolizė, kada baltyminio azoto kiekis sumažėjo, o nebaltyminio azoto kiekis padidėjo, tuo tarpu išrūgų pH pokyčiai buvo nežymūs. Tai patvirtino mikrobiologiniai tyrimai, kurie parodė, kad pienarūgščių bakterijų kiekis rūgščiose išrūgose laikymo metu ženkliai sumažėjo, o proteolitinių bakterijų padidėjo.

Nustatyta, kad dėl elektrostatinės sąveikos tarp rūgščių išrūgų baltymų ir karboksimetilceliuliozės kompleksai susidaro esant tirpalų mišinių pH 3, kai santykis tarp baltymų ir polisacharido 1:1. Tuo tarpu kompleksai tarp rūgščių išrūgų baltymų ir chitozano susidaro esant tirpalų mišinių pH 11, kai santykis tarp baltymų ir polisacharido 1:1. Kompleksų susidarymą tarp rūgščių išrūgų baltymų ir polisacharidų patvirtino elektroforezės ir vidutinio ilgio IR absorbcijos spektrų rezultatai. Gauti rūgščių išrūgų kompleksai geresniu tirpumu pasižymėjo, kai kompleksavimui buvo naudojama karbokdimetilceliuliozė. Nustatyta, kad didėjant šių kompleksų koncentracijai emulsijose, emulsijų stabilumas didėja.

Tamulionis J. Complexation of acid whey proteins with polysaccharides and their properties. Master thesis / supervisor Assoc prof. Dr. Daiva Leskauskaitė; Kaunas University of technology, Faculty of Chemical Technology, Department of food science and technology. Kaunas, 2015. 61 p.

SUMMURY

The aim of this work is to identify the changes of the acid whey protein during the storage and to analyze the possibilities of their extractions from whey by forming complexes with polysaccharides.

The following researches were carried on: a) analysis of composition of nitrogen compounds and microbiological properties of an acid whey obtained after the curd production during storage at different temperatures (6 °C and 18 °C); b) determination of thermodynamic incompatibility between whey proteins and anionic or cationic polysaccharides in the mixtures of their solutions at different pH and ratio between proteins and polysaccharides, seeking to find the conditions of complexes formation between biopolymers; the source of proteins was different in this analysis as well; c) analysis of whey proteins-polysaccharides complexes by electrophoresis method and IR absorbance spectres; d) analysis of solubility of an acid whey protein - polysaccharide complexes and their ability to stabilize the O/W emulsion.

It was found that the intensive hydrolysis of acid whey proteins took place during the first 24 hours of storage, when the highest decrease in protein nitrogen content and the increase in non-protein nitrogen content were detected. At the same time the changes of pH of the acid whey were insignificant during storage. These findings were proved by the microbiological studies or acid whey which has shown that the amount of lactic acid bacteria significantly decreased and the proteolytic bacteria content increased during the storage of acid whey.

It was found that due to the electrostatic forces between acid whey proteins and carboxymethylcellulose complexing process took place in the mixtures of solutions at pH 3, when the ratio between proteins and carboxymethylcellulose was 1:1. The complexes between acid whey proteins and chitosan were formed at pH 11, when the ratio between proteins and chitosan in the solutions mixture was 1:1. Acid whey complexing with polysaccharides was proved by the results of electrophoresis and IR absorbance spectres analysis. Derived whey acid complexes were better in solubility when carboxymethylcellulose was used for complexing. It was found that increasing the concentration of the complex in emulsions, the stability of the emulsion increases.

TURINYS

ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	9
1.1. Rūgščių ir saldžių išrūgų cheminės sudėties skirtumai.....	9
1.2. Išrūgų perdirbimo būdai ir gautų produktų panaudojimas.....	12
1.3. Polisacharidų panaudojimas kompleksams su išrūgų baltymais sudaryti.....	17
1.4. Baltymų ir polisacharidų kompleksų savybės.....	19
1.5. Baltymų – polisacharidų kompleksų funkcinės savybės	21
2. DARBO TIKSLAI IR UŽDAVINIAI	23
3. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI	24
3.1. Tyrimų objektai ir medžiagos	24
3.2. Tiriamojo darbo metu tirtų kompleksų gamyba.....	25
3.3. Išrūgų cheminės analizės metodai	27
3.4. Išrūgų konservavimas	27
3.5. Išrūgų mikrobiologinė analizė	28
3.6. Elektroforezė.....	29
3.7. IR spektroskopija	30
3.8. Fazių diagramų sudarymas	30
3.9. ξ potencialo nustatymas	31
3.10. Tirpumo nustatymas.....	31
3.11. Emulsijų sudarymas	31
3.12. Emulsijų stabilumo tyrimai.....	32
3.13. Reologinė analizė.....	32
3.14. Riebalų rutulėlių dydžio pasiskirstymo nustatymas	33
3.15. Statistinė analizė	33

4. Rezultatai ir jų aptarimas	34
4.1. Išrūgų savybių pokyčiai laikymo metu	34
4.1.1. Rūgščių išrūgų cheminė sudėtis.....	34
4.1.2. Fizikinių cheminių savybių kitimas laikymo metu.....	36
4.1.3. Mikrobiologinių rodiklių kitimas išrūgų laikymo metu	38
4.1.4. Fizikinių cheminių savybių kitimas konservuotose išrūgose laikymo metu	39
4.2. Išrūgų baltymų išskyrimas iš rūgščių išrūgų, sudarant kompleksus su polisacharidais	40
4.2.1. Išrūgų baltymų sąveika su karboksimetilceliulioze	41
4.2.2. Rūgščių išrūgų baltymų sąveika su karboksimetilceliulioze	43
4.2.3. Išrūgų baltymų sąveika su chitozanu	44
4.2.3. Rūgščių išrūgų baltymų sąveika su chitozanu	45
4.2.4. Išrūgų baltymų ir polisacharidų kompleksų elektroforezė ir IR spindulių absorbcija.....	47
4.2.5. Išrūgų baltymų ir polisacharidų kompleksų funkcinės savybės	50
4.2.6. Rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksų reologinės savybės.....	52
IŠVADOS	55
PADĖKA	56
LITERATŪROS SĄRAŠAS	57

ĮVADAS

Išrūgos – pieno produktas, liekantis darant iš pieno fermentinį sūrį, varškę, varškės sūrį, kazeiną. Dažniausiai jos susidaro perdirbant karvių, ožkų, avių ir kupranugarių pieną. Apie 90 % naudojamo pieno virsta išrūgomis sūrio gamybos procese. Rūgščios išrūgos yra atskiriamos po varškės susidarymo. Saldžios išrūgos susidaro, gaminant fermentinius sūrius. Lietuvos pieno perdirbimo įmonėse tik apie 21 % išrūgų yra perdirbama į išrūgų baltymų koncentratų, pieno cukrų, išrūgų miltelius ir kitus produktus. Išrūgas transportuojant gali pakisti jų sudėtis, todėl sūrių gamybos įmonėse, išrūgos yra džiovinamos. Gaunamas aukštos biologinės vertės, ilgą galiojimo laiką turintis produktas, kuris dažniausiai naudojamas gyvūnų šėrimui [40].

Saldžių išrūgų pagaminama žymiai daugiau nei rūgščių, todėl tolesniam jų perdirbimui skiriamas didesnis dėmesys. Tik pastaraisiais metais padidėjo susidomėjimas rūgščiomis išrūgomis, dėl jose gausiai esančių maistinių ir geromis funkcinėmis savybėmis pasižyminčių junginių.

Žinant, kad rūgščių išrūgų problema yra jų utilizavimas, pieno perdirbėjus skatina investuoti į tyrimus, nukreiptus į alternatyvų rūgščių išrūgų panaudojimą. Nuolat augantis įmonių susidomėjimas maisto produktų ekonominiais kaštais, motyvuoja maisto pramonę ir mokslininkus domėtis naujomis technologijomis, įgyvendinant rūgščių išrūgų platesnes panaudojimo galimybes pramonėje. Mokslininkai teigia, kad rūgščios išrūgos savo sudėtimi ir savybėmis nenusileidžia saldžioms išrūgoms. Rūgščiose išrūgose yra aukštos biologinės vertės baltymų, lengvai įsisavinamų mineralinių medžiagų, C, B grupės vitaminų. Dėl šių savybių dar labiau didėja dėmesys rūgščiomis išrūgomis.

Alternatyviam rūgščių išrūgų baltymų išskyrimui yra naudojamas ekonomiškai frakcionavimo būdas t.y. jų kompleksavimas su polisacharidais. Tai yra nekenksmingas aplinkai, mažų ekonominių kaštų reikalaujantis baltymų išgavimo būdas. Jis pasižymi geba keisti baltymų funkcines savybes (tirpumą, paviršiaus aktyvumą ir konformaciją). Gauti baltymų – polisacharidų kompleksai gali būti realizuojami maisto pramonėje emulsijoms stabilizuoti, produktų struktūrinėms ir funkcinėms savybėms gerinti.

Šio darbo tikslas – nustatyti rūgščių išrūgų baltymų pokyčius išrūgų laikymo metu ir išanalizuoti jų išgavimo iš išrūgų galimybes kompleksuojant su polisacharidais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Rūgščių ir saldžių išrūgų cheminės sudėties skirtumai

Išrūgos – tai skystis, vadinamas pieno serumu arba pieno permeatu, liekantis po pieno surauginimo ar sutraukinimo. Išrūgos yra šalutinis sūrio, varškės arba kazeino gamybos produktas, kuris gali būti naudojamas tolesniam perdirbimui ir įvairių produktų gamybai. Pieno pramonėje išrūgos skirstomos į saldžias ir rūgščias [1].

Saldžios išrūgos gaunamos gaminant fermentinius sūrius tokius kaip Čederio, Gouda, Tilžės ar Ementalio sūrius.

Rūgščios išrūgos yra šalutinis produktas, kuris gaunamas pagaminus rūgščius pieno produktus tokius kaip varškė ir varškės sūris.

Pagrindinės sudedamosios išrūgų baltymų dalys yra β – laktaglobulinas ir α – laktalbuminas, jie sudaro apie 70 – 80% visų išrūgų baltymų. β – laktaglobulinas yra pagrindinis išrūgų baltymas, kuris sudaro apie 50% visų išrūgų baltymų ir jo savybės dominuoja išrūgų baltymuose. β – laktaglobulinas yra globulininis, monomero molekulinė masė apie 18,4 kDa, tačiau piene dažniausiai būna dimerų formos. β – laktaglobulinas sudarytas iš 162 aminorūgščių liekanų, turi du disulfidinius ryšius ir vieną tiolo grupę, kuri normalioje būsenoje yra neaktyvi [29, 45].

α – laktalbuminas sudaro 25% visų išrūgų baltymų. Jį sudaro 123 aminorūgščių liekanos, struktūra stabilizuota keturiais disulfidiniais tilteliais, o molekulinė masė yra 14,2 kDa. Spėjama, kad α – laktalbuminas yra pagrindinis virinto pieno kvapo komponentas. Biologinė α – laktalbumino funkcija yra kaip kofermentui dalyvauti laktozės sintezėje [40].

Kraujo serumo albuminas sudaro mažiausią išrūgų baltymų dalį, o į pieną patenka iš laktuojančių gyvūnų kraujo serumo. Tai didelė molekulė, turinti tris globulines sritis, todėl yra pailgos formos. Turi 17 – S – S ryšių ir vieną laisvą – SH grupę. Kraujo serumo albuminas turi daug lizino ir cisteino, o jo izoelektrinis taškas pasiekiamas esant pH 4,7 [39].

Ali K. Alsaed ir kt. atliko cheminius ir fizikinius saldžių ir rūgščių išrūgų savybių tyrimus [1]. Iš šešių tarptautinių pieno perdirbimo įmonių buvo imami bandiniai ir analizuojami jų skirtumai. Matomi akivaizdūs rūgščių išrūgų tarpusavio skirtumai (pagal sausųjų medžiagų kiekį, kurios svyruoja nuo 6,13% iki 7,22%). Toks didelis svyravimas nepastebimas saldžiose išrūgose (nuo 4,59% iki 7,45%) [1].

1 lentelėje pateikta rūgščių ir saldžių išrūgų cheminė sudėtis ir pH. Rūgščių išrūgų pH svyruoja nuo 3,57 iki 4,34, o saldžių išrūgų nuo 6,02 iki 6,58. Rūgščios išrūgos išsiskiria didesniu pelenų kiekiu, kuris svyruoja plačiose ribose nuo 0,57 iki 1,88 %, o tuo tarpu saldžiose išrūgose nustatytas pelenų

kiekis buvo mažesnė ribose, t.y. nuo 0,37 iki 0,58%. Panašią išvadą galima daryti ir analizuojant laktozės kiekį skirtingose išrūgose. Rūgščiose išrūgose jos kiekis buvo nuo 2,99 iki 4,78 %, o saldžiose išrūgose nuo 2,71 iki 3,16 %. Pagal baltymų kiekį rūgščios išrūgos yra pranašesnės už saldžias išrūgas, nes jose nustatyta nuo 0,65 iki 0,96 % baltymų, kai saldžiose išrūgose baltymai sudarė tik 0,37 – 0,65 %. Rūgščios išrūgos riebesnės, lyginant su saldžiomis išrūgomis. Nustatytas rūgščių išrūgų riebumas ribose nuo 0,25 iki 0,93 %, o saldžių išrūgų nuo 0,13 iki 0,67 %. Taigi, skirtingų gamintojų išrūgų cheminė sudėtis ženkliai skyrėsi. Galima numanyti, kad tai priklausė tiek nuo to, kokio sūrio šalutiniu produktu buvo tirtos išrūgos, tiek nuo sūrių bei varškės gamyboje naudojamų technologijų. Tačiau, tendencija, kad rūgščiose išrūgose yra beveik 1 % baltymų, verčia ieškoti būdų jų racionaliam panaudojimui [2].

1.1.lentelė. Rūgščių ir saldžių išrūgų cheminė sudėtis [1]

Pieno produktų perdirbimo įmonės kodas	Išrūgos	Sausųjų medžiagų kiekis, %	pH	Pelenų kiekis, %	Laktozės kiekis, %	Baltymų kiekis, %	Riebalų kiekis, %
1	Saldžios	6,57	4,07	1,88	3,13	0,42	0,40
	Rūgščios	7,22	6,29	0,48	4,64	0,96	0,93
2	Saldžios	6,72	4,34	1,35	3,56	0,61	0,18
	Rūgščios	6,13	6,58	0,38	2,99	0,88	0,78
3	Saldžios	5,54	4,01	0,63	2,71	0,38	0,27
	Rūgščios	7,21	6,10	0,43	4,39	0,69	0,55
4	Saldžios	7,48	3,57	1,64	2,77	0,60	0,38
	Rūgščios	5,8	6,54	0,37	3,52	0,65	0,52
5	Saldžios	6,79	3,93	0,73	3,60	0,65	0,67
	Rūgščios	6,38	6,02	0,45	4,34	0,90	0,57
6	Saldžios	4,59	4,19	0,57	2,80	0,37	0,13
	Rūgščios	6,44	6,19	0,58	4,76	0,88	0,25

Baltymų vertė nusakoma juos sudarančių amino rūgščių sudėtimi. Žmogaus fiziologiniu požiūriu aminorūgštys skirstomos į tris grupes. Nepakeičiamosios aminorūgštys turi būti gaunamos su maistu, nes jos žmogaus organizme nesintetinos arba sintetinami nepakankami jų kiekiai. Tai metioninas, valinas, treoninas, lizinas, triptofanas, fenilalaninas, leucinas, izoleucinas. Dalinai nepakeičiamosios – tai aminorūgštys, kurios tampa nepakeičiamosiomis tik intensyvios baltymų biosintezės periodu, pvz., augant organizmui, sveikstant po ligų. Pakeičiamosioms aminorūgštims priklauso visos likusios iš 20 aminorūgščių, kurių negaunant su maistu organizmas kurį laiką sugeba pats jas sintetinti [40].

Pagal literatūroje skelbiamus duomenis saldžiose ir rūgščiose išrūgose aminorūgščių kiekiai yra panašūs. Pastebimi tik kai kurie skirtumai: saldžiose išrūgose nustatyta daugiau alanino, valino, izoleucino, prolino, treonino, o tuo tarpu rūgščiose išrūgose randama daugiau histidino, leucino, tirozino, fenilalanino (1.2. lentelė).

1.2. lentelė. Amino rūgščių kiekiai rūgščiose ir saldžiose išrūgose [4]

Aminorūgštys	Išrūgos	
	Rūgščios, mg/100g	Saldžios, mg/100g
Alaninas	33.2	37.1
Argininas	18.6	18.1
Asparto rūgštis	80	81.8
Valinas	43.1	46.2
Histidinas	15.5	13.1
Glicinas	16.2	16.8
Glutamo rūgštis	139.1	140.1
Izoleucinas	38.8	49.8
Leucinas	85.1	81.8
Lizinas	72.3	71.6
Metioninas	14.9	13.8
Prolinas	40.8	48.4
Serinas	37.7	40.8
Tirozinas	23.2	19
Treoninas	40.7	50.2
Triptofanas	15.5	16.3
Fenilalaninas	27.1	24.5
Cisteinas	15.4	9.6

Tiek rūgščios, tiek saldžios išrūgos yra geras mineralų ir mikroelementų, tokių kaip: kalcio (Ca), fosforo (P), magnio (Mg), natrio (Na), kalio (K) ir kt., šaltinis. Mineralinių medžiagų kiekiai, esantys rūgščiose ir saldžiose išrūgose, pateikti 1.3. lentelėje.

Na yra nepageidaujamas pieno produktuose dėl jo daromos žalos organizmui, kadangi rekomenduojama mažinti Na kiekį pieno produktuose, didelis dėmesys turėtų būti skiriamas jo kiekiui esančiam saldžiose (35,0mg/100g) ir rūgščiose išrūgose (40,0 mg/100g) [2].

Ca kiekis akivaizdžiai didesnis rūgščiose išrūgose, kuris siekia net 86,0 mg/100g, lyginant su saldžiomis (22,5 mg/100g). Lyginant P ir Mg kiekius, jų koncentracija didesnė rūgščiose išrūgose. K kiekis yra panašus abiejų rūšių išrūgose [4].

1.3. lentelė. Mineralinių medžiagų kiekiai rūgščiose ir saldžiose išrūgose [4]

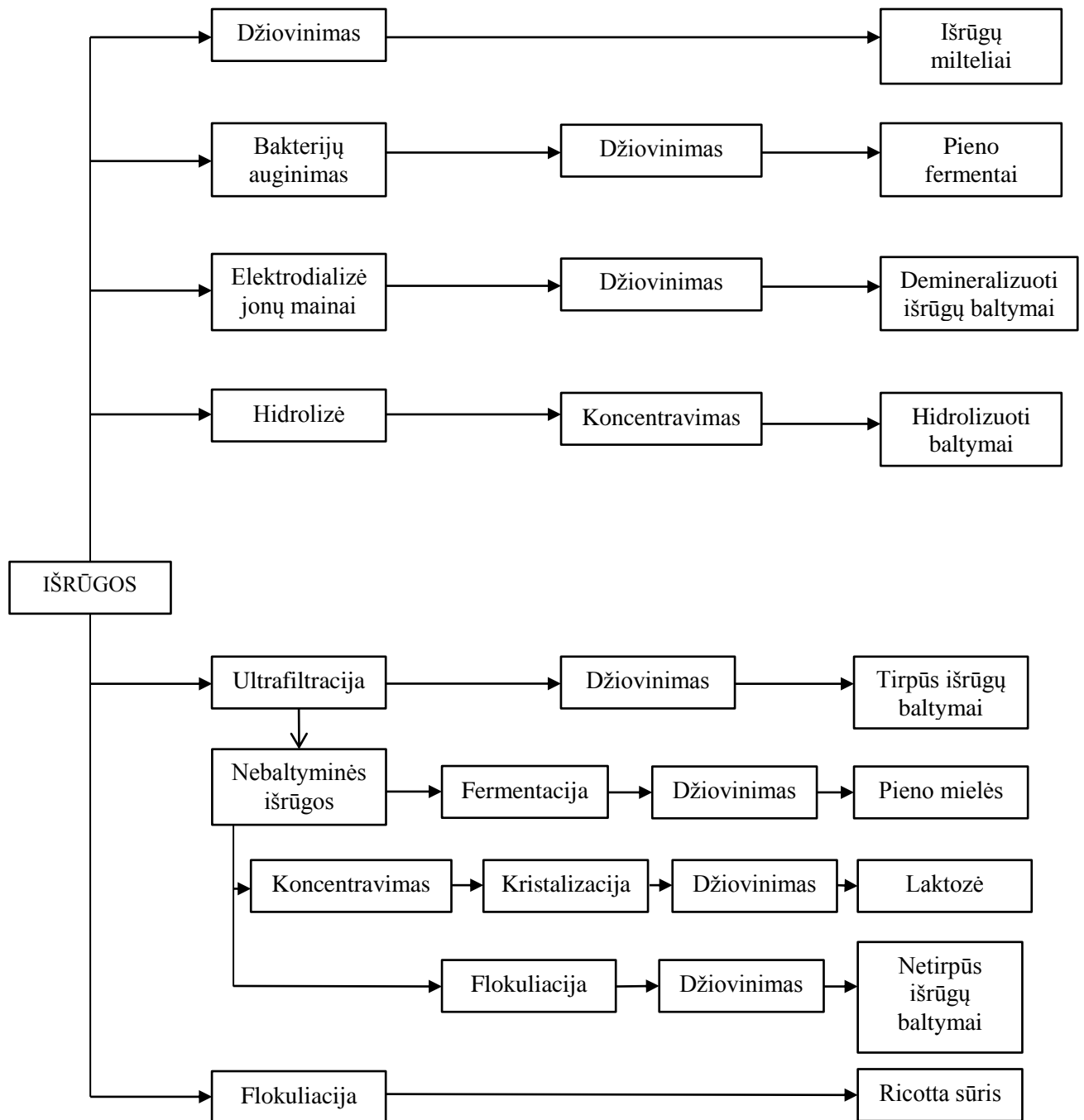
Mineralų kiekis, mg/100g	Išrūgos	
	Rūgščios	Saldžios
Kalcis	86,0	22,5
Fosforas	63,0	42,5
Magnis	8,9	5,8
Natris	40,0	35,0
Kalis	133,0	109,0

1.2. Išrūgų perdirbimo būdai ir gautų produktų panaudojimas

Išrūgų racionalus panaudojimas ir realizavimas išlieka sudėtinga problema pieno pramonėje, ypač mažesniems gamintojams. Saldžių išrūgų perdirbimas yra žymiai plačiau pritaikytas ir išplėtotas gamyboje.

V. Hatzimanikati, C. Hollige ir kt. bei Justin Elliott teigia, kad saldžių išrūgų panaudojimas yra paprastesnis dėl jose esančio didesnio baltymų kiekio ir mažesnio pH, todėl įmonės saldžias išrūgas naudoja baltymų papildų gamybai arba kaip maisto ingredientus [6,8]. Galimi išrūgų perdirbimo būdai pateikti (1.1. paveiksle).

Iš išrūgų pašalinus apie 70 – 90 proc. pieno mineralinių medžiagų ir išdžiovinus gaunami demineralizuoti išrūgų miltai. Ultrafiltracijos būdu gaunamas išrūgų baltymų koncentratas. Iš išrūgų baltymų gaminamas laktoalbuminas ir hidrolizuoti baltymai. Išrūgose yra didelis kiekis mineralinių medžiagų, kurios gali būti naudojamos kaip maisto papildai. Išrūgos naudojamos papildyti sportininkų mitybą. Išrūgų laktozė naudojama pieno rūgštis, pagardų ir alkoholio gamybai. Specialia biotechnologija gali būti gaminamos pieno ir citrinos rūgštys, antibiotikai, fermentai, galaktozė ir kiti produktai. Išrūgos naudojamos laktozei, kondensuotoms ir sausoms išrūgoms, kai kuriems maisto produktams (albumino varškei), natūralaus pieno pakaitalui gaminti, taip pat galvijų prieaugliui bei kiaulėms šerti. Išrūgos kaip priedai naudojami gaminti duoną, krekerius, tešlą. Iš išrūgų gaminami tiesioginio vartojimo maisto produktai ir pusfabrikačiai maisto pramonei. Šveicarijoje išrūgos naudojamos gaminant gaiviuosius gėrimus [39].



1.1. pav. Išrūgų perdirbimo būdai [6]

Išrūgos naudojamos paukščiams, kiaulėms ir galvijams šerti. Išrūgose esanti laktozė galvijų didžiajame prieškrandyje bakterijų ir pirmuonių yra paverčiama į pieno rūgštį, kuri suskaldoma į lakiąsias riebiąsias rūgštis (sviesto rūgštį). Galvijus šeriant įprastai, labai nedidelis pieno rūgšties kiekis patenka į kraują. Galvijams duodant didelį kiekį išrūgų pieno rūgšties perteklius didžiajame prieškrandyje gali sukelti didžiojo prieškrandžio acidozę. Laktozė padeda pasisavinti nebaltyminį azotą, esantį didžiajame prieškrandyje. Amoniako koncentracija prieškrandyje padidėja, racioną papildžius

karbamidu. Todėl racione laktozės ir karbamido santykis turi būti 5:1 arba 6:1, tada yra pagerinama prieskrandžio mikrobinių baltymų sintezė. Tiriant suaugusių atrajotojų azoto turinčių išrūgų virškinamumą, nustatyta, kad didžiajame prieskrandyje esanti mikroflora azotą paverčia baltymais ir 70 % tokių išrūgų yra suvirškinama. Plonosiose žarnose išrūgų virškinamumas yra daug didesnis ir siekia 91 %, tačiau čia patenka tik nedidelė, didžiajame prieskrandyje nesuvirškintų, išrūgų dalis. Nustatyta, kad atrajotojai pasisavina 87 % išrūgose esančių sausųjų medžiagų, kai išrūgos sudaro 30 % viso suvartojamo pašaro kiekio. Manoma, kad tokiu būdu gaunamos energijos kiekis prilygsta iš miežių gautam energijos kiekiui. Vidutiniškai 100 g išrūgų energinė vertė prilygsta 101 kJ arba 24 kcal. 100 kg sveriantis galvijai gali suvartoti 12 – 15 litrų šviežių išrūgų. Koncentruose sausų išrūgų gali būti 50 – 60 %. Sausos išrūgos nėra skanios, todėl koncentruose jos maišomos su melasa, karbamidu ir kitomis mineralinėmis medžiagomis. Toks produktas savo skoninėmis savybėmis yra patrauklus gyvūnams, o maistinėmis – prilygsta sojų išspaudoms. Išrūgų naudojimas kiaulių šėrimui priklauso nuo kiaulių gebėjimo virškinti laktozę, kuri yra pagrindinė sausų išrūgų sudedamoji dalis, ir nuo prisitaikymo vartoti skystą pašarą. Nustatyta, kad laktozės virškinamumas priklauso nuo žarnose esančio fermento laktazės aktyvumo. Laktazė būna aktyvi 3 – 4 savaitių amžiaus paršeliams [40].

Išrūgų baltymų koncentratai, kuriuose baltymų kiekis sausoje būsenoje didesnis nei 90% vadinami išrūgų baltymų izoliatu (IBI) arba whey powder isolate (WPI). IBI gaminami pagal vieną iš dviejų metodų, naudojant mikrofiltraciją su ultrafiltracija arba taikant jonų mainų metodą. Baltymų sudėtis IBI priklausys nuo taikomo metodo. Didžiausias skirtumas yra glikomakropeptido (GMP) buvimas. GMP baltymo fragmentas atsiranda iš kazeino dėl šliužo fermento veiklos sūrių gamybos metu. Jonų mainų proceso metu nepernešama GMP ir todėl GMP nėra IBI pagamintuose jonų mainų būdu, nebent GMP būtų pridėta vėliau. MF / UF procesas išlaiko GMP, todėl jis yra gautame IBI. Apdorojant išrūgas šiais būdais nevyksta baltymų denatūracija, todėl išsaugomas baltymų tirpumas. Toks perdirbimo būdas leidžia baltymo koncentraciją produkte padidinti iki 95% ir dar daugiau. Išrūgų baltymų izoliatai yra mažiau angliavandenių ir riebalų, lyginant su koncentratu [41].

Išrūgų baltymų koncentratas (angliškai – Whey Protein Concentrate). Pirmasis filtravimas, kai išgaunami išrūgų baltymų milteliai, yra vadinamas ultrafiltravimu: naudojant slėgį per akytą membraną baltymai atskiriami nuo riebalų ir laktozės (pieno angliavandenių arba pieno cukraus). Tokiu būdu gaunama pagrindinė išrūgų baltymų medžiaga, kurios baltyminė koncentracija, priklausomai nuo filtravimo kartų, yra nuo 35% iki 85%. Dauguma miltelių savo sudėtyje turi 70-80% baltymų. WPC nėra gryniausias baltymas, nes jis mažai apdorotas, bet tai gana aukštos kokybės medžiaga; be to, jos sudėtyje

yra nedidelis kiekis angliavandenių bei riebalų. Palankiai vertintina tai, kad ribojant išrūgų apdorojimą WPC lieka ir didžioji dalis išrūgų baltymų naudingų junginių [42].

Taigi, galima daryti išvadą, kad saldžių išrūgų perdirbimo galimybių yra, jos sėkmingai taikomos, gaminant įvairius produktus, kurie turi tolesnį pritaikymą maisto produktų, maisto papildų, gyvūnų pašarų gamyboje.

Rūgščių išrūgų pagaminama žymiai mažiau nei saldžių išrūgų, todėl tolesniam jų perdirbimui dėmesio skiriama taip pat žymiai mažiau. Iki šiol maisto technologams ir mokslininkams nepavyko aptikti patogių ir pigių rūgščių išrūgų frakcionavimo technologijų. Dideli kiekiai rūgščių išrūgų gaunami ten, kur gaminama varškė ir varškės sūris, t.y. Lietuvoje, šiaurės rytiniame Lenkijos pakraštyje ir vakarinėje Baltarusijoje. Lietuvoje ši atlieka dažniausiai utilizuojama sušeriant ją kiaulėms. Paskaičiuota, kad kasdien prarandama apie 500 t. rūgščių išrūgų, t.y. apie 184 000 t. per metus. Įmonės taupydamos lėšas rūgščių išrūgų utilizavimui jas pylė į aplinką, tačiau mokslininkų atlikti tyrimai parodė, kad išrūgos patekusios į vandens telkinius absorbuoja deguonį, o tai reiškia, kad upes ir ežerus paverčia į „negyvas jūras“. To pasekoje pastaraisiais metais pradėti daryti tyrimai alternatyviam rūgščių išrūgų panaudojimui.

Rūgščias išrūgas panaudoti ir perdirbti iki šiol ne visada sėkmingai buvo mėginama fizikiniais metodais. Paskutiniame dešimtmetyje pieno pramonėje vis plačiau pradedami taikyti biotechnologiniai metodai. Šie metodai leidžia atlikti darbus, kurie anksčiau buvo neįmanomi: frakcionuoti produktus į labai švairius ir brangius komponentus, gaminti naujus, aukštos pridėtinės vertės produktus [7].

Morr pabrėžia, kad iki šiol rūgščios išrūgos buvo naudojamos kaip vienas iš mitybos komponentų gyvulininkystės pramonėje ir teigė, kad jų racionalus panaudojimas išlieka aktuali problema [12].

Rūgščiose išrūgose gausu maistinių ir geromis funkcinėmis savybėmis pasižyminčių junginių, todėl jos galėtų būti naudojamos įvairių maisto produktų gamyboje. Išrūgų naudojimas maisto pramonėje padidina maisto produktų mitybinę vertę ir praturtintų juos aminorūgštimis, taip pat pagerintų juslines savybes, dėl geresnio emulsavimo ir drėgmės surišimo [13].

Šiuo metu atliekami eksperimentai, ieškant efektyvaus cukraus (laktozės) išgavimo būdo. Daug dėmesio kreipiamas į Ca, kurio ypač daug yra rūgščiose išrūgose (1.2. lentelė), išgryninimui.

Bogdan Dec, Wadysaw Chojnowski atliko rūgščių išrūgų miltelių cheminės sudėties ir tirpumo tyrimus, gautus taikant nanofiltracijos ir neutralizacijos metodus [9]. Nanofiltracijos ir neutralizacijos procesų metu pastebėti ryškūs rūgščių išrūgų miltelių sudėties ir tirpumo pokyčiai. Dėl sumažėjusio pelenų kiekio ir rūgštingumo gautas geresnis miltelių tirpumo indeksas. Tyrimas parodė, kad rūgščių

išrūgų miltelių technologiniame procese, neutralizacijos taikymas padarė reikšmingą įtaką miltelių savybėms. Geresnių savybių produktas gaunamas taikant neutralizavimą po nanofiltracijos. Diafiltruotų rūgščių išrūgų milteliai pasižymėjo geresnėmis savybėmis net už saldžių išrūgų miltelius [10].

Maisto produktų rinkos tyrimai atskleidžia didėjančią susidomėjimą demineralizuotais išrūgų produktais. Kaip teigia Horstas, demineralizuojant išrūgas padidėja jų maistinė vertė [11]. Demineralizuotos išrūgos žymiai lengviau pritaikomos maisto pramonėje negu nefrakcionuotos išrūgos. Toks produktas naudojamas vietoje saldžių išrūgų, gaminant mišinius vaikams, konditerijos gaminių, duonos ir mėsos produktų gamyboje, ledų, šaldytų desertų, užkandžių bei padažų gamyboje.

Rūgščių išrūgų džiovinimas kelia problemų, dėl jose esančio didelio pieno rūgšties kiekio, kuri džiovinimo metu sudaro didelius, netirpius aglomeratus. Be to pieno rūgštis didina išrūgų klampumą ir blogina išrūgų miltelių kokybę. Rūgščių išrūgų džiovinimas efektyvus tik po neutralizavimo, arba jas maišant su liesu pienu [14]. Mokslininkai įrodė, kad rūgščių išrūgų miltelių fizikinės ir cheminės savybės prailgina produkto realizavimo laiką [15].

Rūgščių išrūgų milteliuose (RIM) didžiausią dalį sudaro laktozė. Priklausomai nuo laktozės formos, kuri gali būti amorfinė arba kristalinė, RIM būna higroskopiški arba nehigroskopiški. Miltelių gamybos metu, laktozė turi būti kristalinės formos, tam kad milteliai nesukibtų. Laktozė gerina skonines savybes, suteikia produktams saldumą, įtakoja kristalizaciją ir klampumą [16]. RIM funkcinės savybės gali kisti, nuo juose esančių tirpių baltymų, tankio, kietųjų dalelių pasiskirstymo ir jų dydžio. Todėl būtina tęsti tolimesnius RIM fizikinių savybių tyrimus [17].

RIM buvo gaminami laboratorijoje, juos ultrafiltruojant (NF), neutralizuojant, sutirštinimui naudojant garinimo metodą ir vėliau džiovinami naudojant purkštuvinę džiovyklą. Eksperimentų metu buvo išsiaiškintas nanofiltracijos ir neutralizacijos poveikis RIM. Tyrimų metu neutralizacija buvo taikoma: prieš nanofiltraciją, po nanofiltracijos ir po diafiltracijos. Rūgščių išrūgų pH buvo kontroliuojamas naudojant 30 % NaOH tirpalą, siekiant suvienodinti rūgščių išrūgų pH su saldžių išrūgų. Tyrimui naudotos išrūgos buvo surinktos ir atšaldytos iki 4 °C iš pieno perdirbimo įmonių. RIM buvo tiriami iš karto po pagaminimo [18].

Barrentas ir Morr įrodė, kad nanofiltracija iš rūgščių išrūgų leidžia veiksmingai pašalinti didelį rūgščių ir pelenų kiekį. Nanofiltracijos metu galima pašalinti apie 20% visų kietųjų dalelių [19].

Šiame tyrime detalai ištyrinėtas kai kurių mineralų kiekiai esantys išrūgų milteliuose. Dėl jonų selektyvumo nanofiltracijos membranose, Na buvo pasirinktas kaip vienavalentis jonas, o Ca kaip divalentinis jonas. Rezultatai pateikti 1.4. lentelėje.

1.4.lentelė. Rūgščių išrūgų apdorojimo būdų įtaka Na ir Ca kiekiui

Išrūgų milteliai	Kiekis mg/g	
	Ca	Na
Saldžių išrūgų milteliai	3,90	9,10
Rūgščių išrūgų milteliai	19,40	9,90
Rūgščių išrūgų milteliai po neutralizacijos	13,89	14,22
Rūgščių išrūgų milteliai po nanofiltracijos	14,15	2,49
Rūgščių išrūgų milteliai po neutralizacijos ir nanofiltracijos	18,78	11,29
Rūgščių išrūgų milteliai po nanofiltracijos ir neutralizacijos	13,38	9,59
Rūgščių išrūgų milteliai po nanofiltracijos, diafiltracijos ir neutralizacijos	10,67	8,08

Iš rezultatų matome, kad rūgščių išrūgų milteliuose Na kiekis svyruoja nuo 2,49 mg/g iki 14,22 mg/g. Didžiausias Na kiekis buvo rūgščių išrūgų milteliuose, gautų iš neutralizuotų rūgščių išrūgų, nes neutralizavimui buvo naudojamas NaOH. Kaip ir tikėtasi, pritaikius nanofiltraciją rūgščioms išrūgoms, pastebimas mažiausias Na kiekis rūgščių išrūgų milteliuose (75% mažiau negu natūraliuose rūgščių išrūgų milteliuose). Tai rodo, kad nanofiltracija geba efektyviai sumažinti vienvalečių jonų kiekį. Gauti rūgščių išrūgų milteliai pagaminti iš neutralizuotų rūgščių išrūgų po nanofiltracijos pasižymi geresnėmis savybėmis. Diafiltracija leidžia dar labiau sumažinti Na kiekį rūgščių išrūgų milteliuose (iki 8mg/g), kai saldžių išrūgų milteliuose pasiekiamas ne toks puikus rezultatas (10,67mg/g).

Ca kiekis rūgščių išrūgų milteliuose svyruoja nuo 10,67mg/g iki 19,40 mg/g. Tai rodo, kad nanofiltracija efektyviau mažina vienvalečių jonų kiekį. Boumba pabrėžia, kad divalečių jonų kiekis naudojant nanofiltraciją beveik nekinta [20].

Rūgščių išrūgų sudėties pokyčiai pritaikius nanofiltraciją, diafiltraciją ir neutralizaciją žymiai pagerino produkto savybes. Sumažėjo pelenų kiekis ir rūgštingumas, padidėjo tirpumas, gauti rezultatai geresni už saldžių išrūgų miltelių. Dėl šių pokyčių rūgščių išrūgų miltelius galima plačiai taikyti maisto pramonėje siekiant pagerinti produktų maistinę vertę [21].

1.3 Polisacharidų panaudojimas kompleksams su išrūgų baltymais sudaryti

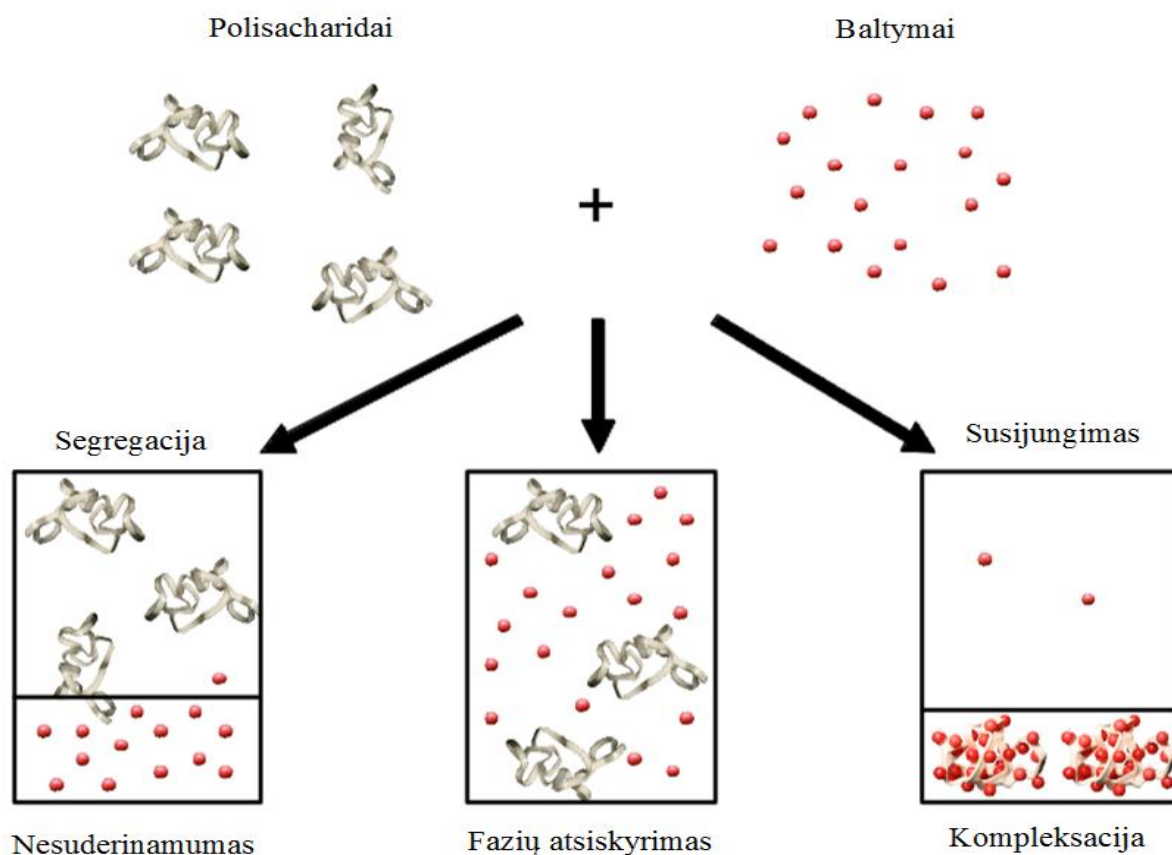
Pastaraisiais metais didėja dėmesys dar vienam baltymų išgavimo iš biologinių sistemų būdai, t.y. jų kompleksavimas su polisacharidais. Tai aplinką tausojantis, pigus baltymų išgavimo būdas. Jo išskirtinumas tas, kad baltymams sąveikaujant su polisacharidais keičiasi baltymų funkcinės savybės: tirpumas, paviršiaus aktyvumas ir konformacija [25].

Baltymų ir polisacharidų vandens tirpaluose galimos 3 pusiausvyros būsenos: termodinaminis nesuderinamumas, kompleksinė koacervacija bei maišumas, parodytos 2.1. paveiksle [24].

Termodinaminis nesuderinamumas būdingas polimerų tirpalui, kai stūmos jėgos tarp skirtingų polimerų yra didesnės nei traukos jėgos tarp tos pačios rūšies polimerų. Įvyksta polimerų išsiskyrimas: susidaro dvi tarpusavyje nesimaišančios fazės, kiekvienoje iš kurių koncentruojasi skirtingos rūšies polimero makromolekulės.

Kompleksinė koacervacija įvyksta tirpale kai elektrostatinė traukamtarp biopolimerų molekulių sąlygoja kompleksų susidarymą. Susidaro dvifazė sistema, tačiau šiuo atveju vienoje iš jų yra susikoncentravę abu polimerai, tuo tarpu kai kitoje polimerų nėra.

Maišumas tirpale pasireiškia, kai sąveika tarp skirtingų polimerų yra vienoda. Polimerams spontaniškai susimaišius susidaro homogeniška stabili sistema.



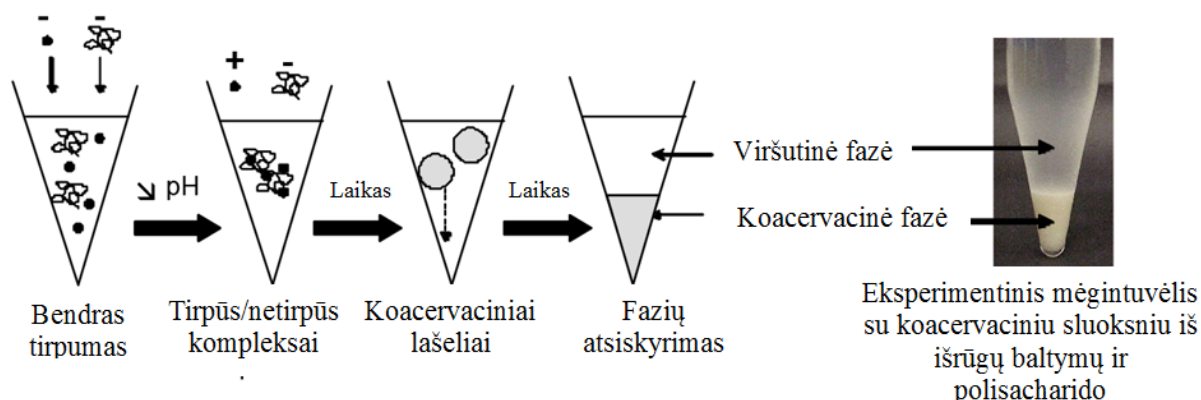
1.2. pav. Baltymų – polisacharidų kompleksų susidarymas

Grinberg ir Tolstoguzov (1997), ištyrę daugiau nei 100 įvairių baltymų – polisacharidai – vanduo sistemų, nustatė, kad termodinaminis nesuderinamumas tarp baltymų ir polisacharidų yra dažniausiai sustinkamas reiškinys [27]. Sąlygos, kurioms esant tirpale išsiskiria fazės, kinta priklausomai nuo

biopolimerų savybių – specifinės struktūros bei molekulinio svorio. Termodinaminis nesuderinamumas dažniausiai pasireiškia sistemose, kuriose baltymai yra kartu su neutraliais polisacharidais ar anijoniniais polisacharidais, kuriems būdingas to paties ženklo krūvis kaip ir baltymams ($\text{pH} > \text{pI}$) ir/arba esant pakankamai didelei joninei jėgai[22].

Kompleksai tarp baltymų ir polisacharidų gali būti kovalentiniai ir elektrostatiniai. Kovalentiniai kompleksai gaunami Mejero reakcijos metu, kai baltymus ir polisacharidus letai kaitinant, baltymų aminogrupės jungiasi su polisacharidų karbonilo grupėmis [29]. Susidarę kompleksai pasižymi geresniu tirpumu ir emulsavimu, nei vieni baltymai. Tokių kompleksų pavyzdžiai yra β -laktoglobulino-dekstrano [30], išrūgų baltymų-maltodekstrino [31], β -laktoglobulino-galaktozės [32] ir kt.

Kai baltymai ir polisacharidai įkrauti priešingai, gali susidaryti elektrostatiniai kompleksai. Tokie kompleksai gali būti tirpūs arba netirpūs. Netirpūs kompleksai susijungia į koacervacinius lašelius ir dėl svorio skirtumų susidaro koacervacinis sluoksnis ir skysta fazė. Rezultate viena iš mišinio fazių susikoncentruoja į du polimerus, o kita į tirpiklį. 2.2.paveiksle pateiktas koacervacijos mechanizmas [24].



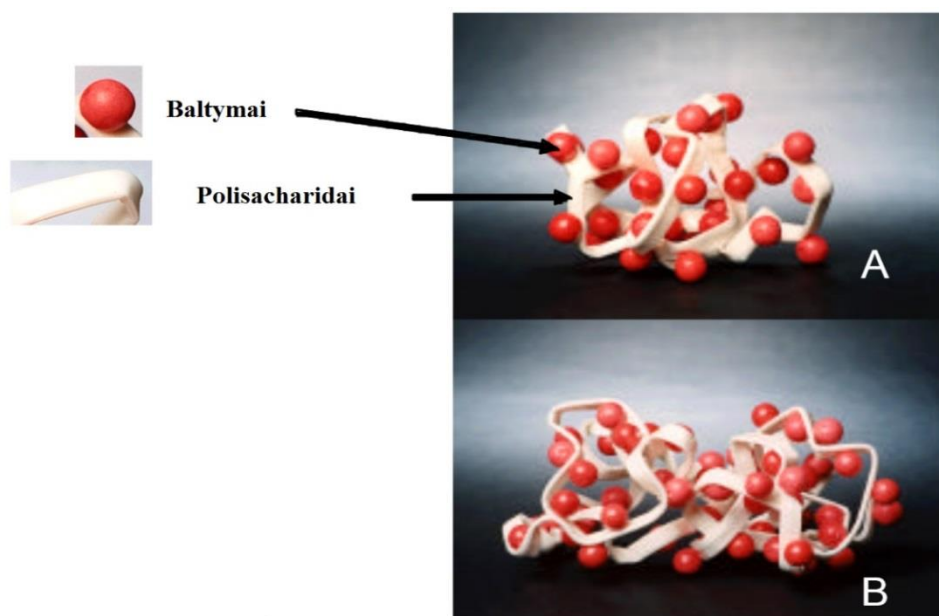
1.3. pav. Baltymų – polisacharidų koacervacijos mechanizmas

1.4. Baltymų ir polisacharidų kompleksų savybės

Kai baltymai ir polielektrolitai būna priešingai įkrauti, dėl elektrostatinėjų sąveikų sudaro kompleksus. Įvairūs fizikiniai – cheminiai veiksniai taip pat turi įtakos elektrostatinėms jėgoms, kurios įtakoja kompleksų susidarymą. Svarbų vaidmenį elektrostatinėjų jėgų susidaryme atlieka pH, kuris nustato baltymų įkrovos tankį [26]. Atlikus tyrimus buvo įrodyta, kad kompleksavimas yra dviejų pakopų procesas, kurį įtakoja pH, sukeldamas du struktūrinius perėjimus (pH_c – tirpių kompleksų susidarymo pradžia ir pH_ϕ – kompleksų atsiskyrimas).

Tirpūs baltymų kompleksai dažniausiai susiformuoja, esant pH virš jų izoelektrinio taško, kuriame baltymai yra neigiamo krūvio kaip ir polielektrolitas [28]. Vidinių polimerų ir tarppolimerinių kompleksų susidarymas pateiktas 2.3. paveiksle.

Norint kontroliuoti baltymų ir polisacharidų kompleksų susidarymą reikia atidžiai kontroliuoti sistemos joninę jėgą, nes esant net mažai druskos koncentracijai gali sumažėti kompleksų susidarymo tikimybė. Taip pat kritinis parametras yra polimero koncentracija, jei polimeras būna virš kritinės koncentracijos, vyksta susilieimo slopinimas. Kiti svarbūs kompleksų susidarymo parametrai yra: polimero molekulinė masė, temperatūra, slėgis, tačiau šie parametrai nėra išsamiai ištyrinėti [33].



1.4. pav. Baltymų – polisacharidų kompleksų tipai. A: vidinių polimerų kompleksai; B: tarppolimeriniai kompleksai

Baltymų kompleksų sudarymui yra naudojami polisacharidai, tokie kaip: karageninas, pektinas, galaktomanai, karboksimetilceliuliozė ir kiti. Polisacharidai, turintys karboksilo grupių nesudaro tirpių kompleksų su globuliniais baltymais kai $\text{pH} > \text{pI}$, o sulfatuoti PS gali formuoti tirpius kompleksus esant net daug didesniai pH už baltymų pI [35]. Kai pH yra didesnis už baltymo izoelektrinį tašką, jaučių serumo albuminas (JSA) elektrostatiškai formuoja tirpius kompleksus su dekstrano sulfatu, ι -karageninu ir κ -karageninu, kai joninė jėga yra maža. Esant mažai joninei jėgai, didžiausia kritinė pH reikšmė, kad įvyktų kompleksacija su JSA yra 6,5 κ -karageninui, 7 ι -karageninui, o dekstrato sulfatui >7 [36].

1.5. Baltymų – polisacharidų kompleksų funkcinės savybės

Polisacharidų – baltymų kompleksų klampumas ir putojimo savybės.

Klampumas ir želatinizacija yra reologinės savybės, kurios priklauso nuo biopolimerų molekulinės charakteristikos, pvz., molekulinės masės, formos, grandinės ilgio. Kiti veiksniai yra koncentracija, sąveika tarp biopolimerų ir vandens ir kiti tirpalo parametrai: pH, joninės jėgos ir kitų šalutinių medžiagų, tokių kaip ligandai ir kitos. Sąveiką tarp baltymų ir polisacharidų galima keisti keičiant polimerų funkcines savybes. Reologinės baltymų – polisacharidų savybės kinta priklausomai nuo komplekse esančio polimero. Tikėtina, kad dviejų biopolimerų tarpusavio ryšys padidins sistemos klampumą susidarant didesnėms dalelėms. Kelių baltyminių – polisacharidinių mišinių sistemų reologinė dinamika buvo išnagrinėta, skalė svyravo nuo klampaus kūno iki viskoelastinio kūno. Tai rodo kad elastingumas yra geresnė savybė nei klampumas. Hidratuoti baltymų – polisacharidų kompleksai padidina klampumo ir reologines savybes, kurios priklauso nuo pradinio ir struktūrinio polisacharido [24].

Joninių jėgų ir baltymų – polisacharidų santykis atlieka svarbų vaidmenį baltymų – polisacharidų sistemose. Optimali druskos koncentracija (0,21 M NaCl) sudaro palankias sąlygas β – laktoglobulinui su pektinu sudaryti stipriomis savybėmis pasižymintį gelį. Siekiant gauti geresnėmis želatinizacijos savybėmis pasižymintį junginį, kuris reikalingas formuoti koacervatus, nes stipri tarpusavio sąveika sumažina kompleksų tirpumą ir todėl mažėja komplekso hidratacijos pajėgumas, kuris priveda prie mažėjančio klampumo[23].

Baltymų – polisacharidų viskoelastinės savybės taip pat atlieka svarbų vaidmenį putų stabilumui įvairiuose maisto produktuose. Oro – vandens sistemos putos – oro patekimas per ploną skysčio plėvelę (vandenį), kur ši skysčio plėvelė yra stabilizuojama per aktyvių molekulių paviršių. Putų stabilumas gerėja didėjant tarpfaziniam skysčio plėvelės stabilumui. Mažas plėvelės stabilumas gali lemti oro difuziją putose, to pasekoje sumažėja putų stabilumas. Dar vienas svarbus skysčio plėvelės parametras yra klampumas, kuris gali kontroliuoti oro įterpimo difuzijos koeficientą putose. Todėl geresnis tarpfazinės skysčio plėvelės stabilumas ir klampumas lemia mažesnę įterpto oro difuziją putose ir padidina jų stabilumą.

Aliejus – vanduo emulsijų stabilumas

Emulsija – dviejų nesimaišančių skysčių dispersinė sistema, kuri stabilizuojasi per aktyvių molekulių paviršių, šie stabilizatoriai vadinami emulsikliais. Emulsiklis turi amfifilines savybes absorbuotis ant skystų lašelių paviršiaus, kuris užkerta kelią fazių atsiskyrimui dviejuose

nesimaišančiuose skysčiuose. Dėl fiksuoto emulsiklio, emulsijos stabilumas priklauso nuo kelių faktorių, tokių kaip: emulsiklio adsorbcijos, koncentracijos ir t.t. Esant mažai emulsiklio koncentracijai emulsijos sistema nesugeba išlaikyti pradinių lašelių dydžio. Šis nestabilumas gali vykti keliais mechanizmais. Dėl prasto skysčio lašelių apgaubimo jie gali susijungti vienas su kitu, sudarydami didelius lašelius, 4 paveikslas. Kur polimerai adsorbuojasi ant skystų lašelių paviršiaus, taip padidinami apgaubimą tarp dviejų vandens lašelių ir todėl pradeda mažėti flokuliacija. Esant didelei emulsiklio koncentracijai emulsijos sudaro stabilius aliejaus lašelius, dėl geresnio skysto lašelio apgaubimo [50].

Emulsijas galima sudaryti naudojant aktyvias paviršiaus medžiagas, tokias kaip: aktyvias paviršiaus molekules, biopolimerus (baltymus arba polisacharidus), hidrokoloidus (baltymų – polisacharidų kompleksus) ir neorganinės dalelės. Emulsijų sistemų stabilumas priklauso nuo dviejų svarbių veiksnių. Pirma – atsumiančios jėgos tarp dviejų artėjančių skystų lašelių, antra – disproporcija (Ostwald – Ripening) – tai procesas, kurio metu kinta lašelių dydis. Kai du lašeliai yra atskirti tarpusavyje skysčio sluoksniu, dujos difunduoja nuo mažesnių link didesnių lašelių, kol dėl slėgių tarp lašelių skirtumų, atsiranda koncentracijų gradientas. Šio proceso metu maži lašeliai tampa mažesni, o didesni padidėja. Didėjant skirtumui tarp lašelių slėgių, procesas pagreitinėja ir vyksta iki tol, kol maži lašeliai išnyksta [37].

Didesnis atstūmimas tarp dviejų šalia esančių lašelių sukelia maksimalų stabilumą, nes susidaro mažiausia galimybė vykti koalescencijai. Atstumianti jėga tarp dviejų šalia esančių skystųjų lašelių nulemia atstumą, t.y., plonos skysčio plėvelės storumas tarp dviejų lašelių juos suartina. Šios skysčio plėvelės storis priklauso nuo adsorbuotos molekulės (emulsiklio) užimamos erdvės. Emulsija dažniausiai gaunama stabilizuojant skirtingus emulsiklius esančius sudėtyje, tokius kaip paviršiaus medžiagos, baltymai arba hidrokoloidai (baltymų – polisacharidų kompleksai) ir skystos plėvelės santykinis storis tarp dviejų lašelių priklauso nuo hidrokoloidų (5 – 10 Nm), baltymų (1 – 5 Nm) paviršiaus medžiagų (0,5 – 1 Nm). Todėl emulsijos lašelių stabilumas gaunamas geresnis kai jie stabiluojami su baltymų – polisacharidų kompleksais. Kitas svarbus veiksnys lemiantis emulsijų stabilumą yra emulsiklių desorbcijos lygis. Emulsiklio molekulės adsorbcija (paviršiaus medžiagos, baltymai ir kt.) sąlyčio paviršiuje yra laikina. Emulsiklio desorbcija sąlyčio paviršiuje nulemia sistemos nestabilumą. Remiantis šiuo faktu, teigiama, kad emulsija stabilizuota dalelių, kurių dydis svyruoja nuo 10Nm iki kelių μm gali būti nestabili, dėl plonos skysčio plėvelės maksimalaus storio ir maksimalios desorbcijos energijos [38].

2. DARBO TIKSLAI IR UŽDAVINIAI

Literatūros analizė parodė, kad plačiai išnagrinėtos saldžių išrūgų fizikinės – cheminės savybės, jų apdorojimo būdai ir pritaikymas pramonėje, tačiau apie rūgščias išrūgas, kurios lieka po varškės ir varškės sūrių gamybos, informacijos pateikiama mažai. Remiantis literatūriniais šaltiniais akivaizdu, kad susidomėjimas rūgščiomis išrūgomis bei galimais jų apdorojimo metodais padidėjo tik pastaraisiais metais. Paaiškėjo, kad jų perdirbimui negalima taikyti tų pačių metodų, kuriais jau daugelį metų sėkmingai perdirbamos saldžios po fermentinių sūrių gamybos likusios išrūgos. Paskaičiuota, kad dėl rūgščių išrūgų perdirbimo technologijų nebuvimo Lietuvoje kasdien prarandama apie 500 t. rūgščių išrūgų, t.y. apie 184 000 t. per metus. Iš diskusijų su pieno įmonių, kuriose po varškės ir varškės sūrių gamybos lieka daug išrūgų, technologais, išaiškėjo dar viena aktuali problema, t.y. kaip sukaupti ir išlaikyti išrūgas ilgesnį laiką, siekiant optimizuoti jų perdirbimą.

Vienas iš baltymų išgavimo iš saldžių išrūgų būdas – išrūgų baltymų kompleksavimas su polisacharidais. Literatūroje randama daug informacijos apie saldžių išrūgų baltymų – polisacharidų kompleksus, jų apdorojimą, panaudojimą ir funkcinės savybes. Tačiau mums prieinamoje mokslinėje literatūroje nepavyko rasti duomenų apie rūgščių išrūgų baltymų ir polisacharidų kompleksų sudarymą bei jų savybes. Manome, kad dėl mažos rūgščių išrūgų rinkos vertės, išrūgų baltymų išgavimas iš išrūgų, kompleksuojant juos su polisacharidais turi ekonominę alternatyvą maisto pramonėje.

Ši aktuali tema, paskatino plačiau išnagrinėti rūgščių išrūgų baltymų – polisacharidų kompleksavimą, bei gautų kompleksų savybes, jų galimą panaudojimą emulsijoms stabilizuoti.

Remiantis literatūros apžvalga bei išnagrinėjus aktualias tyrimų sritis, iškeliamas šis darbo tikslas – nustatyti rūgščių išrūgų baltymų pokyčius išrūgų laikymo metu ir išanalizuoti jų išgavimo iš išrūgų galimybes kompleksuojant su polisacharidais.

Tiksliui pasiekti iškelti uždaviniai:

- Nustatyti rūgščių išrūgų fizikinius cheminius bei mikrobiologinius pokyčius laikymo metu esant skirtingoms laikymo sąlygoms;
- Nustatyti išrūgų baltymų ir įvairių polisacharidų mišinių termodinaminio stabilumo būsenas, priklausomai nuo baltymų šaltinio, terpės pH ir baltymų bei polisacharidų santykio mišinyje
- Charakterizuoti išrūgų baltymų ir polisacharidų kompleksų savybes
- Įvertinti išrūgų baltymų ir polisacharidų kompleksų panaudojimo galimybes stabilizuojant emulsijas

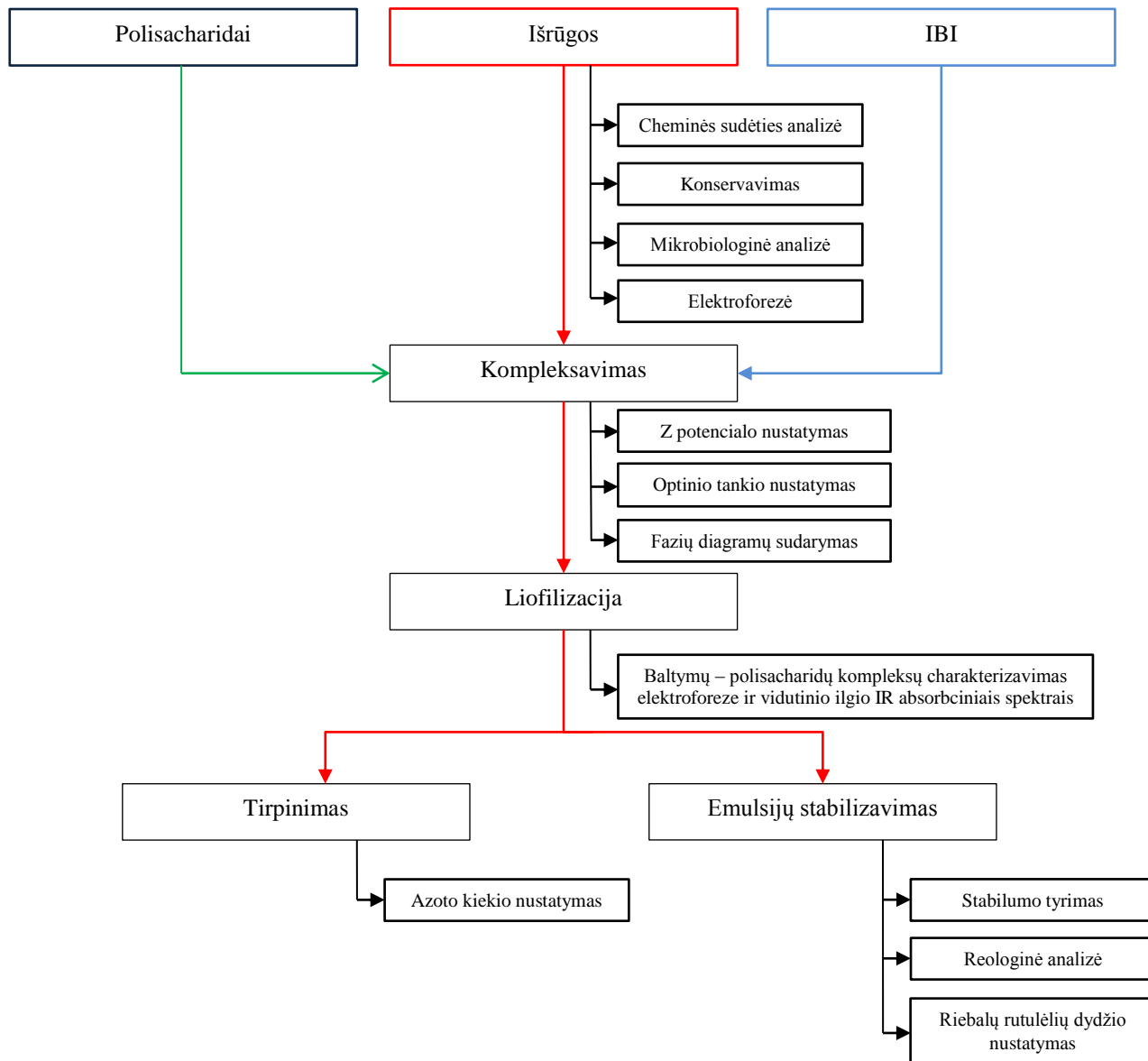
3. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

3.1. Tyrimų objektai ir medžiagos

Tiriamąjį darbo objektai:

- rūgščios išrūgos, gautos po varškės gamybos, kurias pristatydavo UAB „Pieno žvaigždės“ Kauno filialas,
- išrūgų baltymų izoliatas (IBI), kuriame yra 88,5% baltymų, <6% drėgmės, 0,1% laktozės ir 4% pelenų (Lacprodan DI – 9213, Arla Foods Ingredients, Vibis, Danija);
- karboksimetilceliuliozė (toliau KMC), kurios grynumas $\geq 99,5\%$, pakeitimo laipsnis 0,6 – 0,95, klampa (2%, 25°C) 1000 – 3000 mPa·s,
- chitozanas, kurio deacitelinimo laipsnis $>75\%$ ir vidutinė molekulinė masė (190 – 310 kDa), buvo pirktas iš Sigma Aldrich (Airija).

Tiriamąjį darbo metu vykdyti eksperimentiniai tyrimai yra pateikti 3.1. paveiksle.



3.1. pav. Tiriamojo darbo metu vykdytų eksperimentinių tyrimų ryšių schema

3.2. Tiriamojo darbo metu tirtų kompleksų gamyba

Kompleksai buvo gaminami naudojant IBI ir KMC, IBI ir chitozaną, rūgščias išrūgas ir KMC, rūgščias išrūgas ir chitozaną.

Kompleksų gamyba naudojant IBI ir KMC, bei IBI ir chitozaną. Tirpalai buvo gaminami santykiais 1:0; 1:1; 2:1; 3:1; 4:1, visuose mišiniuose galutinė IBI koncentracija buvo 0,5%. Kompleksuojant buvo keičiamas pH 6; 5; 4,5; 4; 3; 2,5; 2 naudojant 1M HCl ir 1M NaOH. Gauti mėginiai su nuosėdomis buvo filtruojami naudojant filtravimo popierių ir džiovinami liofilizuojant. Analogiškai buvo gaminami IBI ir chitozano kompleksai.

Rūgščių išrūgų ir KMC kompleksai buvo gaminami maišant rūgščias išrūgas ir KMC tirpalus santyškiais 1:0; 1:1; 2:1; 3:1; 4:1, visuose mišiniuose galutinė baltymų koncentracija buvo 0,5%. Kompleksuojant buvo keičiamas pH 6; 5; 4,5; 4; 3; 2,5; 2 naudojant 1M HCl ir 1M NaOH. Gauti mėginiai su nuosėdomis buvo filtruojami naudojant filtravimo popierių ir džiovinami liofilizuojant.

Rūgščių išrūgų ir chitozано kompleksai buvo gaminami maišant rūgščias išrūgas ir chitozано tirpalą santyškiais 1:1; 2:1; 3:1; 5:1; 10:1; 15:1; 30:1, visuose mišiniuose galutinė baltymų koncentracija buvo 0,5%. Kompleksuojant buvo keičiamas pH 6; 7; 8; 9; 9,5; 10; 11; 12. Gautos nuosėdos buvo filtruojamos naudojant filtravimo popierių ir džiovinamos liofilizuojant.

Sušaldyti kompleksai liofilizuoti liofilizatoriuje (Zirbus sublimatos 3×4×5, Bad Grund, Vokietija). Sausi bandiniai iki analizės laikyti (-18°C temperatūroje) šaldiklyje.

Sublimacinės džiovyklos veikimo principas yra pagrįstas drėgmės pašalinimu, jai pereinant iš kristalinės būklės į dujinę būklę. Į džiovyklą produktas pakraunamas sušaldytas, viduje sudaromas vakuumas ir iš produkto išsiskiria dalis drėgmės, sumažėja produkto temperatūra. Išsiskyrusi drėgmė sukondensuojama kondensatoriuje, o dėl sumažėjusios temperatūros produkte esanti lasivoji drėgmė susikristalizuoja į ledą. Tada į džiovinimo kameros vidų paduodamas tam tikras šilumos kiekis ir joje vykdomas sublimacijos procesas. Kadangi kondensatoriuje palaikoma žemesnė temperatūra už džiovinimo kameros temperatūra, tai produkte esanti drėgmė išgaruoja.

3.2. Tyrimų metodai

3.3. Išrūgų cheminės analizės metodai

Bendras azoto ir nekazeininio azoto kiekis

Bendras azoto kiekis ir nekazeininio azoto kiekis išrūgų bandiniuose nustatytas remiantis ISO 8968 – 1:2014 „Pienas ir pieno gaminiai. Azoto kiekio nustatymas. Kjeldalio principas ir žalio baltymo skaičiavimas“ metodu.

Kazeinas nusodinamas naudojant acto rūgšties ir natrio acetato tirpalus. Nusodintas kazeinas nufiltruojamas, filtrate lieka nekazeininis azotas. Azoto kiekis filtrate yra nustatomas pagal procedūrą, aprašytą standarte LST EN ISO 8968 – 1:2014, išskyrus 9.1 punktą. Kazeininis azotas apskaičiuojamas iš bendro azoto kiekio atėmus gautą nekazeininį azoto kiekį išrūgose.

Nebaltyminio azoto kiekis

Nebaltyminio azoto kiekis išrūgų bandiniuose nustatytas remiantis ISO 8968 – 4:2001 „Pienas. Azoto kiekio nustatymas. Nebaltyminio azoto kiekio nustatymas“ metodu.

Titruojamasis rūgštingumas

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

pH

Išrūgų pH matuojamas naudojant (Inolab pH 720, Vokietija) pH metrą.

Sausųjų medžiagų kiekis

Sausųjų medžiagų kiekis išrūgų bandiniuose nustatytas remiantis ISO 6731:2010 „Pienas, grietinėlė ir sutirštintas pienas. Visuminio sausųjų medžiagų kiekio nustatymas“ metodika.

Riebalų kiekis

Riebalų kiekis išrūgų mėginiuose nustatytas gravimetriniu metodu, remiantis LST EN ISO 11870:2009 „Pienas ir pieno gaminiai. Riebalų kiekio nustatymas. Bendrieji butirometriniai metodai“. Šis metodas pagrįstas riebalų išskyrimu iš tiriamojo pavyzdžio, veikiant jį koncentruota sieros rūgštimi, izoamilo alkoholiu ir išcentrine jėga. Centrifūgavimas atliktas SuperVario-N aparate (Vokietija).

Kiekvieno bandinio matavimas buvo pakartotas po tris kartus ir išreikštas šių verčių vidurkis [46].

3.4. Išrūgų konservavimas

Konservuojant išrūgas buvo naudojama konservavimo medžiaga – sorbo rūgštis ($C_6H_8O_2$). Paruošti trys bandiniai kuriuose $C_6H_8O_2$ koncentracija buvo: 0 %, 0,01 % ir 0,05 %. Bandiniai buvo laikomi

kambario temperatūroje (~18 °C) 14 dienų. Tyrimo metu matuojamas azoto, nebaltyminio azoto kiekis, titruojamasis rūgštingumas ir pH. Matuojama pirmą, antrą, ketvirtą, šeštą, aštuntą, dešimtą ir keturioliktą bandymo dienas.

3.5. Išrūgų mikrobiologinė analizė

Bendras mikroorganizmų skaičius išrūgose buvo nustatytas remiantis LST EN ISO 4833:2003 (Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis metodas. Kolonijų skaičiavimo 30 °C temperatūroje metodas) standartu. Lėkštelės su bandiniais buvo inkubuojamos 37°C temperatūroje. Tyrimams buvo naudota Plate count agar (REF 610040, „Liofilchem“).

Pienarūgščių bakterijų skaičius buvo nustatytas sėjant išrūgų bandinius ant selektyvios mitybinės terpės (MRS terpė (REF 4017282, „Biolife“)). Bandiniai buvo inkubuojami 30°C temperatūroje 48-72 val. Po inkubavimo vertintos tipiškos pienarūgščių bakterijų kolonijos.

Proteolitinių bakterijų skaičius išrūgose buvo nustatytas remiantis „Mikrobiologinės kontrolės instrukcija pieno perdirbimo įmonėms“ [44]. Lėkštelės su bandiniais buvo inkubuojamos 30°C temperatūroje. Tyrimams buvo naudota Milk Plate agar (REF 610073, „Liofilchem“).

Mikroorganizmų skaičius N (kolonijas sudarantys vienetai viename tiriamo produkto mililitre/grame (KSV/ml)) tiriamajame mėginyje nustatomas apskaičiuojant dviejų vienas po kito einančių skiedinių vidurkį pagal tokią lygtį:

$$N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d}$$

čia:

$\sum C$ - suma kolonijų, suskaičiuotų visose neatmestose lėkštelėse iš dviejų vienas po kito einančių skiedinių, kai bent vienoje lėkštelėje yra mažiausiai 15 kolonijų;

V – užsėtos medžiagos tūris lėkštelėje mililitrais;

n_1 – pirmojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;

n_2 – antrojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;

d – pirmojo vertinamo skiedinio skiedimo koeficientas $d=1$, kai tiriamasis skystas produktas (tiriamas mėginys) yra neskiestas

3.6. Elektroforezė

Bandiniuose esantys baltymai buvo indentifikuojami naudojant elektroforezę. Elektroforezės vykdymo etapai:

- Baltymų standarto paruošimas (Broad Range Marker)

Prieš naudojimą baltymų standartas atšildytas kambario temperatūroje.

- Bandinių paruošimas

Bandinių paruošimas pateiktas 3.1. lentelėje:

3.1. lentelė. Bandinių paruošimas

Bandiniai	Neredukuotiems bandiniams			Redukuotiems bandiniams		
	Baltymų tirpalas (~0,2 – 0,5 % baltymų), µl	LDS Sample Buffer, µl	Distiliuotas vanduo, µl	Baltymų tirpalas (~0,2 – 0,5 % baltymų), µl	LDS Sample Buffer, µl	Sample Reducing Agent, µl
X1	6,5	2,5	1	6,5	2,5	1
X2	32,5	12,5	5	32,5	12,5	5

Paruoštus bandinio buferius sumaišėme su analizuojamu baltymų tirpalu. Paruošti bandiniai kaitinami 10 min 80 °C temperatūroje nuolat maišant.

- Gelio buferio (1X MES Running Buffer) paruošimas

40 ml 20X MES SDS Running Buffer atskiedžiamas 760 ml distiliuoto vandens kiekiu ir išmaišomas.

- Elektroforezės atlikimas

Iš pakuotės išimama gelio kasetė ir atsargiai nuplaunama distiliuotu vandeniu. Išplovus kasetę, atsargiai nulupama apsauginė juostelė ir išimamos šukelės. Su nedideliu 1X MES gelio buferio kiekiu pašalinami oro burbuliukai esantys gelio šulinėliuose. Paruošta gelio kasetė įdedama į gelio kamerą ir pritvirtinama. Vidinė gelio kamera užpildoma gelio buferiu, išorinė gelio kamera iki pusės užpildoma gelio buferiu. Į gelius šulinėlius išvirkščiami paruošti standartai ir redukuoti/neredukuoti bandiniai (20 – 50 µl baltymų <20 µl tūryje į vieną šulinėlį, kai bandinyje yra įvairaus molekulinio dydžio baltymų). Užpildžius visus šulinėlius, išorinė gelio kamera užpildoma gelio buferiu iki viršaus. Prijungiamas maitinimo šaltinis ir 50 min leidžiama 200V srovė, kol bandiniai pasiekia šulinėlio apačią. Bandiniams pasiekus apačią, kasetė išimama ir nuplaunama distiliuotu vandeniu.

Gelio peiliu atsargiai atidaroma gelio kasetė ir įdedama į Coomassie dažus, kuriuose laikoma 12 – 24 val. Nudažytą gelio kasetę labiai atsargiai perkeliame į distiliuoto vandens vonelę ir plauname ~1val.

3.7. IR spektroskopija

Matavimai atlikti FT – IR spektrometru Spektrum GX (Perkin Elmer, JAV). Spektrai buvo užrašomi 2500 – 670 cm^{-1} intervale esant skiriamajai gebai: 1 cm^{-1} , skenavimo pagreičiui: 0,2 cm/s , skenavimo skaičiui: 16 kartų, stiprumui: 1. Kiekvienam mėginiui buvo užrašomi trys atspindžio spektrai. Atspindžio spektrų registravimams naudojome horizontalaus pilno atspindžio priedą ATR (su ZnSe kristalu), ant kurio viso paviršiaus uždedamas mėginys (2 $\text{cm} \times 1 \text{ cm} \times 0,5 \text{ cm}$) ir gerai prispaudžiamas mentele.

3.8. Fazių diagramų sudarymas

Pradžioje paruošti KMC 1% vandens tirpalas ir chitozano 1% vandens tirpalas. Reikalingas CMC kiekis atsveriamas svarstyklėmis 0,0001 tikslumu, užpilamas distiliuotu vandeniu ir maišomas 1 valandą, kambario temperatūroje, naudojant magnetinę maišyklę (IKA C – MAG HS 7, Vokietija). Chitozanas ruošiamas analogiškai kaip ir CMC.

Rūgščių išrūgų mėginys ir KMC (1%) vandens tirpalas buvo maišomi atitinkamais santykiais, kad būtų gauti mišiniai, kuriuose išrūgų baltymų ir KMC santykis būtų 1:1, 2:1, 3:1, 5:1, 10:1, 15:1 ir 30:1. Rūgščių išrūgų mėginys ir chitozano (1%) vandens tirpalas buvo maišomi atitinkamais santykiais, kad būtų gauti mišiniai, kuriuose išrūgų baltymų ir chitozano santykis būtų 1:1, 2:1, 3:1, 5:1, 10:1, 15:1, 30:1. Visų mišinių pH buvo keičiamas 1,5 iki 12, naudojant 0,5 M, 1,0 M, 2,0 M HCl arba 0,5 M, 1,0 M, 2,0 M NaOH tirpalus. Fazių diagrama buvo sudaroma vizualiai vertinant mišinius tuoj po sumaišymo: skaidrus tirpalas, drumstas tirpalas, iškritusios nuosėdos. Taip pat buvo matuojamas mišinių drumstumas, naudojant Evolution™ 300 UV-Vis spektrofotometrą (Thermo Scientific, Loughborough, Didžioji Britanija). Mišinių absorbcija matuota, esant 600 nm bangos ilgiui.

Analogiškai fazių diagramos buvo daromos su IBI ir KMC bei IBI ir chitozano vandens tirpalais. Fazių diagramų sudarymui buvo naudotas 0,5% IBI vandens tirpalas, kuris buvo ruošiamas atsveriant IBI 0,00001 tikslumu, užpilant distiliuotu vandeniu ir maišomas 1 valandą kambario temperatūroje, naudojant magnetinę maišyklę. Fazių diagramų sudarymui naudoti tie patys baltymų ir polisacharidų santykiai kaip ir rūgščių išrūgų atveju.

3.9. ξ potencialo nustatymas

Biopolimerų tirpalų mišinių ir emulsijų zeta-potencialas buvo matuojamas naudojant prietaisą Dispersion technology DT1200 (JAV). Emulsijų ir biopolimerų tirpalų mėginiai buvo atskiesti buferiniais tirpalais santykiu 1:100. Elektrinis krūvis (ξ potencialas) matuotas pagal dalelių judėjimo kryptį ir pagreitį, sukurtame elektros lauke. Elektroforezės mobilumo matavimams paversti ξ potencialo vertėmis buvo naudotas Smoluchowsky matematinis modelis.

Kiekvieno bandinio matavimas buvo pakartotas po tris kartus ir išreikštas šių verčių vidurkis.

3.10. Tirpumo nustatymas

Liofilizuoti baltymų – polisacharidų kompleksų bandiniai buvo tirpinami distiliuotame vandenyje maišant magnetine maišykle (IKA C – MAG HS 7, Vokietija), esant skirtingoms pH reikšmėms (nuo 1 iki 12 pH), kurios buvo reguliuojamos naudojant HCl ir NaOH.

Gauti tirpalai filtruojami naudojant filtravimo popierių. Siekiant nustatyti gautų išrūgų baltymų kompleksų tirpumą gautuose filtratuose nustatomas bendras azoto kiekis, naudojant pamatinį Kjeldalio metodą.

3.11. Emulsijų sudarymas

Baltymų – polisacharidų kompleksų emulsavimo savybių tyrimams buvo paruoštos emulsijos, kurios skyrėsi savo sudėtimi (3.2. lentelė).

Ištirpinti HCl 0,05N tirpale kompleksai buvo maišomi su pirmo spaudimo rapsų aliejumi (Golden Oil, Rusija) ir homogenizuojami homogenizatoriumi ULTRA TURRAX (IKA Werke, Staufen, Vokietija) 5 min, 24000 aps/min greičiu.

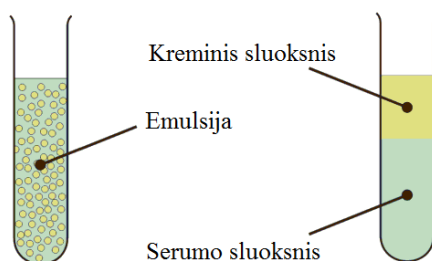
3.2. lentelė. Bandinių sudėtis

Sudėtinės medžiagos	Kompleksų koncentracija emulsijoje														
	0,2 %			0,4 %			0,6 %			0,8 %			1,0 %		
Bandinio Nr.	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Rapsų aliejus, ml	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
KMC + IBI + H ₂ O, ml	50			50			50			50			50		
Ištirpinti išrūgų baltymų kompleksai (gauti naudojant KMC) + H ₂ O, ml			50			50			50			50			50

3.12. Emulsijų stabilumo tyrimai

Emulsijų stabilumui nustatyti, emulsijos buvo išpilstytos po 10 ml į graduotus mėgintuvėlius, mėgintuvėliai sandariai uždaryti naudojant „policeliuliozinę“ plėvelę. Bandiniai laikomi 48 val kambario temperatūroje (~18 °C).

Emulsijos išsisluoksniuoja į du sluoksnius, viršutinį (kreminį) ir apatinį (serumą), 3.2. paveikslas. Išsisluoksniavimas buvo fiksuojamas po 1, 3, 24, 36, 48 valandų.



3.2. pav. Emulsijų išsisluoksniavimas

Išsisluoksniavimo indeksas (I) išreiškiamas procentais pagal 3.1. formulę:

$$I = \left(\frac{M_S}{M_E} \right) \cdot 100 \quad [\%] \quad (3.1.)$$

čia: M_S – serumo kiekis; M_E – bendras emulsijos kiekis [5 Rita]

Kiekvieno bandinio matavimas buvo pakartotas po tris kartus ir išreikštas šių verčių vidurkis.

3.13. Reologinė analizė

Emulsijų reologinės charakteristikos buvo nustatytos užrašant tekėjimo kreives 20 oC temperatūroje reometru Physica MCR (Anton Paar GmbH, Gratz, Austrija), kurios gaunamos išmatavus poslinkio įtempio priklausomybę nuo poslinkio spartos. Poslinkio sparta didinta nuo 0 iki 1000 s⁻¹. Matavimuose taikyta kūgis-plokštelė sistema, kur kūgio diametras buvo 60 mm ir kūgio kampas buvo 2o. Tekėjimo elgesys įvertintas pagal Oswald lygtį, priklausomai nuo didžiausių R₂ reikšmių ir mažiausių standartinių nuokrypių:

$$\tau = A \cdot \gamma^n \quad [\text{Pa}] \quad (3.2.)$$

čia: A – konsistencijos indeksas arba tariamoji klampa; γ – poslinkio sparta, s⁻¹; n – koeficientas, nusakantis tekėjimo pobūdį

Emulsijų tiksotropinėms savybėms nustatyti tarp plokštelių, skirtų reologiniams matavimams, įdėjome bandinį. Apsisukimų greitis buvo didinamas nuo 0 – 1000 s⁻¹ per 5 min (didėjimo kreivė),

pasiekus apsisukimų greitį 1000 s^{-1} laikomas pastovus 50 s ir mažinamas iki 0 s^{-1} per 5 min (mažėjimo kreivė), deformacija buvo matuojama kas 10 s, atliekami trys matavimų pakartojimai.

3.14. Riebalų rutulėlių dydžio pasiskirstymo nustatymas

Riebalų rutulėlių dydžių pasiskirstymas emulsijose ir emulsijų bei virškinimo sulčių mišiniuose nustatytas lazerio difrakciniu spektrometru Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Didžioji Britanija). Įrengimas matuoja dalelių dydžius, kurie svyruoja 0,02-2000 nm ribose. Matavimų metu mėginiai disperguoti maišymo celėje distiliuotame vandenyje. Matavimai atlikti per 24 valandas po to, kai emulsijos buvo pagamintos arba iš karto paėmus mėginius (tiriant emulsijų virškinimą). Riebalų rutulėlių ir tirpiklio refrakciniai indeksai nustatyti atitinkamai 1,5 ir 1,33.

3.15. Statistinė analizė

Eksperimentai kartoti tris kartus, rodiklių matavimus atliekant tris kartus. Rezultatai pateikti kaip vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai, apskaičiuoti MS Excel 2010 programa.

4. Rezultatai ir jų aptarimas

4.1. Išrūgų savybių pokyčiai laikymo metu

Pirmajame darbo etape tyrėme rūgščių išrūgų savybių pokyčius laikymo metu. Žinios apie išrūgų pasikeitimą laikant ypač svarbios mažiems pieno perdirbėjams, kuriems po varškės sūrių ir varškės gamybos susidaro nedaug išrūgų ir tolesniam jų perdirbimui reikia sukaupti didesnę jų kiekį. Rūgščios išrūgos tyrimams buvo paimtos iš atviros ir uždaros varškės gamybos rezervuarų, kurie dažniausiai naudojami Lietuvos pieno perdirbimo įmonėse, ir palyginta jų cheminė sudėtis. Paskui išrūgos buvo laikomos 6°C ir 18°C temperatūroje. Išrūgų sudėties pokyčius vertinome nustatydami baltyminio ir nebaltyminio azoto kiekį. Taip pat matavome išrūgų pH ir titruojamąjį rūgštingumą laikymo metu. Išrūgose vykstančius mikrobiologinius pokyčius vertinome matuodami tris rodiklius: bendrą mikroorganizmų skaičių, proteolitinių bakterijų skaičių ir pienarūgščių bakterijų skaičių.

4.1.1. Rūgščių išrūgų cheminė sudėtis

Pirmiausia nustatėme rūgščių išrūgų, gautų po atviro ir uždaro varškės gamybo būdo sudėtį ir palyginome gautus rezultatus su kitų autorių publikuotais duomenimis. Svarbu, kad abiem būdais gautos išrūgos buvo iš tos pačios pieno perdirbimo įmonės. Rezultatai pateikti 4.1. lentelėje.

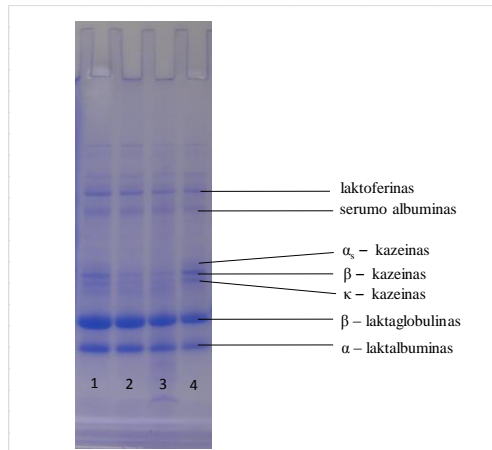
4.1. lentelė. Rūgščių išrūgų cheminė sudėtis ir savybės

Išrūgos gautos taikant varškės gamybos būdą:	Rodikliai				
	Bendras baltymų kiekis, %	pH	Titruojamasis rūgštingumas, T°	Sausųjų medžiagų kiekis, %	Riebalų kiekis, %
Atvira gamyba	1,0933	4,49	72,3	6,14	0,05
Uždara gamyba	0,7947	4,5	64,9	6,67	0,3

Sausųjų medžiagų kiekis rūgščiose išrūgose gautose gaminant varškę skyrėsi 0,53%. Didesnis sausųjų medžiagų kiekis buvo išrūgose gautose iš uždaros gamybos rezervuarų. Išrūgų pH vertės nepriklausė nuo jų gaimo būdo. Nustačius titruojamąjį rūgštingumą pamatėme, kad atviros gamybos išrūgose jis yra ženkliai didesnis (72,3 T°), tuo tarpu uždaros gamybos išrūgose titruojamasis rūgštingumas buvo gautas – 64,9 T°. Tai galima paaiškinti didesniu baltymų kiekiu išrūgose, gautose iš atvirų varškės gamybos vonių. Žinoma, kad pieno baltymų karboksilinės grupės turi įtakos titruojamojo rūgštingumo vertėms. Riebalų kiekis rūgščiose išrūgose priklausė nuo jų gamybos būdo. Nustatyta, kad išrūgų paimtų iš uždaros gamybos rezervuarų riebumas buvo 0,3 %, o išrūgų paimtų iš atviros gamybos rezervuarų – 0,05%. Nebaltyminio azoto kiekiai mažai skyrėsi, tačiau baltyminio azoto kiekis atviros gamybos rūgščiose išrūgose buvo 1,5 didesnis negu uždaros gamybos išrūgose. Tai reiškia, kad baltymų kiekis atviros gamybos rūgščiose išrūgose buvo 1,4 karto didesnis negu uždaros gamybos išrūgose.

Lyginant gautus rūgščių išrūgų cheminės analizės rezultatus su Jordanijos mokslininkų pateiktais duomenimis [1] 2012 metais ir Rusijos mokslininkų [4] 1989 metais pateikta informacija, gauti rezultatai mažai skyrėsi.

Siekiant identifikuoti rūgščiose išrūgose esančius baltymus išrūgos buvo frakcionuojamos, panaudojant elektroforezę. Rezultatai pateikti 4.1. paveiksle, kuriame skirtinguose elektroforezės gelio takeliuose yra rūgščios išrūgos, sukcentruotos iki 65% baltymų koncentracijos.



4.1. pav. Rūgščių išrūgų elektroforezė

Iš pateiktų rezultatų matome, kad analizuoti skirtingų baltymų koncentracijų išrūgų bandiniai mažai skyrėsi baltymų sudėtimi. Rūgščiose išrūgose identifikuoti baltymai yra pateikti 4.2. lentelėje.

4.2. lentelė. Rūgščių išrūgų baltymų frakcijos, nustatytos elektroforezės būdu

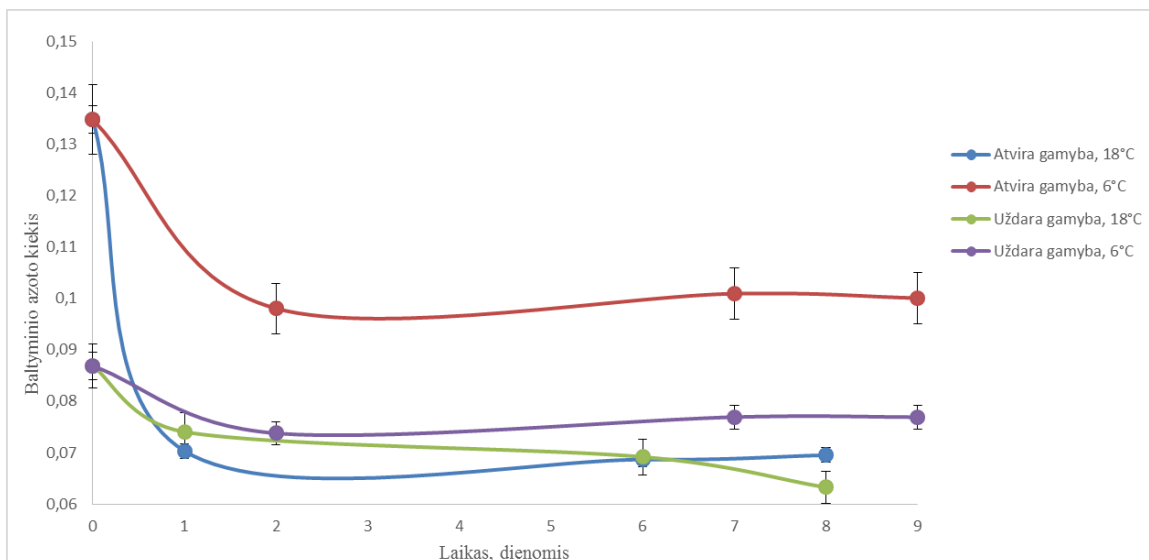
Nr.	Dydis, kDa	Junginys	Nuoroda
1.	15	α – laktalbuminas	[39]
2.	20	β – laktoglobulinas	[39]
3.	30	α_s – kazeinas	[39]
4.	27	β – kazeinas	[38]
5.	25	κ – kazeinas	[38]
6.	60	serumo albuminas	[39]
7.	80	laktoferinas	[39]

Rūgščiose išrūgose iš viso buvo nustatyta 10 junginių, iš jų identifikuoti 7 junginiai: α – laktalbuminas, β – laktoglobulinas, α_s – kazeinas, β – kazeinas, κ – kazeinas, serumo albuminas, laktoferinas. Pagrindiniai analizuotų bandinių junginiai pagal juostelės ryškumą takelyje buvo α – laktalbuminas, β – laktoglobulinas. Tai sutampa su kitų autorių publikuojamais straipsniais apie išrūgų baltymų frakcijas ir jų sudėtį [29, 37, 38, 48].

4.1.2. Fizikinių cheminių savybių kitimas laikymo metu

Toliau tyrėme, kaip keitėsi išrūgų baltymai ir savybės laikymo metu. Baltymų pokyčius vertinome matuodami baltyminio ir nebaltyminio azoto kieki. Nebaltyminio azoto kiekis pasirinktas kaip baltymų skilimo produktų – mažesnės molekulinės masės azoto junginių, rodiklis.

Baltyminio azoto pokyčiai laikymo 6°C ir 18°C temperatūroje 8 – 9 paras pateikti 4.2. paveiksle. Iš gautų rezultatų matome, kad didžiausi baltyminio azoto nuostoliai užfiksuoti per pirmas 24 valandas, laikant išrūgas iš atviros gamybos rezervuarų 6°C ir 18°C temperatūroje bei laikant išrūgas iš uždaros gamybos rezervuarų 18°C temperatūroje. Jie atitinkamai sudarė 48%, 27% ir 14,74%. Tolesnio laikymo metu baltyminio azoto kiekis išrūgose kito nežymiai ir sudarė 1,3 – 2,4% po 9 parų laikymo. Rūgščiose išrūgose, kurios buvo paimtos iš uždaros gamybos rezervuarų, baltyminio azoto kiekio pokyčiai laikant 9 paras 6°C temperatūroje buvo tik 0,24%.

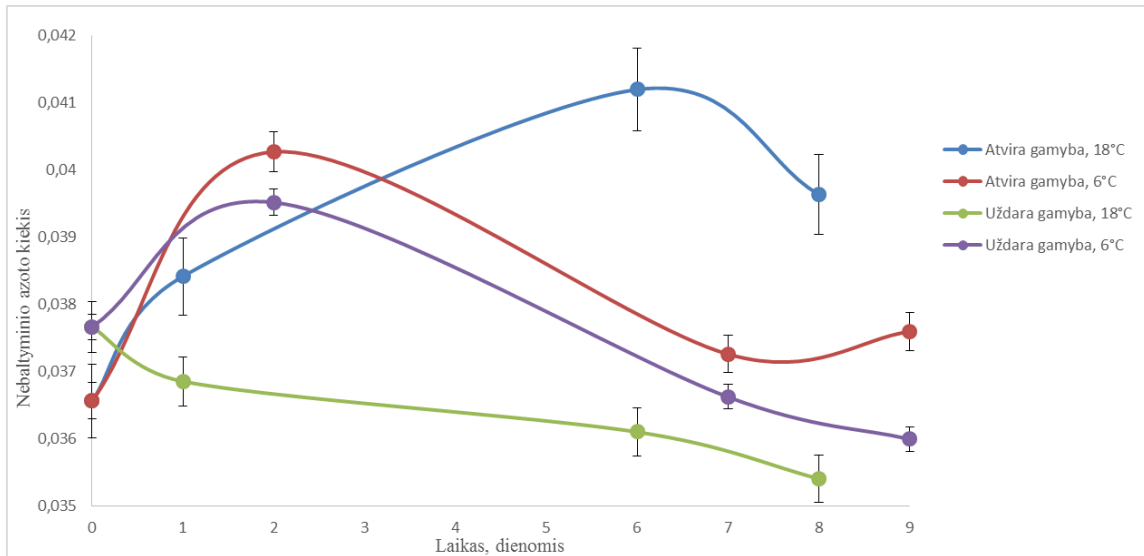


4.2. pav. Baltyminio azoto kiekis rūgščiose išrūgose, kurios buvo laikomos skirtingose temperatūrose

Lygiagrečiai atlikta nebaltyminio azoto kiekio analizė, skirtingus išrūgų bandinius laikant 6°C ir 18°C temperatūroje. Gauti rezultatai pateikti 4.3. paveiksle.

Iš 4.3. paveikslo matome, kad nebaltyminio azoto kiekis tiek atviros, tiek uždaros gamybos rūgščiose išrūgose laikymo pradžioje buvo 0,23 – 0,24%. Laikymo metu jo kiekis keitėsi skirtingai. Atviros gamybos rūgščiose išrūgose laikytose 6°C temperatūroje per pirmas 48 valandas nebaltyminio azoto kiekis padidėjo 10%, o toliau laikant tolygiai mažėjo. Tuo tarpu laikant šias išrūgas 18°C temperatūroje, nebaltyminio azoto kiekis po 24 valandų padidėjo 5%, o praėjus 6 paroms nuo laikymo pradžios jo kiekis dar padidėjo 6,75%. Vėliau nebaltyminio azoto kiekis išrūgose ėmė mažėti. Išrūgose paimtose iš uždaros gamybos rezervuaro ir laikytose 6°C temperatūroje nebaltyminio azoto kiekis

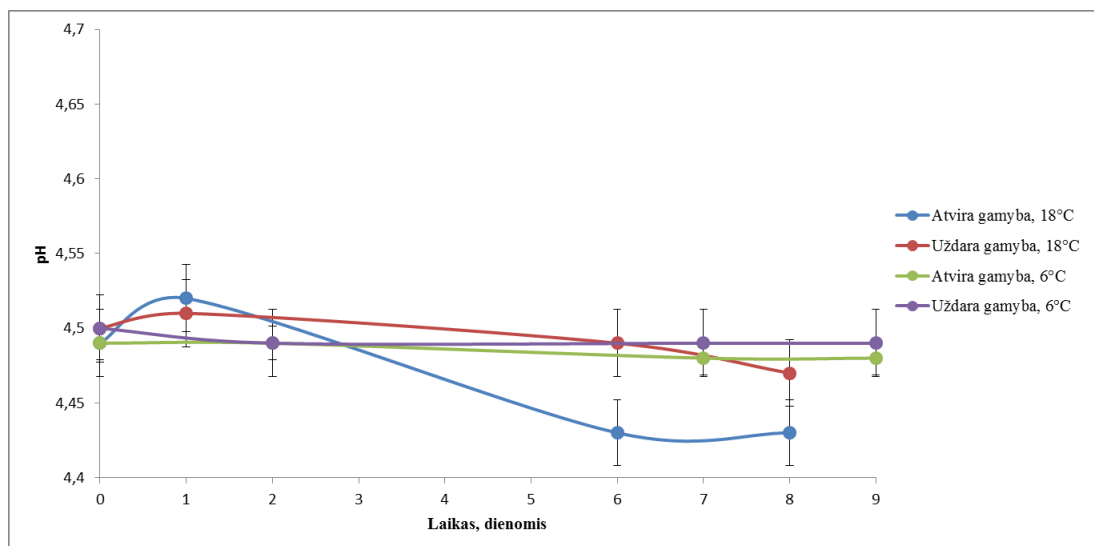
padidėjo 5% po 48 valandų laikymo ir toliau laikant jo kiekis mažėjo. Tuo tarpu nebaltyminio azoto kiekis, laikant uždaros gamybos išrūgas 18°C temperatūroje nežymiai tolygiai mažėjo viso laikymo metu. Nebaltyminio azoto mažėjimas rūgščių išrūgų laikymo pabaigoje gali būti dėl susidariusių lakių amoniako junginių, kurie išgaravo.



4.3. pav. Nebaltyminio azoto kiekio pokyčiai rūgščiose išrūgose, kurios buvo laikomos skirtingose temperatūrose

Taigi, nepriklausomai nuo išrūgų gavimo būdo (iš atviro ar uždaro varškės gamybos rezervuaro) baltyminio azoto kiekis laikant išrūgas 24 – 48 val. mažėja, o nebaltyminio azoto kiekis didėja. Šie procesai intensyviau vyksta, kai išrūgos laikomos 18°C temperatūroje. Tokie azotinių medžiagų pokyčiai rodo, kad 24 – 48 val. laikomose išrūgose vyksta baltymų skilimo procesai, dėl kurių mažėja baltyminio azoto kiekis, o nebaltyminio azoto kiekis, kuris rodo mažos molekulinės masės azotinių junginių susidarymą, didėja. Tokius procesus gali įtakoti po varškės gamybos išrūgose likusios proteolitinės bakterijos [43]. Šiai hipotezei patvirtinti atlikome išrūgų mikrobiologinę analizę (4.1.3. skyrius).

Lygiagrečiai cheminės analizės tyrimams buvo atliekami laikomų išrūgų pH matavimai. Iš gautų rezultatų (4.4. paveikslas) pastebime, kad pH pokyčiai per pirmas 24 valandas buvo nežymūs. Atviros ir uždaros gamybos rūgščias išrūgas laikant 6°C temperatūroje pH reikšmės beveik nepakito net po 8 ir 9 dienų. Žymūs pH pokyčiai išrūgose gauti tik iš uždaros gamybos rezervuaro paimtų ir laikytų 18°C temperatūroje, kurie laikymo metu sumažėjo 1,2 karto.



4.4. pav. Rūgščių išrūgų pH pokyčiai, laikant skirtingose temperatūrose

4.1.3. Mikrobiologinių rodiklių kitimas išrūgų laikymo metu

Siekiant įvertinti rūgščių išrūgų mikrobiologinius pokyčius laikymo metu buvo atlikta išrūgų mikrobiologinė analizė.

Buvo nustatyti trys mikrobiologiniai rodikliai: bendras mikroorganizmų skaičius, dar vadinamas kolonijas sudarančių vienetų (KSV) skaičiumi, proteolitinių bakterijų skaičius ir pienarūgščių bakterijų skaičius.

Rūgščių išrūgų mikrobiologiniai pokyčiai buvo nustatyti šviežiose išrūgose ir po 2 dienų laikymo, 18°C temperatūroje. Gauti rezultatai pateikti 4.3. lentelėje.

4.3. lentelė. Rūgščių išrūgų mikrobiologinių rodiklių kitimas laikymo metu

Rodikliai	Laikas, dienomis	
	0 diena	Po 2 dienų
Pienarūgščių bakterijų skaičius, KSV/ml	$2,5 \times 10^4$	$< 10^3$
Proteolitinių bakterijų skaičius, KSV/ml	$4,7 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$
Bendras bakterijų skaičius, KSV/ml	-	$6,3 \times 10^3$

Nustatyta, kad pienarūgščių bakterijų kiekis laikymo metu ženkliai sumažėjo. Proteolitinių bakterijų skaičius padidėjo 4,68%. Bendras bakterijų skaičius po dviejų dienų – $6,3 \times 10^3$ KSV/ml.

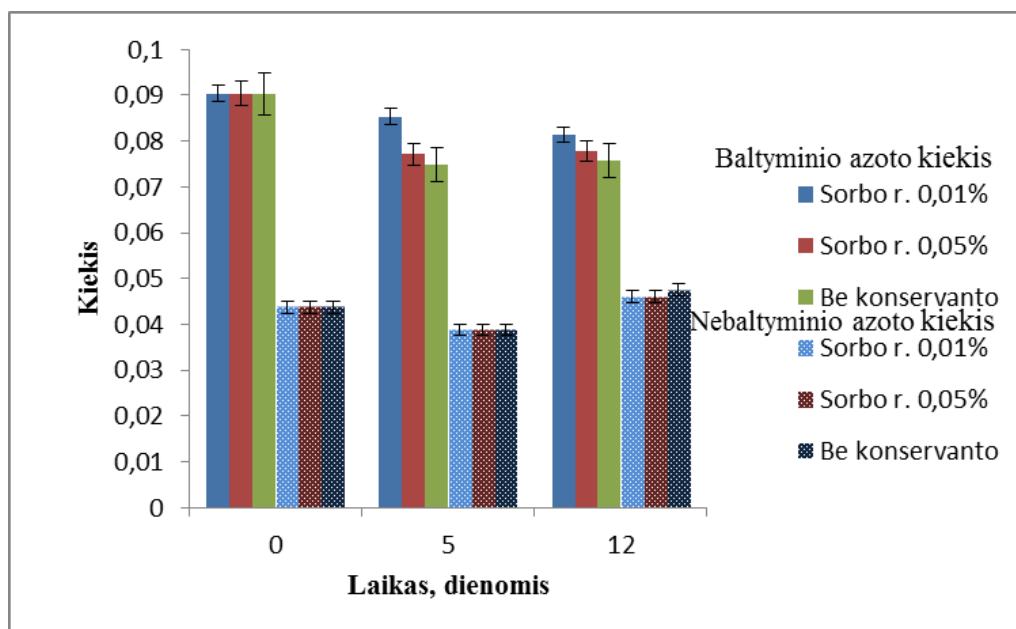
Gauti duomenys patvirtino mūsų iškeltą hipotezę apie proteolitinių bakterijų dominavimą rūgščiose išrūgose. Dėl jų veiklos laikant išrūgas vyksta baltymų proteolizė, dėl kurios mažėja baltyminio azoto kiekis, o nebaltyminio azoto kiekis didėja. Tai, kad nustatėme neženklų išrūgų pH mažėjimą laikymo

metu taip pat patvirtina mikrobiologinės analizės rezultatai, kurie parodė kad laikant išrūgas jose esančių pienarūgščių bakterijų kiekis mažėjo.

4.1.4. Fizikinių cheminių savybių kitimas konservuotose išrūgose laikymo metu

Lietuvos pieno perdirbimo įmonėms, kuriose po varškės ir varškės sūrių gamybos susidaro nedideli išrūgų kiekiai, svarbu sukaupti ir išlaikyti išrūgas ilgesnį laiką, siekiant optimizuoti jų perdirbimą. Kaip parodė mūsų ankstesni tyrimai, laikant išrūgas vyksta intensyvūs jų baltymų pokyčiai dėl po varškės gamybos likusių proteolitinių bakterijų, kurios skaldo baltymus ir dėl to mažėja baltymų kiekis laikomose išrūgose. Dėl šios priežasties rūgščias išrūgas reikia konservuoti. Pieno pramonėje įprastas konservavimas šiluma – pasterizacija, šiuo atveju nėra tinkamas metodas, nes rūgščioje terpėje įvyks baltymų koaguliacija. Todėl reikia ieškoti kito būdo išrūgų konservavimui, t.y. cheminio konservavimo būdo. Tam parinkome žinomą ir pieno pramonėje plačiai naudojamą konservantą – sorbo rūgštį. Nustatėme, kaip keitėsi pH bei baltyminio ir nebaltyminio azoto kiekis laikant išrūgas, kurių konservavimui buvo naudotas skirtingas sorbo rūgšties kiekis.

Sorbo rūgštimi konservuotos rūgščios išrūgos buvo laikomos 18°C temperatūroje 12 dienų. Baltyminio azoto ir nebaltyminio azoto kiekio pokyčiai pateikti 4.5. paveiksle.



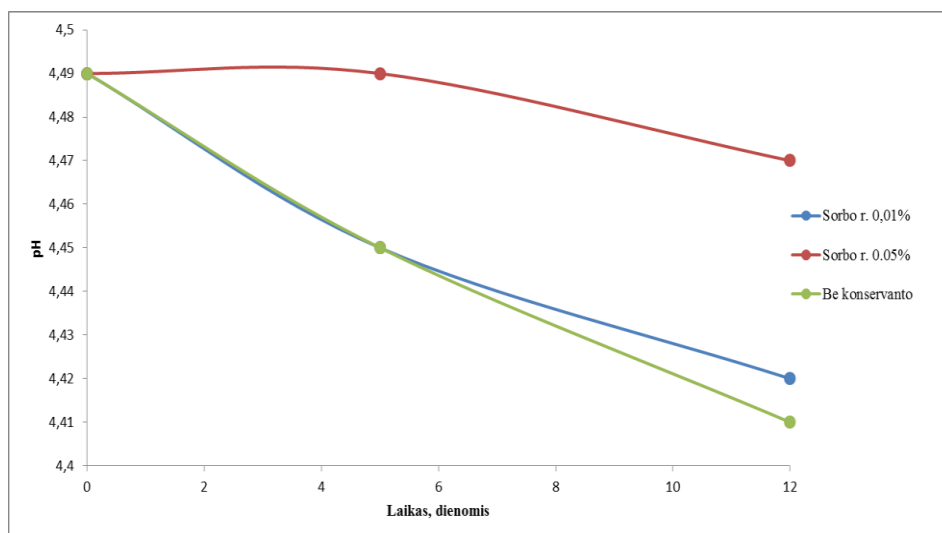
4.5. pav. Baltyminio ir nebaltyminio azoto kiekis rūgščiose išrūgose konservuotose skirtingu sorbo rūgšties kiekiu

Mažiausi baltyminio azoto kiekio nuostoliai gauti išrūgų konservavimui naudojant 0,01% sorbo rūgštį, jose baltyminio azoto sumažėjo 9,7%. Didesni baltyminio azoto nuostoliai (13,85%) gauti

konservavimui naudojant 0,05% sorbo rūgštį. Laikant išrūgas be konservanto gauti baltyminio azoto nuostoliai sudarė 16,19%.

Remiantis gautais rezultatais galime daryti išvadą, kad konservanto koncentracija nebaltyminio azoto kiekiui rūgščiose išrūgose įtakos neturėjo. Nekonservuotose išrūgose susidariusio nebaltyminio azoto kiekis 6% didesnis nei naudojant konservantą.

Atlikus pH matavimus pastebima, kad pH reikšmės laikymo metu mažėja. Rūgščiose išrūgose konservuotose 0,05% sorbo rūgštimi pH pokyčiai buvo mažiausi (0,02). Nekonservuotų ir konservuotų naudojant 0,01% sorbo rūgštį pH sumažėjo atitinkamai 0,8 ir 0,7. pH matavimų rezultatai pateikti 4.6. paveiksle.



4.6. pav. pH pokyčiai konservuotose išrūgose laikymo metu

Atlikus fizikinių cheminių savybių tyrimus konservuotose išrūgose laikymo metu galime teigti, kad efektyviausias rūgščių išrūgų konservavimas yra naudojant 0,01% sorbo rūgštį.

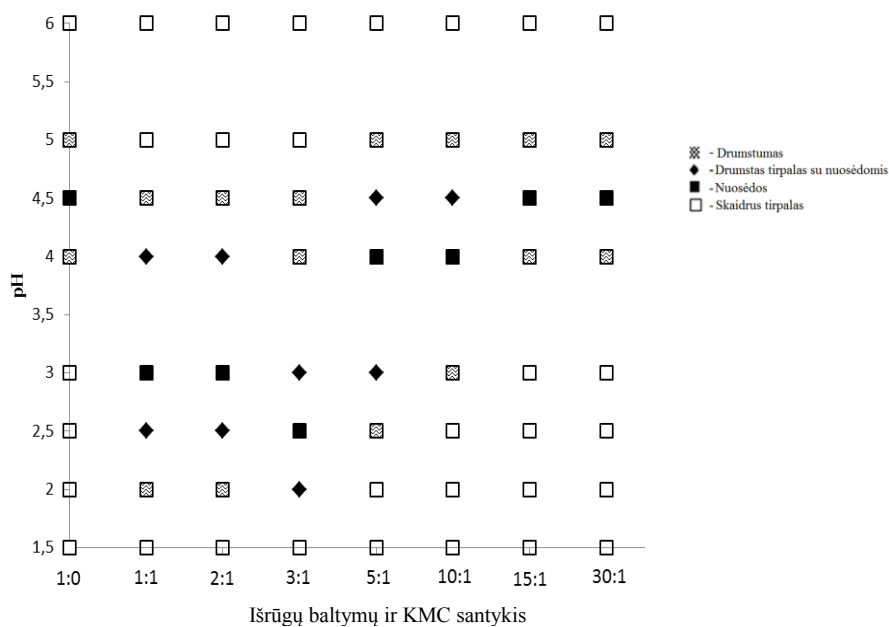
4.2. Išrūgų baltymų išskyrimas iš rūgščių išrūgų, sudarant kompleksus su polisacharidais

Norint tikslingai panaudoti rūgščiose išrūgose esančius baltymus aktualu juos išgryninti. Vienas iš būdų nusodinti baltymus iš išrūgų – sudaryti jų kompleksus su anijoniniais arba katijoniniais polisacharidais keičiant tirpalų pH. Žinoma, kad kompleksai tarp baltymų ir polisacharidų susidaro veikiant elektrostatinėms jėgoms tarp skirtingai įkrautų baltymo bei polisacharido funkcinių grupių. Taigi, pradžioje tyrėme išrūgų baltymų sąveiką su anijoniniu polisacharidu – karboksimeilceliulioze ir katijoniniu – chitozanu.

4.2.1. Išrūgų baltymų sąveika su karboksimetilceliulioze

Sąveika tarp išrūgų baltymų ir karboksimetilceliuliozės (KMC) vandens tirpalų mišiniuose buvo vertinama sudarant fazių diagramas. Tuo tikslu išrūgų baltymų izoliato (IBI) ir KMC vandens tirpalai buvo maišomi skirtingais santykiais: 1:1; 2:1; 3:1; 5:1; 10:1; 15:1; 30:1, keičiant mišinio pH nuo 1,5 iki 6,0. Mišinius vertinant vizualiai buvo nustatytos trys būsenos: skaidrus tirpalas, drumstas tirpalas, iškritusios nuosėdos. Pagal šiuos vertinimus buvo sudarytos fazių diagramos. Taip pat buvo matuoja mišinių absorbcija, esant 600 nm bangos ilgiui bei ξ potencialas. Analogiški tyrimai atlikti maišant rūgščias išrūgas su KMC. Mišiniai buvo sudaryti taip, kad baltymų ir KMC santykis mišiniuose buvo toks pats kaip ir IBI ir KMC mišinių atveju.

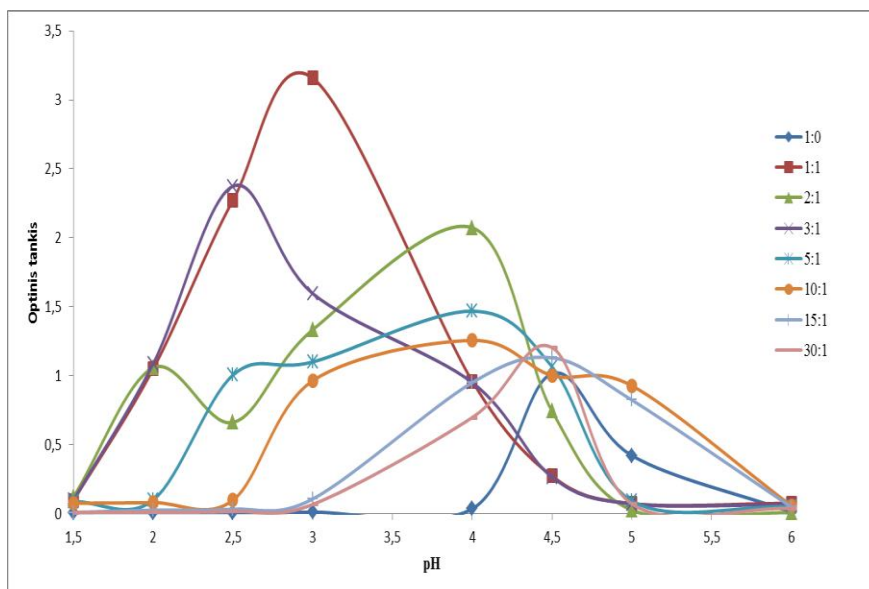
Skirtingais santykiais maišant IBI ir KMC tirpalus ir keičiant pH reikšmes gauta fazių diagrama, pateikta 4.7. paveiksle, o optinio tankio kitimas pavaizduotas 4.8. paveiksle.



4.7. pav. IBI ir KMC tirpalų fazių diagrama priklausomai nuo pH

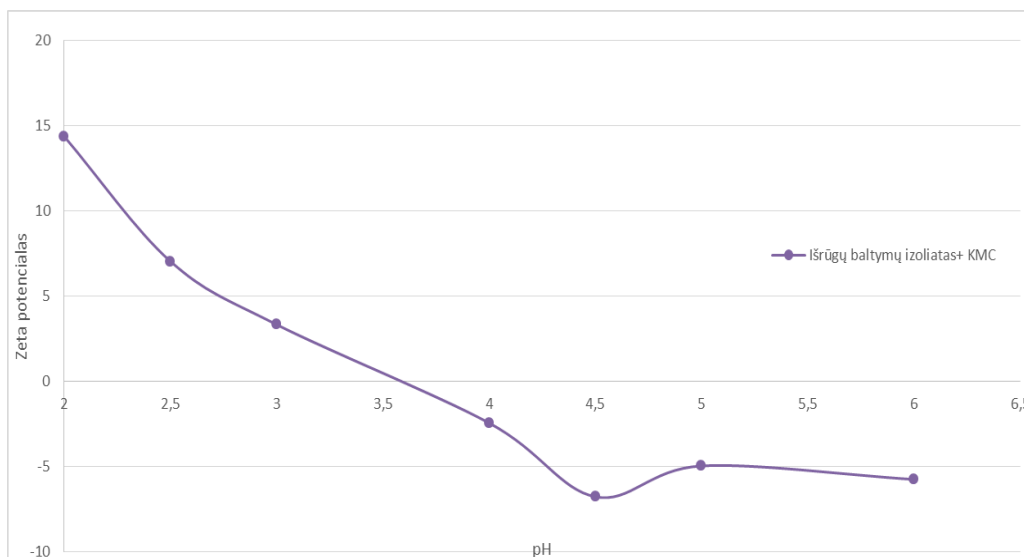
Iš 4.7. ir 4.8. paveikslų matyti, kad kai tirpalų pH buvo tarp 6 – 7, visuose mišiniuose nustatyta viena skaidri fazė, kurios optinis tankis buvo mažas. Viena skaidri fazė, kurios optinis tankis mažas, nustatyta ir esant pH 1,5. Nepriklausomai nuo IBI ir KMC santykio tirpalų mišinyje, esant pH nuo 4,0 iki 4,5, buvo gauti drumsti tirpalai, kurie pasižymėjo dideliu optiniu tankiu. Sumažinus pH iki 3 ir 3,5, kai IBI ir KMC santykis mišiniuose atitinkamai buvo 1:1, 2:1 ir 3:1, nustatytos dvi fazės, sudarytos iš nuosėdų ir neskaidraus tirpalo. Dviejų fazių būseną išliko ir esant pH 2,5, o pH sumažinus iki 2,

nustatytos dvi fazės, kurias sudarė nuosėdos ir skaidrus tirpalas. Lyginant gautus rezultatus su kitų autorių pateikta informacija rezultatai mažai skyrėsi [49, 50].



4.8. pav. IBI ir KMC vandens tirpalų mišinių optinis tankis priklausomai nuo pH

Analizuojant optinio tankio kitimo kreives, matome, kad sistemos didžiausio optinio tankio intervalai siaurėja, didinant KMC kiekį tirpalų mišinyje. Šie duomenys atitinka fazių diagramoje pavaizduotas IBI ir KMC tirpalų būsenas.



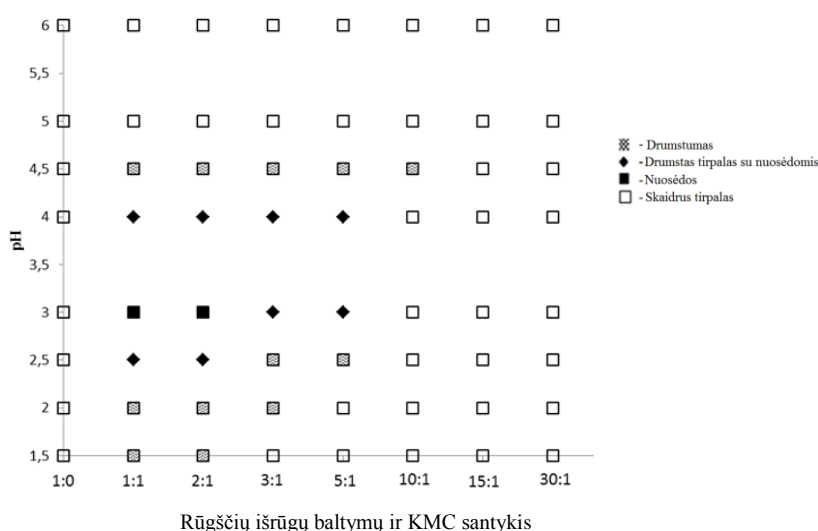
4.9. pav. IBI ir KMC vandens tirpalų ξ – potencialas priklausomai nuo pH

Baltymų ir polisacharidų elektrosstatinės sąveikos vertinimui tyrėme biopolimerų tirpalų ξ – potencialus. Kaip matome iš 4.9. paveiksle pateiktų duomenų, ξ – potencialo matavimai patvirtino

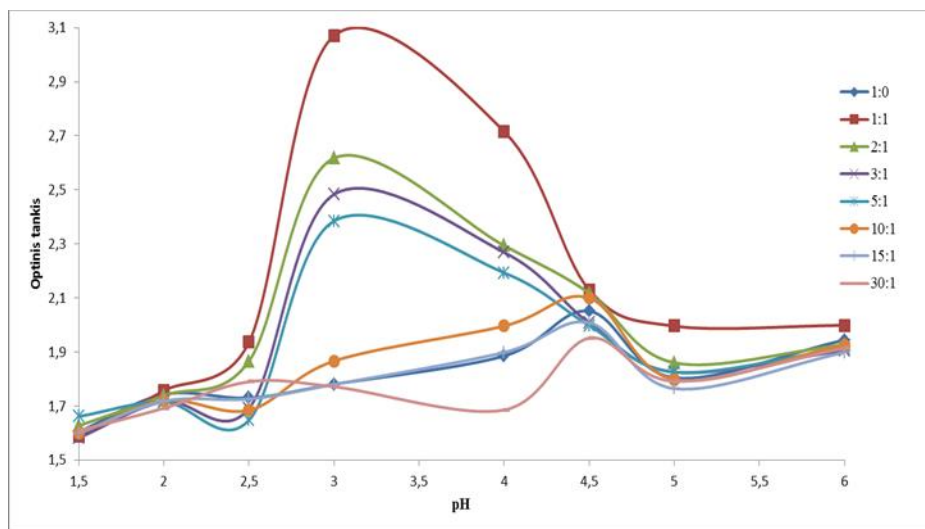
anksčiau iškeltą prielaidą, kad išrūgų baltymai ir KMC vandens tirpaluose sudaro elektrostatinis kompleksus, esant pH nuo 3 iki 4. Iš IBI ir KMC tirpalų mišinio ξ – potencialo matavimų rezultatų matome, kad esant pH 3,5, išrūgų baltymų teigiamos grupės neutralizavo KMC funkcinių grupių krūvį, todėl nustatytas ξ – potencialas lygus 0. Tai reiškia, kad sąveika tarp IBI ir KMC įvyko.

4.2.2. Rūgščių išrūgų baltymų sąveika su karboksimetilceliulioze

Skirtingais santykiais maišant rūgščių išrūgų baltymų ir KMC tirpalus ir keičiant pH reikšmes gauta fazių diagrama, pateikta 4.10. paveiksle, o optinio tankio kitimas pavaizduotas 4.11. paveiksle.



4.10. pav. Rūgščių išrūgų baltymų ir KMC vandens tirpalų mišinių fazių diagrama priklausomai nuo pH



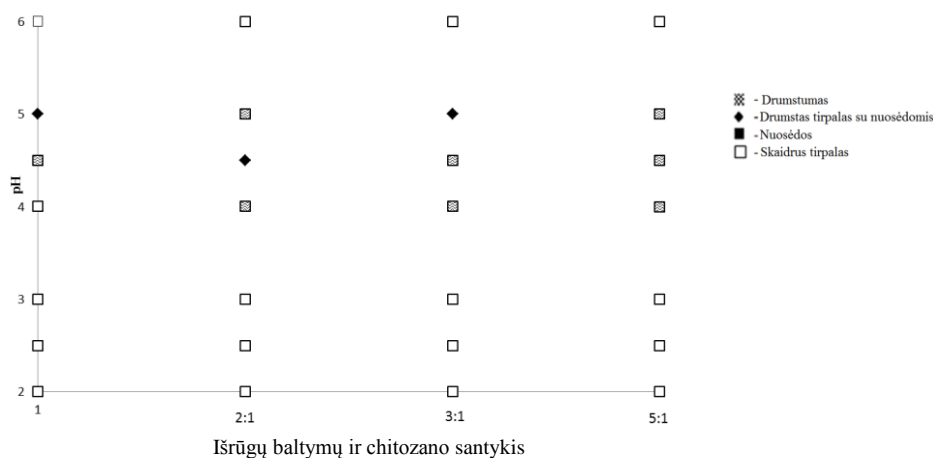
4.11. pav. Rūgščių išrūgų baltymų ir KMC vandens tirpalų optinis tankis priklausomai nuo pH

Iš 4.10. ir 4.11. paveikslų matyti, kad kai tirpalų pH buvo tarp 5 – 6, visuose mišiniuose nustatyta viena skaidri fazė, kurios optinis tankis buvo mažas. Viena skaidri fazė nustatyta ir esant mišinių pH 1,5 kai rūgščių išrūgų baltymų ir KMC santykis mišinyje buvo 3:1. Viena skaidri fazė nustatyta ir prie visų pH reikšmių esant santykiams 10:1, 15:1 ir 30:1. Rūgščių išrūgų baltymų ir KMC santykiams esant 1:1, 2:1, 3:1 ir 5:1, pH intervale 2,5 – 4 gauti drumsti tirpalai, kurių optinis tankis buvo didelis.

Analizuojant optinio tankio kitimo kreives, matome, kad sistemos didžiausio optinio tankio intervalai siaurėja, didinant KMC kiekį tirpalų mišinyje. Šie duomenys atitinka fazių diagramoje pavaizduotas rūgščių išrūgų baltymų ir KMC tirpalų būsenas.

4.2.3. Išrūgų baltymų sąveika su chitozanu

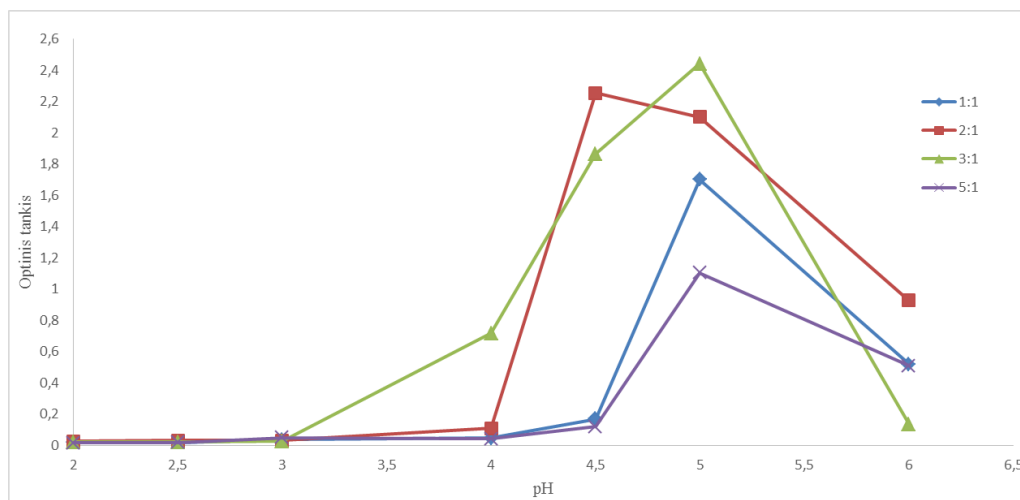
Daugelyje baltymų ir polisacharidų sistemų destabilizuojančios jėgos pasireiškia stipriau nei stabilizuojančios, dėl to šių sistemų išsisluoksniavimas į skirtingas fazes yra neišvengiamas. Mūsų tirti išrūgų baltymų ir chitozano įvairių koncentracijų mišiniai taip pat buvo linke drumstis, pasiekus mišinio pH 4 – 5. (4.12 pav.). Įvertinus tai, kad išrūgų baltymų molekulių ir chitozano grandinių funkcinės grupės, esant mažoms pH reikšmėms, turi vienodo ženklo (teigiamą) krūvį, galima teigti apie tarp šių polimerų veikiančias atostūmio jėgas, kai pH buvo intervale 2 – 3. Tai, pagal polimerų maišumo teoriją, sąlygoja didesnę sąveiką tarp tirpiklio ir skirtingų polimerų nei tarpusavyje tarp skirtingų polimerų, dėl ko sistema neišsisluoksniuoja į dvi skirtingas fazes.



4.12. pav. IBI ir chitozano vandens tirpalų fazių diagrama priklausomai nuo pH

Iš paveikslų matyti, kad kai tirpalų pH buvo 6, visuose mišiniuose nustatyta viena skaidri fazė, kurios optinis tankis buvo mažas. Visų tirpalų skaidrios fazės nustatytos ir esant pH ribose nuo 2,0 iki 3,0. Nepriklausomai nuo IBI ir chitozano santykio tirpalų mišinyje, esant pH nuo 4,0 iki 4,5, buvo gauti

drumsti tirpalai, kurie pasižymėjo didesniu optiniu tankiu. Padidinus pH iki 5 esant įvairiems IBI ir chitozano santykiams, optinis tankis visuose tirpaluose gautas didelis, nustatyta pakibusių didelių dalelių tirpale fazė.



4.13. pav. IBI ir chitozano vandens tirpalų mišinių optinis tankis priklausomai nuo pH

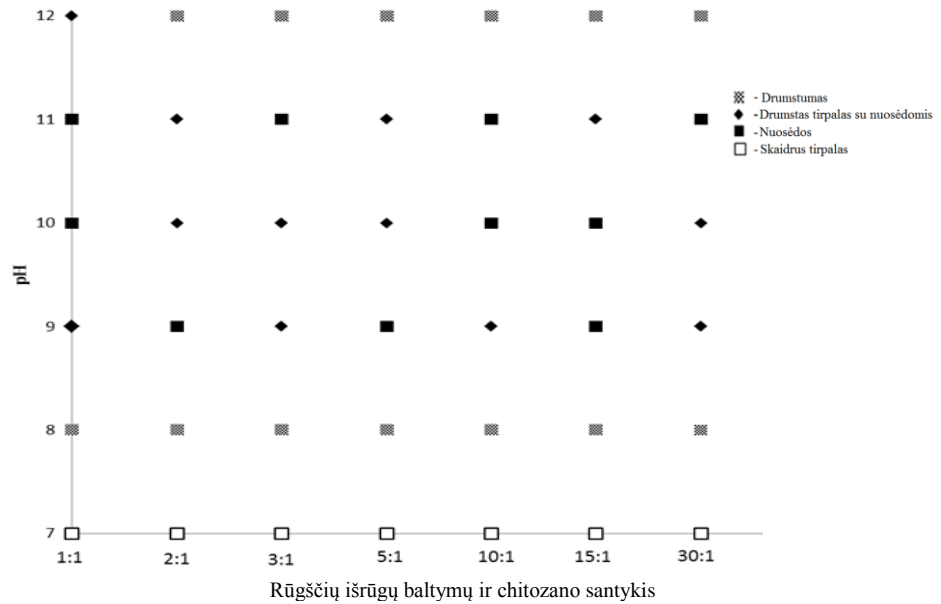
Analizuojant optinio tankio kitimo kreives, matome, kad sistemos didžiausio optinio tankio intervalai plėtėja, didinant chitozano kiekį tirpalų mišinyje. Šie duomenys atitinka fazių diagramoje pavaizduotas IBI ir chitozano tirpalų būsenas.

4.2.3. Rūgščių išrūgų baltymų sąveika su chitozanu

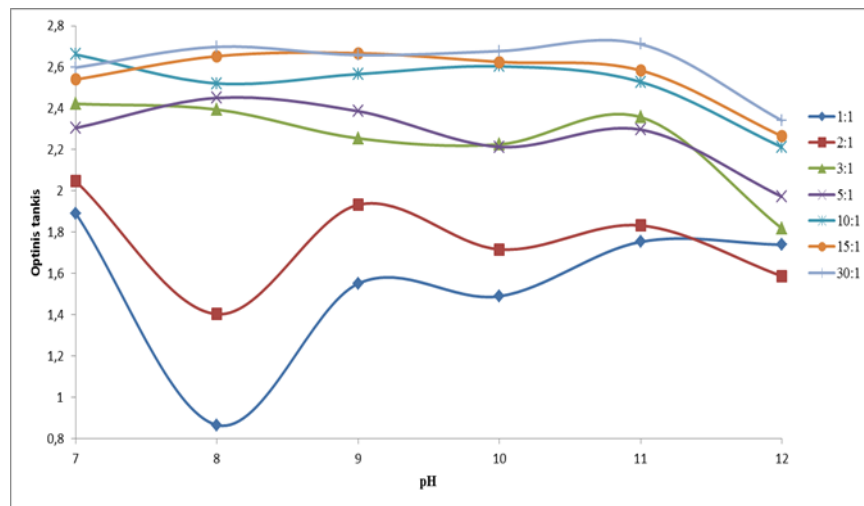
Sudarius rūgščių išrūgų ir chitozano tirpalo mišinių fazių diagramą (4.14 pav.) matome, kad padidinus pH iki 9 – 11, pasiekiamas visiškas sistemų nesuderinamumas, kai dvifazė sistema susidaro net ir mažiausias polimerų koncentracijas turinčiuose tirpaluose. Tai galima paaiškinti tuo, kad padidinus pH, mažėjant elektrostatiniam krūviui bei atostūmio jėgoms tarp baltymų ir chitozano galima silpna elektrostatinė sąveika, ko pasekoje gali susidaryti dvifazė sistema, vienoje iš jų susikaupiant tarp šių biopolimerų susidariusiems kompleksams.

Iš paveikslų matyti, kad kai tirpalų pH buvo tarp 7 – 8, visuose mišiniuose nustatyta viena skaidri fazė, kurios optinis tankis buvo mažas. Nepriklausomai nuo rūgščių išrūgų baltymų ir chitozano santykio tirpalų mišinyje, esant pH nuo 8,0 iki 12,0, buvo gauti drumsti tirpalai, kurie pasižymėjo dideliu optiniu tankiu. Padidinus pH iki 10 esant santykiams 1:1, 10:1, 15:1 susidarė dvi fazės, sudarytos iš nuosėdų ir skaidraus tirpalo, tuo tarpu esant santykiams 3:1 ir 30:1 dvi fazės susidarė esant pH 11. Pastebėta, kad esant santykiams 2:1, 5:1 ir 15:1 tirpale susidarė nuosėdos ir skaidraus tirpalo fazės

pasiekus pH 9. Nepriklausomai nuo pH, rūgščių išrūgų baltymų ir chitozano santykio, visi tirpalai pradėjo drumstis pasiekus pH – 8.



4.14. pav. Rūgščių išrūgų baltymų ir chitozano vandens tirpalų mišinių fazių diagrama, priklausomai nuo pH



4.15. pav. Rūgščių išrūgų baltymų ir chitozano vandens tirpalų mišinių optinis tankis priklausomai nuo pH

Analizuojant optinio tankio kitimo kreives, matome, kad sistemos didžiausio optinio tankio intervalai siaurėja, didinant chitozano kiekį tirpalų mišinyje. Šie duomenys atitinka fazių diagramoje pavaizduotas rūgščių išrūgų baltymų ir chitozano tirpalų būsenas.

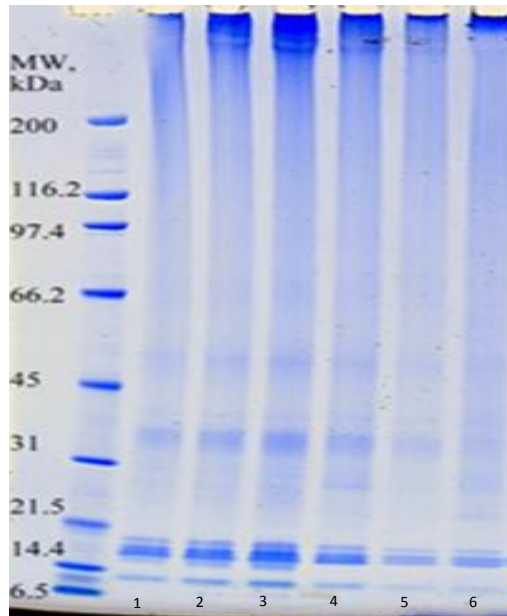
Lyginant gautus rezultatus sudarant IBI ir KMC, IBI ir chitozano kompleksus su rūgščių išrūgų baltymų ir KMC, rūgščių išrūgų baltymų ir chitozano kompleksais, galime teigti, kad KMC su IBI kompleksuoja geriau nei su rūgščių išrūgų baltymais, tačiau chitozanas su rūgščių išrūgų baltymais

pasižymi geresnėmis kompleksavimo savybėmis nei su IBI. Todėl norint nusodinti baltymus esančius rūgščiose išrūgose, efektyviausia yra naudoti polisacharidą – chitozaną.

4.2.4. Išrūgų baltymų ir polisacharidų kompleksų elektroforezė ir IR spindulių absorbcija

Tolesniame darbo etape remdamiesi gautais duomenimis apie sąlygas, kuriomis tarp rūgščių išrūgų baltymų ir polisacharidų vyksta elektrostatinė sąveika ir galimai susidaro kompleksai, pagaminome rūgščių išrūgų ir KMC bei rūgščių išrūgų ir chitozano kompleksus. Tuo tikslu rūgščios išrūgos ir KMC (1%) vandens tirpalas buvo maišomi santykiu 1:1, pH buvo mažinamas naudojant 1,0M ir 0,5M HCl tirpalus kol pasiekė 3, nes esant tokiai pH reikšmei rūgščių išrūgų baltymų ir KMC geba sudaryti kompleksus buvo didžiausia. Rūgščios išrūgos ir chitozano (1%) vandens tirpalas buvo maišomi santykiu 1:1, pH buvo keliamas iki 11, naudojant 0,5M NaOH. Esant pH 11 reikšmei rūgščių išrūgų baltymų ir chitozano geba sudaryti kompleksus yra didžiausia.

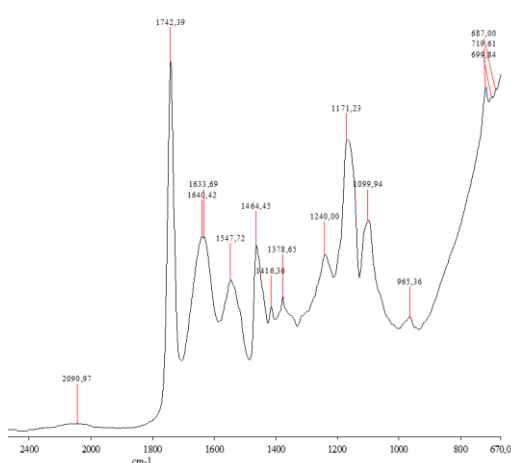
Toliau buvo svarbu įrodyti, kad tarp išrūgų baltymų ir polisacharidų tikrai susidarė kompleksai. Tuo tikslu vėl atlikome baltymų frakcionavimą elektroforezės metodu. Duomenis pateikiame 4.16. paveiksle. 1 – 4 takeliuose, kurie atspindi išrūgų baltymų izoliato (1 ir 2 takelis) bei rūgščių išrūgų (3 ir 4 takeliai) bandinius, matomos ryškios juostos, gelių apačioje yra α -laktoalbumino (14,2 kDa) ir β -laktoglobulino (18,4 kDa) frakcijos. 3 ir 4 takeliuose pastebimos kiek ryškesnės juostelės ties 30 kDa vieta, tai reiškia, kad rūgščių išrūgų mėginiuose yra likę kazeino frakcijų pėdsakai. Tuo tarpu 5 ir 6 takeliuose, kurie atspindi išrūgų baltymų ir KMC bei išrūgų baltymų ir chitozano kompleksus, išrūgų baltymams charakteringos α -laktoalbumino ir β -laktoglobulino juostelės beveik nematomos. Tai gali reikšti, kad didžioji dalis išrūgų baltymų sudarė kompleksus su KMC ir chitozanu, kurių molekulinė masė yra ženkliai didesnė ir šie junginiai nematomi gelio takeliuose, kuriuose galime matyti junginius, kurių didžiausia molekulinė masė – 200 kDa. Akivaizdu, jog baltymų ir polisacharidų kompleksai susiformavo labai dideli ir viršija 200 kDa masę.



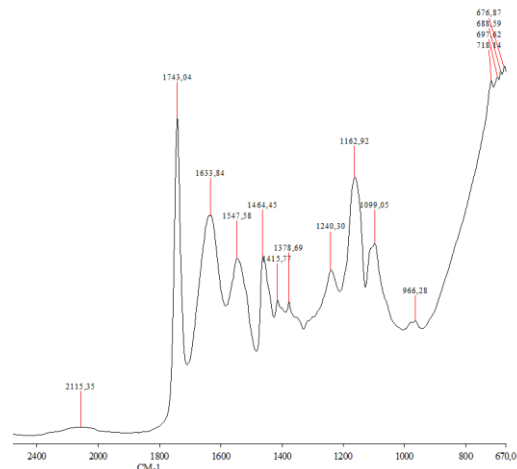
4.16.pav. SDS-PAGE analizės rezultatai: 1 ir 2 takeliai – išrūgų baltymų izoliato tirpalas; 3 ir 4 takeliai – rūgšties išrūgos; 5 takelis – rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksų tirpalas; 6 takelis – rūgščių išrūgų baltymų ir chitozano kompleksų tirpalas.

Toliau išrūgų baltymų ir polisacharidų kompleksus analizavome naudodami IR spindulių absorbciją, kuri junginiuose iššaukia vibraciją, priklausomai nuo absorbuotos šviesos dažnio, pasikeičiant atstumams tarp atomų (valentiniai svyravimai) arba kampams tarp jungčių (deformaciniai svyravimai). Vidutinio ilgio IR spindulių spektroskopijoje spektrai užrašomi $2500-900\text{ cm}^{-1}$ bangos ilgių intervale. $1700-1500\text{ cm}^{-1}$ regione registruojami amidams priklausančios šių jungčių valentiniai svyravimai: 1650 cm^{-1} – C=O grupės valentiniai svyravimai, o 1550 cm^{-1} C-NH grupės valentiniai svyravimai. Šios grupės suteikia informacijos apie baltymus ir jų bei kitų komponentų tokių kaip vandens, jonų ar kiti baltymų, tarpusavio sąveiką. $1500-900\text{ cm}^{-1}$ srityje registruoja C – O ir C – C jungčių valentinius svyravimus.

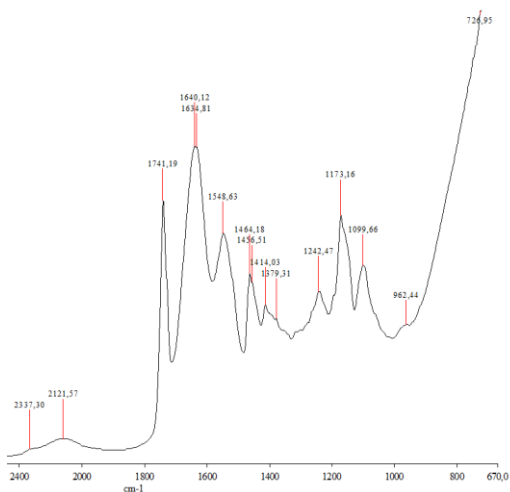
Rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksų bei rūgščių išrūgų baltymų ir chitozano kompleksų vidutinio ilgio IR absorbciniai spektrai pateikti 4.17. a ir b paveiksle. Šiame paveiksle palyginimui pateikti išrūgų baltymų izoliato ir rūgščių išrūgų vidutinio ilgio IR absorbciniai spektrai (4.17. paveikslo c ir d).



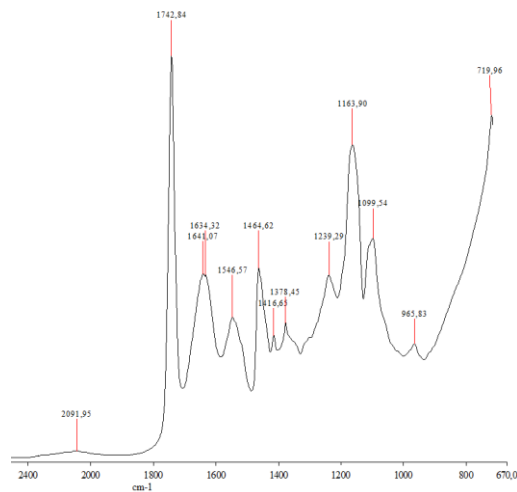
a)



b)



c)



d)

4.17. pav. Rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksų (a), rūgščių išrūgų baltymų ir chitozano kompleksų (b), išrūgų baltymų izoliato (c) ir rūgščių išrūgų (d) vidutinio ilgio IR absorbciniai spektrai.

Išrūgų baltymus geriausiai charakterizuoja amidams priklausančių jungčių valentiniai svyravimai: 1650 cm^{-1} – C=O grupės valentiniai svyravimai, o 1550 cm^{-1} C – NH grupės valentiniai svyravimai. Jie užregistruoti visuose mėginiuose. Tuo tarpu galakturonanus, arabinanus ir galaktanus, kurie yra karboksimetilceliuliozės ir chitozano sudėtinė dalis atspindi smailės ties 690 ir 670 cm^{-1} . Šias smailes galima matyti 4.17. paveikslo a ir b paveiksluose, kurie atspindi išrūgų baltymų ir KMC bei išrūgų baltymų ir chitozano kompleksus.

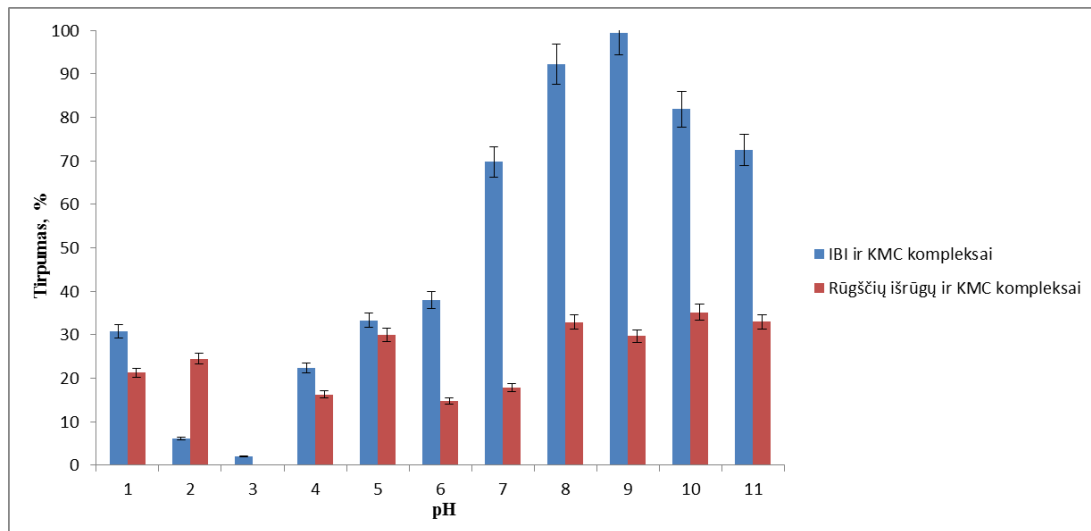
Taigi, tiek elektroforezės, tiek vidutinio ilgio IR absorbcinių spektrų rezultatai patvirtino, kad tarp išrūgų baltymų ir KMC bei išrūgų baltymų ir chitozano eksperimento sąlygomis susidarė kompleksai.

4.2.5. Išrūgų baltymų ir polisacharidų kompleksų funkcinės savybės

Sekančiame darbo etape tyrėme išrūgų baltymų ir polisacharidų kompleksų funkcines savybes.

Kadangi kompleksų tirpumas yra svarbus veiksnys jų panaudojimui maisto, farmacijos ir kitose pramonės šakose, tolimesniuose tyrimuose buvo analizuojama baltymų ir KMC kompleksų tirpumo priklausomybė nuo pH.

Tiriamąjį darbo metu gauti rezultatai pateikti 4.18. paveiksle.



4.18. pav. IBI ir KMC, rūgščių išrūgų ir KMC kompleksų tirpumas priklausomai nuo pH

Analizuojant IBI ir KMC kompleksų tirpumo diagramą (4.18. paveikslas) matyti, kad kompleksai pasižymi geriausiu tirpumu esant pH – 10, ištirpo 99% baltymų kompleksų, kai esant pH 3,5 kompleksų tirpumas siekė 6%.

Vertinant gautų rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksų tirpumą, nustatėme, kad geriausiai šie kompleksai tirpsta esant pH 11 – ištirpo 33% baltymų. Gauti rezultatai pateikti 4.18. paveiksle.

Vertinant gautų IBI ir KMC kompleksų funkcines savybes nustatėme jais stabilizuotų emulsijų gravitacinį stabilumą, dalelių dydį bei reologines savybes. Šiame etape tyrimams naudojome a/v emulsijas, kuriose riebalų keikis buvo 40 %, o jų stabilizavimui naudojome skirtingą IBI ir KMC kompleksų kiekį nuo 0,2 iki 0,8 %. Taip pat keitėme emulsijų pH. Duomenys apie emulsijų gravitacinį stabilumą pateikti 4.4. lentelėje. Laikant emulsijas kambario temperatūroje 48 valandas stebėjome emulsijų išsisluoksniavimą, kurį įvertinome pagal susidariusio serumo kiekį.

4.4. lentelė. IBI ir KMC kompleksais stabilizuotų emulsijų A/V gravitacinis stabilumas priklausomai nuo kompleksų kiekio ir pH

	IBI-KMC kompleksų kiekis emulsijoje, %	Išsiskyrusio serumo kiekis, %, praėjus laikui, val.			
		4	8	24	48
pH 6	0,2	4%	18%	34%	59%
	0,4	3%	10%	26%	42%
	0,6	0%	0%	10%	27%
	0,8	0%	0%	2%	11%
pH 12	0,2	10%	24%	52%	74%
	0,4	8%	19%	38%	53%
	0,6	0%	8%	21%	32%
	0,8	0%	2%	16%	30%

Iš gautų rezultatų matyti, kad serumo išsiskyrimo tendencija tarp skirtingų mėginių nevienoda. Emulsijos, kurių stabilizavimui panaudota 0,8% ir 0,6% IBI – KMC kompleksų pirmas 4 valandas buvo stabilios esant skirtingiems pH, tačiau po 8 valandų stabilios liko tik tos emulsijos, kurios buvo stabilizuotos 0,8% ir 0,6% IBI – KMC kompleksų, esant pH 6. Praėjus 48 valandoms jų stabilumas sumažėjo 42% ir 27%. Kituose bandiniuose serumas skyrėsi palaipsniui. Bandiniai, kurių pH 6 buvo stabilesni.

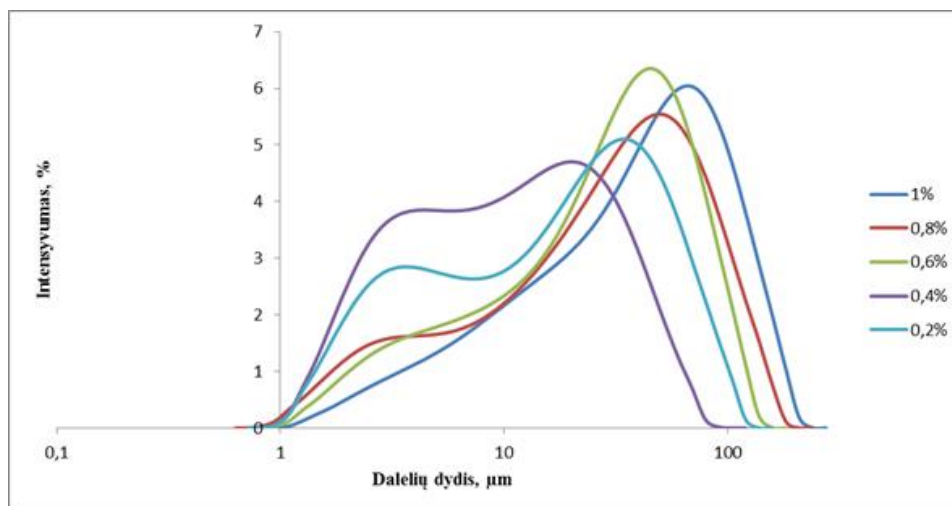
Analogišką tyrimą atlikome su emulsijomis, stabilizuotomis rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksais, kurių kiekį emulsijoje keitėme nuo 0,2 iki 1,0 %, o pH buvo 11. Tokia pH vertė parinkta, nes esant pH 11 nustatytas geriausias kompleksų tirpumas. 4.5. lentelėje pateikti emulsijų stabilumo rezultatai.

4.5. lentelė. Rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksais stabilizuotų emulsijų A/V gravitacinis stabilumas priklausomai nuo kompleksų kiekio ir pH

	Rūgščių išrūgų baltymų – KMC kompleksų kiekis emulsijoje, %	Išsiskyrusio serumo kiekis, %, praėjus laikui, val.			
		4	8	24	48
pH 11	0,2	54%	33%	13%	9%
	0,4	62%	41%	19%	14%
	0,6	71%	54%	27%	21%
	0,8	79%	66%	38%	23%
	1,0	86%	72%	45%	27%

Rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksų emulsijų didžiausias stabilumas pastebėtas esant 1% kompleksų koncentracijai emulsijoje. Lyginant emulsijų stabilumo tyrimų rezultatus pateiktus straipsniuose [51, 52], mūsų gautos emulsijos pasižymėjo mažesniu stabilumu.

Norint įvertinti rūgščių išrūgų ir KMC kompleksų koncentracijos įtaką tirtų emulsijų riebalų rutulėlių dydžio pasiskirstymui, buvo matuojamas įvairių kompleksų kiekiu stabilizuotų emulsijų riebalų rutulėlių dydis. Gauti rezultatai pateikti 4.20. paveiksle.



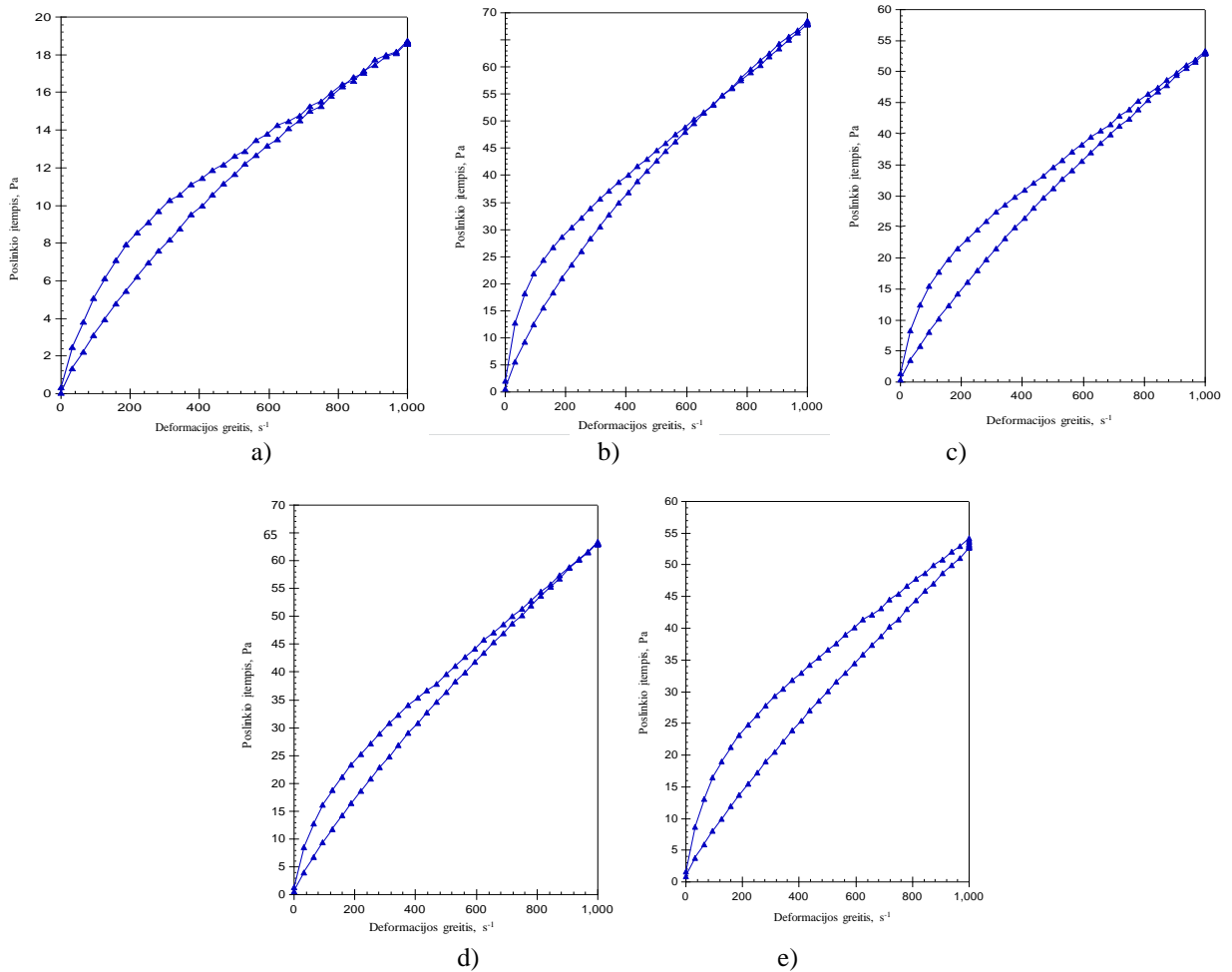
4.20. pav. Riebalų rutulėlių dydžio priklausomybė nuo rūgščių išrūgų ir KMC komplekso kiekio emulsijose

Iš gautų rezultatų matyti, kad didėjant kompleksų koncentracijai emulsijose taip pat didėjo riebalų rutulėlių dydis. Padidėjusį riebalų rutulėlių dydį galėjo įtakoti emulsijose naudoti rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksai, kurie buvo dideli.

4.2.6. Rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksų reologinės savybės

Siekiant įvertinti kompleksų koncentracijos įtaką emulsijų reologinėms savybėms buvo atlikti reologiniai tyrimai. Rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksais stabilizuotų emulsijų tekėjimo kreivės, kai stabilizavimui naudotas skirtingas kompleksų kiekis, parodyta 4.21. paveiksle.

Emulsijų tekėjimo kreivių aprašymui pasirinkome Oswald lygtį, kadangi šio reologinio modelio regresijos kreivės atitikimo koeficientas (R^2), lyginant su kitų modelių, buvo artimiausias vienetui. Oswald lygtis aprašo neniutoninių skysčių elgesį, veikiant tam tikromis deformacijomis. Pagrindinės reologinės konstantos, apibūdinančios emulsijų tekėjimo elgesį, keičiant deformacijos greitį nuo 0 iki 1000 s^{-1} , yra klampos konstanta K ($\text{Pa} \cdot \text{s}^n$) ir takumo indeksas n (4.6 lentelė). Klampos konstanta suteikia informacijos apie emulsijų klampą, o takumo indeksas nusako, kokiam skysčių tipui priklauso emulsijos. Emulsijų takumo indeksai parodė, kad jos visos pasižymėjo pseudoplastiniams skysčiams būdingomis savybėmis ($n < 1$). Pseudoplastiškų skysčių poslinkio įtempis didėjo, o tariamoji klampa mažėja, didinant deformaciją [47].



4.21. pav. Rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksais stabilizuotų emulsijų tekėjimo kreivės, didinant ir mažinant deformacijos greitį, kai kompleksų kiekis emulsijose: 0,2% (a), 0,4% (b), 0,6% (c), 0,8% (d), 1,0% (e)

Emulsijų tekėjimo kreivių aprašymui pasirinkome Oswald lygtį, kadangi šio reologinio modelio regresijos kreivės atitikimo koeficientas (R2), lyginant su kitų modelių, buvo artimiausias vienetui. Oswald lygtis aprašo neniutoninių skysčių elgesį, veikiant tam tikromis deformacijomis. Pagrindinės reologinės konstantos, apibūdinančios emulsijų tekėjimo elgesį, keičiant deformacijos greitį nuo 0 iki 1000 s^{-1} , yra klampos konstanta K ($\text{Pa} \cdot \text{s}^n$) ir takumo indeksas n (4.6 lentelė). Klampos konstanta suteikia informacijos apie emulsijų klampą, o takumo indeksas nusako, kokiam skysčių tipui priklauso emulsijos. Emulsijų takumo indeksai parodė, kad jos visos pasižymėjo pseudoplastiniams skysčiams būdingomis savybėmis ($n < 1$). Pseudoplastiškų skysčių poslinkio įtempis didėjo, o tariamoji klampa mažėja, didinant deformaciją [47].

4.6. lentelė. Emulsijų reologinių konstantų priklausomybė nuo kompleksų koncentracijos emulsijose

Kompleksų koncentracija emulsijoje, %	Reologiniai duomenys pagal "Oswald"		
	K	n	R
0,2	0,1486	0,7064	0,9870

4.6. lentelės tęsinys

Kompleksų koncentracija emulsijoje, %	Reologiniai duomenys pagal "Oswald"		
	K	n	R
0,2	0,1486	0,7064	0,9870
0,4	1,0638	0,5995	0,9934
0,6	0,4186	0,6333	0,9899
0,8	0,6794	0,6497	0,9918
1,0	0,8748	0,5868	0,9762

K – konsistencijos įtempis arba tariamoji klampa; N – srauto savybių indeksas; R – korealiacijos koeficientas.

4.6 lentelės duomenys rodo, kad klampiausios buvo emulsijos, kurių stabilizavimui panaudota 0,4 % rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksų. Šiai emulsijai nustatytas ir labiausiai pseudoplastinis elgesys – n lygus 0,5995. Mažiausiai klampios buvo emulsijos su 0,2% rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksų. Lyginant mūsų gautus reologinius duomenis su kitų autorių publikuotų staripsnių informacija, mūsų pagamintos emulsijos pasižymėjo prastesnėmis savybėmis [53, 54].

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad rūgščių išrūgų cheminė sudėtis priklausė nuo varškės gamybos būdo, po kurio gautos išrūgos. Po varškės gamybos atvirame gamintuve gautose išrūgose buvo mažiau riebalų (0,05%), mažiau sausųjų medžiagų (6,14%), bet daugiau baltymų (0,86%), lyginant su išrūgomis po varškės gamybos uždareme gamintuve, kuriose riebalų, sausųjų medžiagų ir baltymų buvo atitinkamai 0,3%, 6,67% ir 0,55%.

2. Nustatyta, kad laikant išrūgas po varškės gamybos tiek +6, tiek +18 °C temperatūroje per pirmas 24 valandas vyko intensyvūs baltymų hidrolizės procesai, dėl kurių baltyminio azoto kiekis sumažėjo 48%, o nebaltyminio azoto kiekis padidėjo 10%. Rūgščių išrūgų pH pokyčių laikymo metu nenustatyta.

3. Atlikus išrūgų po varškės gamybos mikrobiologinius tyrimus nustatyta, kad pienarūgščių bakterijų kiekis laikymo metu ženkliai sumažėjo, o proteolitinių bakterijų skaičius padidėjo apie 5%.

4. Sudarius fazių diagramas nustatyta, kad sąveika tarp išrūgų baltymų ir KMC bei vandens tirpalų mišiniuose bei sąveika tarp išrūgų baltymų ir chitozano vandens tirpalų mišiniuose priklausė nuo biopolimerų santykio mišiniuose, pH ir išrūgų baltymų šaltinio.

5. Elektroforezės ir vidutinio ilgio IR absorbcinių spektrų rezultatai patvirtino, kad baltymų – polisacharidų kompleksai susidarė, maišant išrūgų baltymų ir KMC tirpalus santykiu 1:1, esant pH 3 susidarė kompleksai, o maišant išrūgų baltymų ir chitozano tirpalus santykiu 1:1, esant pH 11.

6. Nustatyta, kad išrūgų baltymų ir KMC kompleksų tirpumas priklausė nuo pH ir buvo didžiausias – 99%, esant pH 10, o išrūgų baltymų ir chitozano kompleksų tirpumas buvo didžiausias – 0,9%, esant pH 2.

7. Ištyrus emulsijas stabilizuotas rūgščių išrūgų baltymų ir KMC kompleksais, nustatyta, kad didėjant kompleksų koncentracijai (0,2 – 1%) emulsijose, didėja emulsijų gravitacinis stabilumas ir riebalų rutulėlių dydis. Atlikus emulsijų reologinius matavimus akivaizdžių skirtumų tarp skirtingais kompleksų kiekiais stabilizuotų emulsijų nepastebėta, išskyrus emulsiją, kurioje kompleksų koncentracija buvo 0,4%. Ši emulsija pasižymėjo didesne klampa (2,04 Pa·s)

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei prof. dr. Daivai Leskauskaitei už pagalbą rašant baigiamąjį magistro darbą bei atliekant tiriamąjį darbą, už vertingą informaciją ir pastabas, puikų darbo organizavimą.

Taip pat dėkoju ir kitiems dėstytojams už suteiktas žinias.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Alsaed, A. K. and Ahmed, R. Concentrating and drying of whey and utilization of the produced products in bakery and confectionery. A progress report, Department of Nutrition and Food Technology, Faculty of Agriculture, University of Jordan, Amman, Jordan, 2010, Vol. 26(8), p. 716 – 724.
2. Mathur, B., and Shahani, K. Use of total whey constitutes for human foods, *Journal of Dairy Science*, 1979, Vol. 62, p. 99-105.
3. Cha A. S., Loh, J., Nellenback, T. Acid whey texture system, United States Patent and Trademark Office, patent number, 2006, Vol. 7, p. 873 – 894.
4. Т. Сенкевич, К. Л. Ридель. Молочная сыворотка: переработка и использование в агропромышленном комплексе, 1989, п. 5 – 264.
5. Leskauskaitė, D. Pieno perdirbimo pramonei būdingos problemos ir jų sprendimo būdai, 2014, p. 2.
6. Prof. V. Hatzimanikatis, président du jury Prof. C. Holliger, Prof. I. W. Marison, directeurs de thèse Prof. C. Lacroix, rapporteur Dr C. Poget, rapporteur Prof. U. von Stockar, rapporteur. Fuel Bioethanol Production from Whey Permeate, 2009, Vol. 24(2), p. 437.
7. Siso MIG. The biotechnological of utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 1996, Vol57, p. 1-11.
8. T.M. Campos Motta, R.B. Hoffa, F. Barreto, R.B.S. Andrade, D.M. Lorenzini, L.Z. Meneghini, T.M. Pizzolatto. Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic like sample preparation and liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry analysis, 2014, p. 498 – 505.
9. Bogdan Dec, Weadyseaw Chojnowski, Chair of Dairy Science and Quality Management, University of Warmia and Mazury, Olsztyn. Characteristics of acid whey powder partially demineralised by nanofiltration, 2006, Vol. 15(56), p. 87–90.
10. Boumba V.A., Voutsinas L.P., Philippopoulos C.D., Composition and nutritional value of commercial dried whey products from feta cheese manufacture. *Int. J. Dairy Technol.*, 2001, Vol. 54, p. 141–145.
11. van der Horst H.C., Timmer J.M.K., Robertson T., Leenders J., Use of nanofiltration for concentration and demineralization in the dairy industry: model for mass transport. *J. Membrane Sci.*, 1995, Vol. 104, p. 205.
12. Barrantes L.D., Morr C.V., Partial deacidification and demineralization of cottage cheese whey by nanofiltration. *J. Food Sci.*, 1997, Vol. 62, p. 338–341.

13. Morr, C.V. and Ha, E.Y.W. 1993. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1993, Vol. 33(6), p. 431 – 476.
14. M. Amdadul Haquea, Jie Chenc, Peter Aldredd, Benu Adhikari. Drying and denaturation characteristics of whey protein isolate in the presence of lactose and trehalose, 2015, p. 8–16.
15. Saltmarch M., Labuza T.P. Influence of relative humidity on the physicochemical state of lactose in spray dried sweet whey powders. *J. Dairy Sci.*, 1980, Vol. 45, p. 1231–1236,1242.
16. Evren Önay-Uçara, Nazlı Ardaa, Murat Pekmeza, Ayşe Mine Yılmazb, Nazlı Böke-Sarıkahyac, Süheyla Kırmızıgülç, A. Suha Yalçın Comparison of antioxidant capacity, protein profile and carbohydrate content of whey protein fractions. 2014, p. 34–40.
17. Nguyen M., Reynolds N., Vigneswaran S., By-product recovery from cottage cheese production by nanofiltration. *J. Cleaner Prod.*, 2003, Vol. 11, p. 803–807.
18. Elane Schwinden Prudêncioa, Carmen M.O. Müllera, Carlise B. Fritzen-Freireb, Renata D.M. Castanho Ambonia, José C. Cunha Petrus. Effect of whey nanofiltration process combined with diafiltration on the rheological and physicochemical properties of ricotta cheese. 2014, p. 92–99.
19. Kelly J., Kelly P., Desalination of acid casein whey by nanofiltration. *Int. Dairy J.*, 1995, Vol. 5, p. 291–303.
20. Boumba V.A., Voutsinas L.P., Philippopoulos C.D., Composition and nutritional value of commercial dried whey products from feta cheese manufacture. *Int. J. Dairy Technol.*, 2001, Vol. 54, p. 141–145.
21. Kai Pan, Qi Song, Lei Wang, Bing Cao. A study of demineralization of whey by nanofiltration membrane, 2011, p. 217–221.
22. Oparin, A. I. *The origin of life*; Dover Publications, Inc.: New York, 1953. Osman, M.E.; Williams, P.A.; Menzies, A.R.; Phillips, G.O. Characterization of commercial samples of gum arabic. *J. Agr. Food Chem.*, 1993, Vol. 41(1), p. 71-77.
23. Menger, F. M. *Supramolecular chemistry and self-assembly*, 2002, Vol. 99, p. 4818-4822.
24. Bungenberg de Jong, H. G. Crystallisation- Coacervation- Flocculation. In *Colloid Science*; Kruyt H. R., Ed.; Elsevier Publishing Company: Amsterdam, 1949, Vol. 2, Chapter VIII, p.232-258.

25. Ye, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 2008, Vol. 43(3), p. 406–415.
26. M. Šutovská, P. Capek, M. Kočmalová, I. Pawlaczyk, d, E. Zaczyńska, A. Czarny, I. Uhliariková, R. Gancarczyk, d, S. Fraňová. Characterization and pharmacodynamic properties of Arnica montana complex. 2014, p. 214-221.
27. V.Ya. Grinberg, V.B. Tolstoguzov. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 1997, Vol. 11, p. 145-158.
28. T. Koupantsisa, E. Pavlidou, A. Paraskevopoulou. Flavour encapsulation in milk proteins – CMC coacervate – type complexes, 2014, p. 134–142.
29. Bouyer, E., et al., F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, Vol. 436(1), p. 359–378.
30. Wooster, T. J., Augustin, M. A. β -Lactoglobulin–dextran Maillard conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, Vol. 303(2), p. 564–572.
31. Akhtar, M., Dickinson, E. Whey protein-maltodextrin conjugates as emulsifying agents: an alternative to gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 2007, Vol. 21(4), p. 607–619.
32. Corzo-Martínez, M., et al. Interfacial and foaming properties of bovine β -lactoglobulin: Galactose Maillard conjugates. *Food Hydrocolloids*, 2012, Vol. 27(2), p. 438–447.
33. Weinbreck, F.; de Vries, R.; Schrooyen, P.; de Kruif, C. G. Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules*, 2003, Vol. 4 (2), p. 293-303.
34. Weinbreck, F.; Nieuwenhuijse, H.; Robijn, G. W.; de Kruif, C. G. Complex formation of whey proteins – exocellular polysaccharide EPS B40, 2003, Vol. 19, p. 9404-9410.
35. Stephen, a. M.; philips, g. O.; williams, p. A. *Food Polysaccharides and Their Applications*. Second edition, 2006, p. 733.
36. Dickinson, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Journal of Food hydrocolloids*, 2003, Vol. 17(1), p. 25-39
37. Bengoechea, C., Jones, O. G., Guerreo, A., & McClements, D. J. *Food Hydrocolloid*, 2011, p. 1227-1232.

38. Ganzelves, R. A., Fokkink, R., van Vilet, T., Cohen Stuart, M. A. de Jongh, H.H.J. *Journal of Colloid and Interface Science, Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids* 2008, p. 137-140.
39. Chiara Mollea, Luca Marmo and Francesca Bosco. *Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry*, 2014, p. 549 – 570.
40. Prieiga per internetą:
<<<http://www.nmvrvi.lt/lt/naujienos/248>>>. [Žiūrėta 2015 – 03 – 27]
41. Viviane M. Azevedoa, Marali V. Diasa, Soraia V. Borgesa, Ana Letícia R. Costab, Eric Keven Silvab, Éber Antonio A. Medeirosc, Nilda de Fátima F. Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties, 2015, p. 179–188.
42. Mehrdad Khanzadia, Seid Mahdi Jafaria, Habibollah Mirzaeia, Faramarz Khodaian Cheginib, Yayha Maghsoudloua, Danial Dehnada. Physical and mechanical properties in biodegradable films of whey protein concentrate–pullulan by application of beeswax, 2015, p. 24–29
43. A. Pukalskas. Naujaisių mokslinių pasiekimų maisto produktų biotechnologijos srityje mokslinė studija “Maisto gamybos biotechnologija”, 2007, p. 3 – 55.
44. J. Šalomskienė ir I. Mačionienė. KTU Maisto institutas, 2004, p. 1 – 7.
45. V. Kontogiorgos, S.M. Tosh, P.J. Wood. Phase behaviour of high molecular weight oat β -glucan/whey protein isolate binary mixtures, 2009, p. 949–956.
46. Kantautas, A; ir Leskauskas, B. Tyrimų optimizavimo laboratoriniai darbai: mokomoji knyga. Kaunas, 2001, p. 66.
47. Leskauskaitė, D. Maisto produktų reologijos paskaitų konspektai. Kaunas, 2009, p. 1 – 81.
48. Lina Zhaoa, Xixi Caia, Shunli Huangb, Shaoyun Wangc, Yifan Huangb, Jing Honga, Pingfan Raoa. Isolation and identification of a whey protein-sourced calcium-binding tripeptide Tyr-Asp-Thr, 2015, p. 16 – 23.
49. A. Paraskevopouloua, E. Tsiogaa, C.G. Biliaderisb, V. Kiosseogloua. Acid-induced gelation of aqueous WPI–CMC solutions: Effect on orange oil aroma compounds retention, 2013, p. 368 – 374.
50. T. Koupantsis, V. Kiosseoglou. Whey protein–carboxymethylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability, 2009, p. 1156 – 1163.

51. Bahareh Tabatabaee Amid, Hamed Mirhosseini. Stabilization of water in oil in water (W/O/W) emulsion using whey protein isolate-conjugated durian seed gum: Enhancement of interfacial activity through conjugation process, 2014, p. 107 – 114.
52. Chaoying Qiu, c, Mouming Zhao, b, Eric Andrew Deckerc, d, David Julian McClements. Influence of protein type on oxidation and digestibility of fish oil-in-water emulsions: Gliadin, caseinate, and whey protein, 2015, p. 249 – 257.
53. Khanitta Ruttarattanamongkola, M. Nor Afizahb, Syed S.H. Rizvic. Stability and rheological properties of corn oil and butter oil emulsions stabilized with texturized whey proteins by supercritical fluid extrusion, 2015, p. 139 – 147.
54. Laura Olivera, b, Lieke Berndsenc, George A. van Aken, b, Elke Scholtena. Influence of droplet clustering on the rheological properties of emulsion-filled gels, 2015, p. 74 – 83.
55. LST ISO 8968 – 1:2014. Pienas ir pieno gaminiai. Azoto kiekio nustatymas. 1 dalis. Kjeldalio principas. Vilnius: LST departamentas, 2014.
56. LST ISO 8968-4:2001. Pienas. Azoto kiekio nustatymas. Vilnius: LST departamentas, 2001.
57. LST ISO 6731:2010. Pienas, grietinėlė ir sutirštintas pienas. Visuminio sausųjų medžiagų kiekio nustatymas (pamatinis metodas). Vilnius: LST departamentas, 2010.
58. LST ISO 11870:2009. Pienas ir pieno gaminiai. Riebalų kiekio nustatymas. Bendrieji butirometrinių metodų taikymo nurodymai. Vilnius: LST departamentas, 2009.