



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Sąlygų parinkimas baltymų ekstrakcijai iš ryžių išspaudų ir jų funkcinių bei gelio sudarymo savybių tyrimai**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Romantė Pažėraitė**

Projekto autorė

**Dr. Daiva Žadeikė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2021**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Sąlygų parinkimas baltymų ekstrakcijai iš ryžių išspaudų ir jų funkcinių bei gelio sudarymo savybių tyrimai**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Romantė Pažeraitė**

Projekto autorė

**Dr. Daiva Žadeikė**

Vadovė

**Doc. Rimantė Vinauskienė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2021**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Romantė Pažėraitė

## **Sąlygų parinkimas baltymų ekstrakcijai iš ryžių išspaudų ir jų funkcinių bei gelio sudarymo savybių tyrimai**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Romantė Pažėraitė

*Patvirtinta elektroniniu būdu*

Pažėraitė, Romantė. Sąlygų parinkimas baltymų ekstrakcijai iš ryžių išspaudų ir jų funkcinių bei gelio sudarymo savybių tyrimai. Magistro baigiamasis projektas/ vadovė dr. Daiva Žadeikė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės Technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: ryžių išspaudos, baltymų geliai, fermentinė hidrolizė, funkcinės savybės

Kaunas, 2021. 55 p.

### **Santrauka**

Ryžių gėrimo gamybos procese susidaro dideli kiekiai šalutinių produktų – ryžių išspaudų. Ši šalutinė maisto žaliava nėra racionaliai panaudojama, dažniausiai naudojama pašarams arba utilizuojama. Dėl šios priežasties, technologijų, tokių kaip šalutinių produktų valorizavimui į didesnės pridėtinės vertės maisto komponentus kūrimas ir diegimas tampa aktuali ne tik valstybės ar regiono, bet ir pasauliniu lygmeniu. Literatūros duomenimis, ryžių išspaudose yra likę vertingų baltymų, kurie pasižymi maistingumu ir tinka alergiškiems žmonėms. Baigiamojo darbo tikslas – parinti optimalias ekstrakcijos sąlygas maksimaliam baltymų išskyrimui iš ryžių išspaudų (RI) ir įvertinti išskirtų baltymų funkcines ir gelio sudarymo savybes bei sudaryti baltymų izoliatų gamybos, taikant biotechnologinius metodus, schemą. Darbe parinkti fermentai ir sudaryta fermentų kompozicija baltymų ekstrakcijai iš RI padidinti, įvertinta išgautų baltymų vandens ir aliejaus absorbcinė geba, emulsijos ir putų sudarymo pajėgumas ir stabilumas. Gelių sudarymui baltymai modifikuoti, taikant apdorojimą ultragarsu ir fermentais transgliutaminaze ar proteinaze. Rezultatai parodė, kad daugiausia baltymų iš RI galima išekstrahuoti (2,104 mg/ml), vykdant šarminę ekstrakciją 60 °C temperatūroje, esant pH 10 ir sausųjų medžiagų ir vandens santykiui 1:4. Baltymų išėigą iš RI galima padidinti iki 71 %, hidrolizuojant fermentų kompozicija, sudaryta iš amilazės, celiulazės ir proteazės. Hidrolizė fermentų kompozicija nežymiai sumažino (2,5 %) baltymų putų tūrio ir stabilumo vertes, lyginant su neapdorotų RI baltymais. Proteazės ir fermentų kompozicijos panaudojimas RI apdorojimui padidino baltymų aliejaus absorbcinę gebą (AAG), atitinkamai 66 % ir 67,4 %, tačiau apdorotų fermentų kompozicija ir neapdorotų RI baltymai mažiau absorbavo vandenį (VAG atitinkamai 61,1 % ir 63,2 %), lyginant su proteaze apdorotais baltymais (64,3 %). Atlikus ryžių baltymų koncentrato (RBK) gelių tekstūros analizę, nustatyta, kad naudojant proteazę baltymų hidrolizei, galima išgauti kietesnį ir tvirtesnės konsistencijos gelį, nei naudojant transgliutaminazę (TG). Didžiausio klampumo masė ir didžiausio kietumo gelis gautas, hidrolizuojant proteaze 20 % koncentracijos baltymų suspensiją. Naudojant TG skirtingomis fermento ir baltymo koncentracijomis reikšmingų skirtumų tarp rezultatų nenustatyta. Ryžių baltymų apdorojimas aukšto intensyvumo ultragarsu ir baltymų modifikavimas proteolitiniais fermentais leido suformuoti stabilesnę ir tvirtesnę gelinę struktūrą. Atlikti tyrimai parodė, kad fermentinė hidrolizė yra efektyvus būdas išgauti vertingus baltymus iš ryžių išspaudų, o apdorojimą ultragarsu galima efektyviai panaudoti funkcionalių maisto produktų gamybai.

Pažėraitė, Romantė. Selection of Conditions for Protein Extraction from Rice Press Cake and Evaluation of Their Functional and Gel - Forming Properties. Master's Final Degree Project/ supervisor dr. Daiva Žadeikė; Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology.

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

Keywords: rice bran, protein gels, enzymatic hydrolysis, functional properties

Kaunas, 2021. 55 p.

### **Summary**

The production of rice drink produces large amounts of by-products - rice press cake. This by-product of food is not rationally used, it is usually used for feed or disposed of. For this reason, the development and implementation of technologies such as the valorisation of by-products into higher value-added food components is becoming relevant not only at the national or regional level, but also at the global level. According to the literature, rice cake contains valuable proteins that are nutritious and suitable for people with allergies. The aim of the final work is to improve the optimal extraction conditions for maximum protein extraction from rice press cake (RI) and to evaluate the functional and gel-forming properties of the extracted proteins and to create a scheme for the production of protein isolates using biotechnological methods. In the final work, the enzymes were selected and the enzyme composition was formed to increase the protein extraction from RI, the water and oil absorption capacity, emulsion and foaming ability and stability of the obtained proteins were evaluated. For gel formation, proteins were modified by sonication and enzymatic transglutaminase or proteinase treatment. The results showed that most of the protein from RI could be extracted (2,104 mg/ml) by alkaline extraction at 60 °C at pH 10 and a dry matter to water ratio of 1:4. Protein recovery from RI can be increased to 71 % by hydrolyzing an enzyme composition consisting of amylase, cellulase, and protease. Hydrolysis of the enzyme composition slightly (2,5 %) reduced the volume and stability values of the protein foam compared to the crude RI proteins. The use of a protease and enzyme composition for RI treatment increased the oil absorption capacity (AAG) by 66 % and 67,4 %, respectively, however, the composition of the treated enzymes and the control sample absorbed less water (VAG 61,1 % and 63,2 %, respectively) compared to the protease-treated proteins (64,3 %). Gel texture analysis of rice protein isolate (RBI) showed that using a protease under optimal conditions could yield a harder and stronger gel than using transglutaminase. At a protein concentration of 20 % and a protease content of 800 AV/ 100 g, a mass of maximum viscosity was obtained and a gel of maximum hardness was formed. The use of transglutaminase increased gel cohesion and viscosity index. No significant differences between results were found with TG at different enzyme and protein concentrations. High-intensity ultrasonic treatment of rice proteins and modification of proteins with proteolytic enzymes allowed the formation of a more stable and stronger gel structure. Analysis have shown that enzymatic hydrolysis is an efficient way to extract valuable proteins from rice bran, and ultrasonic treatment can be used effectively for the production of functional foods.

## Turinys

<b>Santrumpų ir terminų sąrašas .....</b>	<b>8</b>
<b>Įvadas.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Literatūros apžvalga .....</b>	<b>10</b>
1.1. Ryžių cheminės sudėties komponentai.....	10
1.2. Ryžių baltymai.....	11
1.2.1. Ryžių baltymų struktūra .....	11
1.2.2. Ryžių baltymų funkcinės savybės .....	12
1.3. Baltymų ekstrakcijos metodai ir priemonės jos efektyvumui padidinti .....	13
1.3.1. Osborno klasifikacija ir baltymų išgavimas .....	13
1.3.2. Baltymų ekstrakcija šarmais .....	14
1.3.3. Nusodinimas izoelektriniame taške .....	15
1.4. Priemonės baltymų ekstrakcijai padidinti ir jų funkcinėms savybėms modifikuoti.....	15
1.4.1. Fermentinė hidrolizė.....	15
1.4.2. Apdorojimas ultragarsu .....	17
1.5. Ryžių baltymų gelių charakteristika .....	18
1.5.1. Ryžių baltymų izoliatų, hidrolizatų ir koncentratų charakteristika .....	18
1.5.2. Ryžių baltymų gelių susidarymas ir savybės.....	19
1.5.3. Ryžių baltymų gelių funkcinės savybės .....	20
1.5.4. Ryžių baltymų gelių bioaktyvios savybės .....	21
1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas .....	22
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....</b>	<b>23</b>
2.1. Tyrimo objektai .....	23
2.2. Tyrimo metodai .....	24
2.2.1. Cheminės analizės metodai .....	24
2.2.2. Redukuojančiųjų sacharidų nustatymas.....	24
2.2.3. Baltymų ekstrakcija iš ryžių išspaudų .....	24
2.2.4. Baltymų kiekio nustatymas <i>Bradfordo</i> metodu.....	25
2.2.5. Fermentinė hidrolizė.....	25
2.2.6. Ryžių baltymų ekstrakcija .....	25
2.2.7. Ryžių baltymų izoliatų funkcinių savybių nustatymas.....	25
2.2.8. Baltymų elektroforezė .....	26
2.2.9. Baltymų suspensijų ruošimas ir struktūrizavimas ultragarsu .....	28
2.2.10. Ryžių baltymų gelių tekstūros įvertinimas .....	28
2.2.11. Ryžių baltymų gelių mikroskopinė analizė .....	29

2.2.12. Ryžių baltymų gelių skenuojamoji elektroninė mikroskopija (SEM).....	29
2.2.13. Duomenų matematinė statistinė analizė .....	29
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas .....</b>	<b>30</b>
3.1. Ekstrakcijos sąlygų parinkimas efektyviai baltymų išėigai.....	30
3.2. Fermentų kompozicijos sudarymas baltymų išgavimui iš ryžių žaliavos .....	32
3.3. Neapdorotų ir hidrolizuotų ryžių išspaudų (RI) baltymų funkcinių savybių palyginamasis įvertinimas .....	33
3.3.1. Vandens ir aliejaus absorbcinė geba.....	33
3.3.2. Putų sudarymo pajėgumas .....	34
3.4. Ryžių baltymų modifikavimo fermentais įtaka gelių sudarymo pajėgumui.....	36
3.4.1. Hidrolizės transglutaminaze (TG) ir proteaze įtaka ryžių baltymų tekstūros savybėms.....	38
3.5. Skirtingos koncentracijos ryžių baltymų gelių struktūros tyrimai.....	42
<b>4. Rekomendacijų dalis .....</b>	<b>45</b>
<b>Išvados .....</b>	<b>48</b>
<b>Literatūros sąrašas .....</b>	<b>49</b>
<b>1 Priedas .....</b>	<b>55</b>

## **Santrumpų ir terminų sąrašas**

LRR – laisvosios riebalų rūgštys

DH – hidrolizės laipsnis

PGA – propilenglikolio alginatas

DNS – 3,5-dinitro salicilo rūgštis

TE – Trolokso ekvivalentas

RI – ryžių išspaudos

RBK – ryžių baltymų koncentratas

FK – fermentų kompozicija

VAG – vandens absorbcinė geba

AAG – aliejaus absorbcinė geba

TG – transgliutaminazė

KI – klampumo indeksas

## Įvadas

Baltymų suvartojimas kasmet didėja ir jo paklausa nuolat auga, todėl iškyla poreikis ieškoti alternatyvių maistingų baltymų šaltinių. Pastaraisiais dešimtmečiais atkreiptas dėmesys į augalinius baltymus, kaip alternatyvą gyvūninės kilmės baltymams dėl mažos kainos, gausumo, pigaus bioaktyvių peptidų šaltinio ir geros maistinės vertės [1].

Kitas iššūkis pramonei – tvarių technologijų, atitinkančių žiedinės ekonomikos principus, kūrimas. Didėjant maisto poreikiui, didėja pramonės įmonių neigiamas poveikis aplinkai, nes gamybos metu susidaro dideli kiekiai šalutinių produktų. Pastarieji dažnai panaudojami kaip menkavertė žaliava pašarams arba utilizuojami, taip didinant klimato kaitos problemas. Dėl šios priežasties, technologijų, tokių šalutinių produktų valorizacija į didesnės pridėtinės vertės maisto komponentus, kūrimas ir diegimas tampa aktualiu ne tik valstybės ar regiono, bet ir pasauliniu lygmeniu.

Vienos iš tokių vertingų augalinės kilmės atliekų yra ryžių perdirbimo šalutiniai produktai – ryžių išspaudos po augalinio gėrimo gamybos, ir ryžių sėlenos – ryžių malimo šalutinis produktas, turintys maistingų, antikancerogeninių ir hipoalerginių baltymų [2]. Produktai, kurių sudėtyje yra ryžių, tinkami alergiškiems žmonėms. Ryžių sėlenose yra 1,7 % fitatų ir 12 % skaidulinių medžiagų [2]. Ryžių sėlenose bendras aminorūgščių lizino, treonino ir izoleucino kiekis yra didesnis nei kitose grūdų kultūrose.

Ryžių baltymai paprastai išgaunami, juos ekstrahuojant šarmais [3] arba atliekant fermentinę hidrolizę, kurios metu naudojama celiulazės ir ksilanazės [4], o baltymų hidrolizatai gaunami, pridėdant proteolitinių fermentų [5]. Taip pat taikoma apdorojimas ultragarsu. Tai vienas iš efektyvesnių, greitesnių ir plačias panaudojimo galimybes turinčių apdorojimo būdų [6]. Taikant šį metodą, gaunama didesnė išeiga ir greitesnė ekstrakcijos kinetika [7]. Baltymams ultragarsas sukelia makroskopinius pokyčius, tokius kaip sumažėjęs klampumas, drumstumas. Taip pat pakeičia funkcines savybes – gelio sudarymą, tirpumą, putojimą [8].

Išgauti ryžių baltymai panaudojami gelinės struktūros susidarymui. Gelėjimas – reiškinys, susijęs su polimerų grandinių susijungimu, kurio metu yra suformuojamas trimatis tinklas. Gelis susidaro, vykstant dalelių arba makromolekulių agregacijai, taip pat veikiant fiziškai (šiluma, slėgis) ar chemiškai (rūgštys, jonai, fermentai) [9].

**Darbo tikslas:** pritaikyti fermentinę hidrolizę baltymų ekstrakcijai iš ryžių išspaudų ir jų modifikavimui, įvertinant baltymų funkcines ir gelių sudarymo savybes.

### Darbo uždaviniai:

1. Terpės pH ir temperatūros parinkimas baltymų ekstrakcijai iš ryžių išspaudų.
2. Ryžių išspaudų fermentinės hidrolizės amilaze, celiulaze ir proteaze tyrimai ir fermentų kompozicijos sudarymas efektyviai baltymų ekstrakcijai.
3. Išskirtų skirtingomis sąlygomis baltymų izoliatų funkcinių savybių įvertinimas.
4. Hidrolizės skirtingais fermentais (transgliutaminaze ir proteaze) sąlygų nustatymas ryžių baltymų modifikavimui, įvertinant gelių sudarymo, gelių tekstūros ir struktūros savybes.
5. Baltymų produktų gamybos iš ryžių išspaudų proceso schemos sudarymas.

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Ryžių cheminės sudėties komponentai

Ryžiai (*Oryza sativa* L.) yra viena svarbiausių maistinių kultūrų pasaulyje. Maistui daugiausia vartojamos ryžių kruopos – valyti grūdai, be vaisiaus sėklinių luobelų ir gemalų. Ryžius sudaro trys pagrindinės dalys – endospermas arba baltieji ryžiai (~70 %), lukštas/ luobelės (~20 %) ir sėlenos (~10 %) [2]. Nesmulkintuose ryžiuose yra 63,6 – 73,2 % angliavandenių, 1,5 – 2,3 % riebalų, 5,8 – 7,7 % baltymų, 2,9 – 5,2 % pelenų. Baltieji ryžiai yra dažniausiai vartojami dėl minkštos tekstūros ir prekinės išvaizdos. Juose randama iki 76,7 % angliavandenių, o tai yra pagrindinis energijos šaltinis, ir tik 7,4 % baltymų [2]. Ryžių baltymai yra itin vertingi, nes juose yra visos aminorūgštys. Iš nepakeičiamų aminorūgščių, lizino randama 3 – 4 %, t.y. 50 % daugiau nei kviečiuose. Šios žaliavos baltymų efektyvumo santykis (2,0 – 2,5) yra panašus į pieno kazeino (2,5), o virškinamumas didesnis nei 90 % [2].

Ryžių produktų naudojimas maisto produktų gamyboje vis labiau auga, nes vartotojai labiau domisi sveikesniais produktais. Produktai, kurių sudėtyje yra ryžių, tinkami alergiškiems žmonėms, be to ryžių išspaudos, sėlenos ir lukštai yra naudojami atitinkamai, kaip energijos šaltinis ir polimeriniai užpildai. Ryžių išspaudose yra 1,7 % fitatų ir 12 % skaidulinių medžiagų [2]. Ryžių išspaudose bendras aminorūgščių lizino, treonino ir izoleucino kiekis yra didesnis nei kitose grūdų kultūrose.

Ryžių išspaudos gaunamos po ryžių augalinio gėrimo gamybos bei kitų galimų procesų metu. Ryžių išspaudos yra ryžių sėklų dalis, gaunama pašalinant juos iš krakmolingos endospermos ryžių malimo procese. Ryžių išspaudas sudaro nedidelis kiekis ryžių gemalo ir šiek tiek ryžių išspaudų miltelių, galinčių atsirasti malimo metu [10]. Ryžių išspaudose yra apie 14 – 16 % baltymų, lizino kiekis sudaro apie 3 – 4 %, tai yra daugiau nei ryžių endosperme [10]. Ryžių sėlenose yra gausu antioksidacinių medžiagų, tokių kaip tokoferoliai,  $\gamma$ -orizanolis bei kitų fenolinių junginių, kurie mažina cholesterolio kiekį ir trombocitų agregaciją kraujyje, pasižymi priešuždegiminiu poveikiu [2].

Ryžių antrinės maisto žaliavos yra išmetamos arba naudojamos pašarų gamybai [11]. Pastaruoju metu išspaudų maistiniai komponentai plačiai tyrinėjami, prieinant išvados, kad jos gali būti naudojamos kaip maisto ingredientas, nes turi daug maistinių medžiagų. Tačiau naudojant sėlenas, o ne ryžių išspaudas turi būti stabilizuotos tuoj pat jas pagaminus, dėl jose esančios lipazės – fermento, kuris greitai hidrolizuoja riebalus iki laisvųjų riebalų rūgščių (LRR) ir glicerolio, o tai žymiai pablogina ryžių sėlenų kokybę. Lipolitinį aktyvumą galima pašalinti, taikant pažangias stabilizavimo technologijas. Tokiu būdu gauta medžiaga vadinama stabilizuotomis ryžių sėlenomis, kurios pasižymi geru skoniu, didesniu tirpumu ir ilgesne galiojimo trukme. Pagrindinė ryžių sėlenų stabilizavimo priemonė yra fermento veikimo sustabdymas termiškai apdorojant, pavyzdžiui, kaitinant mikrobangomis ar apdorojant ultragarsu. Papildomai fermentuojant probiotiniais mikroorganizmais, galima pagerinti stabilizuotų ryžių sėlenų funkcines savybes [11].

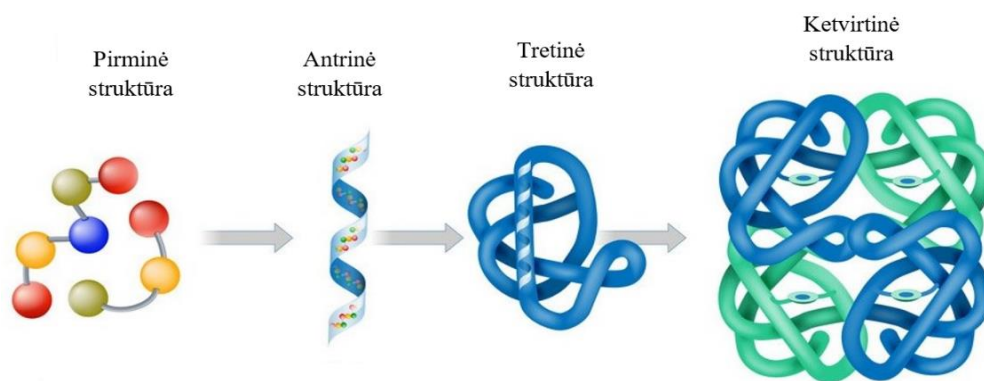
Ryžių išspaudų maistiniai komponentai pasižymi teigiama įtaka sveikatai, todėl jos pradėtos naudoti įvairių maisto produktų praturtinimui ir kaip funkcinis maistas. Ryžių išspaudos pasižymi panašiomis savybėmis į prebiotikų. Tai nevirškinamos plonajame žarnyne medžiagos, kurios storajame žarnyne tampa prebiotinių bakterijų maisto šaltiniu. Todėl ryžių išspaudos užkerta kelią *Salmonella* bakterijų dauginimuisi virškinamajame trakte [12].

Ryžių antrinės žaliavos gali būti naudojamos papildų ir baltymų koncentratų gamyboje. Ryžių išspaudos yra ideali kepinių sudedamoji dalis, gaminant daug skaidulų turinčius su sumažintu riebalų kiekiu produktus. Maiste naudojamos maltos ryžių išspaudos arba baltymų koncentratų pavidalu. Jos turi būdingą žemės riešutų aliejaus skonį, kuris naudojamas, gaminant užkandžius ir kepinius. Kepti produktai su ryžių išspaudų milteliais, tokie kaip sausainiai, bandelės, pyragaičiai pasižymi geresne maistine verte, lyginant su kvietiniais miltais. Pakeitus 10 – 20 % ryžių išspaudų miltais kvietinius miltus, sausainiuose baltymų kiekis gautas didesnis 0,93 – 3,43 %, lyginant su sausainiais tik iš kvietinių miltų [12].

## 1.2. Ryžių baltymai

### 1.2.1. Ryžių baltymų struktūra

Ryžių baltymai yra linijiniai polimerai, sudaryti iš L- $\alpha$ -aminorūgščių. Baltymų struktūra skirstoma į pirminę, antrinę, tretinę ir ketvirtinę (žr. 1.1 pav.).



1.1 pav. Baltymo struktūros [13]

Pirminė baltymų struktūra – linijinė polipeptidinė grandinė, sudaryta iš L- $\alpha$ -aminorūgščių, sujungtų tarpusavyje peptidiniais ryšiais. Peptidiniu ryšiu yra vadinamas stiprusis kovalentinis ryšys, susidarantis tarp vienos aminorūgšties  $\alpha$ -karboksigrupės ir kitos aminorūgšties  $\alpha$ -aminogrupės. Peptidinėje grandinėje CONH- anglies atomas yra  $sp^2$  hibridizuotos formos. C', O ir N atomai yra vienoje plokštumoje, nes sudaro konjuguotąją sistemą. Dėl šios sistemos vyksta tam tikri cheminių ryšių pokyčiai. Dvigubasis ryšys C=O pailgėja, o C-N ryšys sutrumpėja [13].

Galimi du peptidinės grupės išsidėstymo būdai plokštumoje – cis- ir trans- konfigūracija. Kai peptidinio ryšio O ir H atomai yra toje pačioje peptidinės grupės plokštumoje C'-N ryšio pusėje, jie užima cis- padėtį, o kai peptidinio ryšio O ir H atomai yra priešingose peptidinėse grupės plokštumose C'-N ryšio pusėje, tuomet užima trans- padėtį [13].

Antrinė baltymų struktūra yra pirminės baltymo struktūros išsidėstymas erdvėje, ją stabilizuoja vandeniliniai ryšiai. Šios baltymų struktūros grandinės gali būti išdėstyta dvejopai – sudaryti  $\alpha$  spiralę arba  $\beta$  klostatą struktūrą.  $\alpha$  spiralė dažna baltymo struktūra, kurią stabilizuoja vandeniliniai ryšiai, esantys visose peptidinėse grupėse ir lemiantys spiralės stabilumą. Baltymuose paprastai randama dešinioji  $\alpha$  spiralė, kuri yra daug stabilesnė negu kairioji. Dešinioji  $\alpha$  spiralė sukasi pagal laikrodžio rodyklę (iš kairės į dešinę) ir tai lemia L-aminorūgščių radikalų išsidėstymas [13].

Baltymų  $\beta$  klostyta struktūra yra gana išstęta, ją taip pat stabilizuoja tarpmolekuliniai vandeniliniai ryšiai arba vidiniai molekuliniai vandeniliniai ryšiai.  $\beta$  klostyta struktūra skirstoma į lygiagrečią ir antilygiagrečią. Lygiagrečioje polipeptidinių grandinių N-galai nukreipti į tą pačią pusę, o antilygiagrečioje – į priešingas puses [13].

Tretinė baltymų struktūra yra polipeptidinės grandinės antrinės struktūros elementų išsidėstymas erdvėje. Pakitus tretinei struktūrai, kinta baltymo biologinis aktyvumas. Tretinės struktūros baltymo molekulės skirstomos į globulines ir fibrilines. Globuliniai baltymai dažniausiai yra elipsoido formos, o fibriliniai – ištęsusios formos. Baltymo tretinę struktūrą stabilizuoja vandeniliniai, elektrostatiniai ryšiai, hidrofobinė sąveika ir kovalentiniai ryšiai [13].

Baltymai, kurie sudaryti iš dviejų ir daugiau polipeptidinių grandinių, tarpusavyje sujungtų nekovalentiniais ryšiais, turi ketvirtinę struktūrą. Formuojantis ketvirtiniai struktūrai, baltymai išsaugo pagrindinę tretinės struktūros konfigūraciją. Susiformavus šiai baltymo struktūrai, padidėja stabilumas, sumažėja santykinis paviršius, tūris. Ketvirtinę struktūrą turintys baltymai atsparesni fermentų proteazių ir temperatūros poveikiui, denatūracijai [13].

Ryžiuose yra dviejų rūšių baltymai – biologiškai aktyvūs (fermentai) ir biologiškai neaktyvūs (atsarginiai baltymai), taip pat randama kelių tipų lipazių. Be lipazių yra amilazių, katalazių, askorbo rūgšties oksidazių, citochromo oksidazių, lipoksigenazių, polifenolio oksidazių, dehidrogenazių ir esterazių. Biologiškai neaktyvūs baltymai yra ryžių azoto, anglies ir sieros atsargos. Ryžiuose pastebimi du morfologiškai skirtingi baltymų kūnai: sferinis su koncentruotais sluoksniais (SBK) ir netaisyklingos formos tankus baltymo kūnas (NBK), kuris kaupiasi, vystantis ryžio grūdai. SBK su koncentruotais sluoksniais yra sudarytas iš prolaminų, o kristaliniuose baltymuose yra glutelinų ir globulinų. Jų dydis svyruoja nuo 2 – 3  $\mu\text{m}$  skermens kristalinio baltymo iki 1 – 2  $\mu\text{m}$  skermens sferinio baltymo kūno. NBK dažnai vadinami kristaliniais baltymų kūnais dėl baltymo matricoje pastebimos gardelės [14].

Fabian ir Ju (2011) tyrimai parodė, kad ryžių išspaudų baltymai yra aukštos kokybės ir svarbūs maisto ir farmacijos tikslams. Tai yra augalinis baltymas, kurį galima gauti iš ryžių išspaudų, gausus ir pigus žemės ūkio šalutinis produktas. Baltymų kiekis ryžių išspaudų yra apie 10 – 15 %, juos sudaro 37 % vandenyje tirpių, 31 % druskos tirpale tirpių, 2 % alkoholyje tirpių ir 27 % šarmuose tirpių baltymų. Dėl unikalių hipoalerginių savybių ir priešvėžinio aktyvumo, juos galima plačiai pritaikyti. Jau prieš kelis dešimtmečius buvo kalbama apie ryžių išspaudų baltymų ekstrahavimą ir ryžių baltymų izoliatų gamybą [15].

### **1.2.2. Ryžių baltymų funkcinės savybės**

Ryžių sėlenų baltymai laikomi vertingais, nes jie yra bespalviai, švelnaus skonio, turi daug nepakeičiamų aminorūgščių, yra hipoalergiški ir hipocholesterolemiški [10]. Be to, ryžių išspaudų baltymų fizikinės, cheminės ir biologinės savybės pranašesnės už sojų, bulvių krakmolo, žemės riešutų, pupelių baltymų [2]. Tačiau, norint juos naudoti maistui, pageidautina, kad jie pasižymėtų ir kitomis savybėmis, tokiomis kaip putų, gelių ir emulsijų sudarymo pajėgumas.

Baltieji ir rudieji ryžiai naudojami baltymų koncentratų, kurių hidrolizės laipsnis 3,89 – 4,16 %, gamybai. Optimali tokių baltymų koncentratų proteolizė gauta, naudojant endoproteolitinius fermentų preparatus ir kombinuotus endoproteolitinius bei egzopeptidazinius preparatus [16].

Baltymų koncentratai, gauti iš baltųjų ryžių, pasižymi geresnėmis savybėmis, nei koncentratai iš rudųjų ryžių. Baltųjų ryžių baltymų putų sudarymo pajėgumas nustatytas 5 – 6 kartus didesnis nei rudųjų ryžių baltymų. Baltymų koncentratai pagaminti fermentinės hidrolizės būdu pasižymi didesnėmis tirpumo ir geresnėmis vandens surišimo ir putų sudarymo pajėgumu. Tačiau riebalų absorbcijos savybės gautos mažesnės nei baltymų koncentratų, iš nepaveiktos fermentais žaliavos. Baltųjų ryžių baltymų koncentratų putojimo pajėgumas artimas kiaušinių albumino putų sudarymo gebai. Ryžių baltymų funkcinės savybės priklauso nuo pasirinkto modifikavimo metodo, proteolizės sąlygų ir ryžių tipo. Šios sąlygos užtikrina, kad baltymų koncentratų funkcinėmis savybėmis būtų galima stabilizuoti technologinį gamybos procesą bei pagerinti maisto kokybę [16].

### **1.3. Baltymų ekstrakcijos metodai ir priemonės jos efektyvumui padidinti**

#### **1.3.1. Osbornio klasifikacija ir baltymų išgavimas**

Nesmulkintų ryžių grūduose randama įvairių rūšių baltymų, kurie remiantis Osbornio klasifikacija, skirstomi pagal frakcijos tirpumą į glutelinus (32,5 %), albuminus (30,9 %), globulinius (24,9 %) ir prolaminus (11,6 %). Šių baltymų frakcijų pasiskirstymas ryžių išspaudose priklauso nuo ryžių veislės [2].

Gliutelinai yra pagrindinė ryžių baltymų sudedamoji dalis, ryžių išspaudose jų randama 22,7 – 40,2 %. Šie baltymai mažai tirpūs vandenyje dėl disulfidinių jungčių ir hidrofobinės sąveikos [2]. Sunkiai išgaunami iš išspaudų dėl savybės agreguoti, t.y. sudaryti stambius molekulinis darinius. Gliutelinai yra netaisyklingos formos ryžių baltymai, geriausiai tirpsta, esant  $\text{pH} < 3$  ir  $> 10$  [14]. Gliutelinai pasižymi didžiausia molekuline mase, lyginant su kitomis ryžių išspaudų baltymų frakcijomis, ir yra sudaryti iš dviejų rūšių molekulių subvienetų. Rūgštiniams baltymams priskiriami 30 – 39 kDa dydžio subvienetai, o baziniams – 19 – 25 kDa molekulinės masės subvienetai. Rūgštiniai ir baziniai subvienetai yra sujungti tarpmolekuliniais disulfidiniais ryšiais, taip susidarant gliutelinų molekulėms, kurių bendra molekulinė masė svyruoja nuo 64 kDa iki 500 kDa [2]. Gliutelinai sunkiai hidrolizuojami, tačiau naudojant stipresnį šarmų tirpalą, gaunami  $\alpha$ -polipeptidai, kurių molekulinė masė 34 – 39 kDa, ir  $\beta$ -polipeptidai, kurių molekulinė masė 21 – 23 kDa [14].

Albuminai – tirpūs vandenyje baltymai, koaguliuoja kaitinant; ryžiuose jų randama 6,24 – 9,73 %, molekulinė masė ~100 kDa. Cao ir kt. (2009) nustatė, kad albuminai sudaryti iš 10 iki 20 kDa molekulinės masės polipeptidų [2]. Wei ir kt. (2007) teigia, kad 16 kDa ryžių albuminai pasižymi antioksidaciniu aktyvumu [17]. Gryno albumino išskyrimas iš ryžių išspaudų yra sudėtingas, nepaisant to, kad jis lengvai išgaunamas, ekstrahuojant vandeniu kambario temperatūroje. Taip yra todėl, kad augaluose randamos tam tikros druskos, todėl albuminai ir globulinai visada yra ekstrahuojami kartu. Norint išgauti gryną albuminą, reikia taikyti ultrafiltraciją arba dializę [14].

Globulinai – druskos tirpaluose tirpūs baltymai, savo struktūroje turintys sieros. Ryžių išspaudose globulinų randama 12,5 – 24,9 % [2]. Šiame baltyme nėra lizino, tačiau yra dideli cisteino ir metionino kiekiai [14]. Globulinų polipeptidinė grandinė yra stabilizuota disulfidiniais ryšiais. Ryžių endosperme esantys globulinai skirstomi į keturias subfrakcijas, kurių molekulinė masė gali svyruoti nuo 16 iki 130 kDa [2]. Ryžių globulinai nepasižymi geromis antioksidacinėmis savybėmis, tačiau hidrolizuojant pepsinu, susidarę peptidai turi antioksidacinį poveikį [14]. Šie peptidai yra sudaryti iš 6 – 30 aminorūgščių liekanų, kurių molekulinė masė svyruoja nuo 6,7 iki 36

kDa, o peptidai, turintys N-gale tirozino liekaną, pasižymi didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu [14].

Prolaminai – alkoholyje tirpūs baltymai, dažniausiai ekstrahuojami 70 % etanoliu arba 50 % propanoliu. Jie netirpsta arba beveik netirpsta vandenyje, bet lengvai tirpūs rūgštyse ar šarmuose [22]. Ryžių išspaudose šių baltymų yra 3,24 – 11,6 %, jų molekulinė masė 23 kDa. Cao ir kt. (2009) nustatė, kad prolaminai sudaryti iš trijų subvienetų, kurių molekulinės masės yra 10, 13 ir 16 kDa [1]. Šie prolaminų subvienetai turi panašų aminorūgščių kiekį, yra daug glutamo rūgšties, alanino, glicino ir arginino, kiek mažesnis kiekis randamas lizino ir histidino [22].

Taikant Osborno frakcionavimą ryžių sėlenų baltymų išgavimui, naudojant vandenį, NaCl tirpalą, 60 % etanolį ir 0,1 M NaOH, galima išgauti daugiau nei 90 % baltymų. Pramoniniu mastu, naudojant kelis gavybos etapus, galima prarasti dalį produkto, tai reiškia mažesnę išeigą ir mažesni gamybos proceso efektyvumą [14].

Kitos medžiagos taip pat gali būti naudojamos kaip pagalbinės priemonės ryžių išspaudų baltymams ekstrahuoti. Plovikliai, riebalų rūgščių druskos, reduktoriai (merkaptoetanolis, ditiotreitolis), silpnos rūgštys (acto, pieno) ir karbamidas, turintis stiprų ardomąjį poveikį vandenilinėms jungtims. Tačiau tirpikliai, turintys karbamido, acto rūgšties ir aliuminio laktato nėra pakankamai veiksmingi ryžių baltymams ekstrahuoti, o plovikliai nepasižymi pakankama tirpinimo geba [14]. Kita vertus, naudojant disulfidinius ryšius redukuojančius agentus kartu su natrio laurilsulfatu, galima išgauti iki 80 % baltymų. Pagal Cynthia ir Yi [14], naudojant acto rūgšties, karbamido ir cetiltrimetilamonio bromido mišinį, išgauto baltymo kiekis siekė ~ 90 %, tačiau šis mišinys ir baltymų išgavimo būdas nėra tinkamas, jei norimą baltymą panaudoti maisto produktų gamybai.

### **1.3.2. Baltymų ekstrakcija šarmais**

Didelio grynumo baltymus galima išgauti, taikant ekstrahavimą šarmais, tačiau ekstrahuojant cheminiais reagentais, keičiasi baltymų struktūra ir funkcinės bei bioaktyvios savybės. Esant didelei šarmų koncentracijai, vyksta nepageidaujamos baltymų modifikacijos: baltymų denatūracija, cheminiai amino rūgščių pokyčiai, suyrant aminorūgštims ir vykstant jų racemizacijai, baltymų – angliavandenių sąveikos (Mailardo reakcija), susiformuojant tamsiems pigmentams, taip pat sumažinama maistinė vertė dėl toksiškų junginių susidarymo, tokių kaip lizinoalaninas [3]. Šarminės ekstrakcijos metu pakeičiama baltymų antrinė struktūra, t.y. susilpnėja  $\alpha$  spiralės ir  $\beta$  klostinės struktūros [18].

Wang ir kt. (2015) nustatė, kad esant 0,03 M šarmo tirpalo koncentracijai, baltymų tirpumas padidėja, o baltymų paviršiaus hidrofobiškumas sumažėja. Didesnės nei 0,03 M šarmo koncentracijos sukelia šarminę denatūraciją, kurią daugiausia nulemia  $\alpha$  spiralės struktūros suirimas. Vykdamas baltymų ekstrakciją šarmais, sumažėja nepakeičiamų aminorūgščių kiekis, tokių kaip treoninas, cisteinas ir lizinas. Nepaisant to, šis metodas plačiai naudojamas pramonėje, gaminant augalinės kilmės baltymų izoliatus [3].

### **1.3.3. Nusodinimas izoelektriniame taške**

Baltymų nusodinimui izoelektriniame taške didelės įtakos turi tokie parametrai, kaip pH, joninės sąveikos stiprumas, baltymo konformacija, krūvio tankis ir polimerų koncentracijos. Tirpale sumaišius du priešingų krūvių polimerus, vyksta jų susijungimas ir nusodinimas.

Naudojant polisacharidus, gali būti nusodinamas didesnis baltymo kiekis. Baltymas, kurio krūvis yra teigiamas, gali jungtis su neigiamai įkrautu polisacharidu, tuomet baltymo izoelektrinis taškas tampa mažesnis, ir baltymas nusodinamas [19]. Alginatas ir karageninas, du anijoniniai polisacharidai, dažniausiai naudojami maisto produktuose kaip tirštikliai, stabilizatoriai ir medžiagos, gerinančios gelio struktūros susidarymą. Pagal Betschart ir kt. [20], polisacharidai pasižymi skirtinga geba nusodinti tam tikrą baltymų kiekį, esant pH 2 – 4. Naudojant alginatą ir karageniną, esant pH 4, iškrinta panašūs kiekiai baltymų. Tai paaiškinama tuo, kad esant šiam pH, ryžių baltymai turi labai mažai krūvių, kurie gali sąveikauti su polisacharidais. Ryžių išspaudų baltymų izoelektrinis taškas yra tarp pH 4,0 ir 5,5. Remiantis Velings ir Mestdagh [21] tyrimais, alginatas įgauna krūvį, tik esant pH > 2. Neigiamas alginato krūvis padidėja, didinant pH, tuo atveju padidėja ir nusodinamų baltymų kiekis. Kita vertus, kadangi ryžių išspaudų baltymų izoelektrinis taškas yra arti pH 4, teigiamas baltymo krūvis turi tendenciją mažėti. Karageninas yra stiprus anijonas, suteikiantis neigiamą krūvį. Todėl atsiranda nedidelis polisacharido krūvio pokytis, esant pH 2 – 3,5. Didžiausias baltymų nusodinimas įvyksta, esant tam tikram pH ir polisacharido/ baltymo kiekio santykiui. Taip yra todėl, kad polisacharido kiekis parodo, kiek polisacharidų molekulių yra tirpale, o tirpalo pH nusako grynąjį jonizuoto polisacharido krūvį tirpale. Naudojant karageniną, didžiausia gauta baltymų išeiga iš ryžių išspaudų ekstrakto yra 95 %, kai pH 3,5 ir karagenino/ baltymo santykis 2:1, o naudojant alginatą, maksimali baltymų išeiga – 93 %, kai pH 3,5, o alginato/ baltymo santykis 1:1 [19].

Be to, baltymų ir polisacharidų kompleksas gali būti naudojamas mikrokapsulių, naujų biomedžiagų ir maisto pakuočių gamyboje [19].

Amonio sulfatas – taip pat vienas labiausiai naudojamų reagentų baltymams nusodinti. Didelis druskos kiekis nusodina didelį kiekį baltymų, skatindamas jų susijungimą į stambias molekules (agregaciją) [2].

## **1.4. Priemonės baltymų ekstrakcijai padidinti ir jų funkcinėms savybėms modifikuoti**

### **1.4.1. Fermentinė hidrolizė**

Fermentinės hidrolizės būdu padidinamas baltymų kiekis iš ryžių išspaudų, pridedant proteolitinių fermentų. Ši efektyvumo priemonė yra pigi, specifiška, padeda išskirti biologiškai aktyvius ir antioksidacinius peptidus bei sumažina baltymų alerginį potencialą. Baltymai, išskirti fermentinės hidrolizės būdu, greičiau absorbuojami virškinamajame trakte, naudingos medžiagos nukreipiamos į kraują ir organus, taip sustiprinama imuninė sistema [22].

Baltymų išskyrimui naudojant fermentinę hidrolizę, gaunamos geresnės baltymų funkcinės savybės – tirpumas, emulsijų ir putų sudarymo pajėgumas, taip pat pasikeičia baltymo molekulinė masė. Baltymo struktūros pakitimai fermentinės hidrolizės metu leidžia geriau sulaikyti aliejų ir vandenį. Šios hidrolizės metodo efektyvumas priklauso nuo fermento tipo, pH, temperatūros, reakcijos laiko ir fermento koncentracijos [22].

Amilazę gamina daugybė gyvūnų, augalų, bakterijų, grybų ir pelėsių, tačiau biotechnologijų srityje daugiausiai naudojamos bakterinės ir grybinės kilmės  $\alpha$ -amilazės. Dažnai  $\alpha$ -amilazių gamybai naudojamos įvairios *Bacillus spp.* rūšys [23]. Naudojant  $\alpha$ -amilazę [23], hidrolizuojamas krakmolas ir išlaisvinami baltymai, taip pagerinamas ekstrahavimo efektyvumas ir padidindamas laisvųjų baltymų tirpumas. Naudojant  $\alpha$ -amilazę ir fitazę, padidinama baltymų ekstrakcija, slopinant baltymų sąveiką su krakmolu ir fitatais išspaudose, kurie trukdo baltymų ekstrakcijai [14]. Apdorojant  $\alpha$ -amilazėmis ryžių išspaudas (pH 6,5; 95 °C, 45 min.) ir efektyviai pašalinus likusį krakmolą ir kitas priemaišas, baltymų išėigą galima padidinti iki 13,4 % [14].

Kumagai ir kt. (2006) ištyrė virškinamumą ryžių baltymų, išgautų taikant šarminę ekstrakciją ir krakmolo hidrolizę  $\alpha$ -amilaze. Rezultatai parodė, kad išskirtų šiais dviem būdais baltymų kiekis sudarė, atitinkamai 84,7 % ir 78,2 %, taip pat, aminorūgščių atžvilgiu abi baltymų grupės turėjo gana panašias kompozicijas, nors cisteino ir metionino po šarminės ekstrakcijos nustatyti mažesni kiekiai. Tiriant virškinamumą su pepsinu ir pankreatinu imituotomis *in vitro* sąlygomis, baltymų struktūros analizė parodė, kad šarminiu būdu išskirtų baltymų virškinamumas didesnis, nei išekstrahuotų, atlikus krakmolo hidrolizę amilaze. Baltymų elektroninė mikroskopija parodė, kad šarminiu būdu išekstrahuoti gliutelinai buvo transformuoti į mažas, amorfiškas granules, o po hidrolizės  $\alpha$ -amilaze išlaikė dalinę baltymų struktūrą. Tuo metu prolaminai, nors ir išlaikė savo struktūrą, tačiau sudarė dvigubus sluoksnius, tai parodo, kad prolaminai yra jautrūs šarminiai aplinkai. Baltymų virškinimą lemia prolaminų ir gliutelinų struktūriniai pokyčiai, kuriuos sukelia ekstrahavimas šarminiu būdu [24].

Ryžių produktas, kuriame yra 65 % baltymų, gali būti gaunamas, įprastus ryžių miltus apdorojant *Termamyl* 120 L  $\alpha$ -amilaze 90 °C temperatūroje, 30 min [25]. Tokiu būdu išskirto baltymo fizikinės ir cheminės savybės išlieka nepakitusios. Papildomas angliavandenių skaidymas hidrolizuojančiais fermentais gali padidinti ne tik baltymų kiekį iki 70 %, bet taip pat padidinti krakmolo hidrolizę iki DE > 15. Procedūra yra veiksminga krakmolo hidrolizei, tačiau ne tokia efektyvi celiuliozės ir hemiceliuliozės hidrolizei. Taigi tokioje netirpioje frakcijoje, be baltymų, yra nemažas kiekis netirpių skaidulų [25].

Baltymų hidrolizei taip pat plačiai naudojamos mikrobinės kilmės egzoproteazės ir endoproteazės [8]. Naudojant proteazes ryžių išspaudų baltymų hidrolizei, galima padidinti baltymų tirpumą ir ekstrakcijos efektyvumą. Egzoproteazės atskelia atskiras aminorūgštis iš abiejų peptidinės grandinės galų, o endoproteazės suskaido peptidinius ryšius polipeptidinės grandinės viduje. Pagal Cynthia ir Yi (2011) [14], naudojant endoproteazių ir egzoproteazių mišinį, galima išgauti iki 87,6 % baltymų, o naudojant alkalazes ir endoproteazes – iki 81,4 % baltymų (ekstrakcijos sąlygos – pH 8 ir 50 °C). Remiantis Hamada atliktais tyrimais [26], baltymų išėigą iš ryžių išspaudų galima padidinti iki 92 %, padidinus baltymų hidrolizės laipsnį (DH) iki 10 %. Ryžių išspaudų baltymus taip pat galima efektyviai išekstrahuoti, naudojant proteolizę iki 2 % DH su Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> ir (arba) NDS (0,2 mmol/g baltymų). Baltymų išėiga tuo atveju padidėja nuo 74 % iki 84 %, atitinkamai naudojant Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, NDS ir abi medžiagas kartu. Naudojant reagentus atskirai, gaunami plataus spektro vidutinio dydžio peptidų baltymų hidrolizatai, kuriuose 78 % baltymų molekulinė masė yra 11 – 68 kDa ribose [26].

Proteazių naudojimas gali būti veiksmingas būdas išgauti aukštos kokybės ir pridėtinės vertės ingredientus skirtus maistui iš ryžių išspaudų. Naudojant bakterinės kilmės (*Bacillus licheniformis*

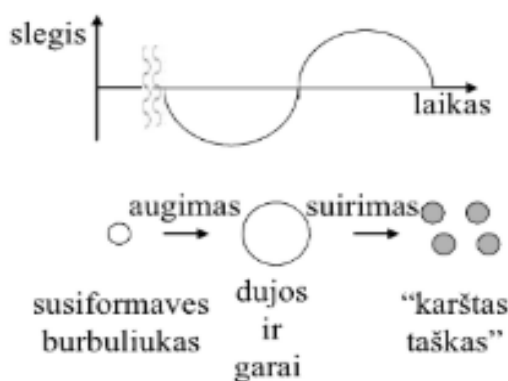
LBA 46) ir komercinę (Alcalase 2,4 L) proteazes, ryžių baltymų hidrolizatai pasižymėjo bioaktyvumu, išreiškus Trolokso ekvivalentu, atitinkamai 18,78 (TE) ir 19,31 TE  $\mu\text{mol/g}$  [27].

Kadangi celiuliozė ir hemiceliuliozė sudaro didžiąją dalį ryžių išspaudų angliavandenių, naudojant hemiceliulazes (65 °C; pH 4), galima išgauti iki 46 % baltymų, o naudojant tik celiulazes, išgaunama iki 35 % baltymų. Naudojant fermentus, hidrolizuojančius ksilaną, gaunamas didesnis baltymų ekstrakcijos iš ryžių išspaudų efektyvumas – baltymų išgaunama iki 55 % [14]. Pagal Guan ir Yao (2008) [1], kad karbohidrazių, tokių kaip arabanazė, celiulazė, hemiceliulazė ir ksilanazė kompozicija, gali veiksmingai nutraukti jungtis polisacharidų matricoje ir taip išlaisvinti daugiau tarpląstelinių baltymų. Naudojant fermentų kompoziciją, esant 50 – 65 °C temperatūrai ir pH 3,8, baltymų išgaunama iki 57 %.

#### 1.4.2. Apdorojimas ultragarsu

Ultragaras yra viena iš greitų, plačias panaudojimo galimybes turinčių ekologiškų technologijų, pastaraisiais metais naudojamų maisto pramonėje. Apdorojimas ultragarsu naudojamas įvairiose maisto technologijų srityse kristalizavimui, ekstrahavimui, džiovimui, filtravimui, emulsijų sudarymui, sterilizavimui ir kt. Ultragarso kavitacija yra viena iš inovatyvių priemonių, taikomų įvairių augalinių substratų stabilizavimui, struktūrizavimui, mikroorganizmų fermentinių sistemų aktyvinimui ir vertingų ingredientų efektyvesniam išgavimui [6].

Ultragaras – tai specialaus tipo garso bangos, kurios paprastai sukuriamos nuo 20 kHz iki 100 MHz diapazone. Sklisdamos garso bangos sudaro suslėgimo ir išretinimo zonas, galinčias nutraukti Van der Valso jėgas. Kai slėgio kitimas pakankamai didelis, tada skysčio slėgis tampa mažesnis nei jo garų slėgis, ir atsiranda vakuominių burbuliukų, kurie didėja tol, kol viršijama jų vidinė pusiausvyra. Viršijus šią pusiausvyrą, vanduo staiga suspaudžia šiuos burbuliukus ir jie suyra, susidarant daug mažų burbuliukų, vadinamų „karštu tašku“ (žr. 1.2 pav.) [28].



1.2 pav. Kavitacijos burbuliuko dinamika [28]

Efektyviam junginių išgavimui įtakos turi bandinio susmulkinimo laipsnis, drėgmės kiekis, dalelių dydis ir tirpiklis. Pagrindiniai parametrai, taikant ultragarasą, yra intensyvumas, pH, temperatūra, dažnis, trukmė, tirpiklio koncentracija ir tirpiklio bei kietos medžiagos santykis. Tirpiklio rūšis taip pat daro didelę įtaką ekstrahavimo efektyvumui. Dažniausiai naudojami tirpikliai yra metanolis, acetonas ir etanolis. Pagal Mason [29], ultragaras turi keletą savybių, kurios gali padidinti komponentų ekstrahavimo efektyvumą, pavyzdžiui, didesnę difuziją, didesnis masės perdavimas,

augalinės žaliavos ląstelių suskaidymas, didesnis tirpiklio įsiskverbimas į medžiagą ir ultragarso kapiliarinis poveikis.

Taikant žaliavos komponentų ekstrakcijai ultragarso, gaunama didesnė išeiga ir greitesnė ekstrakcijos kinetika. Ekstrahavimo efektyvumo padidėjimas yra priskiriamas kavitacijos reiškiniui, kurį tirpiklyje sukuria praeinanti ultragarso banga. Ultragarso veikia mechaniškai, suskaidydamas matricą ir sukeldamas mažesnių dalelių susidarymą, tokiu būdu padidinamas ekstrakcijos tirpiklio paviršiaus plotas [7]. Taip pat procesas leidžia sumažinti temperatūrą, sudarant sąlygas termolabilių junginių išgavimui [30].

Didelio intensyvumo ultragarso keičia baltymų struktūros konformaciją, paveikdamas vandenilinius ryšius ir hidrofobines sąveikas dėl kavitacijos reiškinio. Baltymams ultragarso sukelia makroskopinius pokyčius, tokius kaip sumažėjęs klampumas, drumstumas. Taip pat pakeičia funkcines savybes – gelio sudarymą, tirpumą, putojimą [8]. Apdorojimas ultragarsu padidina tirpių baltymų išskyrimą iš ryžių į vandenį, dėl kavitacijos reiškinio [31].

Nustatyta, kad apdorojimo ultragarsu temperatūra įtakoja baltymų ekstrakcijos efektyvumą. Pagal Li ir kt. [31], keliant temperatūrą, padidėja tirpių baltymų išeiga, tai paaiškinama termodinaminiu poveikiu: aukštesnė temperatūra pagreitina žaliavos suminkštėjimą ir išsipūtimą, padidina difuziją ir ekstrahuojamų junginių tirpumą [31]. Taip pat, ultragarso panaudojimas efektyviai pagerina fermentinę hidrolizę ir reikšmingai padidina ryžių sėlenose esančių tirpių baltymų išeigą ir įtakoja ryžių baltymų struktūros pokyčius [31].

O ryžių sėlenose yra fermento lipazės, kuris daro įtaką riebalų hidrolizei iki laisvųjų riebalų rūgščių (LRR) ir glicerolio, o tai reikšmingai sumažina ryžių sėlenų kokybę, todėl norint sėlenas panaudoti kaip vertingą maisto ingredientą, jos turi būti stabilizuotos [11]. Šie trūkumai gali būti pašalinti, naudojant pažangias stabilizavimo technologijas. Tokiu būdu gauta medžiaga vadinama stabilizuotomis ryžių sėlenomis, pasižyminčiomis priimtiniu skoniu, didesniu komponentų tirpumu ir ilgesne galiojimo trukme. Pagrindinė ryžių sėlenų stabilizavimo priemonė yra fermento lipazės deaktivavimas, hidrotermiškai apdorojant, pavyzdžiui, ultragarsu.

## **1.5. Ryžių baltymų gelių charakteristika**

### **1.5.1. Ryžių baltymų izoliatų, hidrolizatų ir koncentratų charakteristika**

Ryžių baltymų koncentratas – gryniausias, kokybiškiausias baltymas, nes yra mažai apdorotas. Sudėtyje turintis nedidelį kiekį angliavandenių ir lipidų. Aukštos kokybės baltymai išgaunami žemoje temperatūroje, mažo rūgštingumo sąlygomis, vengiant baltymo denatūracijos (pažeidimo), atliekant ultrafiltracijos (UF) procesą. Fizikinio atskyrimo metodu, naudojant slėgį per mikroporinę membraną atskiriami baltymai. Taip gaunama pagrindinė žaliava – ryžių baltymų koncentratas, kuriame baltymo koncentracija yra nuo 70 % iki 80 % baltymų [56].

Ryžių baltymų koncentratai, kuriuose baltymų kiekis sausoje fazėje yra didesnis nei 90 %, vadinami ryžių baltymų izoliatais (RBI). Izoliatai gaminami naudojant jonų keitimo metodą, turi didžiausią baltymų kiekį viename grame. Pažangesni izoliatų gamybos būdai – mikrofiltracija (MF), ultrafiltracija (UF), kryžminio srauto filtracija (CFM), kurie leidžia baltymų koncentraciją padidinti iki 95 %. Šių gamybos metodų privalumas, kad nevyksta baltymų denatūracija, todėl yra

išsaugomas baltymų tirpumas [57]. Todėl šie būdai leidžia gamintojui pagaminti geros kokybės ir aukštos biologinės vertės produktą.

Hidrolizatai – fermentinės hidrolizės būdu gauti baltymai. Kokybiškiausi hidrolizatai – gaminami iš ultra ir mikrofiltruoto izoliato, naudojant proteolitinius fermentus. Hidrolizės proceso metu, baltymų molekulės, veikiamos specifinių fermentų, suskaidomos į mažesnės molekulinės masės junginius: di ir tri peptidus, taip pat gaunama ir laisvos aminorūgštys [58]. Šiais būdais išgauti baltymai yra panaudojami praktiškai formuojant įvairaus stabilumo gelines struktūras.

### 1.5.2. Ryžių baltymų gelių susidarymas ir savybės

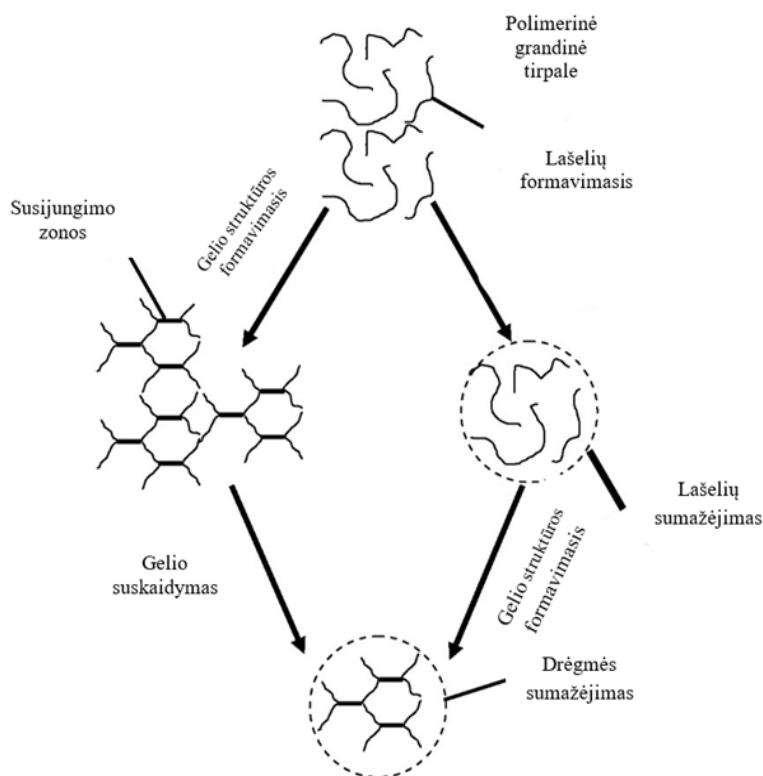
Gelėjimas yra reiškinys, susijęs su polimerų grandinių susijungimu, kurio metu yra suformuojamas trimatis tinklas, kuris sulauko ir imobilizuoja vandenį, kad susidarytų standi struktūra. Gelio susidarymas yra savaiminis procesas iš polimero dispersijos arba dalelių suspensijos, veikiant termiškai ar keičiant pH. Gelis susidaro, vykstant dalelių arba makromolekulių agregacijai, kurios metu sukuriama tinklas, apimantis visą tūrį. Geliai gali susidaryti, vykstant fiziškai (šiluma, slėgis) ar chemiškai (rūgštys, jonai, fermentai) sukeltoms gelinimo reakcijoms. Gelio sudarymas labiausiai priklauso nuo: temperatūros, slėgio, pH, fermentų, tirpiklio kokybės, gelinimo agento koncentracijos, molinės masės/ polimerizacijos laipsnio [9]. Didelis angliavandenių kiekis ryžių išspaudose gali sukelti mažą ryžių baltymų gelių grynumą. Jie gali būti pašalinami, naudojant angliavandenius hidrolizuojančius fermentus –  $\alpha$ -amilazę, hemiceliulazę ir celiulazę [33].

Terminis būdas, naudojamas baltymų gelių sudarymui, yra labiausiai paplitęs būdas. Proceso pradžioje vyksta molekulių išsiskyrimas ir atsipalaidavimas dėl terminio poveikio. Vėliau vyksta molekulių agregacija, susidaro didelės molekulinės masės kompleksai. Pirmasis etapas yra grįžtamasis, o antrasis – negrįžtamas procesas. Pagrindinė funkcija atitenka disulfidiniams (-S-S-) ryšiams ir hidrofobiniai sąveikai. Aukštas slėgis suteikia galimybę modifikuoti funkcines molekulių savybes, palaikomos reakcijos, dėl kurių sumažėja bendras sistemos tūris, kuris sukelia vandens sumažėjimą, o esant dideliame slėgiui, terpės pH mažėja. Gelių, gautų naudojant slėgį ir šilumą tekstūra ir reologinės savybės skiriasi. pH pokyčiai dėl rūgščių pridėjimo keičia molekulių grynąjį krūvį, todėl keičia sąveiką tarp molekulių ir tirpiklio, tai yra, hidratacines savybes. Be to, druskų tirpumas kinta, priklausomai nuo pH, dėl ko susidaro gelis. Fermentų sukeltas gelėjimas pagrįstas kovalentinių kryžminių jungčių susidarymu. Fermentai, naudojami gelio struktūrai sudaryti, yra transgliutaminazės, peroksidazės, proteazės ir polifenolio oksidazės. Gelis susidaro, tik viršijant minimalią baltymo koncentraciją [34].

Yra du gelių dalelių susidarymo mechanizmai: nuolatinis fazių susidarymas ir disperguotų fazių susidarymas (žr. 1.3 pav.). Metodai skiriasi proceso etapų tvarka, o tai lemia skirtingas gelio dalelių savybes. Nuolatinis fazių susidarymas įvyksta tada, kai pirmiausia susidaro gelis, o vėliau suskaidomas į mažesnes daleles. Disperguotų fazių susidarymo metodas pagrįstas, kad pirmiausia susidaro lašeliai, kuri vėliau virsta gelio dalelėmis [34].

Tiriant ryžių baltymų gelių struktūrą elektroniniu mikroskopu, nustatyta, kad jų struktūra panaši į lęšių. Šie baltymai sukuria tvirtesnį, tankesnį trimatį tinklą [35]. Ryžių išspaudų baltymus sumaišius su išrūgų baltymų koncentratu, susidaro baltymų agregatai, tačiau mažesnės ir rutuliškos formos baltymai susijungia plonais fibrilniais siūleliais. Padidinus išspaudų baltymų ir išrūgų baltymų

santykį (1:2), tinklas tampa smulkesnis. Susidariusi tokia struktūra suteikia galimybę vandeniui sulaikyti ir geliui formuotis [35].



**1.3 pav.** Gelio struktūros susidarymo mechanizmas [34]

Baltymų gelių tekstūros ir funkcinės savybės gali skirtis, priklausomai nuo apdorojimo sąlygų. Ryžių išspaudų baltymų geliai naudojami įvairiuose maisto produktuose, tokiuose kaip kavos balinimo priemonės, priedai, gėrimai, konditerijos, mėsos ir duonos gaminiai. Ryžių baltymų geliai kartu su polisacharidu pululanu naudojami valgomosioms plėvelėms gaminti, kurios pasižymi geru atsparumu tempimui. Pridedant propilenglikolio alginato (PGA) ir aliejaus, sukuriama atsparumas vandens garams ir sudaromos hidrofobinės sąlygos. Kryžminis aminorūgščių ir PGA sujungimas pagerina plėvelės stiprumą per kovalentinį ryšį, esant aukštam terpės pH [34, 36].

Atsižvelgiant į ryžių išspaudų baltymų kokybę, jie vis plačiau naudojami maisto produktams praturtinti. Be to, sparčiai didėjant augalinių baltymų paklausai, jie iš rinkos išstumia gyvūninės kilmės baltymus. Tačiau ryžių sėlenų naudojimas maistui yra ribojamas dėl riebalų hidrolizės, laisvųjų riebalų rūgščių susidarymo. Vėliau šis procesas turi įtakos pašalinio skonio susidarymui dėl riebalų oksidacijos. Prieš naudojant ryžių sėlenas kaip maisto ingredientą arba gaminant ryžių sėlenų baltymų gelius, naudojama lipazė riebalams pašalinti [33].

### 1.5.3. Ryžių baltymų gelių funkcinės savybės

Didelė dalis maisto produktų turi gelio struktūrą, pvz: uogienės, želė, konditerijos gaminiai, desertai, vaisių ir daržovių pagrindu paruošti produktai. Norint pasiekti gelio formą, visada naudojamas vienas ar keli gelinimo agentai. Dažniausiai hidrokoloidai gaunami iš natūralių šaltinių, savo sudėtyje turinčių daug polisacharidų ir baltymų. Šie junginiai suteikia vandeninėms

dispersijoms tirštumą ir gelio formą, padidina putų stabilumą, emulsijų sudarymo gebą, mažina sinerezę ir taip pat padidina vandens sulaikymą [9].

Kadangi gelio susidarymas iš esmės yra zolio (skysčio) transformacija į gelio (kieto kūno) būseną, jos metu keičiasi klampumo ir elastingumo savybės. Gelis yra tarpinė fazė tarp kietos ir skystos disperinės fazės, pasižymintis elastingumu ir tekėjimo savybėmis. Kitaip tariant, formuojant gelį vyksta nepertraukiamų ir nenutrūkstamų fazių mainai. Todėl atsiranda poreikis matuoti reologines gelio (produkto) charakteristikas. Reologinės savybės nustatomos, esant didelėms deformacijoms, tai yra matuojamos lūžio, plyšimo charakteristikos, tokios kaip įtempimas. Reologinės savybės priklauso nuo gelio molekulinio tinklo [9].

Baltymų gelių funkcinės savybės – vienas iš pagrindinių kriterijų, kuris nulemia baltymų įsisavinimą ir priimtinumą. Baltymų funkcinės savybės apibrėžiamos paviršiaus hidrofobiškumu, tirpumu ir emulgavimo savybėmis. Baltymo funkcinės savybės daugiausiai nulemia fizikinės, cheminės bei struktūros savybės [33]. Ryžių baltymų geliai pasižymi geru emulsijų sudarymo pajėgumu ir emulsijų stabilumu, šios savybės rodo, kad juos galima naudoti kaip riebalų emulsiklius.

Tirpumas yra viena pagrindinių funkcinių savybių, kuris nulemia baltymo panaudojimo galimybes. Adebisi ir Ogawa [33] teigia, kad baltymų tirpumas glaudžiai susijęs su emulsijų sudarymo ir putojimo savybėmis. O paviršiaus hidrofobiškumas koreliuoja su paviršiaus, tarpfluoksnio įtempimu ir emulsijos stabilumu. Tačiau baltymų tirpumą gali pakeisti tokie veiksniai, kaip pH, druskos koncentracija, tirpiklio dielektrinė konstanta ir temperatūra. Šių sąlygų pokyčiai skatina elektrostatinės ir hidrofobinės sąveikos pokyčius baltymų struktūroje, dėl ko atsiranda naujos ir kintančios struktūros konformacijos, turinčios įtakos ryžių baltymų gelių funkcinėms savybėms [33].

Ryžių išspaudų baltymų geliai geriau tirpsta, esant aukštesniam pH. Pagal Bera ir Mukherjee [37], ryžių išspaudų baltymų geliai geriausiai tirpsta (> 75 %), esant pH 9,0 – 10,5, ir mažiausiai (~ 13 %), esant pH 4,5 – 5,5. Tai susiję su azoto tirpumo padidėjimu virš ir žemiau ryžių išspaudų baltymų izoelektrinio taško (pH 4,5). Esant rūgštiniam pH, šis padidėjimas yra nežymus, nes įtakos turi fitatai, kurie su baltymais sudaro netirpius kompleksus. Pagal Gnanasambandam ir Hettiarachchy [38], didžiausias azoto tirpumas (82 ir 57 %) nustatytas, esant pH 10, o mažiausias (8 ir 5 %) – esant pH 4 [14].

#### **1.5.4. Ryžių baltymų gelių bioaktyvios savybės**

Vis didėja susidomėjimas maisto produktuose naudojamų baltymų bioaktyviomis savybėmis. Antioksidantai užima svarbią vietą kasdieninėje žmonių mityboje, nes laisvieji radikalai nuolat gaminasi žmogaus metabolizmo metu ir gali sukelti rimtų sveikatos problemų bei pakenkti organinėms biomolekulėms, kurios skatina DNR pokyčius. Antioksidantai – medžiagos, apsaugančios nuo laisvųjų radikalų susidarymo pertekliaus [39]. Tyrimai nustatyta, kad baltymų hidrolizatai ir peptidai pasižymi aukštu antioksidaciniu pajėgumu ir veikia kaip natūralūs antioksidantai. Peptidai, turintys antioksidacinių savybių ir kurių aminorūgščių dydis svyruoja nuo 2 iki 10 vienetų, slopina biologinių makromolekulių oksidaciją [49].

Dawidowicz ir Olsszowy [40] nustatė, kad ryžių išspaudų nehidrolizuotų baltymų geliai pasižymi mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu, esant pH 2. Padidinus pH iki 6,5 ir 8,0, DPPH radikalo antioksidacinis aktyvumas padidėja. Lyginant su hidrolizuotų 25 ir 120 min., esant pH 2,0; 6,5; 8,0, ryžių baltymų gelių antioksidacinį aktyvumą, pastebėta, kad ilgesnė hidrolizės trukmė padidina antioksidacinį aktyvumą [39].

## 1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Literatūros apžvalgoje pateikta ryžių cheminės sudėties komponentai, baltymų struktūra, funkcinės savybės. Nurodyta baltymų ekstrakcijos metodai, priemonės baltymų ekstrakcijai padidinti ir funkcinėms savybėms modifikuoti bei išnagrinėta ryžių baltymų gelių charakteristikos.

Ryžius sudaro trys pagrindinės dalys – endospermas arba baltieji ryžiai (~70 %), lukštas/ luobelės (~20 %) ir sėlenos (~10 %) [2]. Nesmulkiuose ryžiuose yra 63,6 – 73,2 % angliavandenių, 1,5 – 2,3 % riebalų, 5,8 – 7,7 % baltymų, 2,9 – 5,2 % pelenų [2]. Ryžių baltymai yra linijiniai polimerai, sudaryti iš L- $\alpha$ -aminorūgščių. Baltymų struktūra skirstoma į pirminę, antrinę, tretinę ir ketvirtinę.

Baltymų išskyrimui naudojant fermentinę hidrolizę, gaunamos geresnės baltymų funkcinės savybės – tirpumas, emulsijų ir putų sudarymo pajėgumas, taip pat pasikeičia baltymo molekulinė masė. Baltymo struktūros pakitimai fermentinės hidrolizės metu leidžia geriau sulaikyti aliejų ir vandenį. Šios hidrolizės metodo efektyvumas priklauso nuo fermento tipo, pH, temperatūros, reakcijos laiko ir fermento koncentracijos [22]. Taikant žaliavos komponentų ekstrakcijai ultragarsą, gaunama didesnė išeiga ir greitesnė ekstrakcijos kinetika. Didelio intensyvumo ultragarsas keičia baltymų struktūros konformaciją, paveikdamas vandenilinius ryšius ir hidrofobines sąveikas dėl kavitacijos reiškinio. Baltymams ultragarsas sukelia makroskopinius pokyčius, tokius kaip sumažėjęs klampumas, drumstumas. Taip pat pakeičia funkcinės savybės – gelio sudarymą, tirpumą, putojimą [8]. Apdorojimas ultragarsu padidina tirpių baltymų išskyrimą iš ryžių į vandenį, dėl kavitacijos reiškinio [31].

Gelis susidaro, vykstant dalelių arba makromolekulių agregacijai, kurios metu sukuriama tinklas, apimantis visą tūrį. Geliai gali susidaryti, vykstant fiziškai (šiluma, slėgis) ar chemiškai (rūgštys, jonai, fermentai) sukeltoms gelinimo reakcijoms. Gelio sudarymas labiausiai priklauso nuo: temperatūros, slėgio, pH, fermentų, tirpiklio kokybės, gelinimo agento koncentracijos, molinės masės/ polimerizacijos laipsnio [9]. Dažniausiai geliniai struktūrai susidaryti naudojami fermentais yra transgliutaminazės, peroksidazės, proteazės ir polifenolio oksidazės. Gelis susidaro, tik viršijant minimalią baltymo koncentraciją [34]. Tačiau didelis angliavandenių kiekis ryžių išspaudose gali sukelti mažą ryžių baltymų gelių grynumą. Jie gali būti pašalinami, naudojant angliavandenius hidrolizuojančius fermentus –  $\alpha$ -amilazę, hemiceliulazę ir celiulazę [33]. Fermentų sukeltas gelėjimas pagrįstas kovalentinių kryžminių jungčių susidarymu. Išnagrinėtų straipsnių metodikos, gauti rezultatai, vyraujančios tendencijos pritaikytos atliekant baigiamąjį darbą ir aprašant rezultatus.

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1. Tyrimo objektai

**Žaliava.** Ryžių išspaudos (RI) gautos iš įmonės X (Beckum, Vokietija) po ryžių augalinio gėrimo gamybos (18 kHz ultragarsu 2 min., 60 °C, 4.8 kW) (2.1 lentelė). Eksperimentui atlikti, RI išdžiovintos 35 °C temperatūroje iki 14 % drėgnio ir sumaltos laboratoriniu malūnu. Mėginiai laikyti 4 °C temperatūroje šaldytuve.

2.1 lentelė. Pagrindiniai ryžių išspaudų (RI) cheminės sudėties komponentai

Medžiaga	Drėgnis, g/ 100 g	Baltymai, g/ 100 g	Skaidulinės medžiagos, g/ 100 g	Riebalai, g/ 100 g
RI	14,00 ± 1,41	21,93 ± 0,26	45,34 ± 1,64	9,93 ± 0,93

Pramoninis baltymų koncentratas (RBK), įsigytas iš įmonės MyProtein (Northwich, JK) (2.2 lentelė), naudotas baltymų gelių gamybos eksperimente.

2.2 lentelė. Pagrindiniai ryžių baltymų koncentrato (RBK) cheminės sudėties komponentai

Medžiaga	Drėgnis, g/ 100 g	Baltymai, g/ 100 g	Skaidulinės medžiagos, g/ 100 g	Riebalai, g/ 100 g
RBI	2,47 ± 0,23	78,00 ± 0,39	8,00 ± 0,34	2,10 ± 0,26

**Fermentai.** Ryžių išspaudų fermentinei hidrolizei naudoti pramoniniai fermentų preparatai: AlphaStar PLUS ( $\alpha$ -amilazė) ir CeluStar XL (celiulazė/ ksilanazė) (Dyadic International Inc., JAV) bei SQzyme PS-NL (neutrali proteazė) (Suntaq International Limited, Kinija) (2.3 lentelė). Baltymų modifikavimui parinkti du skirtingo veikimo fermentai: transgliutaminazė (Franken Biochem Co, Kinija) ir neutrali proteazė (SQzyme PS-NL). Eksperimentui ruošti darbiniai fermentų tirpalai, praskiedus fermentų preparatus distiliuotu vandeniu santykiu 1:100.

2.3 lentelė. Fermentų preparatai ir jų charakteristikos

Preparatas	Aktyvumas, V/ml	Aktyvūs fermentai	Mikroorganizmai	Optimalus pH	Optimali temperatūra, °C
AlphaStar PLUS	12000	$\alpha$ -amilazė	<i>Bacillus subtilis</i>	6.0 – 7.0	65 – 75
CeluStar XL	> 45000 > 34000	Celiulazė/ Ksilanazė	<i>Trichoderma reesei</i>	3.5 – 7.5	35 – 60
SQzyme PS – NL	10000	Proteinazė	<i>Bacillus subtilis</i>	6.0 – 7.5	30 – 65
Transgliutaminazė	100 – 120	Transgliutaminazė	<i>Streptovercillium spp.</i>	6.0 – 8.0	40 – 50

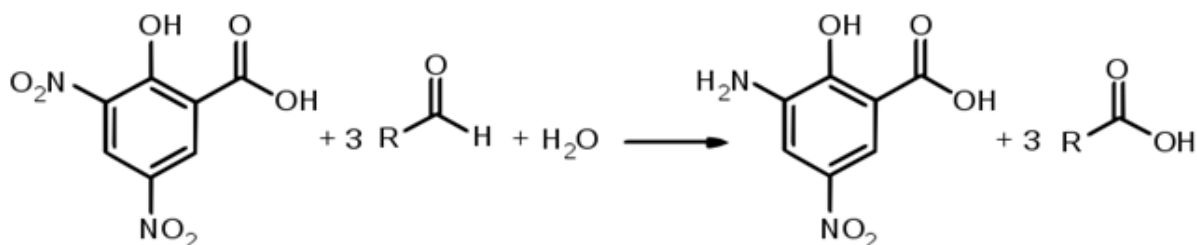
## 2.2. Tyrimo metodai

### 2.2.1. Cheminės analizės metodai

Ryžių išspaudų cheminė sudėtis nustatyta AOAC [41] standartiniais metodais. Baltymų kiekis nustatytas Kjeldalio metodu pagal azoto kiekį (AOAC metodas 920.152). Baltymų kiekis apskaičiuotas, azoto kiekį dauginant iš koeficiento 5,95 (ryžiams). Riebalų ekstrakcijai (heksanas, 3 val.) naudotas Soksleto metodas (AOAC metodas 996.01). Drėgnis nustatytas gravimetriniu metodu, džiovinant mėginį ( $5 \pm 0,001$  g)  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje iki pastovios masės (AOAC metodas 1999).

### 2.2.2. Redukuojančiųjų sacharidų nustatymas

Metodo esmė: redukuojantys sacharidai su 3,5-dinitrosalicilo rūgštimi stipriai šarminėje aplinkoje sudaro spalvotus junginius (žr. 2.1 pav.). Pagal susidariusios spalvos intensyvumą kiekybiškai nustatomas redukuojančių sacharidų kiekis.



2.1 pav. 3, 5-dinitrosalicilo rūgšties redukcija, susidarant 3-amino-5-nitrosalicilo rūgščiai

DNS reagentas ruoštas iš 1 g 3,5-dinitrosalicilo rūgšties ir 20 g natrio-kalio tartrato, ištirpinto 100 ml 0,4 M NaOH. Tyrimui atlikti 0,5 ml ryžių išspaudų vandeninio ekstrakto (5 g medžiagos užpilta 20 ml dist. vandens ir maišyta 30 min. magnetine maišykle) sumaišyta su 0,5 ml DNS reagento ir 1 ml dist. vandens. Tirpalai kaitinti 5 min.  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  laipsnių temperatūros vandens vonioje. Po kaitinimo mėginiai atvėsinti ir praskiesti iki 10 ml distiliuotu vandeniu. Matuotas tirpalų optinis tankis spektrofotometru, esant bangos ilgiui 540 nm [42].

**Gliukozės kalibracinės tiesės sudarymas.** Redukuojančių sacharidų kiekiui nustatyti, sudaryta gliukozės kalibracinė tiesė. Tam ruoštas darbinis 10 mg/ml koncentracijos gliukozės tirpalas. Ruošti skirtingos koncentracijos gliukozės tirpalai (0 – 2 mg/ml), į juos įpilta po 0,5 ml DNS reagento ir 1 ml dist. vandens, mėginiai kaitinti 5 min  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Po kaitinimo mėginiai atvėsinti ir praskiesti iki 10 ml tūrio distiliuotu vandeniu. Matuotas tirpalų optinis tankis spektrofotometru, esant bangos ilgiui 540 nm.

Redukuojančių sacharidų kiekis išreikštas gliukozės kiekiu, kurios koncentracija (mg/ml) tirpale apskaičiuota iš kalibracinės tiesės lygties ( $y = 0,2104x + 0,0043$ ,  $R^2 = 0,9905$ ).

### 2.2.3. Baltymų ekstrakcija iš ryžių išspaudų

Ryžių išspaudų mėginys (5 g) sumaišytas su distiliuotu vandeniu skirtingu santykiu (1:2; 1:4 ir 1:6) ir maišytas magnetine maišykle, esant skirtingai temperatūrai ( $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  ir  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), po to centrifuguota (8000 aps/min; 10 min). Parinkus optimalią ekstrakcijos temperatūrą ir sausų medžiagų ir vandens

santykį, vertinta pH įtaka baltymų ekstraktyvumui, keičiant terpės pH (3; 4; 6; 7; 8; 9; 10). Visais atvejais gautuose ekstraktuose nustatyta tirpių baltymų koncentracija (mg/ml) *Bradfordo* metodu.

#### 2.2.4. Baltymų kiekio nustatymas *Bradfordo* metodu

*Bradfordo* metodas pagrįstas baltymų sąveika su specifiniu reagentu – Coomasee brilantinio mėlio dažikliu, su kuriuo baltymai sudaro mėlynos spalvos junginį (spalvos intensyvumas tiesiogiai priklauso nuo baltymų koncentracijos) [43]. *Bradfordo* reagentas ruoštas iš 100 mg Coomasee brilantinio mėlio G-250, 50 ml 95 % etanolio ir 100 ml 85 % fosforo rūgšties, praskiedžiant tirpalą iki 1000 ml dist. vandeniui. Tyrimui atlikti, 100 µl ryžių išspaudų baltymų ekstrakto sumaišyta su 3 ml *Bradfordo* reagentu. Tirpalai inkubuoti 30 min kambario temperatūroje, po to matuotas tirpalų optinis tankis spektrofotometru, esant bangos ilgiui 595 nm. Bendras baltymų kiekis apskaičiuotas iš tiesinės priklausomybės tarp jaučio serumo albumino koncentracijos (mg/ml) tirpale ir absorbcijos lygties.

**Kalibracinės tiesės sudarymas.** Kalibracinei tiesei sudaryti naudotas 2 mg/ml koncentracijos jaučio serumo albumino tirpalas, kurio skirtingi kiekiai sumaišyti su 3 ml *Bradfordo* reagentu, etaloniniai tirpalai inkubuoti 30 min kambario temperatūroje, po to išmatuota tirpalų šviesos sugertis, esant 595 nm bangos ilgiui. Nubraižyta tiesinė absorbcijos priklausomybė nuo jaučio serumo albumino koncentracijos (mg/ml) tirpale ( $y = 0,6469x + 0,0897$ ,  $R^2 = 0,9562$ ).

#### 2.2.5. Fermentinė hidrolizė

Fermentinei hidrolizei RI mėginys (5 g) sumaišytas su distiliuotu vandeniu santykiu 1:4. Mėginių pH sureguliuotas naudojant 0,1 M NaOH ir HCl tirpalus. Žaliava hidrolizuota, naudojant atskirus fermentus: amilazę (144 AV/ 100 g, 55 °C, 90 min., pH 6,5), celiulazę (300 AV / 100 g, 55 °C, 90 min., pH 7) ir proteazę (150 AV/ 100 g, 55 °C, 90 min., pH 7) bei fermentų kompoziciją, sudarytą iš amilazės, celiulazės ir proteazės (aktyvumų santykis 1:2:1), hidrolizę vykdant 120 min., 55 °C vandens vonioje su purtykle. Hidrolizuoti mėginiai centrifuguoti (8000 aps/min., 10 min.), gautame centrifugate nustatytas tirpių baltymų kiekis *Bradfordo* metodu.

#### 2.2.6. Ryžių baltymų ekstrakcija

Ryžių baltymų taikyta ekstrakcija, esant skirtingam terpės pH, ir nusodinimas rūgštimi jų izoelektriniame taške [32]. Mėginiams paruošti, 5 g ryžių išspaudų sumaišyta su 20 ml dist. vandeniui, terpės pH (6,5; 7 ir 10) sureguliuotas atitinkamai 0,1M HCl ar 0,1M NaOH. Baltymų nusodinimui, mėginiai maišyti magnetine maišykle 30 min. 60 °C temperatūroje, pilant 0,1 M HCl tirpalą iki tirpalo pH 4,3. Iškritusios baltymų dalelės nusodintos centrifuguojant (8000 aps/min; 10 min). Supernatantas atskirtas, o nuosėdos liofilizuotos (MAXI dray lyo, Danija) 12 valandų -110 °C temperatūroje. Gauti baltymų milteliai laikyti 4 °C šaldytuve sandarioje pakuotėje.

#### 2.2.7. Ryžių baltymų izoliatų funkcinių savybių nustatymas

**Vandens ir aliejaus absorbcijos geba.** Baltymų funkcinės savybės vertintos pagal Kumar'o ir kt. metodiką [44]. Tyrimui atlikti 0,15 g liofilizuotų baltymų miltelių sumaišyta su 1,5 ml distiliuoto vandens ar rapsų aliejaus. Mėginiai išmaišyti stikline lazdele ir laikyti 20 min. kambario

temperatūroje, po to centrifuguoti (3000 aps./min., 20 min.). Supernatantas pašalintas, o nuosėdos pasvertos. Vandens (VAG) ir aliejaus (AAG) absorbcinė geba apskaičiuota pagal formulę:

$$\text{VAG/AAG (\%)} = \frac{A_2 - A_1}{A_2 - A_0} \times 100, \quad (1)$$

čia -  $A_0$  – mėgintuvėlio masė, g;  $A_1$  – pradinio mėginio su mėgintuvėliu masė, g;  $A_2$  – mėginio po centrifugavimo masė (su mėgintuvėliu), g.

**Putų sudarymo pajėgumas.** Baltymų putų sudarymo pajėgumas vertintas pagal *Jarpa-Parra* ir kt. metodiką [45]. Liofilizuotų RI baltymų mėginys (0,5 g) sumaišytas su 12,5 ml distiliuoto vandens, po to mėginiai homogenizuoti (IKA T50 digital Ultra-Turrax, Vokietija) (9500 aps/min; 3 min.). Putų sudarymo pajėgumas išreikštas susidariusių putų tūriu, kuris apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{Putų tūris (\%)} = \frac{V_2 - V_1}{V_1} \times 100, \quad (2)$$

čia -  $V_1$  – mėginio tūris prieš homogenizavimą, ml;  $V_2$  – mėginio tūris po homogenizavimo, ml.

Putų stabilumas nustatytas, išlaikius bandinį 30 min. kambario temperatūroje (25 °C). Putų stabilumas apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{Putų stabilumas (\%)} = \frac{S_2 - S_1}{S_1} \times 100, \quad (3)$$

čia -  $S_1$  – mėginio tūris prieš homogenizavimą, ml;  $S_2$  – mėginio tūris po išlaikymo, ml.

### 2.2.8. Baltymų elektroforezė

Baltymų izoelektrinio taško ir molekulinės masės nustatymui taikyta elektroforezė poliakrilamido gelyje, naudojant natrio dodecilsulfatą. Analizei naudota vertikaliosios elektroforezės sistema OMNI PAGE (Cleaver Scientific Ltd., JK). Elektroforezei ruošti tirpalai ir jų receptūros pateikti 2.4 lentelėje.

**2.4 lentelė.** Tirpalai ir jų ruošimas

Eil. Nr.	Tirpalas	Ruošimo procedūra
1	2	3
1.	30 % akrilamidas/ 0,8 % N, N'-metilenbisakrilamidas	Ištirpinama 30 g akrilamido ir 0,8 g N, N'-metilenbisakrilamido ir skeidžiama vandeniu iki 100 ml.
2.	4 × TRIS-HCL/NDS buferis, pH 6,8	6,05 g TRIS ištirpinama 40 ml vandens. Įgautą tirpalą įpilama 1N HCl, kol tirpalo pH pasiekia 6,8 ir pripilama vandens iki 100 ml.
3.	4 × TRIS-HCL/NDS buferis, pH 8,8	91 g TRIS ištirpinama 300 ml vandens. Įgautą tirpalą pilama 1 N HCl, kol tirpalo pH pasiekia 8,8 ir pripilama vandens iki 500 ml.
4.	Baltymų denatūravimo buferis	25 ml 4 × TRIS HCL/ NDS buferis pH 6,8, 20 ml glicerolio, 4 g NDS, 2 ml 2 – merkaptoetanolio, 1 mg bromfenolio mėlynojo ir pripilama vandens iki 100 ml.

**2.4 lentelės tęsinys. Tirpalai ir jų ruošimas**

<b>Eil. Nr.</b>	<b>Tirpalas</b>	<b>Ruošimo procedūra</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
5.	10 % amonio peroksisulfatas	0,1 g medžiagos ištirpinamas 1 ml vandens.
6.	TEMED	-
7.	Elektroforezės buferis	3,02 g TRIS, 14,4 g glicino, 1 g NDS ištirpinama 1000 ml vandens.
8.	Baltymų tvirtinimo tirpalas	25 ml izopropilo alkoholio, 10 ml acto rūgšties ir 65 ml vandens.
9.	Dažo Coomassie mėlio tirpalas	10 ml acto rūgšties, 0,006 g Coomassie mėlio G-250, ištirpinama 90 % vandens.
10.	10 % acto rūgštis	10 ml acto rūgšties skiedžiama iki 100 ml.

**Skiriamąjo ir koncentruojamojo poliakrilamido gelių paruošimas.** Skiriamąjo ir koncentruojamojo gelių receptūros pateiktos 2.5 lentelėje. Skiriamajame gelyje galutinė akrilamido koncentracija – 12 %.

**2.5 lentelė. Skiriamąjo ir koncentruojamojo gelio ruošimas**

<b>Pradiniai tirpalai</b>	<b>Skiriamasis gelis</b>	<b>Koncentruojamasis gelis</b>
	<b>Kiekis, ml</b>	<b>Kiekis, ml</b>
30 % akrilamidas/ 0,8 % N, N'-metilenbisakrilamidas	4	1,7
4 × TRIS-HCL/ NDS buferis, pH 8,8	2,5	-
4 × TRIS-HCL/ NDS buferis, pH 6,8	-	2,5
H <sub>2</sub> O	3,4	5,7
10 % amonio peroksisulfatas	0,1	0,15
TEMED	0,004	0,01

Baltymų molekulinės masės identifikavimui naudotas 10 – 203 kDa molekulinės masės baltymų standartas (mPAGE MES SDS, Merck, Vokietija).

Analizei atlikti tiriamasis baltymų tirpalas (1 mg/ml) sumaišytas su baltymų denatūruojančiu buferiu santykiu 1:1 (2.4 lentelė, Nr. 4), mėginys 5 min. kaitintas verdančio vandens vonelėje. Po to atvėsintas ir centrifuguotas mini centrifugoje. Analizei naudota 10 µl baltymų standarto tirpalo, ir po 20 µl kiekvieno analizuojamo baltymų tirpalo. Elektroforezės sąlygos: 220 V, 40 A, trukmė 40 min. Atlikus elektroforezę, geliai laikyti 30 min. baltymų tvirtinimo tirpale (2.4 lentelė, Nr. 8), po to dažyti Coomassie mėlio tirpalu (2.4 lentelė, Nr. 9), išlaikant 12 val. Po dažymo, geliai plauti 10 % acto rūgšties (2.4 lentelė, Nr. 10) tirpalu, dist. vandeniu ir nufotografuoti.

### 2.2.9. Baltymų suspensijų ruošimas ir struktūrizavimas ultragarsu

Optimizuojant fermentinės hidrolizės sąlygas ryžių baltymų gelių susidarymui, ruoštos skirtingos koncentracijos (12, 14, 16, 18 ir 20 %) ryžių baltymų koncentrato (RBK) suspensijos distiliuotame vandenyje, tirpalo pH sureguliuojant 0,1 M NaOH tirpalu. Baltymų modifikavimui naudoti du skirtingo veikimo fermentai, skirtingais kiekiais: transgliutaminazė (2,4; 4,8; 7,2 ir 9,6 AV/ 100 g), esant terpės pH 8, ir proteazė (200, 400, 600 ir 800 AV/ 100 g), esant terpės pH 7. Mėginiai hidrolizuoti 90 min. 50 °C temperatūros vandens vonioje su purtykle, po to apdoroti ultragarsu gelio susidarymui.

**Apdorojimas ultragarsu.** Eksperimentui atlikti 50 g mėginio plastikiniame maišelyje apdorota ultragarsu (UG): 37 kHz, galia 70 W, intensyvumas 120 %, išlaikant 30 min, 60 °C temperatūroje ultragarso vonelėje (Proclen 3.0 DSP, Vokietija). Po apdorojimo, mėginiai patalpinti į plastikinius indelius, atvėsunami ir išlaikomi 24 val., 4 °C temperatūroje gelio susidarymui. Po išlaikymo, vizualiai vertintas gelio susiformavimas, mėginių konsistencija akustiniu klampos matuokliu, tekstūra tekstūros analizatoriumi ir optiniu mikroskopu. Dalis mėginių liofilizuoti ir analizuoti skenuojančiu mikroskopu.

### 2.2.10. Ryžių baltymų gelių tekstūros įvertinimas

Baltymų gelių tekstūros parametrai vertinti akustiniu prietaisu (MATMUO, Lietuva) ir tekstūros analizatoriumi TA.XT plus (Stable Micro Systems, Godalmingas, JK).

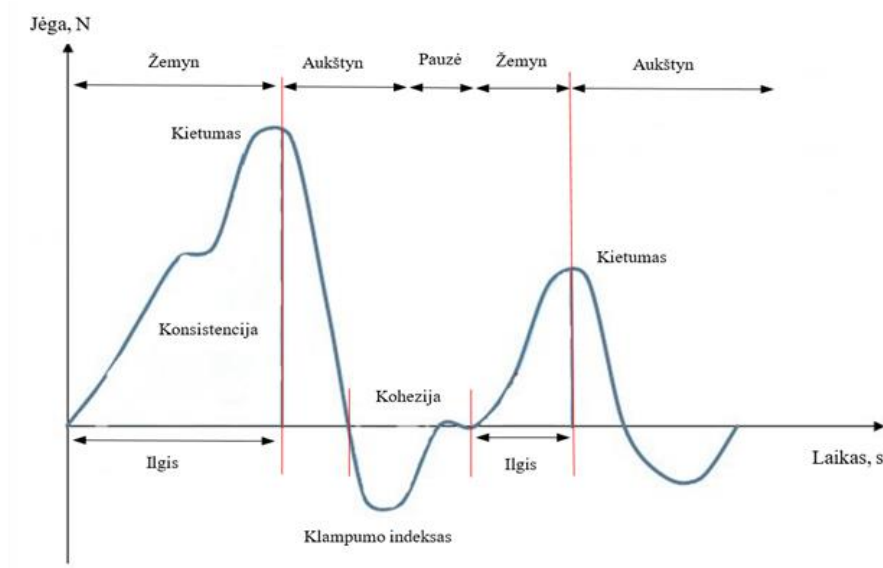
**Akustinis prietaisas** matuoja bekontakčiu būdu garso sklidimo atstumą, remiantis akustinio aidolokacinio signalo sklidimo trukme nuo ultragarso siuntiklio – ėmiklio iki mėginio poveikio modulio viršutinės plokštumos iki atgal. Išvedus signalo sklidimo greičio reikšmių vidurkį, gaunamas vidutinis atstumas – parametras  $h$  (mm), kurį nukrenta kūnas analizuojamoje gelio masėje per laiko vienetą. Analizei atlikti gelis (mėginio masė 50 g) plastikiniame indelyje (skersmuo 50 mm, sluoksnio storis 10 mm) analizuotas, naudojant metalinį plunžerį (svoris 30,255 g, plokštelės skersmuo 10 mm, storis 1 mm). Matavimo trukmė – 300 sekundžių. Skirtumams tarp mėginių įvertinti, analizuotos parametro  $h$  vertės po 150 s matavimo.

Kritimo greičio pokytis geliuose įvertintas po 200 sekundžių ir apskaičiuotas pagal formulę:

$$\Delta v = \frac{\Delta h}{\Delta t}, \quad (4)$$

čia -  $\Delta v$  – kritimo greičio pokytis, mm/s;  $\Delta h$  – kritimo atstumo pokytis, mm;  $\Delta t$  – kritimo laiko pokytis, s.

**Tekstūros analizatoriumi** vertintas gelių kietumas (N), konsistencija (N·s), kohezija (N) ir klampumo indeksas (N·s). Tekstūros vertinimui naudotas 20 mm skermens cilindrinis plunžeris (penetracijos greitis 1 mm/s, penetracijos gylis 5 mm). Parametrai nustatyti iš jėgos – laiko kreivės. Darbinio kūno judėjimas pateiktas (žr. 2.2 pav.). Kietumas nustatytas kaip didžiausios suspaudimo jėgos smailė. Klampumo indeksas įvertintas kaip neigiamos jėgos smailės plotas. Kohezija nustatyta kaip didžiausia neigiama jėga, atitinkanti darbą, reikalingą darbiniam kūnui ištraukti iš gelio.



2.2 pav. Gelių tekstūros kreivė

### 2.2.11. Ryžių baltymų gelių mikroskopinė analizė

RBI gelių mėginių struktūra analizuota elektroniniu mikroskopu (Nikon Eclipse, JAV). Tiriamoji medžiaga užtepta ant objektyvinio stiklelio plonu sluoksniu ir uždengiama dengiamuoju stikleliu. Analizuoti trys lygiagretūs mėginiai, didinimas 10x.

### 2.2.12. Ryžių baltymų gelių skenuojamoji elektroninė mikroskopija (SEM)

Liofilizuoti gelių mėginiai analizuoti skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (FEI Quanta 200 FEG, JAV), didinimas 500x. SEM turi elektronų šaltinį, iš kurio elektronai yra paleidžiami į mėginio paviršių. Elektronų pluoštas į bandinį krenta sufokusuotas iki kelių nanometrų dydžio skersmens, o jų padėtį ant bandinio valdo nukreipimo ritė. Surinkta informacija skaitmenizuojama ir rodoma ekrane [51].

### 2.2.13. Duomenų matematinė statistinė analizė

Tirtųjų rodiklių vidutinės vertės ir standartinio nuokrypio vertės apskaičiuotos, naudojant *MS Excel* programinį paketą. Ryšio tarp matuojamų rodiklių stiprumui nustatyti naudota dvinarė koreliacinė analizė ir grafinė duomenų išraiška. Skirtumų tarp matuojamų parametrų vidurkių reikšmingumui įvertinti, analizuojant fermentinės hidrolizės įtaką baltymų išgavimui ir jų funkcines savybes, taikyta vieno faktoriaus dispersinė analizė (ANOVA), naudojant statistinės programos SPSS Statistics (25 ver., IBM Corp., JAV) paketą. Faktoriaus reikšmingumo lygmuo nustatytas, esant patikimumui 95 %.

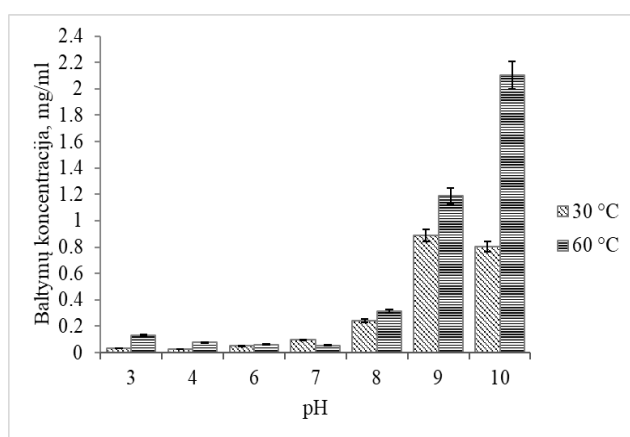
### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Ekstrakcijos sąlygų parinkimas efektyviai baltymų išėigai

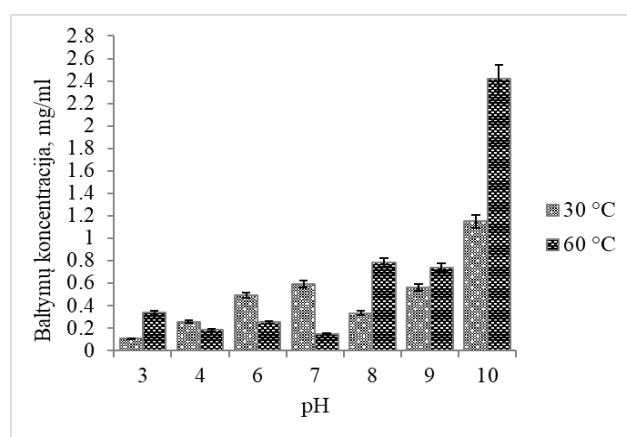
Pirmajame etape buvo parinktos optimalios sąlygos baltymų ekstrakcijai, keičiant terpės pH, temperatūrą ir sausųjų medžiagų/ vandens santykį, ekstrakcijos trukmė laikyta pastovi – 30 min.

Tyrimo rezultatai parodė, kad atliekant baltymų ekstrakciją 30 °C temperatūroje ir didinant terpės pH nuo 3 iki 10, kai medžiagos ir vandens santykis 1:2, tirpių baltymų koncentracija ekstrakto didėjo nuo 0,032 mg/ml iki 0,804 mg/ml (žr. 3.1 A pav.).

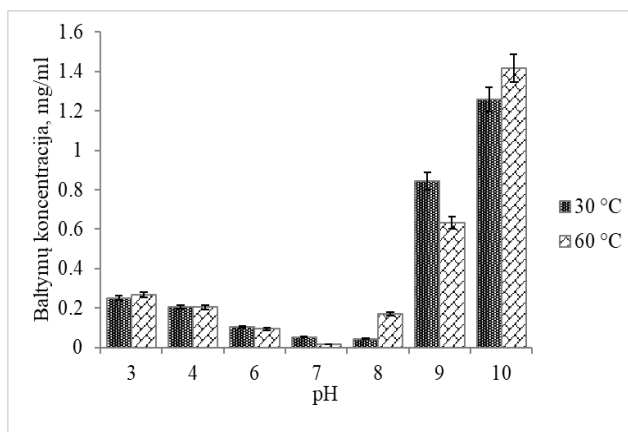
Atliekant baltymų ekstrakciją 60 °C temperatūroje, keičiant terpės pH nuo 3 iki 10, baltymų išgauta nuo 0,130 mg/ml iki 2,104 mg/ml (žr. 3.1 A pav.). Didžiausias baltymų kiekis gautas, esant pH 10 ir 60 °C temperatūrai (2,104 mg/ml).



A



B



C

**3.1 pav.** Baltymų ekstrakcijos efektyvumo priklausomybė nuo terpės pH, esant  $sm/v$  santykiui 1:2 (A), 1:4 (B) ir 1:6 (C).

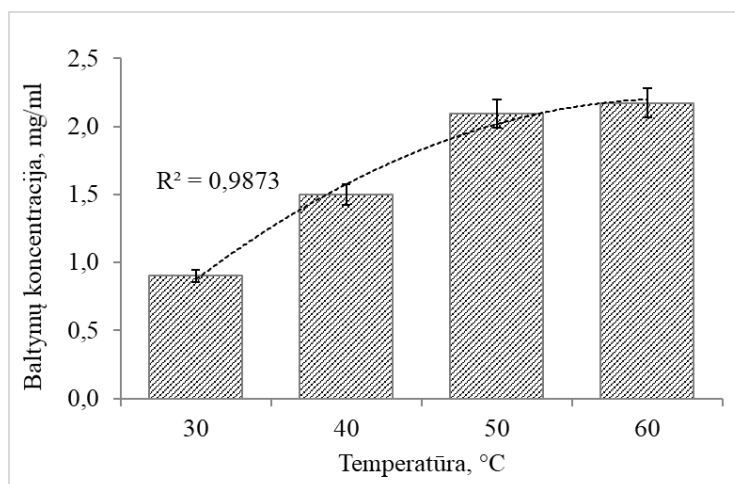
Ta pati tendencija pastebėta, didinant medžiagos ir vandens santykį (žr. 3.1 B, C pav.). Vertinant sausųjų medžiagų ir vandens ( $sm/v$ ) santykio įtaką baltymų ekstraktyvumui, nustatyta, kad didinant  $sm/v$  nuo 1:2 iki 1:4 ir vykdant ekstrakciją 60 °C temperatūroje, baltymų koncentraciją galima padidinti, atitinkamai nuo 7,2 iki 25,1 karto (žr. 3.1 A, B pav.). Tačiau padidinus vandens kiekį ( $sm/v$  santykis 1:6), gautas žymus ( $p > 0,05$ ) baltymų kiekio sumažėjimas (30 %) (žr. 3.1 C pav.).

Apibendrinant, baltymų ekstrakcijos padidėjimui reikšmingos įtakos turėjo terpės pH ir ekstrakcijos temperatūra ir  $sm/v$  santykis. Didžiausias baltymų kiekis (2,422 mg/ml) gali būti išgautas, atliekant baltymų ekstrakciją 60 °C temperatūroje, esant pH 10 ir  $sm/v = 1:4$  (3.1 A, B pav.).

Regresinė analizė parodė (1 priedas), kad terpės pH ir turi reikšmingos įtakos ( $R^2 = 0,724 - 0,975$ ,  $p < 0,05$ ) baltymų koncentracijos padidėjimui ekstraktoje. Didinant terpės pH nuo 3 iki 10, baltymų koncentracija ekstraktoje didėja eksponentine (30 °C) arba polinomine (60 °C) priklausomybe, kai  $sm/v$  santykis 1:2 ir 1:6 (atitinkamai  $R^2 = 0,9259$  ir  $0,7241$ ; ir  $R^2 = 0,9751$  ir  $0,8873$ ), tai parodo, kad baltymų ekstrakcija 30 °C temperatūroje didėja tolygiai, didinant pH, o 60 °C temperatūroje baltymų kiekis ekstraktoje didesnis, esant mažoms arba aukštomis pH vertėms.

Didesnė pH įtaka baltymų ekstraktyvumui temperatūrose, nustatyta, esant  $sm/v$  santykiui 1:2 ir 1:6 (atitinkamai  $R^2 = 0,9259 - 0,9751$  ir  $R^2 = 0,9058 - 0,9506$ ), o esant  $sm/v = 1:4$ , nustatyta mažesnė pH (atitinkamai  $R^2 = 0,7242 - 0,8873$ ), patvirtinant didesnę temperatūros įtaką.

Siekiant optimizuoti baltymų ekstrakciją, papildomai vertinta temperatūros įtaka, keičiant ją nuo 30 °C iki 60 °C, esant terpės pH 10 ir optimaliam  $sm/v$  santykiui (1:4) (žr. 3.2 pav.). Tyrimas parodė, kad didinant ekstrakcijos temperatūrą nuo 30 iki 60 °C, baltymų išeiga padidėjo 2,4 karto (nuo 0,901 iki 2,173 mg/ml) (3.2 pav.).



**3.2 pav.** Baltymų koncentracijos priklausomybė nuo temperatūros ( $SM/V$  santykis 1:4, pH 10).

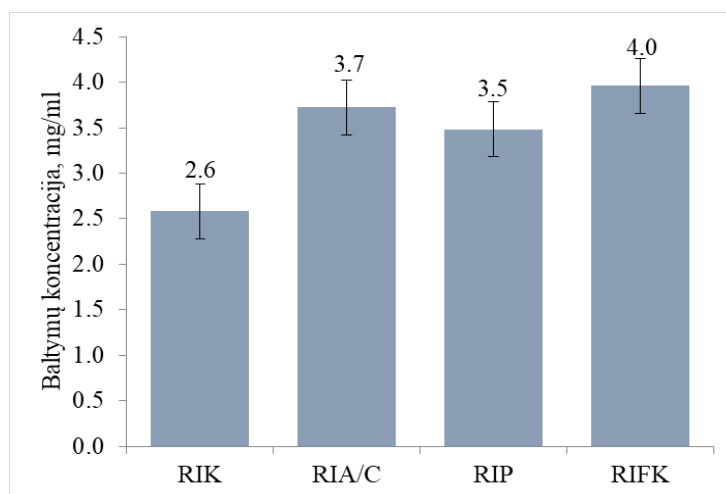
Regresinė analizė parodė, kad ekstrakcijos temperatūra turi reikšmingos įtakos ( $R^2 = 0,9231$ ,  $p < 0,05$ ) baltymų koncentracijos padidėjimui ekstraktoje. Didinant temperatūrą, baltymų koncentracija ekstraktoje didėja polinomine priklausomybe, kurią galima aprašyti regresijos lygtimi:  $y = -0,1301x^2 + 1,0317x - 0,087$  ir kuri parodo, kad baltymų ekstrakcija yra efektyvesnė temperatūrose nuo 40 °C iki 50 °C, tačiau efektyvumas sumažėja, esant 50 – 60 °C temperatūriniam režimui (3.2 pav.). Pagal literatūrą [1, 14], esant ekstrakcijos temperatūrai 50 – 65 °C, galima išgauti 35 – 57 % baltymų iš augalinės žaliavos.

Šiame etape gauti rezultatai yra svarbūs, nustatant optimalias baltymų išgavimo iš ryžių perdirbimo atliekų sąlygas: terpės pH, temperatūrą ir  $sm/v$  santykį. Tolimesniame eksperimente baltymų ekstrakcijai naudotos sąlygos: trukmė 30 min., terpės pH 10 ir  $sm/v$  santykis 1:4, ekstrakcijos temperatūra 60 °C.

### 3.2. Fermentų kompozicijos sudarymas baltymų išgavimui iš ryžių žaliavos

Šio tyrimo tikslas buvo parinkti fermentus ir sudaryti fermentų kompoziciją efektyviai baltymų ekstrahcijai, vertinant tirpių baltymų pokyčius ekstrakto (žr. 3.3 pav.).

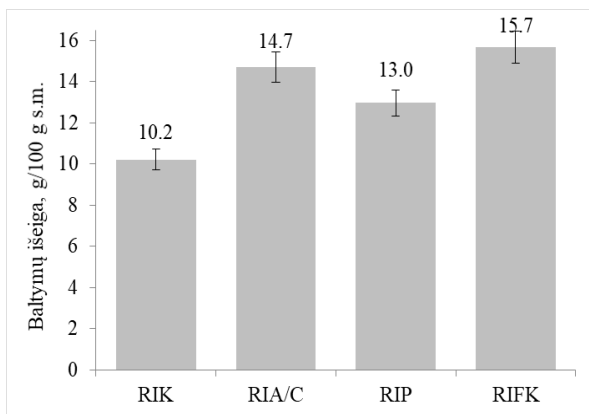
Tyrimo rezultatai parodė, kad skirtingų fermentų ar jų kombinacijų panaudojimas turi reikšmingos įtakos baltymų koncentracijai ekstrakto ( $p < 0,05$ ) ir baltymų išėigai ( $p < 0,05$ ). Ryžių išspaudas apdorojus proteaze, gauta 25 % daugiau baltymų, lyginant su kontroliniu mėginiu (2,6 mg/ml) (3.3 pav.). Apdorojus RI amilaze ir celiulaze, ekstrakto nustatytas 30 % didesnis baltymų kiekis, lyginant su neapdorotu mėginiu, ir 6 % didesnis, lyginant su mėginiu apdorotu proteaze. Didžiausias baltymų kiekis nustatytas, RI apdorojus fermentų kompozicija (amilazė/ celiulazė/ proteazė). Šiuo atveju gauta 6 % daugiau baltymų, nei naudojant tik amilazę ir celiulazę, ir 35 % daugiau baltymų, lyginant su nehidrolizuotu mėginiu (RI<sub>K</sub>).



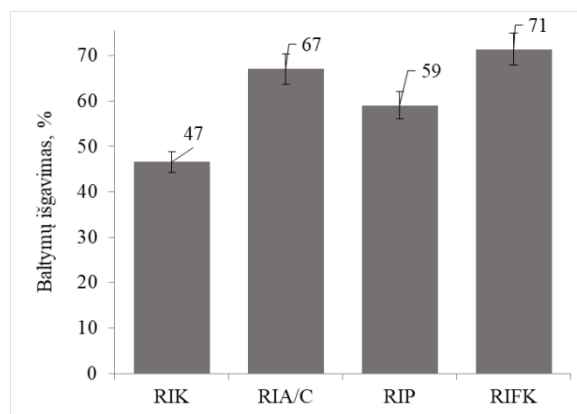
**3.3 pav.** Fermentinės hidrolizės (90 min., 55 °C), naudojant atskirus fermentus ir fermentų kompoziciją, įtaka baltymų kiekiui ekstrakto. RI<sub>K</sub> – neapdorotos RI (kontrolė); RI<sub>A/C</sub> – RI apdorotas amilaze / celiulaze; RI<sub>P</sub> – RI apdorotos proteaze; RI<sub>FK</sub> – apdorotos fermentų kompozicija.

Vertinant baltymų išėigą iš RI galimybes (žr. 3.4 A pav.), apskaičiuota, kad didžiausia išėiga gauta RI apdorojus, naudojant fermentų kompoziciją (15,7 %), mažesnė baltymų išėiga nustatyta, RI hidrolizuojant tik proteaze (13,0 %) ar amilaze/ celiulaze (14,7 %). Mažiausia baltymų išėiga (10,2 %) kontroliniame mėginyje.

Vertinant baltymų ekstrahcijos efektyvumą (žr. 3.4 B pav.), nustatyta, kad daugiausia baltymų iš RI išgauta, naudojant fermentų kompoziciją (71 %), mažesnis baltymų išėigimo efektyvumas nustatytas, RI hidrolizuojant amilaze/ celiulaze (67 %) ir proteaze (59 %). Mažiausias baltymų išėigimas (47 %) nustatytas kontroliniame mėginyje. Remiantis literatūra, didžiausias galimas baltymų išėigimas 65,9 % iš ryžių išspaudų buvo gautas, naudojant amilazę ir proteazę kartu, o baltymų išėigimas iš nehidrolizuoto mėginio sudarė 47 % [14].



**A**



**B**

**3.4 pav.** Fermentinės hidrolizės įtaka baltymų išeigai (A) ir išgavimo efektyvumui (B). RI<sub>K</sub> – neapdorotos RI (kontrolė); RI<sub>A/C</sub> – RI apdorotas amilaze/ celiulaze; RI<sub>P</sub> – RI apdorotos proteaze; RI<sub>FK</sub> – apdorotos fermentų kompozicija.

Pagal literatūroje pateiktus duomenis [23],  $\alpha$ -amilazė hidrolizuoja krakmolą, ir taip išlaisvinami baltymai, pagerinamas ekstrahavimo efektyvumas ir padidindamas baltymų tirpumas. Pagal Cynthia [14], apdorojant  $\alpha$ -amilazėmis ryžių sėlenas (pH 6,5; 95 °C, 45 min.) ir efektyviai pašalinus krakmolą ir kitas priemaišas, baltymų išeigą galima padidinti iki 13,4 %, o apdorojant ryžių išspaudas celiulaze (65 °C; pH 4), galima išgauti iki 35 % baltymų. Pagal Guan ir Yao [1], karbohidrazių, tokių kaip celiulazė, hemiceliulazė ir ksilanazė, kompozicija gali veiksmingai nutraukti jungtis polisacharidų matricoje ir taip išlaisvinti daugiau tarpląstelių baltymų. Naudojant fermentų kompoziciją 50 – 65 °C temperatūroje ir esant pH 3,8, baltymų išgauta iki 57 %. Naudojant proteazes ryžių baltymų hidrolizei, galima padidinti baltymų tirpumą ir ekstrakcijos efektyvumą [14]. Pagal Sumantha ir Deepa [47], proteazės efektyviai veikia, esant terpės pH 7, temperatūrai 55 °C, hidrolizės trukmei 72 min.

Atlikto tyrimo atveju daugiausiai baltymų išgauta (71 %), RI apdorojus fermentų kompozicija, sudaryta iš amilazės, celiulazės ir proteazės. Mažesnis baltymų išgavimo efektyvumas nustatytas, RI hidrolizuojant amilaze/celiulaze (67 %) ar proteaze (59 %).

### 3.3. Neapdorotų ir hidrolizuotų ryžių išspaudų (RI) baltymų funkcinių savybių palyginamasis įvertinimas

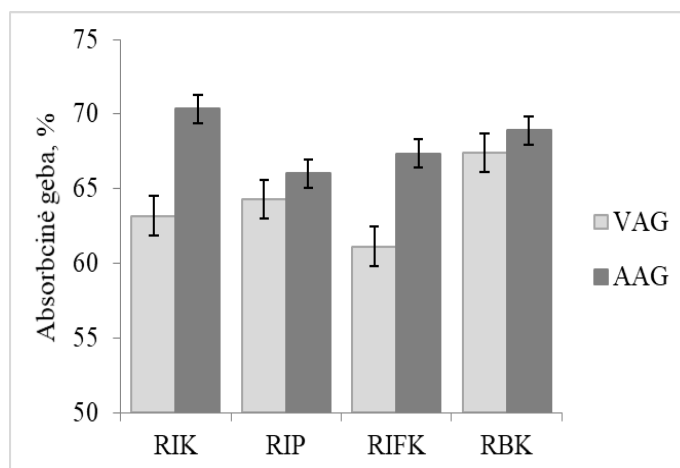
Šio etapo tikslas – įvertinti ryžių žaliavos apdorojimo sąlygų įtaką išekstrahuotų baltymų funkcinėms savybėms. Tyrimo rezultatai pateikti 3.5 ir 3.6 paveiksluose.

Rezultatai parodė, kad baltymų ekstrakcijos sąlygos turi reikšmingos įtakos baltymų tirpumui, emulsijų ir putų sudarymo gebai, vandens ir aliejaus absorbciniam pajėgumui.

#### 3.3.1. Vandens ir aliejaus absorbcinė geba

Tyrimo rezultatai rodo (žr. 3.5 pav.), kad baltymai, išekstrahuoti iš neapdorotų RI pasižymėjo didžiausia aliejaus absorbcine geba (AAG) (70,4 %), lyginant su baltymais, išgautais iš apdorotų proteaze (66 %) ir fermentų kompozicija (67,4 %) RI. Panašia AAG verte (68,9 %) pasižymėjo pramoninis ryžių baltymų koncentratas (RBK).

Taip pat, neapdorotų ir apdorotų proteaze RI baltymai mažiau absorbavo vandenį (VAG atitinkamai 63,2 % ir 64,3 %). Mažiausia vandens absorbcinė geba (61,1 %) nustatyta baltymų, išskirtų iš apdorotų fermentų kompozicija RI. Didžiausia vandens absorbcinė geba (67,4 %) pasižymėjo pramoninis ryžių baltymų koncentratas (RBK) (žr. 3.5 pav.)

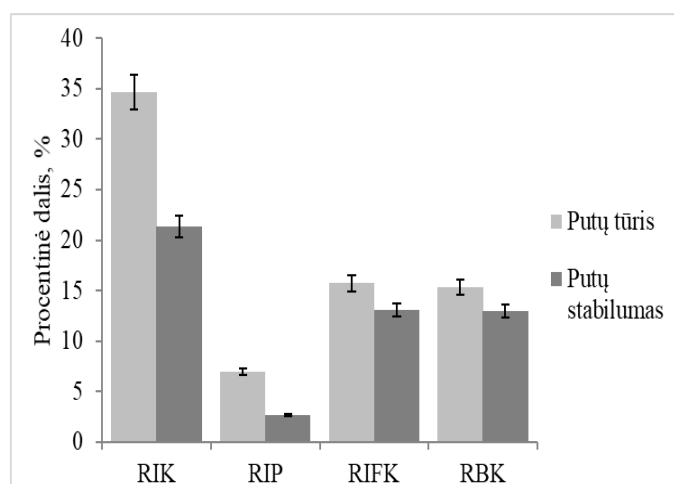


**3.5 pav.** Ryžių baltymų vandens (VAG) ir aliejaus (AAG) absorbcinė geba. Mėginiai: RI<sub>K</sub> – neapdorotos RI (kontrolė); RI<sub>P</sub> – RI apdorotos proteaze; RI<sub>FK</sub> – RI apdorotos fermentų kompozicija; RBK – pramoninis ryžių baltymų koncentratas.

Remiantis literatūros duomenimis, baltymų izoliatai, gauti iš baltųjų ryžių, pasižymi geresnėmis absorbcinėmis savybėmis, nei izoliatai iš rudųjų ryžių [16]. Pagal Coa ir Wen [48], rudųjų ryžių baltymų izoliatų vandens absorbcinė geba yra 1,96 ml/g, aliejaus absorbcinė geba – 2,93 ml/g. Autoriai nustatė, kad baltųjų ryžių baltymų izoliatų vandens absorbcijos geba yra 1,5 karto didesnė, o aliejaus absorbcinė geba yra 1,8 karto didesnė nei rudųjų ryžių baltymų.

### 3.3.2. Putų sudarymo pajėgumas

Skirtingai apdorotos žaliavos baltymų izoliatų ir koncentrato putų sudarymo pajėgumo ir stabilumo tyrimų rezultatai pateikti 3.6 paveiksle.

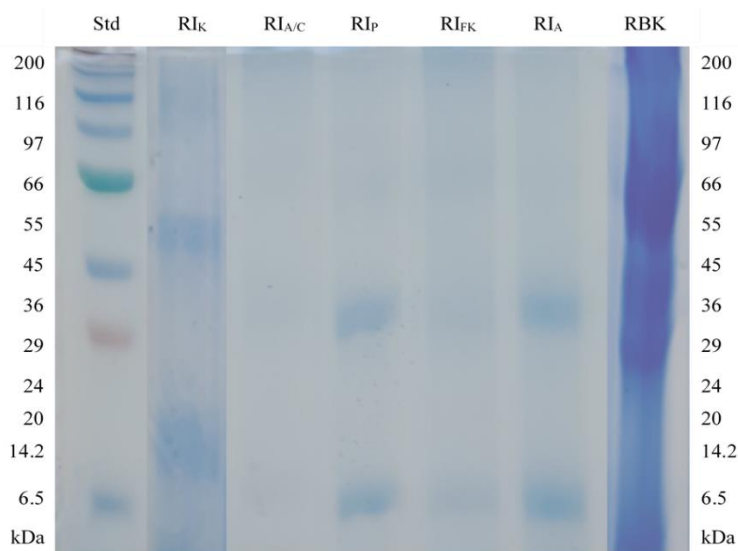


**3.6 pav.** Baltymų putų tūris ir putų stabilumas. Mėginiai: RI<sub>K</sub> – neapdorotos RI (kontrolė); RI<sub>P</sub> – RI apdorotos proteaze; RI<sub>FK</sub> – apdorotos fermentų kompozicija; RBK – ryžių baltymų koncentratas.

Rezultatai parodė, kad baltymai, išskirti iš neapdorotų RI, pasižymėjo didžiausiu putų tūriu (34,7 %) ir putų stabilumu (21,3 %). Baltymų iš hidrolizuotų fermentų kompozicija RI putų tūrio ir stabilumo vertės nustatytos nežymiai (2,5 %) mažesnės, lyginant su neapdorotų RI baltymais. Mažiausias putų tūris (6,9 %) ir putų stabilumas (2,7 %) gauti apdorotų proteaze RI baltymų. Rezultatai rodo, kad baltymai išgauti fermentinės hidrolizės būdu, pasižymėjo geru putų sudarymo pajėgumu.

Baltymų funkcinę savybių pokyčiai gali būti susiję su baltymų molekulių dydžiu ir tirpumo savybėmis, todėl baltymo struktūros pakitimai, įvykę fermentinės hidrolizės metu, leido geriau sulaikyti aliejų ir vandenį. Pagal literatūrą [16], hidrolizės įtaka baltymų funkcinėms savybėms priklauso nuo žaliavos rūšies, fermento tipo, pH, temperatūros, reakcijos laiko ir fermento koncentracijos. Proteazės ne tik išlaisvina surištus baltymus, bet ir suskaido į mažesnės molekulinės masės peptidus, kurie pasižymi didesniu tirpumu ir mažesne vandens ar riebalų absorbcija [22]. Kolpakova ir kt. [16] teigia, kad baltųjų ryžių baltymų putų sudarymo pajėgumas yra 5 – 6 kartus didesnis nei rudųjų ryžių baltymų. Baltųjų ryžių baltymų koncentratų putojimo pajėgumas artimas kiaušinių albumino putų sudarymo gebai. Pagal autorius, putų tūriui ir stabilumui įtakos turi terpės pH, didinant terpės pH nuo rūgštinio (pH 3,0) iki šarminio (pH 9,0), ryžių baltymų putų tūris padidėja [16].

*Elektroforezė poliakrilamido gelyje* parodė skirtumus tarp išekstrahuotų iš neapdorotų ir apdorotų fermentais RI baltymų komponentų (žr. 3.7 pav.). Analizuojant baltymų elektroforetinį gelį, nustatyta, kad neapdorotų RI baltymus sudaro komponentai, kurių molekulinė masė 116 – 97 kDa, 55 kDa, ir 20 – 14,2 kDa.



**3.7 pav.** Ryžių išspaudų baltymų elektroforetinis frakcionavimas poliakrilamidiniame (12 %) gelyje.

Mėginiai: Std – baltymų standartas; RI<sub>k</sub> – neapdorotos RI (kontrolė); RI<sub>A/C</sub> – RI apdorotas amilaze/ celiulaze; RI<sub>p</sub> – RI apdorotas proteaze; RI<sub>FK</sub> – RI apdorotas fermentų kompozicija; RI<sub>A</sub> – RI apdorotas amilaze; RBK – ryžių baltymų koncentratas.

Baltymų iš apdorotų amilaze/ celiulaze RI elektroforetiniame gelyje nustatyti mažesni nei 36 kDa molekulinės masės komponentai, tačiau gautos linijos neryškios dėl galimai mažesnės baltymų koncentracijos mėginiuose. Ryžių išspaudų, apdorotų proteaze, amilaze ir fermentų kompozicija, baltymų elektroforetiniame gelyje nustatyti 30 – 36 kDa ir 10,5 – 14,2 kDa peptidai. Tai patvirtina, kad

fermentai hidrolizavo baltymus, padidindami mažos molekulinės masės peptidų kiekį. Didelės molekulinės masės baltymų (> 120 kDa), juostų intensyvumas nežymus, tai rodo, kad fermentai iš dalies hidrolizavo ryžių išspaudų baltymus.

Remiantis literatūros duomenimis, gliutelinai sunkiai hidrolizuojami, susidarant  $\alpha$ -polipeptidams, kurių molekulinė masė 34 – 39 kDa, ir  $\beta$ -polipeptidams, kurių molekulinė masė 21 – 23 kDa [14]. Ši baltymų frakcija pasižymi didžiausia molekuline mase, lyginant su kitomis ryžių sėlenų baltymų frakcijomis. Albuminai sudaryti iš 10 iki 20 kDa molekulinės masės polipeptidų [2]. Ryžių endosperme esantys globulinai skirstomi į keturias subfrakcijas, kurių molekulinė masės gali svyruoti nuo 16 iki 130 kDa [2]. Ryžių sėlenose prolaminų baltymų yra 3,24 – 11,6 %, jų molekulinė masė 23 kDa. Pagal Cao ir kt. (2009), ryžių prolaminai sudaryti iš subvienetų, kurių molekulinės masės yra 10, 13 ir 16 kDa [1].

Pagal Mundi [54] globulinų aliejaus ir vandens absorbcinė geba yra mažesnė nei albuminų, dėl baltymo rutuliškos struktūros, disulfidinių jungčių bei hidrofobinės sąveikos, kuri riboja sąveiką su aliejumi ir vandeniu. Albuminai pasižymi atviresne, lankstesne struktūra ir gali absorbuoti didesnę kiekį aliejaus ir vandens. Tačiau lyginat globulino ir albumino putų tūrį ir putų stabilumą, globulinai pasižymi didesniu putų stabilumu. Tai įtakos turi didesnis paviršiaus hidrofobiškumas, kuris palengvina baltymų sąveiką nei esanti sąveika tarp albumino polipeptidų [54]. Prolaminai pasižymi mažesne vandens, aliejaus absorbcine gebe ir putų stabilumu nei globulinai ir albuminai. Šioms savybėms įtakos turi prolaminų hidrofobinės liekanos, kurios randamos baltymo šerdyje [55].

Galima teigti, kad ryžių baltymų funkcines savybes galima reguliuoti, parenkant atitinkamus fermentus ir ekstrakcijos sąlygas. Tokiu būdu, modifikuojant baltymų izoliatų funkcines savybes, būtų galima stabilizuoti technologinį gamybos procesą bei pagerinti maisto kokybę [16].

### 3.4. Ryžių baltymų modifikavimo fermentais įtaka gelių sudarymo pajėgumui

Šiame etape buvo vertinta fermentų transgliutaminazės ir proteinazės įtaka ryžių baltymų gelio susidarymo pajėgumui (3.1 lentelė). Eksperimentui atlikti naudotas pramoninis ryžių baltymų koncentratas (RBK).

Rezultatai parodė, kad gelio susidarymas reikšmingai priklausė nuo baltymo koncentracijos ir fermento specifiškumo.

3.1 lentelė. Baltymo koncentracijos ir fermento įtaka gelio sudarymui

Baltymo koncentracija (%)	Be fermento		Su TG		Su proteaze	
	Gelis	Konsistencija	Gelis	Konsistencija	Gelis	Konsistencija
12	-	Skysta	-	Skysta	-	Skysta
14	-	Skysta	-	Skysta	-	Skysta
16	-	Skysta	-	Skysta	-	Skysta
18	-	Skysta	+	Silpnas gelis	+	Silpnas gelis
20	-	Skysta	+	Silpnas gelis	+	Silpnas gelis

**Pastaba:** (-) gelis nesudarė; (+) gelis susidarė; TG – transgliutaminazė.

Nemodifikuoto RBK suspensijas paveikus tik ultragarsu, gelis nesusidarė visais atvejais. Baltymų 16 – 18 % koncentracijos suspensijas paveikus tranqliutaminaze (TG) (2,4 AV/ 100 g) ir proteaze (200 AV/ 100 g), gauti silpnos konsistencijos geliai. Remiantis literatūra [50], gelio susidarymo procesas pagreitėja, esant didesnei baltymo koncentracijai dėl intensyvesnių tarpmolekulinių jungčių. Dėl baltymų kryžminio susijungimo susidaro didesnio stiprumo ir stabilumo geliai. Gelinės struktūros susidarymas pagrįstas jonine ir hidrofobine sąveika, vandenilinių jungčių bei Van der Valso jėgų buvimu tarp molekulių [50].

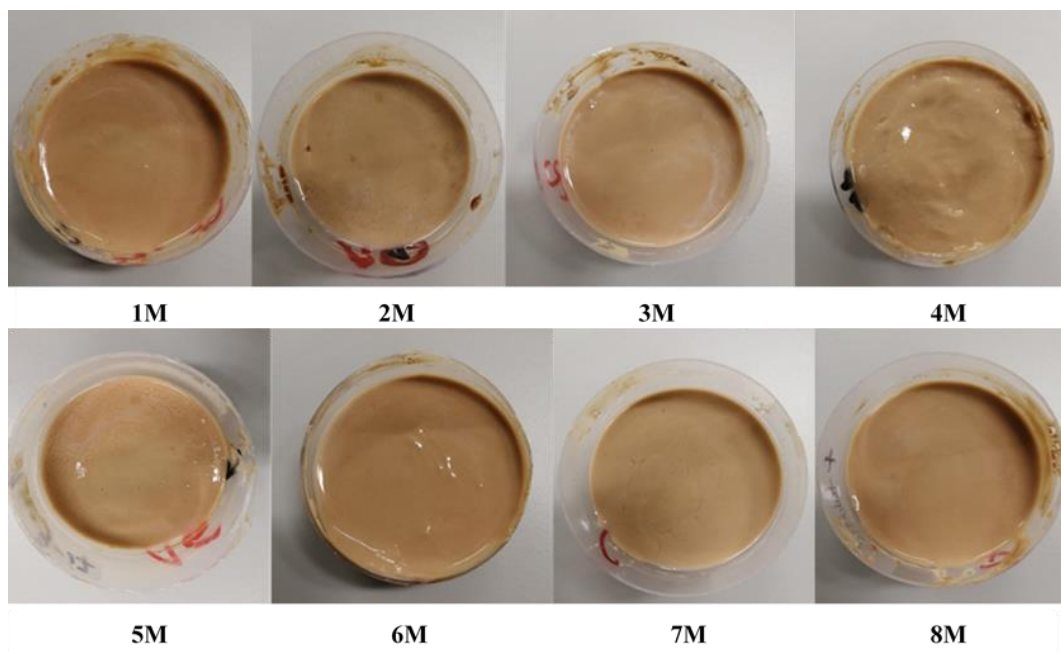
Siekiant gauti tvirtos konsistencijos gelius, atliktas eksperimentas, optimizuojant fermentų proteazės ir TG kiekius (3.2 lentelė). Rezultatai rodo, kad padidinus šių fermentų kiekius, buvo reikšmingai pagerintas RBK gelio susidarymo pajėgumas: tvirtas gelis susidarė, apdorojant 18 ir 20 % RBK suspensijas 4,8 – 9,6 AV/ 100 g TG ir 400 – 800 AV/ 100 g proteaze.

Pagal literatūrą [50], baltymų gelio susidarymo mechanizmas pagrįstas tuo, kad dalinai išsiskleidusiuose baltymų grandinėse susiformuoja nesuvynioti polipeptido segmentai, kurie sąveikauja tarpusavyje ir sudaro trimatį tinklą. Dalinis baltymų išskyrimas su nedideliais antrinės struktūros pokyčiais yra reikalingas geliui sudaryti [50]. Geliai gali susidaryti, vykstant fiziškai (šiluma, slėgis) ar chemiškai (rūgštys, jonai, fermentai) sukeltoms gelinimo reakcijoms. Gelio sudarymas labiausiai priklauso nuo temperatūros, slėgio, pH, fermento kiekio, tirpiklio kokybės, gelinimo agento koncentracijos, molinės masės/ polimerizacijos laipsnio [9].

**3.2 lentelė.** Transgliutaminazės (TG) ir proteazės įtaka RBK baltymų (20 % ir 18 % koncentracijos) gelio sudarymui

Mėginys	Fermento kiekis (AV/ 100 g)		Su TG		Su proteaze	
	TG	Proteazė	Gelis	Išvaizda	Gelis	Išvaizda
<b>Baltymo koncentracija 20 %</b>						
I	2,4	200	+	Silpnas gelis	+	Silpnas gelis
II	4,8	400	+	Tvirtas gelis	+	Tvirtas gelis
III	7,2	600	+	Tvirtas gelis	+	Tvirtas gelis
IV	9,6	800	+	Tvirtas gelis	+	Tvirtas gelis
<b>Baltymo koncentracija 18 %</b>						
V	2,4	200	+	Silpnas gelis	+	Silpnas gelis
VI	4,8	400	+	Tvirtas gelis	+	Tvirtas gelis
VII	7,2	600	+	Tvirtas gelis	+	Tvirtas gelis
VIII	9,6	800	+	Tvirtas gelis	+	Tvirtas gelis
<b>Pastaba:</b> (-) gelis nesusidarė; (+) gelis susidarė.						

Vizualiai vertinant gautus gelius (3.8 pav.), pastebėtas drėgmės išskyrimas gelio paviršiuje po 24 valandų išlaikymo. Šis procesas vadinamas sinereze, vykstančia tarp papildomų tarpmolekulinių jungčių atsiradimo, dėl ko sumažėja sričių, galinčių surišti tirpiklį skaičius, o taip pat tarpmolekulinių erdvių dydis, galinčių sulaikyti tirpiklį.



**3.8 pav.** RBK geliai: 1M – 20 % suspensija su TG (4,8 AV/ 100 g); 2M – 20 % suspensija su TG (9,6 AV/ 100 g); 3M – 18 % suspensija su TG (4,8 AV/ 100 g); 4M – 18 % suspensija su TG (9,6 AV/ 100 g); 5M – 20 % suspensija su proteaze (400 AV/ 100 g); 6M – 20 % suspensija su proteaze (800 AV/ 100 g); 7M – 18 % suspensija su proteaze (400 AV/ 100 g); 8M – 18 % suspensija su proteaze (800 AV/ 100 g)

Atlikus analizę pirštais, kai gelis padedamas tarp nykščio, smaližiaus ir didžiojo pirštų, jaučiamas glotnus paviršius, nėra kruopėtumo. Atliekant lipnumo testą ant pirštų, jaučiami gelio likučiai, taip pat nežymi gelio sinerezė rankoje, palaikius 10 s.

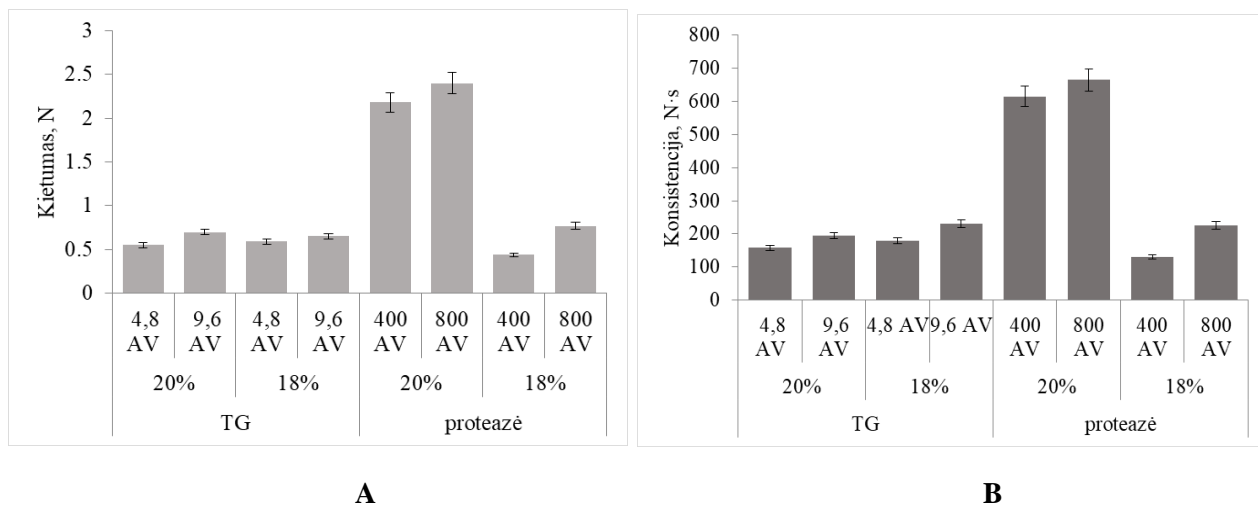
Pastebėta, kad suardžius gelių struktūrą maišant, konsistencija susilpnėja, bet išlaikius tam tikrą laiko tarpą, vėl įgyja pradinę konsistenciją. Šį procesą galima paaiškinti traukos ir stūmos jėgų pokyčiais tarp koloidinių dalelių. Pusiausvyra tarp šių jėgų nusistovi, esant tam tikroms sąlygoms. Sumaišius gelį, pusiausvyra tarp dalelių suyra ir gelis pereina į skystą būseną. Geliai, kuriems būdinga ši savybė, vadinami tiksotropiniais. Remiantis literatūra, gelinėje sistemoje vykstantys procesai dažnai būna grįžtamieji, veikiant juos šiluma [59]. Grįžtamojo gelio tirpimo temperatūra dažnai būna aukštesnė už gelio susidarymo (sukietėjimo) temperatūrą. Šis temperatūrų skirtumas vadinamas histereze.

#### **3.4.1. Hidrolizės transgliutaminaze (TG) ir proteaze įtaka ryžių baltymų tekstūros savybėms**

Šiame etape analizuota modifikavimo skirtingais fermentais ir struktūrizavimo ultragarsu įtaka RBK gelių tekstūros pokyčiams. Tirti geliai, gauti, baltymo 18 % ir 20 % suspensijas hidrolizavus skirtingais fermentais (transgliutaminaze ir proteaze) ir paveikus 30 min. ultragarsu (37 kHz, intensyvumas 120 %) 60 °C temperatūroje.

Gelių formavimosi procesas prasideda nuo makromolekulių suspensijos paruošimo, kurią apdorojant, susiformuoja erdvinė struktūra – gelis. Prieš susiformuojant geliui, mėginys yra takus skystis, susiformavus geliui, jis tampa klampiai elastingu kūnu.

Tyrimas atliktas, siekiant nustatyti tinkamiausią fermentą baltymų modifikavimui, optimizuoti baltymo ir vandens santykį suspensijoje, įvertinant gelių tektūros parametrus. Tyrimo metu vertintas gelių kietumas, konsistencija, kohezija ir klampumo indeksas (KI) (žr. 3.9 – 3.10 pav.).



**3.9 pav.** Ryžių baltymų (18 % ir 20 % koncentracijos) gelių, hidrolizuotų transgliutaminaze (TG) ir proteaze, kietumas (A) ir konsistencija (B).

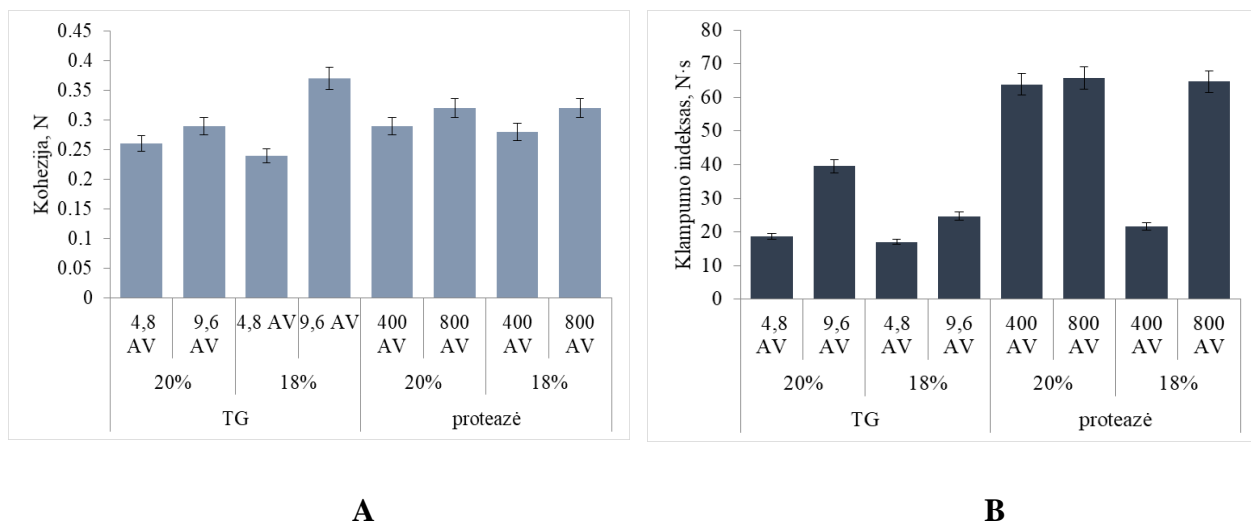
Nustatyta reikšminga ( $p < 0,05$ ) proteazės įtaka gelio kietumui ir konsistencijai. Didžiausiu kietumu ir konsistencija (atitinkamai 2,4 N ir 664,97 N·s) pasižymėjo gelis, gautas, 20 % baltymų suspensiją apdorojus didžiausiu proteazės aktyvumu (800 AV/ 100 g), o dvigubai mažesnis šio fermento aktyvumas 9 % sumažino gelio kietumą. Mažesnės koncentracijos (18 %) baltymų suspensijos atveju, padidinus fermento kiekį nuo 400 iki 800 AV/ 100 g, gautas vidutiniškai 42,5 % didesnio kietumo ir konsistencijos gelis, lyginant su mėginiu, apdorotu mažesniu fermento kiekiu (0,44 N ir 129,78 N·s) (žr. 3.9 A pav.).

Naudojant transgliutaminazę (TG) baltymų modifikavimui, taip pat nustatyti reikšmingi skirtumai ( $p < 0,05$ ) tarp skirtingu fermento kiekiu paveiktų baltymų gelių kietumo ir konsistencijos. Gelių iš 20 % baltymų suspensijos, kietumo ir konsistencijos vertės kito, atitinkamai 0,55 – 0,7 N ir 157,29 – 194 N·s, o 18 % koncentracijos baltymo mėginiai sudarė 0,59 – 0,65 N kietumo ir 180,37 – 231,34 N·s konsistencijos gelius.

Didžiausia konsistencijos vertė (664,97 N·s) nustatyta gelio, 20 % baltymų suspensiją apdorojus didžiausiu proteazės kiekiu (800 AV/ 100 g). Sumažinus baltymų koncentraciją iki 18 %, gelio, hidrolizuotų 400 ir 800 AV/ 100 g proteaze, konsistencijos vertės sumažėjo, atitinkamai 80 % ir 66 % (žr. 3.9 B pav.). Geliai apdoroti transgliutaminaze, pasižymėjo 53 % mažesnėmis konsistencijos vertėmis, lyginant su apdorotais proteaze.

Naudojant transgliutaminazę, baltymai buvo mažiau suskaidyti ir surišti, todėl kietumo vertės gautos reikšmingai mažesnės, lyginant su proteaze paveiktais mėginiais. Pagal literatūrą glutamino ir lizino likučiai, esantys baltymo struktūroje turi būti paveikti TG, kad aktyviai vyktų baltymų kryžminės reakcijos. Reakcija tęsis, jei šios dvi aminorūgštys bus prieinamos ir erdvėje pasiekiamos fermentui hidrolizuoti. Vienas iš pagrindinių baltymų kryžminės reakcijos rezultatų yra gelio susidarymas. Be to, sutankėjus baltymų tinklui, galutinio produkto tekstūra tampa kietesnė [53].

Iš gautų rezultatų (žr. 3.10 A pav.) matyti, kad fermento kiekis turėjo mažiau reikšmingą įtaką ( $p < 0,05$ ) gelio lipnumui. Didžiausia kohezija (0,37 N) pasižymėjo gelis, gautas 18 % suspensiją apdorojus TG (9,6 AV/ 100 g). Panaudojus mažesnę fermento kiekį, kohezija sumažėjo 31,4 %. Baltymų 20 % koncentracijos suspensijos atveju, dvigubai padidinus TG kiekį, gautas 10 % didesnės kohezijos gelis, lyginant su mėginiu, apdorotu mažesniu fermento kiekiu (0,26 N).



**3.10 pav.** Ryžių baltymų (18 % ir 20 % koncentracija) gelių, hidrolizuotų transgliutaminaze (TG) ir proteaze, kohezija (A) ir klampumo indeksas (B).

Naudojant proteazę baltymų modifikavimui, reikšmingų skirtumų tarp tuo pačiu fermento kiekiu paveiktų skirtingos baltymų koncentracijos mėginių kohezijos nenustatyta ( $p > 0,05$ ). Gelių, gautų, naudojant 20 % baltymų suspensiją, kohezijos vertės nustatytos, atitinkamai 0,29 – 0,32 N, o 18 % koncentracijos mėginiai sudarė 0,28 – 0,32 N kohezijos gelius (žr. 3.10 A pav.).

Rezultatai rodo, kad TG kiekis ir baltymo koncentracija suspensijoje turėjo įtakos gelio klampumui (žr. 3.10 B pav.) Didžiausiu klampumo indeksu (KI) (65,78 N·s) pasižymėjo gelis, gautas 20 % baltymų suspensiją paveikus didesniu proteazės kiekiu (800 AV/ 100 g). Mažesnis proteazės kiekis 3 % mažino gelio KI vertę. 18 % koncentracijos baltymų suspensijos atveju, didesnis proteazės kiekis 66 % padidino gelio KI, lyginant su mėginiu, apdorotu mažesniu fermento kiekiu (21,69 N·s). Naudojant TG 9,6 AV/100 g baltymų modifikavimui, didžiausias KI (39,51 N·s) nustatytas, naudojant 20 % baltymų suspensiją, o mažesnis fermento kiekis 53 % sumažino gelio KI (18,61 N·s). Gelių, gautų, naudojant 18 % baltymų suspensiją atveju, KI padidėjo 31 %, esant didesniam TG kiekiui (9,6 AV/100 g).

Masės klampumą nulemia cheminis ryšys tarp daleles sudarančių atomų ir jonų, taip pat molekulių sąveikos [50]. Baltymo 18 % suspensiją paveikus transgliutaminaze, didesnio 35 % lipnumo gauti mėginiai, paveikti didesniu fermento kiekiu (9,6 AV/ 100 g), mažesnis TG kiekis sumažino gelio kohezijos vertes 0,24 N. Didesnės koncentracijos baltymų (20 %) geliams fermento kiekis turėjo mažiau reikšmingą įtaką kohezijos vertėms ( $p < 0,05$ ).

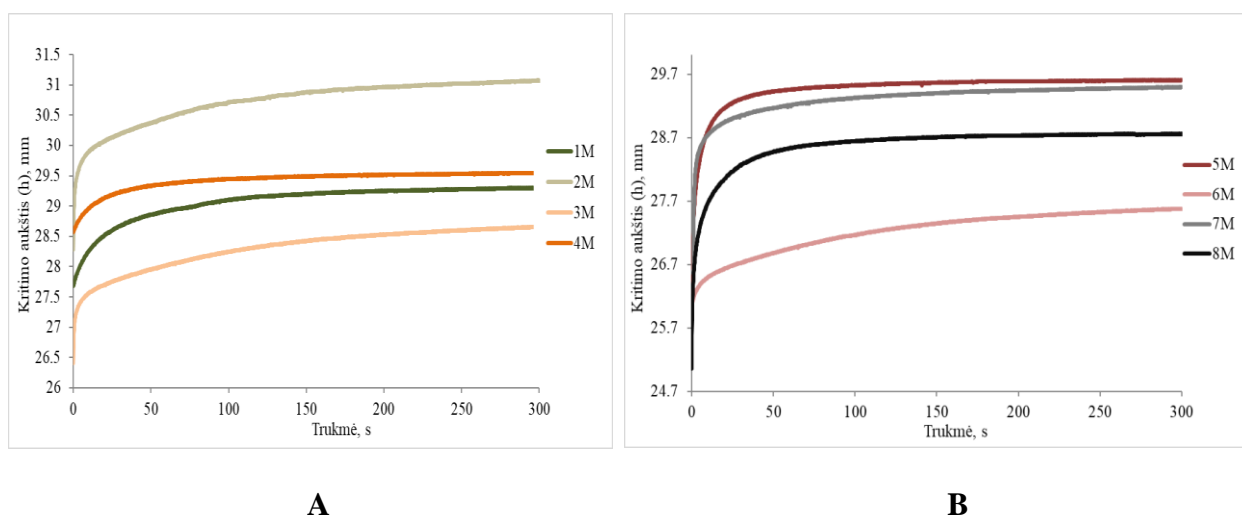
Proteazės panaudojimas ryžių baltymų modifikavimui, reikšmingai padidino klampumo indekso vertes, lyginant su TG (žr. 3.10 B pav.) Didesnės koncentracijos (20 % suspensija) baltymų mėginiams, fermento kiekio įtaka nustatyta mažiau reikšminga (KI vertės kito nuo 63,84 N·s iki

65,78 N·s), o mažesnės koncentracijos (18 % suspensija) baltymų mėginių atveju, fermento kiekio padidinimas nuo 400 iki 800 AV/ 100 g, padidino 2,98 karto KI vertes.

Apibendrinant ryžių baltymų gelių tekstūros tyrimo rezultatus, galima daryti išvadą, kad naudojant proteazę, galima išgauti kietesnį ir tvirtesnės konsistencijos gelį, nei naudojant TG. Didesnio kietumo geliai susidaro, esant 20 % baltymo koncentracijai suspensijoje. Optimalus SQzyme PS-NL proteazės kiekis gelių susidarumui gali būti rekomenduojamas 400 AV/ 100 g, nes reikšmingų skirtumų tarp gelio kietumo ir konsistencijos bei lipnumo, naudojant skirtingus proteazės kiekius, nenustatyta ( $p > 0,05$ ). Reikšminga fermento kiekio įtaka nustatyta 18 % baltymo koncentracijos suspensijoms.

Gelių klampumo tyrimai akustiniu prietaisu (žr. 3.11 A, B pav.) patvirtino, kad proteaze apdorotų baltymų gelių mėginiai pasižymėjo tvirtesne struktūra, t.y. parametro  $h$  vertė 200 s matavimo taške kito nuo 28,73 mm iki 29,58 mm, o apdorotų TG, kito nuo 28,53 mm iki 30,96 mm. Mažesnės  $h$  vertės parodo, kad mėginys yra klampesnis.

Nustatyta, kad baltymų 20 % suspensiją apdorojus TG 9,6 AV/ 100 g (2M), susidarė mažiausio klampumo, t.y. silpniausios struktūros gelis ( $h = 30,97$  mm). Reikšmingai mažesnė  $h$  vertė (29,52 mm) ir stabiliai išlaikoma struktūra pasižymėjo 18 % baltymų mėginys, apdorotas TG 9,6 AV/ 100 g (4M). 1 % mažesnė  $h$  vertė (29,25 mm) – 20 % baltymų mėginyje gautame panaudojus 4,8 AV/ 100 g (1M). Didžiausias klampumas, t.y. mažiausia  $h$  vertė (28,53 mm), nustatyta gelio iš 18 % baltymų, apdorotų TG 4,8 AV/ 100 g (3M) (žr. 3.11 A pav.).

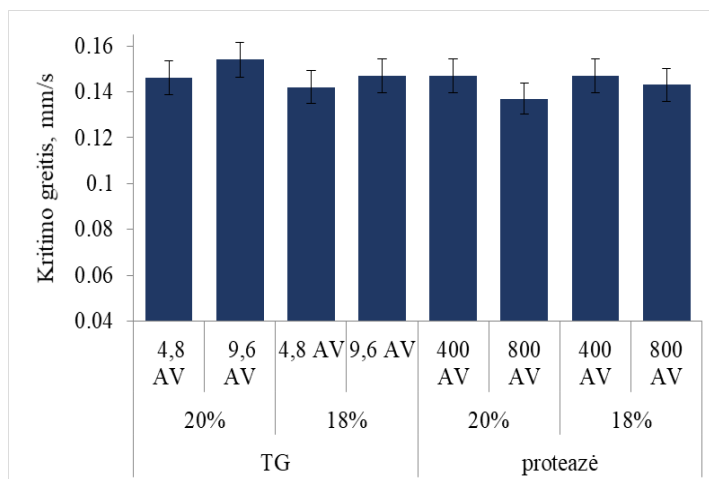


**3.11 pav.** Ryžių baltymų 20 % (1M, 2M, 5M, 6M) ir 18 % (3M, 4M, 7M, 8M), apdorotų transgliutaminaze (TG) (A) ir proteaze (B) geliai.

Analizuojant mėginius apdorotus proteaze, pastebėta, kad geliai pasižymėjo didesniu klampumu nei geliai gauti, apdorojus RBK transgliutaminaze (žr. 3.11 B pav.). Didžiausias klampumas, t.y. mažiausia  $h$  vertė (27,45 mm), nustatyta 20 % baltymų mėginyje, apdorotame proteaze (800 AV/ 100 g) (6M). Nežymus (2,9 %)  $h$  vertės (29,59 mm) padidėjimas nustatytas 20 % baltymų mėginyje, hidrolizuotame 400 AV/ 100 g proteazės (5M). Analizuojant 18 % koncentracijos baltymo gelius, nustatytas reikšmingas ( $p < 0,05$ ) mėginio  $h$  vertės padidėjimas (28,73 mm) (8M). Didžiausia  $h$  verte (29,44 mm), o tuo pačiu mažiausiu klampumu, pasižymėjo 18 % baltymų mėginys (7M), apdorotas mažesniu proteazės kiekiu (400 AV/ 100 g).

Tikslesniam gelių konsistencijos įvertinimui, apskaičiuotas gelyje krentančio kūno greitis 200 s matavimo taške (žr. 3.12 pav.). Didžiausias plunžerio kritimo greitis (0,154 mm/s), o tuo pačiu mažiausias klampumas, nustatytas 20 % baltymų mėginyje, paveiktame didžiausiu TG kiekiu (9,6 AV/ 100 g). Šis mėginys pasižymėjo ir vizualiai silpniausia gelio struktūra.

Mažesnės plunžerio kritimo greičio  $v$  vertės (vid.  $v = 0,146$  mm/s) nustatytos 20 % ir 18 % koncentracijos baltymų, paveiktų mažesniais TG ir proteazės kiekiais, t.y. šis mėginys sudarė tvirčiausios struktūros gelį ( $v = 0,137$  mm/s). Didesnis TG kiekis suskystino gelį ir tuo pačiu didino plunžerio kritimo gelyje greitį ( $v = 0,147$  mm/s) (žr. 3.12 pav.)



**3.12 pav.** Ryžių baltymų (18 % ir 20 % koncentracijos) gelių, hidrolizuotų transgliutaminaze (TG) ir proteaze, plunžerio kritimo greičio ( $v$ ) pokytis.

Gelių tekstūros analizė akustiniu klampos matuokliu patvirtino, kad tvirtesnei ir stabilesnei gelinei struktūrai sudaryti, suspensiją apdorojant ultragarsu, įtakos turi baltymų koncentracija suspensijoje, fermentų kiekis ir rūšis.

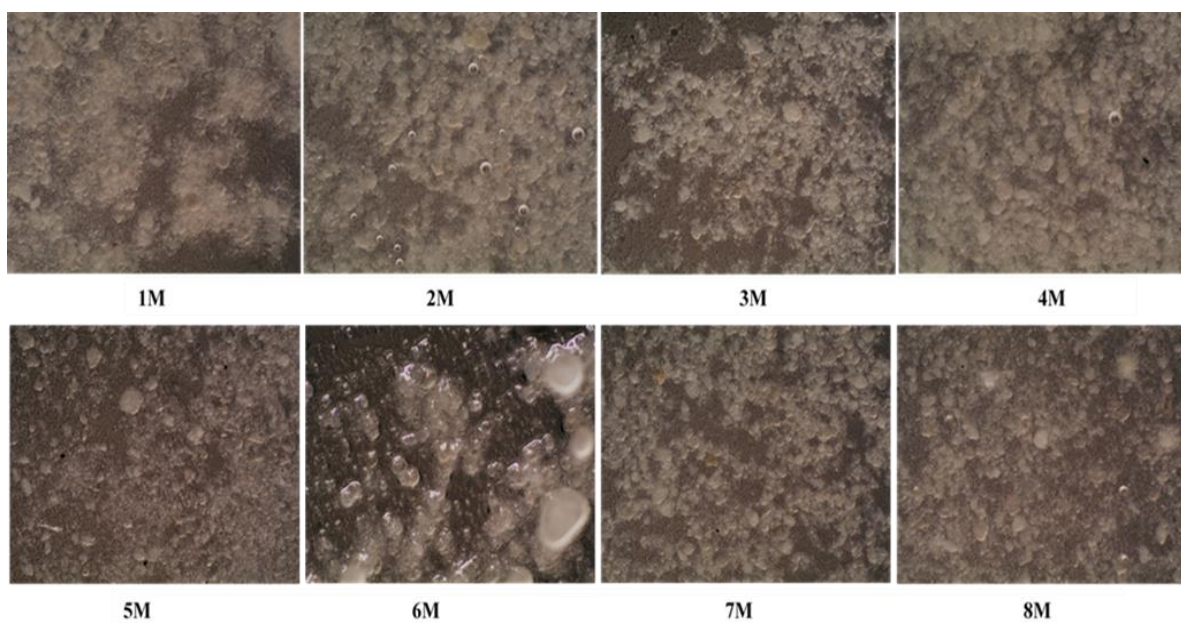
Apibendrinus gautus rezultatus, galima teigti, kad norint gauti tvirtos tekstūros ir konsistencijos ryžių baltymų gelius, rekomenduojama naudoti 20 % baltymų suspensiją. Kadangi reikšmingų skirtumų tarp gelių, paveiktų skirtingu proteazės kiekiu, tekstūros parametrų nenustatyta, ekonomiskumo sumetimais gali būti naudojamas mažesnis SQzyme PS-NL proteazės kiekis (400 AV/ 100 g baltymo). Paveiktų TG baltymų geliai pasižymi reikšmingai ( $p < 0,05$ ) mažesniu kietumu ir konsistencija.

### 3.5. Skirtingos koncentracijos ryžių baltymų gelių struktūros tyrimai

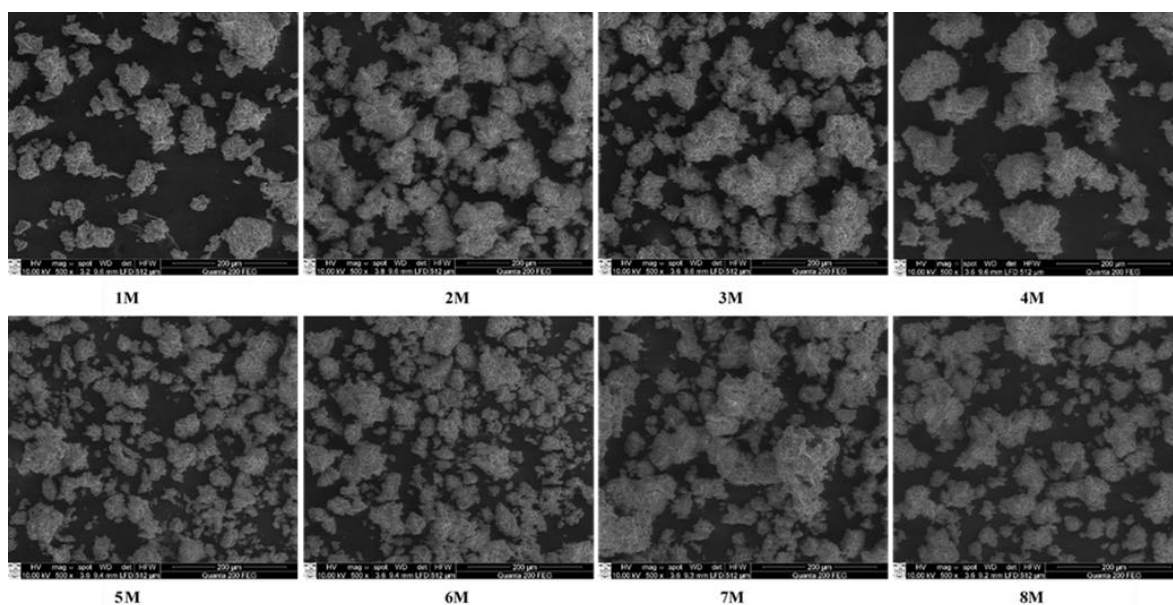
Ryžių baltymų gelių struktūros vertinimo optiniu elektroniniu mikroskopu rezultatai pateikti 3.13 paveiksle. Struktūros mikroskopinė analizė leido įvertinti gelio mikrodalelių dydžius ir išsidėstymo pobūdį gelyje.

Gautose nuotraukose galima išskirti mikrodaleles (tankios baltos formos) ir serumą (juodos spalvos). Geliuose, gautuose 18 – 20 % baltymų suspensijas apdorojus proteaze (400 – 800 AV/ 100 g), pastebėtos didžiausios baltymų globulės, šie geliai pasižymėjo homogeniška struktūra, matomas didesnis baltymų tinklo vienalytiškumas (žr. 3.13 pav.).

Mažiau homogeniškesnė struktūra nustatyta mėginyje (3M), 18 % baltymų suspensijos apdorotos TG (4,8 AV/ 100 g), tam galimai įtakos turėjo mažesnė baltymų koncentracija ir mažesnis fermento kiekis. Didesnius mikrogrūdelius galima pastebėti 20 % ir 18 % baltymų mėginiuose, apdorotuose proteaze (5M ir 8M). Geliuose gautuose 20 % suspensiją apdorojus TG (1M ir 2M) stebimas mikrogrūdelių struktūros homogeniškumas, tolygus išsidėstymas bei tinklo vienalytiškumas (žr. 3.13 pav.).



**3.13 pav.** Gelių, paveiktų transgliutaminaze (1M – 4M) ir proteaze (5M – 8M), mikroskopinė analizė (10x didinimas). Mėginiai: 1M, 2M – 20 % RBK geliai (TG kiekis, atitinkamai 4,8 ir 9,6 AV/ 100 g); 3M, 4M – 18 % RBK (TG kiekis, atitinkamai 4,8 ir 9,6 AV/ 100 g); 5M, 6M – 20 % RBK geliai (proteazė, atitinkamai 400 ir 800 AV/ 100 g); 7M, 8M – 18 % RBK geliai (proteazė, atitinkamai 400 ir 800 AV/ 100 g)



**3.14 pav.** RBK gelių analizė skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (FEI Quanta 200 FEG, JAV), didinimas 500x. Mėginiai: 1M, 2M – 20 % RBK geliai (TG kiekis, atitinkamai 4,8 ir 9,6 AV/ 100 g); 3M, 4M – 18 % RBK (TG kiekis, atitinkamai 4,8 ir 9,6 AV/ 100 g); 5M, 6M – 20 % RBK geliai (proteazė, atitinkamai 400 ir 800 AV/ 100 g); 7M, 8M – 18 % RBK geliai (proteazė, atitinkamai 400 ir 800 AV/ 100 g)

Liofilizuoti gelių mėginiai analizuoti skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (SEM) paviršiaus morfologijai įvertinti (žr. 3.14 pav.). SEM nuotraukose galima išskirti polipeptidų fragmentus, įvertinti jų dydį ir atstumą tarp atviro tinklo struktūrų.

Geliai, gauti apdorojus ryžių baltymus TG, pasižymėjo didesniais granulių fragmentais ir atviresne tinklo struktūra. Gelių, gautų baltymus apdorojus proteaze, morfologinė struktūra yra tankesnė ir gauti žymiai mažesni baltymo paviršiaus granulių fragmentai (mėginiai 5M, 6M, 7M, 8M). Remiantis gautais SEM rezultatais, galima teigti, kad proteazė baltymų molekules suskaidė į smulkesnės struktūros junginius ir leido suformuoti stabilesnius gelius, nei apdorojimas TG.

Tranagliutaminazė (TG) inicijuoja baltymų tinklo susidarymą, katalizuodama acilo pernešimo reakciją tarp  $\gamma$ -karboksilamido grupės ir pirminių aminių, susidarant  $\gamma$ -glutamino-ilizino izopeptido jungtims [52]. Todėl TG naudojamas gelinėms struktūroms sudaryti dėl baltymų ir polisacharidų komplekso koacervacijos, t.y. sąveikaujant dviems polielektrolitams, kuriuose yra priešingo ženklo baltymų su skirtingais izoelektriniais taškais [52]. Naudojant TG, sustiprinama baltymų gelio struktūra ir neįvyksta molekulių disociacija.

Proteazės suskaido ilgąsias baltymų grandines į trumpesnius fragmentus (peptidus) ir galiausiai į amino rūgštis. Taip pat apdorojimas ultragarsu gali įtakoti baltymų struktūros konformaciją, paveikdamas vandenilinius ryšius ir hidrofobines sąveikas dėl kavitacijos reiškinio, kuomet yra pakeičiamos funkcinės savybės (gelio sudarymas) [8].

Apibendrinus gautus rezultatus, galima teigti, kad naudojant baltymų hidrolizei proteolitinius fermentus, galima gauti homogeniškos ir tvirtos tekstūros gelius. Baltymai apdoroti transgliutaminaze, sudarė reikšmingai ( $p < 0,05$ ) mažesnio kietumo ir konsistencijos gelius.

#### 4. Rekomendacijų dalis

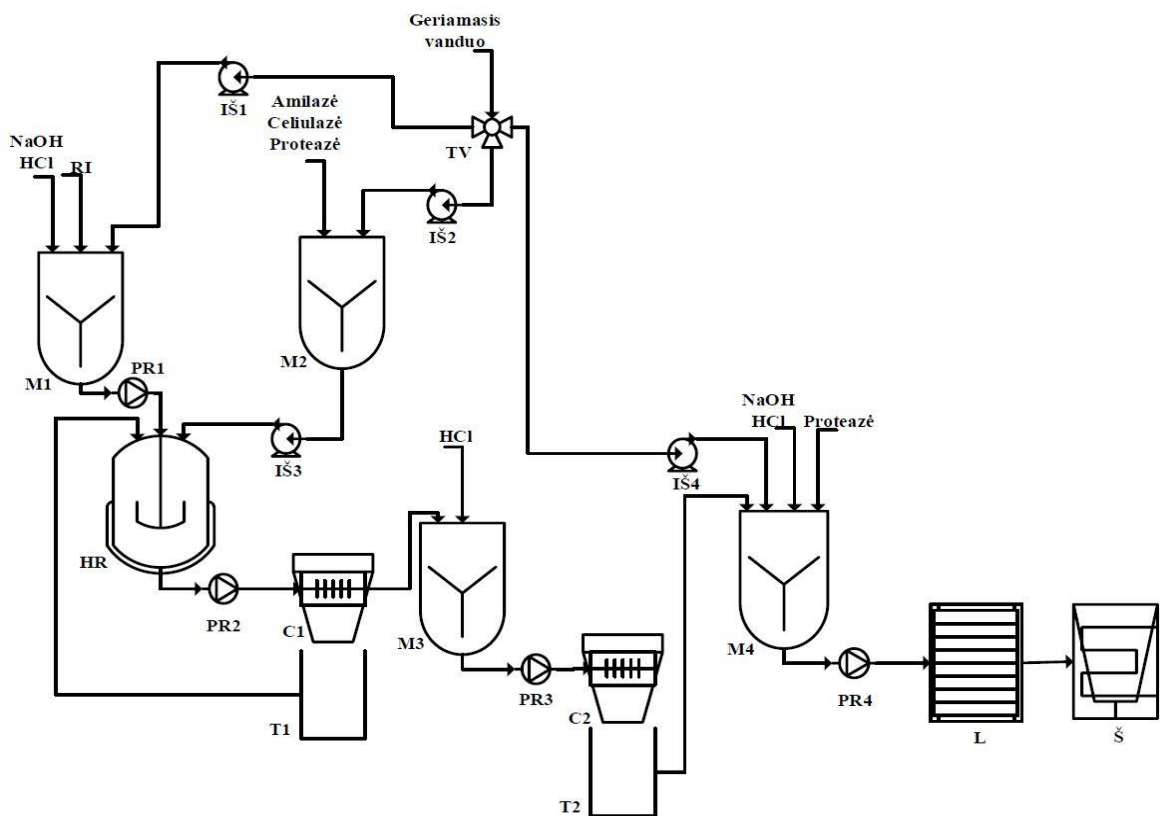
Efektyviam baltymų išskyrimui iš ryžių išspaudų (RI) rekomenduojama taikyti žaliavos hidrolizę multifermentine kompozicija, sudaryta iš amilazės (AlphaStar Plus), hemiceliulazių (CeluStar XL) ir neutralios proteazės (SQzyme PS-NL), optimizavus baltymų ekstrakcijos iš RI sąlygas: 60 °C temperatūra, esant terpės pH 10 ir  $sm/v = 1:4$ . Šiomis sąlygomis gaunamas maksimalus baltymų kiekis ekstrakte (2,42 mg/ml), o baltymų išeiga – 15,7 %.

Išgautų ryžių baltymų modifikavimui ir gelio sudarymo pajėgumo padidinimui rekomenduojama ryžių baltymų izoliatus modifikuoti, hidrolizuojant neutralia proteinaze (SQzyme PS-NL), kurios optimalus kiekis 400 AV/ 100 g baltymų. Hidrolizės sąlygos: 90 min., 50 °C temperatūra. Baltymų 20 % koncentracijos suspensijų modifikavimas proteaze leidžia išgauti homogenišką ir tvirtą ryžių baltymų gelinę struktūrą.

RI baltymų produktai, pasižymintys gelio sudarymo pajėgumu, gali būti panaudoti įvairių maisto produktų, tokių kaip kavos balinimo priemonės, priedai, gėrimai, konditerijos, mėsos ir duonos kepinių, gamyboje. Ryžių baltymų kombinacijoje su atitinkamais polisacharidais geliai gali būti panaudojami valgomosioms plėvelėms gaminti, kurios pasižymi geru atsparumu tempimui [34]. Pridedant propilenglikolio alginato (PGA) ir aliejaus, gali būti sukuriamas atsparumas vandens garams ir sudaromos hidrofobinės sąlygos [34, 36].

Baltymų gelinės struktūros sudarymui gali būti taikomas apdorojimas ultragarsu (37 kHz, intensyvumas 120 %) 60 °C temperatūroje. Apdorojimas aukšto intensyvumo ultragarsu keičia baltymų struktūros konformaciją, paveikdamas vandenilinius ryšius ir hidrofobines sąveikas dėl kavitacijos reiškinio. Reguluojant apdorojimo ultragarsu sąlygas, galima modifikuoti baltymų fizikines, chemines ir funkcines savybes – tirpumą, putų sudarymo pajėgumą ir stabilumą bei gelio sudarymą [8].

Baltymų izoliatų ir modifikuotų baltymų (hidrolizatų) gamybos iš ryžių išspaudų principinė aparatūrinė gamybos proceso schema pateikta 4.1 paveiksle.



4.1 pav. Ryžių baltymų izoliatų gelių principinė aparatūrinė gamybos proceso schema

**Aparatūra:** M1 – M4 – maišyklės, PR1 – PR4 – peristaltiniai siurbliai, IŠ1 – IŠ4 – išcentriniai siurbliai, HR – hidrolizės reaktorius; TV – trišakis vožtuvas, C1 – C2 – centrifūgos, T1 – T2 – talpyklos, L – liofizatorius, Š – šaldytuvas.

Ryžių išspaudos (RI) sumaišomos su geriamuoju vandeniu, atitinkančiu HN 24:2017 reikalavimus, maišyklėje (M1) santykiu 1:4. Terpės pH sureguliuojamas iki 10, naudojant 0,1 M NaOH ar 0,1 M HCl tirpalus. Lygiagračiai šiam procesui (M2) maišyklėje paruošiama fermentų kompozicija, sudaryta iš amilazės, celiulazės ir proteazės (aktyvumų santykis 1:2:1), dozuojant 39 ml/kg masės. Paruošta masė iš maišyklės (M1) peristaltiniu siurbliu (PR1) tiekama į hidrolizės reaktorių (HR), į kurį išcentrinio siurbliu (IŠ1) tiekiamas paruoštas fermentų mišinys (FK). Žaliavos hidrolizės reaktoriuje (HR) vykdoma RI fermentinė hidrolizė (120 min., 55 °C). Kontroluojami parametrai: temperatūra, baltymų kiekis. Po fermentinės hidrolizės masė iš reaktoriaus (HR) peristaltiniu siurbliu (PR2) tiekama į centrifūgą (C1), kurioje atskiriamos dvi frakcijos – skysta frakcija su išekstrahuotais baltymais ir nuosėdos (8000 aps/min.), kurios pašalinamos ir surenkamos talpykloje (T1) arba pakartotinai hidrolizuojamos. Sekantis etapas – baltymų nusodinimas vykdomas reaktoriuje (M4), kur tiekiamas 0,1 M HCl tirpalas terpės pH sureguliuvimui iki pH 4,3 – ryžių baltymų izoelektrinio taško. Po baltymų nusodinimo, gautas mišinys peristaltiniu siurbliu (PR3) tiekiamas į centrifūgą (C2) ir baltymų nuosėdos atskiriamos nuo skystos frakcijos. Gauta klampi masė surenkama į talpyklą (T2), iš kurios dalimis tiekama hidrolizato gamybai. Ryžių baltymų hidrolizato gamybai ruošama 20 % koncentracijos baltymų suspensija. Tam baltymų izoliatas tiekiamas į maišyklę (M4), į kurią išcentrinio siurbliu (IŠ4) tiekiamas vanduo. Suspensijos pH sureguliuojamas 0,1 M NaOH arba 0,1 M HCl tirpalais iki pH 7, tiekama proteazė (400 AV/100 g) ir vykdoma baltymų hidrolizė 90 min. 50 °C temperatūroje. Hidrolizuotų baltymų masė peristaltiniu siurbliu (PR4) tiekama į liofilizatorių (L), kur liofilizuojama -110 °C temperatūroje, 12 valandų.

Džiovinami šaltyje baltymų masė žemoje temperatūroje kietėja, skystai fazei pasišalinant dujų pavidalu, vykstant sublimacijos procesui. Gauti hidrolizuotų baltymų milteliai laikomi 4 °C šaldytuve sandarioje pakuotėje (Š). Išliofilizuotas baltymų hidolizatas gali būti panaudotas kaip gelius sudarantis priedas įvairių maisto produktų gamyboje.

## Išvados

1. Nustatyta, kad daugiausia baltymų iš RI galima išekstrahuoti (2,42 mg/ml), vykdant šarminę ekstrakciją 60 °C temperatūroje, esant terpės pH 10 ir *sm/v* santykiui 1:4.
2. Baltymų iš RI ekstrakcijos efektyvumą galima padidinti, taikant hidrolizę fermentų kompozicija, sudaryta iš amilazės, celiulazės ir proteazės (aktyvumų santykis 1:2:1). Tokiu būdu baltymų išeigą galima padidinti iki 71%, lyginant su hidrolize proteaze (59 %) ar amilazės ir celiulazės kombinacija (67 %).
3. Nustatyta, kad fermentinės hidrolizės panaudojimas baltymų ekstrakcijai mažino išekstrahuotų baltymų riebalų (AAG) ir vandens absorbcijos gebą (VAG): hidrolizuojant proteaze AAG ir VAG vertės nustatytos, vidutiniškai 6,2 % mažesnės, o naudojant fermentų kompoziciją, vidutiniškai 4,4 % mažesnės, lyginant su baltymais, išekstrahuotais iš nehidrolizuotų RI (atitinkamai, 70,4 % ir 67,4 %). Žaliavos fermentinė hidrolizė proteaze ir fermentų kompozicija, neturėjo reikšmingos įtakos baltymų putų sudarymo pajėgumui ir putų stabilumui (sumažėjimas atitinkamai 2,5 ir 0,5 %), lyginant su baltymais iš neapdorotos fermentais žaliavos (atitinkamai, putų sudarymo pajėgumas 34,7 % ir stabilumas 21,3 %).
4. Rezultatai parodė, kad baltymų koncentracija, fermento specifiskumas ir kiekis turi reikšmingą poveikį RI baltymų gelių sudarymui. Tvirtas gelis susidaro (kietumas 2,18 ir 2,4 N, konsistencija 614,49 ir 664,97 N·s), hidrolizuojant ryžių baltymų izoliatą neutralia proteaze, esant 20 % baltymo koncentracijai. Transgliutaminaze (TG) apdoroti baltymai sudarė silpnesnės tekstūros gelius (vid. kietumas 0,62 N; vid. konsistencija 190,75 N·s).
5. Gelių klampumo tyrimas akustiniu prietaisu patvirtino, kad proteaze apdorotų baltymų gelių mėginiai pasižymėjo didesniu klampumu, nei apdorotų TG mėginių: parametro *h* vertė nustatyta 2,6 % mažesnė, lyginant su TG (vid. *h* = 29,57 mm). Baltymų apdorojimas TG mažino mėginių baltymų masės klampumą, o tuo pačiu didino krentančio masėje plunžerio greitį (*v* = 0,154 mm/s), lyginant su apdorotais proteaze baltymais (*v* = 0,144 mm/s).
6. Hidrolizuotų baltymų gelių struktūros vertinimas elektroniniu mikroskopu parodė, kad gelių struktūra priklauso nuo naudoto fermento ir jo kiekio bei baltymo koncentracijos. Optimaliu proteazės (400 AV/ 100 g) kiekiu apdorotų baltymų geliai pasižymėjo homogeniškiausią struktūra. Didesnis proteazės kiekis paveikė heterogeniškos struktūros su didesnėmis globulėmis susidarymą, o mažesnė baltymų koncentracija turėjo įtakos mažiau homogeniškai gelio struktūrai susidaryti.
7. Baltymų koncentratų geliai, apdoroti transgliutaminaze, pasižymėjo didesniais granuliu fragmentais ir atviresne baltymų tinklo struktūra. RBK gelių, gautų apdorojus proteaze, morfologinė struktūra gauta tankesnė su smulkesnių granuliu fragmentais.
8. Ryžių baltymų hidrolizatų iš RI gamybos schema gali būti panaudota maisto pramonėje baltymų izoliatų ir/ar jų panaudojimo gelinės struktūros maisto sistemų gamybai.

## Literatūros sąrašas

1. GUAN, X. ir YAO, H. 2008. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chem.*, 106: 345 – 351. [žiūrėta 2020 – 10 – 10]
2. PHONGTHAI S., HOMTHAWORNCHOO W., ir kt. Preparation, properties and application of rice bran protein. *International Food Research Journal* 24(1): 25-34. 2017. [žiūrėta 2020 – 06 – 09].
3. FURONG H., WENHUI D., ir kt. Alkali solution extraction of rice residue protein isolates: influence of alkali concentration on protein functional, structural properties and lysinoalanine formation. *Food chemistry*, 207 – 215. 2017. [žiūrėta 2020 – 06 – 16].
4. SHIH, F. ir DAIGLE, K. Preparation and characterization of rice protein isolates. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 77. 885-889. 2000. [žiūrėta 2020 – 06 – 17].
5. LUO Y., PAN K., ZHONG Q. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. *Food Chemistry [interaktyvus]*. 155 (2014), 146 – 154. [žiūrėta 2020 – 06 – 29]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.048.
6. TIWARI, B. K.; MASON, T. J. Ultrasound processing of fluid foods. In: *Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods*. Academic Press, 2012. 135-165. [žiūrėta 2020 – 06 – 29].
7. ZHU K., SUN X., ir kt. Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles. 266 – 271. 2009. [žiūrėta 2020 – 06 – 17].
8. STEFANOVIC A., JOVANOVIĆ J., ir kt. Influence of ultrasound probe treatment time and protease type on functional and physicochemical characteristics of egg white protein hydrolysates. 2218 – 2229. 2018. [žiūrėta 2020 – 06 – 17].
9. BANERJEE S., BHATTACHARYA S. ir kt. Food gels: gelling process and new applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition [interaktyvus]*. 2012, 334 – 346. [žiūrėta 2020 – 09 – 10]. Prieiga per doi: 10.1080/10408398.2010.500234.
10. WANG Ch., XU F., ir kt. Physico - chemical and structural properties of four rice bran protein fractions based on the multiple solvent extraction method. *Czech J. Food Sci. [interaktyvus]*. 33, 2015 (3): 283 – 291 [žiūrėta 2020 – 06 – 09]. Prieiga per doi: 10.17221/462/2014-CJFS.
11. QUERESHI, A. A., MO, H., PACKER, L. ir PETERSON, D. M., Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant, and antitumor properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48 (8): 3130-3140. 2000. [žiūrėta 2020 – 09 – 10].
12. BODIE, A.R., MICCICHE A. C., ir kt. Current trends of rice milling by products for agricultural applications and alternative food production systems. *Food Syst [interaktyvus]*. 2019. [žiūrėta 2020 – 09 – 10]. Prieiga per doi: 10.3389/fsufs.2019.00047.
13. PRAŠKEVIČIUS A., IVANOVIENĖ L., ir kt. *Biochemija*. KMU leidykla, Kaunas, 2003. ISBN 9986-451-8-2 [žiūrėta 2020 – 09 – 10].

14. CYNTHIA F., ir kt. A review on rice bran protein: its properties and extraction methods [interaktyvus]. 818 – 827. 2011. [žiūrėta 2020 – 07 – 10]. Prieiga per doi: 10.1080/10408398.2010.482678.
15. FABIAN, C., JU Y.-H., ir kt. A review on rice bran protein: its properties and extraction methods. *Crit Review in Food Science and Nutrition*, 2011, 51(9), 816-827. [žiūrėta 2020 – 09 – 10].
16. KOLPAKOVA V.V., CHUMIKINA L.V., ir kt. Modification of functional properties of white and brown rice protein concentrates. *Vestnik VGUIT (Processing of VSUET)*, 81 (1), 181 – 189. 2019. [žiūrėta 2020 – 07 – 10].
17. WEI C., ir kt. Rice albumin N- terminal (Asp-His-His-Gln) prevents against copper ion-catalyzed oxidations. *J Agric Food Chem.*, 55: 2149-2154. 2007. [žiūrėta 2020 – 07 – 10].
18. ZHAOLI Z., YANG W., ir kt. Alkali extraction of rice residue protein isolates: Effects of alkali treatment conditions on lysinoalanine formation and structural characterization of lysinoalanine – containing protein. *Food chemistry*, 176 – 183. 2018. [žiūrėta 2020 – 06 – 16].
19. FABIAN. C.B., HUYNH L.H., ir kt. Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate. *Food science and technology*. 375 – 379. 2010. [žiūrėta 2020 – 06 – 16].
20. BETSCHART A.A., ir kt. Saunders rice by-products: comparative extraction of nitrogen from U.S. and Spanish bran and germ. *Journal of Food Science*. 1088 – 1093. 1977. [žiūrėta 2020 – 06 – 29].
21. VELINGS N.M., MESTDAGH M.M. Protein adsorption in calcium alginate gel beads. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 133 – 141. 1994. [žiūrėta 2020 – 06 – 29].
22. TAJENDRA P., RAASHID A., ir kt. Statistical optimization of enzymatic hydrolysis of rice bran protein concentrate for enhanced hydrolysate production by papain. *Food science and technology*. 77 - 83. 2019. [žiūrėta 2020 – 06 – 16].
23. PAUL J.S., BELIYA E., ir kt. Production of biocatalyst  $\alpha$ -amilase from agro – waste rice bran by using *Bacillus tequilensis* TB5 and standardizing its production process. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020. [žiūrėta 2020 – 06 – 29].
24. KUMAGAI T., ir kt. Production of rice protein by alkaline extraction improves its digestibility. *J Nutr Sci Vitaminol*. 52 (6): 467 – 72. 2006. [žiūrėta 2020 – 07 – 10].
25. SHIH F.F. ir kt. Use of enzymes for the separation of protein from rice flour. *Cereal Chemistry*. 74(4), 437-441. [žiūrėta 2020 – 09 – 10].
26. HAMADA J.S., ir kt. Use of protease to enhance solubilization of rice bran proteins. *Journal of Food Biochemistry*. 23(3): 307 – 321. 2007. [žiūrėta 2020 – 07 – 10].
27. GONCALVES DOS SANTOS AGUILAR J., ir kt. Optimization of the enzymatic hydrolysis of rice protein by different enzymes using the response surface methodology. *Biotech [interaktyvus]*. 8(8): 372. 2018. [žiūrėta 2020 – 07 – 10]. Prieiga per doi: 10.1007/s13205-018-1401-1.

28. ŠAČKUS A., ir kt. Žalioji chemija. Vitae Litera, 2007. ISBN 978-9955-686-49-1 [žiūrėta 2020 – 06 – 16].
29. MASON T.J. ir kt. New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*. 226-230. 2011. [žiūrėta 2020 – 06 – 29].
30. WANG, L., ir kt. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), p.300–312. 2006. [žiūrėta 2020 – 06 – 17].
31. LI S., MA H., ir kt. A new kinetic model of ultrasound-assisted pretreatment on rice protein. *Ultrasonics – Sonochemistry*, 40, 2018, 644–650. [žiūrėta 2020 – 06 – 29].
32. GARBA U., KAUR S., Protein isolates: production, functional properties and application. 2014. 35 – 42. [žiūrėta 2021 – 01 – 03].
33. ADEBIYI A.P., OGAWA T., ir kt. Preparation and characterization of high – quality rice bran proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture [interaktyvus]*. 2007. [žiūrėta 2020 – 09 – 10]. Prieiga per doi: 10.1002/jsfa.2819.
34. BUREY P., BHANDARI B.R., ir kt. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition [interaktyvus]*. 2008, 361 – 377. [žiūrėta 2020 – 09 – 10]. Prieiga per doi: 10.1080/10408390701347801.
35. RAFE A., VAHEDI E., ir kt. Rheology and microstructure of binary mixed gel of rice bran protein-whey: effect of heating rate and whey addition. *Journal of the science of food and agriculture [interaktyvus]*. 2015. [žiūrėta 2020 – 09 – 10]. Prieiga per: doi: 10.1002/jsfa.7586.
36. SHARIF M.K., BUTT M.S., ir kt. Rice bran: a novel functional ingredient. *Critical reviews in food science and nutrition [interaktyvus]*. 2013. [žiūrėta 2020 – 09 – 10]. Prieiga per doi:10.1080/10408398.2011.608586.
37. BERA M.B, MUKHERJEE R.K. Solubility, emulsifying and foaming properties of rice bran protein concentrates. *J Food Sci.*, 54: 142 – 145. [žiūrėta 2020 – 09 – 10].
38. GNANASAMBANDAM R., HETTIARACHCHY N.S. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: Preparation and properties. *J Food Sci.*, 60: 1066–1069. [žiūrėta 2020 – 09 – 10].
39. FELIX M., ROMERO A., ir kt. Development and evaluation of rheological and bioactive properties of rice protein – based gels. *Journal of Cereal Science [interaktyvus]*. 75: 91–100, 2016. [žiūrėta 2020 – 09 – 10]. Prieiga per doi:10.1016/j.jcs.2016.10.004.
40. DAWIDOWICZ A.L., OLSZOWY M. Antioxidant properties of BHT estimated by ABTS assay in systems differing in pH or metal ion or water concentration. *Eur. Food Res. Technol [interaktyvus]*. 232: 837 – 842, 2011 [žiūrėta 2020 – 09 – 10]. Prieiga per doi:10.1007/s00217-011-1451-7.
41. AOAC (1990). Helrich, K. (ed.). *Official Methods of Analysis*. 15th edn, AOAC Inc., Arlington, VA. ISBN 0935584420. [žiūrėta 2021 – 01 – 03].

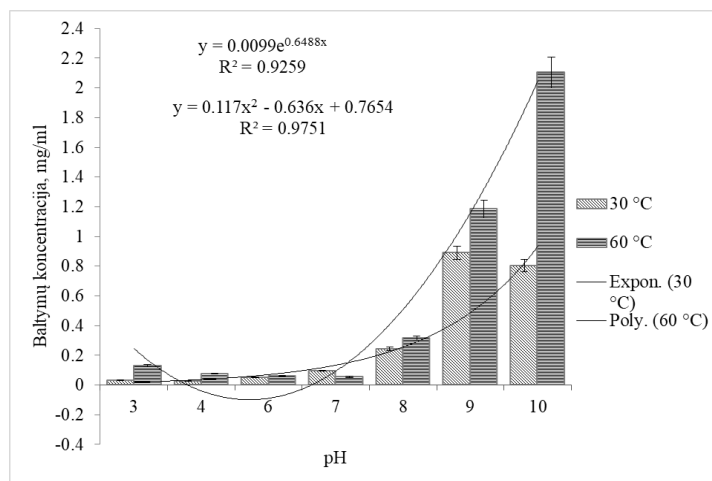
42. MILLER G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. 1959. [žiūrėta 2020 – 09 – 10].
43. KRUGER N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. The Protein Protocols Handbook. Part I. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2002. ISBN 9780896039407. [žiūrėta 2021 – 01 – 03].
44. KUMAR K.S. ir kt. Studies on the functional properties of protein concentrate of *Kappaphycus alvarezii* doty: an edible seaweed. Food Chemistry 153:353-360. 2014. [žiūrėta 2021 – 01 – 03].
45. JARPA – PARRA M ir kt. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. LWT Food Sci Technol 57(2):461 – 469. 2014. [žiūrėta 2021 – 01 – 03].
46. BADONIENĖ L., BENDIKIENĖ V. ir kt. Vilniaus universitetas. Biochemijos ir biofizikos katedra. BIOCHEMIJOS laboratoriniai darbai. 2006. 99 – 111. [žiūrėta 2021 – 01 – 03].
47. SUMANTHA A., DEEPA P. ir kt. Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. Food Science and Technology [interaktyvus]. 2006 [žiūrėta 2021 – 01 – 03]. [žiūrėta 2021 – 01 – 03] Prieiga per doi: 10.1590/S1516-89132006000600019.
48. COA X., WEN H., ir kt. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. Journal of Cereal Science [interaktyvus]. 2009. 184 – 189. Prieiga per doi: 10.1016/j.jcs.2009.04.009.
49. LIU Y. Q., STRAPPE P. ir kt. Functional peptides derived from rice bran proteins. 2017. 349 – 356. Prieiga per doi: 10.1080/10408398.2017.1374923. [žiūrėta 2021 – 01 – 03].
50. ZAYAS J.F. Gelling properties of proteins. 1997. 310 – 366. [žiūrėta 2021 – 03 – 03].
51. WU N., QIAO C. ir kt. Retrogradation inhibition of rice starch with dietary fiber from extruded and unextruded rice bran [interaktyvus]. 2021. 113 [žiūrėta 2021 – 03 – 03]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106488.
52. QIAN L., HEPING C., ir kt. Mild enzyme-induced gelation method for nanoparticle stabilization: effect of transglutaminase and laccase cross-linking. J. Agric. Food Chem [interaktyvus]. 2021. 69. 4, 1348-1358. [žiūrėta 2021 – 04 – 10]. Prieiga per doi: 10.1021/acs.jafc.0c05444.
53. ZHANG Y., B. K. SIMPSON. Food – related transglutaminase obtained from fish/ shellfish. 2019. 3214 – 3232. Prieiga per doi: 10.1080/10408398.2019.1681357. [žiūrėta 2021 – 04 – 17].
54. MUNDI S., ALUKO R. E. Physicochemical and functional properties of kidney bean albumin and globulin protein fractions [interaktyvus]. 2012. 299 – 306. [žiūrėta 2021 – 04 – 17]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodres.2012.04.006.
55. AKHARUME F., SANTRA D. ADEDEJI A. Physicochemical and functional properties of proso millet storage protein fractions. Food Hydrocolloids [interaktyvus]. 2019. 108. [žiūrėta 2021 – 04 – 17]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105497.

56. REGAN J.O. ENNIS M.P. ir kt. 13-milk proteins. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 2009. 298-358. [žiūrėta 2021 – 04 – 17].
57. AZEVEDO V. M., DIAS M. V. ir kt. Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. Food Hydrocolloids [interaktyvus]. 2015. 179 – 188. [žiūrėta 2021 – 04 – 17] Prieiga per doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.02.014.
58. SCAAFSMA G. Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. European Journal of Clinical Nutrition. 2009. 1161 – 1168. [žiūrėta 2021 – 04 – 17].
59. MATHEW F. Recent advances in topical gel formulation. World Journal of Clinical Pharmacology, Microbiology and Toxicology. 2015. ISSN 2454-1729. [žiūrėta 2021 – 04 – 17].

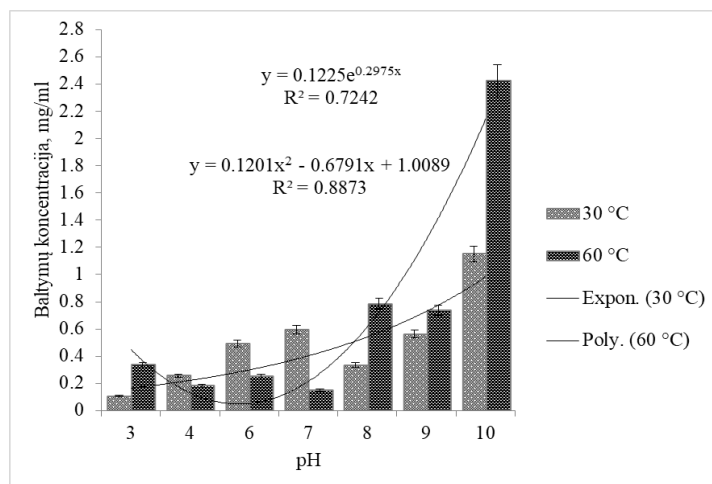
**Darbo rezultatai pristatyti studentų mokslinėje konferencijoje „Chemija ir cheminė technologija 2021” ir publikuoti konferencijos pranešimų medžiagoje:**

Romantė Pažeraitė, Daiva Žadeikė, Joana Bendoraitienė, Žaneta Rukuižienė, Ramutė Maždžierienė, Gražina Juodeikienė, Valdas Jakštas. Baltymų ekstrakcijos iš ryžių išspaudų sąlygų optimizavimas baltymų gelių gamybai. Studentų mokslinės konferencijos „Chemija ir cheminė technologija 2021” pranešimų medžiaga: respublikinė studentų mokslinė konferencija, 2021 05 14 / rinkinio sudarytojai: T. Dambrauskas, G. Kručaitė, D. Sinkevičiūtė; Kauno technologijos universitetas. Cheminės technologijos fakultetas. eISSN 2538-7332. p. 77-82

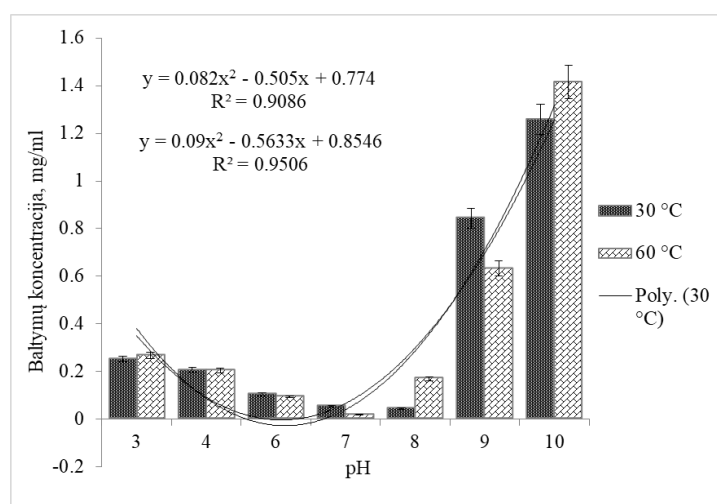
## 1 Priedas



1 pav. Baltymų ekstrakcijos efektyvumo priklausomybė nuo terpės pH, esant  $sm/v$  santykiui 1:2.



2 pav. Baltymų ekstrakcijos efektyvumo priklausomybė nuo terpės pH, esant  $sm/v$  santykiui 1:4.



3 pav. Baltymų ekstrakcijos efektyvumo priklausomybė nuo terpės pH, esant  $sm/v$  santykiui 1:6.