



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos magistro studijų programos II kurso studentė

Ieva GUDONYTĖ

Magistro baigiamasis darbas

Augalinės kilmės baltymų fermentinės hidrolizės tyrimas

Darbo vadovė:

dr. Inga Matijošytė

Konsultantai:

Jokūbas Krutkevičius

Aušra Veteikytė

Vilnius, 2020

Augalinės kilmės baltymų fermentinės hidrolizės tyrimas

Darbas atliktas: **Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Taikomosios biokatalizės sektoriuje**

Darbą atliko: **Ieva GUDONYTĖ**

Darbo vadovė: **dr. Inga MATIJOŠYTĖ**

TURINYS

TURINYS.....	3
Santrumpos.....	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 Bioekonomika ir auganti maistinių baltymų paklausa	7
1.2 Kas yra maistiniai baltymai?	9
1.3 Augalinės ir gyvūninės kilmės baltymų palyginimas.....	11
1.4 Augalinių baltymų hidrolizatai.....	13
1.5 Augalinės kilmės žaliavų apdorojimo („pre-treatment“) svarba	15
1.6 Augalinių baltymų hidrolizės būdai ir jų ypatumai	17
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	22
2.1 Prietaisai ir priemonės	22
2.2 Naudotos medžiagos ir tirpalai.....	22
2.2.1 Tyrimo objektas.....	22
2.2.2 Fermentai.....	22
2.2.3 Proteazių aktyvumo nustatymo tirpalai	23
2.2.4 Buferiniai tirpalai	23
2.2.5 Baltymų koncentracijos nustatymo Bradford‘o metodu tirpalai	23
2.2.6 Ksilanazinio aktyvumo nustatymui naudojami tirpalai	24
2.2.7 Baltymų elektroforezės ir gelių vizualizavimo „Coomassie“ dažų tirpalai.....	24
2.2.8 Mitybinės terpės	25
2.2.9 Guanidino hidrochlorido ir urėjos tirpalai.....	25
2.2.10 Baltymų išskyrimo tirpalai	25
2.3 Metodai	25
2.3.1 Proteazių aktyvumo nustatymas su N,N-dimetilkazeinu.....	25
2.3.2 Buferinių tirpalų įtaka fermentų Vilzim PRO dry ir Vilzim PRO conc dry aktyvumui.....	27
2.3.3 Baltymų koncentracijos nustatymas Bradford‘o metodu	27
2.3.4 Ksilanazinio aktyvumo nustatymas.....	28
2.3.5 Baltymų elektroforezė NDS-PAGE metodu	29
2.3.6 Liucernos miltų (LM) ir juose esančių baltymų hidrolizė.....	30
2.3.7 Hidrolizės laipsnio (DH) nustatymas	32
2.3.8 Mikrobiologinio užterštumo tyrimas hidrolizės mėginiuose.....	32
2.3.9 Mikrobiologinio užterštumo šalinimo ir įvertinimo metodika	32
2.3.10 Antimikrobinų medžiagų panaudojimo tyrimo metodika	33
2.3.11 Natrio nitrito antimikrobinio poveikio priklausomybė nuo koncentracijos	33

2.3.12 Liucernos miltų fizikinio apdorojimo metodika.....	33
2.3.13 Liucernos baltymų apdorojimo guanidino hidrochloridu ir urėja metodika.....	34
2.3.14 Liucernos miltų nuriebalinimas.....	34
2.3.15 Dujų chromatografijos (GC) analizė.....	35
2.3.16 Baltymų išskyrimas iš nuriebalintų liucernos miltų.....	35
3. REZULTATAI	37
3.1 Proteazių aktyvumo tyrimai	38
3.1.1 Aktyvumo nustatymas.....	38
3.1.2 Buferninių tirpalų įtaka aktyvumui	39
3.2 Liucernos miltų (LM) ir juose esančių baltymų hidrolizė.....	40
3.3 Liucernos miltų ar juose esančių baltymų išankstinis apdorojimas	43
3.3.1 Apdorojimas guanidino hidrochloridu (GdmHCl) ir urėja.....	43
3.3.2 Apdorojimas lipolizininiais fermentais	44
3.3.3 Apdorojimas amilaze ir gliukoamilaze.....	45
3.4 LM hidrolizatų mikrobiologinio užterštumo tyrimas	49
3.4.1 Mikrobiologinio užterštumo šalinimas.....	49
3.4.2 Hidrolizės tyrimas apdorojant LM slėgiu, mikrobangomis, ultragarsu ir aukšta temperatūra	51
3.4.3 Antimikrobinų medžiagų panaudojimo tyrimas.....	52
3.4.4. LM hidrolizės tyrimas, panaudojant natrio nitritą.....	56
3.5 Liucernos baltymų išskyrimas.....	59
3.5.1 Liucernos miltų nuriebalinimas.....	59
3.5.2 Liucernos miltuose esančių baltymų izoliacija.....	60
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	61
IŠVADOS.....	63
REZULTATŲ SKLAIDA.....	64
PADĖKA.....	64
SANTRAUKA	65
SUMMARY	66
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	67

Santrumpos

- a.r.* – aminorūgštys
AA – akrilamidas
APS – amonio persulfatas
B(OH)₃ – boro rūgštis
BAA – bis-akrilamidas
BP – bioaktyvūs peptidai
CuSO₄ – vario sulfatas
DH – hidrolizės laipsnis
DMC – N,N-dimetilkazeinas
EAA – nepakeičiamos aminorūgštys
GdmHCl – guanidino hidrochloridas
H₃PO₄ – fosforo rūgštis
HCl – druskos rūgštis
HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfoninė rūgštis
JSA – jaučio serumo albuminas
K₂HPO₄ – dikalio hidrofosfatas
KCl – kalio chloridas
LM – liucernos miltai
Na₂B₄O₇ × 10H₂O – tetraboro rūgšties natrio druska
Na₂CO₃ – natrio karbonatas
Na₂HPO₄ – dinatrio hidrofosfatas
Na₂SO₃ – natrio sulfitas
NaCl – natrio chloridas
NaH₂PO₄ × 2H₂O – natrio divandenilio monofosfato dihidratas
NaOH – natrio hidroksidas
NDS – natrio dodecilsulfatas
NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinė elektroforezė
NEAA – pakeičiamos aminorūgštys
TEMED – N,N,N',N'-tetrametileno-1,2-diaminas
TNBS – 2,4,6-trinitrobenzeno sulfoninė rūgštis
Tris – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiolis

IVADAS

Numatyta, kad iki 2050 m. augant žmonių populiacijai visame pasaulyje, augs ir maistinių produktų poreikis. Ilgainiui prognozuojamas trūkumas tradicinių baltyminių šaltinių, tokių kaip mėsa, pienas ir kt. Nesuteikus organizmui reikiamo baltymų kiekio, žmogus jaučia fizinį silpnumą, galvos svaigimą, padidėja samonės netekimo rizika, gali būti iššaukiama anemija ar susilpnėti imuninės sistemos atsparumas infekcinėms ligoms. Aprūpinti organizmą baltyminėmis medžiagomis galima vartojant ne tik gyvūninės, bet ir augalinės kilmės produktus. Susidomėjimas augaliniais baltymais auga dėl jų teigiamo poveikio sveikatai. Įrodyta, kad augalinės kilmės baltymai yra gausus nepakeičiamų aminorūgščių, skaidulų ir vitaminų šaltinis, o jų sudėtyje randamas riebalų kiekis yra minimalus, priešingai negu gyvūniniuose baltymuose. Tačiau augaliniai baltymai, kaip maistiniai ingredientai, nėra plačiai naudojami dėl ypatingai glaustos ir sunkiai virškinamos baltymo struktūros bei sudėtingo augalinių žaliavų apdorojimo, kurį lemia didelis kiekis sunkiai pašalinamų priemaišinių medžiagų. Pavyzdžiui, augalų ląstelių sienelės yra beveik neskaidomos žmonių organizme dėl fermentų, gebančių suhidrolizuoti celiuliozę, trūkumo. Todėl svarbus šio tyrimo uždavinys yra pagerinti baltymų maistines savybes juos suhidrolizuojant fermentiškai. Iššūkis fermentiškai suhidrolizuoti baltymus, paremtas pramoninėje gamyboje skatinamu tvariu maisto produktų išgavimu. Teigiama, kad fermentiškai suskaidyti baltymai nėra užteršiami druskomis ar toksiškomis medžiagomis, priešingai negu cheminės hidrolizės metu, bei yra daug lengviau absorbuojami organizme ir gali būti naudojami įvairių gyventojų grupių vartojimui. Tyrimo objektu pasirinkti liucernos miltai (LM), dėl jų sudėtyje esančio didelio kiekio baltymų. Tačiau mokslinės informacijos apie fermentinę baltyminių hidrolizatų gamybą iš augalinės kilmės miltų yra labai mažai, o apie liucernos miltų ir juose esančių baltymų fermentinę hidrolizę nėra, nes vis dar trūksta mokslinių duomenų apie detalią liucernos augalo biocheminę struktūrą. Be to, rinkoje esančių proteazių specifiskai pritaikytų augalinių baltymų hidrolizei aukšta kaina apriboja jų pritaikomumą pramoninėje gamyboje ir skatina ištirti kitų maistinių proteolitinių fermentų efektyvumą hidrolizuojant liucernos baltymus.

Darbo tikslas – suhidrolizuoti liucernos miltuose esančius baltymus, naudojant maistines proteazes bei optimizuoti augalinių priemaišų fermentinį apdorojimą.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti optimalias komercinių proteazių veikimo sąlygas;
2. Parinkti patikimiausią hidrolizės rezultatų įvertinimo metodiką;
3. Ištirti liucernos miltų apdorojimo būdus;
4. Ištirti liucernos miltų hidrolizato mikrobiologinį užterštumą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Bioekonomika ir auganti maistinių baltymų paklausa

Sparčiai augant pasaulio gyventojų skaičiui, didėja įvairių prekių, tokių kaip maisto produktų, vaistinių preparatų bei energijos poreikis, o viso to pasekmė yra ribotų ar netgi baigtinių gamtinių išteklių eikvojimas, ekosistemų ir biologinės įvairovės nykimas bei klimato kaita¹. Gausus gamtinių išteklių naudojimas lemia padidėjusį šiltnamio efektą sukeliančių dujų išmetimą į aplinką ir yra viena iš klimato kaitos priežasčių (Birner, 2017). Akivaizdu, kad sprendžiant aptartas problemas, turi būti išlaikyta stabili ekonomika bei kuriamos darbo vietos (Aguilar ir kt., 2018). Taigi, poreikis pasiekti tvarumą yra stipri paskata modernizuoti pramonės šakas, siekiant optimizuoti ir tobulinti gamybos procesus².

2012 m. vasario 13 d. buvo paskelbta ir priimta Europos Bioekonomikos strategija, kurios siekis plėtoti ekonominį modelį, pagrįstą atsinaujinančių biologinių išteklių naudojimu ir jų pavertimu gyvybiškai svarbiais produktais ar bioenergija³. Apibrėžti penki pagrindiniai bioekonomikos tikslai: visuomenės aprūpinimo maistu užtikrinimas, tvarus gamtos išteklių valdymas, priklausomybės nuo neatsinaujinančių išteklių mažinimas, klimato kaitos švelninimas ir darbo vietų kūrimas, palaikant konkurencingumą Europoje (Wohlfahr ir kt., 2019). Bioekonomikos samprata bei prioritetiniai tikslai kito per pastarąjį dešimtmetį. Iš pradžių buvo siekiama sumažinti iškastinio kuro, kaip degalų suvartojimą, pakeičiant jį biologiniu kuru (bioetanolium, biodyzelinu ir kt.). Bėgant metams didesnis dėmesys buvo skiriamas bioproduktų sintezei. Nuo 2018 m. Europos Sąjungos (ES) atnaujintoje Bioekonomikos strategijoje buvo siekiama spręsti žiedinės ekonomikos klausimus, taikant atliekų perdirbimą į produktus, turinčius pridėtinę vertę, tokius kaip maistas, pašarai, biologiniai preparatai ir kt. (Aguilar ir kt., 2019). Taigi, per pastarąjį dešimtmetį stebimas staigus bioekonomikos vystymasis (Aguilar ir kt., 2018).

Egzistuoja vieninga nuomonė, kad norint sėkmingai plėtoti bioekonomiką, reikalingos tvirtos mokslu ir tyrimais pagrįstos žinios, naujų ir efektyvesnių technologijų kūrimas, kurioms reikia investicijų į inovacijas ir aukštos kvalifikacijos darbo jėgos. Pažymima, kad biotechnologijų vaidmuo, siekiant pereiti prie bioekonomikos siūlomų idėjų, įvardijamas kaip svarbus Europos bioekonomikos ramstis, būtinas tvariam ekonomikos augimui, energijos tiekimui ir gyvenimo lygio palaikymui (Birner, 2017). Pavyzdžiui, biotechnologiniai metodai

¹ <https://cordis.europa.eu/article/id/400949-bio-based-innovation-builds-europes-bioeconomy>

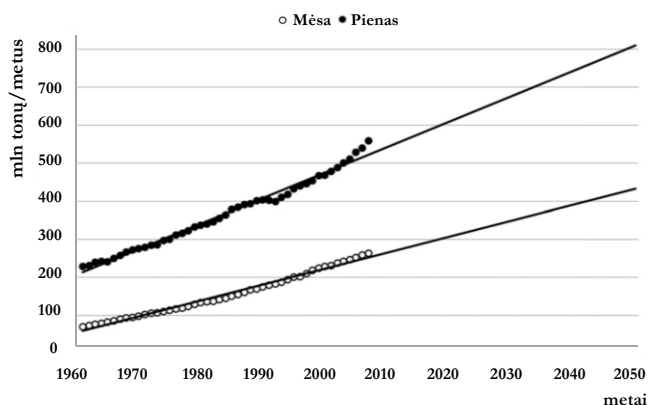
² https://ec.europa.eu/research/bioeconomy/pdf/ec_bioeconomy_strategy_2018.pdf

³ <https://ec.europa.eu/research/bioeconomy/index.cfm?pg=policy&lib=strategy>

ir procesai gali būti taikomi žemės ūkio, farmacijos, chemijos ir energetikos sektoriuose. Ypatingai vertinama pramoninė biotechnologija, apimanti biokatalizę, sintetinę biologiją, metabolinę inžineriją ir kt. Teigiama, kad bioakatalizė yra viena pagrindinių alternatyvų cheminei pramonei ir, be abejo, turės didelę įtaką tolimesniam bioekonomikos augimui (Aguilar ir kt., 2019).

Poreikis tausoti gamtinius išteklius, mažinti klimato kaitą bei užtikrinti augančio gyventojų skaičiaus poreikių patenkinimą, lėmė bioekonomikos plėtrą daugelyje pasaulio šalių. Akivaizdu, kad bioekonomika sparčiai progresuojantis projektas, reikalaujantis nuolatinių investicijų į mokslinius tyrimus bei inovacijas (Pellis ir kt., 2018). Remiantis ilgalaikėmis prognozėmis pagal ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizaciją (EBPO), numatoma, kad iki 2055 m. bioekonomika bus pagrindinis Europos ekonomikos plėtros principas (Vitunskienė ir kt., 2017). Taip pat, kintant bioekonomikos sampratai daugelis šalių priėmė konkrečias bioekonomikos strategijas, tačiau visose iš jų akcentuojamas pakankamo maisto kiekio užtikrinimas, atsižvelgiant į sparčiai augantį gyventojų skaičių pasaulyje (Aguilar ir kt., 2018).

Kylant pragyvenimo lygiui aukšto išsivystymo šalyse, didėja ir baltyminių produktų paklausa⁴. Daugumoje Europos šalių suaugusiųjų baltymų racione didžiausią dalį sudaro mėsa ir mėsos produktai bei pienas ir pieno produktai⁵. Suvartojamų gyvūninės kilmės maistinių baltymų kiekis siekia apie 65-70 % (Chardigny ir Walrand 2016). Remiantis Jungtinių tautų maisto ir žemės ūkio organizacijos statistiniais duomenimis (FAOSTAT), numatytas didėjantis mėsos ir pieno produktų poreikio augimas, kuris 2050 m. atitinkamai sieks 435 mln ir 843 mln tonų per metus (1.1 pav.) (Boland ir kt., 2013). Prognozuojama, kad iki 2050 m. tradicinių baltymų šaltinių nebus pakaks aprūpinti gyventojus maistu⁴.



1.1 pav. Prognozuojamas mėsos ir pieno produktų poreikio augimas iki 2050 m. remiantis FAOSTAT duomenimis, pagal Boland ir kt. (2013)

⁴ <https://ec.europa.eu/info/funding-tenders/opportunities/portal/screen/opportunities/topic-details/bbi.2018.so3.f2>

⁵ https://ec.europa.eu/jrc/en/health-knowledge-gateway/promotion-prevention/nutrition/protein#_Toc44

Gyvūninės kilmės baltyminių produktų poreikio augimas yra iššūkis žemės ūkio pramonei, nes didžioji dalis užaugintų augalinių žaliavų yra sunaudojama pašarams (Li, 2013). Pavyzdžiui, Europa yra priklausoma nuo importuojamų gyvuliams šerti reikalingų baltymų – importuojama apie 70 % viso reikalingo kiekio, kuriam užauginti išnaudojama apie 60-70 % visos dirbamos žemės⁴. Akivaizdu, kad tokia mitybos grandinė nėra efektyvi. Paskaičiuota, kad jei reikiamas augalinių baltymų kiekis būtų tiesiogiai išgaunamas iš augalinės kilmės žaliavų, pasėlių auginimui reikėtų mažiau nei 10 % šiuo metu dirbamos žemės ploto (Li, 2013). Be to, gyvūninės kilmės baltyminių produktų sintezė reikalauja daugiau energijos ir vandens išteklių (Chardigny ir Walrand, 2016). Taigi, atsižvelgiant į gyvūninių baltyminių produktų poreikio augimą, pramonė yra skatinama ieškoti alternatyvių baltymų šaltinių (Lonnie ir kt., 2018). ES 2019 metais pradėtas vykdyti projektas „Alternatyvių ir atsinaujinančių šaltinių pritaikymas didelio masto baltymų, naudojamų maistui ir pašarams, gamybai“⁴. Šiuo metu pagrindine alternatyva yra laikomi augaliniai baltymai (Lonnie ir kt., 2018).

1.2 Kas yra maistiniai baltymai?

Viena iš svarbiausių žmogaus racioną sudarančių maistinių medžiagų yra baltymai (Wen ir kt., 2019). Baltymų svarbą mokslininkai pripažino jau XIX amžiaus pradžioje. Švedų chemikas Jöns Jacob Berzelius 1838 m. sukūrė terminą „baltymas“, kilusį iš graikų kalbos prōteios ir reiškiantį „esantis pirmoje vietoje“ (Koshland ir Haurowitz, 2019). Maistiniai baltymai aprūpina žmogaus organizmą aminorūgštimis, kurios yra būtinos organizmo augimui ir vystymuisi (Li-Chan ir Lacroix, 2018) bei yra svarbus azoto ir sieros šaltinis, nes azotas sudaro apie 16 % bendros baltymų masės. Azotas yra reikalingas nukleorūgščių, purinų, pirimidinų sintezei². Be to, maistinių baltymų teikiamos aminorūgštys yra energijos šaltinis (Case ir kt., 2011).

Jungtinių tautų maisto ir žemės ūkio organizacijos - FAO duomenimis septintadalis pasaulio gyventojų patiria badą ir net 1 milijardas žmonių vartoja nepakankamai baltymų (Chardigny ir Walrand, 2016). Esant nepakankamam baltymų kiekiui organizme, jaučiamas fizinis silpnumas, galvos svaigimas, sutrinka koordinacija bei padidėja sąmonės netekimo rizika (Brickley ir Ives, 2008; Wu, 2016). Mažas baltymų kiekis racione gali būti susijęs su prastu fiziniu pasirengimu ir raumenų silpnumu (Wu, 2016). Vaikystėje gali sutrikti augimas ar atsirasti sveikatos problemų (Hughes ir kt., 2011). Esant ypatingai žemai baltymų koncentracijai organizme, gali būti iššaukiama anemija, mažesnis organizmo atsparumas infekcinėms ligoms. Pakankamas baltymų kiekis skatina medžiagų apykaitą (Brickley ir Ives, 2008). Žinoma, kad baltyminiai produktai yra naudojami svorio kontrolėje (Ahnen ir kt., 2019).

Baltymai yra sudaryti iš aminorūgščių, kurios tradiciškai yra klasifikuojamos į pakeičiamas (NEAA) ir nepakeičiamas (EAA) aminorūgštis (1.2 pav.) (Hou ir kt., 2015).



1.2 pav. NEAA – pakeičiamos aminorūgštys ir EAA – nepakeičiamos aminorūgštys, pagal Hou ir kt. (2015)

Ypatingai svarbios yra EAA, kurių žmogaus organizmas nesintetina, todėl jos turi būti gaunamos su maistu (Elmadfa ir Meyer, 2017). EAA yra naudojamos daugelio mažos molekulinės masės junginių sintezėje, kurie atlieka svarbias fiziologines funkcijas, tokias kaip rūgščių ir šarmų pusiausvyros palaikymas, antioksidacinis aktyvumas, hormonų sintezė, genų ekspresija ir kt. (Hou ir kt., 2015). Be to, organizme baltymai yra sintetinami *de novo*, panaudojant aminorūgštis gautas su maistu, priešingai negu riebalai ir angliavandeniai, kurie yra kaupiami (Chardigny ir Walrand, 2016). Dėl didelio baltymų poreikio, maistiniai baltymai aprūpina žmogaus organizmą ir NEAA, kurios natūraliai gali būti sintetamos organizme (Wolfe ir kt., 2017). Esant NEAA trūkumui ir EAA pertekliui, pastarosios yra naudojamos sintezėje, siekiant panaikinti disbalansą, o tokia sintezė reikalauja didelių energetinių sąnaudų. Taigi, maistiniai baltymai turi aprūpinti organizmą tiek NEAA, tiek EAA (Elmadfa ir Meyer, 2017).

Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis rekomenduojama baltymų paros norma yra 0,83 g baltymų 1 kilogramui kūno svorio. Tačiau, priklausomai nuo amžiaus grupės bei fizinio aktyvumo, optimalus suvartojamų baltymų kiekis per parą gali skirtis (Ahnen ir kt., 2019). Nustatyta baltymų paros norma asmenims, sergantiems ūmiomis bei lėtinėmis ligomis, siekia 1,2-1,5 g baltymų/kg kūno svorio (Lonnie ir kt., 2018). Taip pat sportininkams ir žmonėms, turintiems intensyvių fizinį krūvį, būtinas maistinių baltymų kiekis viršija 0,83 g/kg (Chardigny ir Walrand, 2016). Šios rekomendacijos reikalingos palaikyti minimalų azoto kiekį organizme (Lonnie ir kt., 2018). Maistinių baltymų poreikis įvairių amžiaus grupių žmonėms pateiktas 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. Maistinių baltymų poreikis (g/kg kūno svorio), įvairių amžiaus grupių žmonėms, per parą, pagal Wu (2016) ir Lonnie ir kt. (2018)

Grupė	Amžius, metais	Baltymų kiekis, g/kg
Kūdikiai	0,3 - 0,5	1,31
	0,75 - 1,0	1,14
Vaikai	1 - 3	1,02
	4 - 8	0,92
Paaugliai	9 - 13	0,90
	14 – 18 (berniukai)	0,87
	14 – 18 (mergaitės)	0,85
Suaugusieji	≥ 19	0,83
	> 65	1,0-1,2

Baltymų kiekis nėra pagrindinis rodiklis, siekiant pilnai patenkinti organizmo baltyminius poreikius. Be galo svarbi ir baltymų kokybė. Pagrindinis maistinių baltymų kokybės rodiklis iki 2013 m. buvo PDCAAS, kuris yra paremtas EAA procentine dalimi baltymo sudėtyje (Chardigny ir Walrand, 2016). Kadangi organizmo aprūpinimas reikiamomis a.r. priklauso nuo jų biologinio prieinamumo, vertinant baltymo kokybę būtina atsižvelgti ne tik į bendrą kiekį baltymo sudėtyje, bet ir į kiekvienos a.r. ypatybes bei virškinamumą (Elmadfa ir Meyer, 2017). 2013 m. FAO paskelbė PDCAAS indekso atitikmenį DIAAS. Tai EAA virškinamumo balas, kuris yra paremtas ne tik baltymų procentine sudėtimi, bet ir organizmo sugebėjimu pasisavinti aminorūgštis, t.y. įvertinti jų virškinamumą plonojoje žarnoje. Akivaizdu, kad ypatingai vertinami lengvai virškinami baltymai, kuriuos organizmas pasisavina greičiau. Taigi, baltymų poreikis yra svarbus tiek kiekybiniu, tiek kokybiniu požiūriu (Chardigny ir Walrand, 2016).

1.3 Augalinės ir gyvūninės kilmės baltymų palyginimas

Žinoma, kad baltymai yra gyvybiškai svarbus mitybinis komponentas (Li-Chan ir Lacroix, 2018). Organizmą aprūpinti baltyminėmis medžiagomis galima vartojant augalinės ir gyvūninės kilmės produktus (Wen ir kt., 2019). Augalinių baltymų šaltiniai dažniausiai yra ankštiniai augalai bei grūdiniai produktai (Chardigny ir Walrand, 2016). Perdirbti augaliniai baltymai gali būti gaunami izoliato (90 % ir daugiau baltymų), koncentrato (apie 50-70 % baltymų) ar miltų (50 % ir mažiau baltymų) formomis (Wadhwa ir kt., 2014; Chardigny ir Walrand, 2016). Susidomėjimas augalinės kilmės baltymais auga dėl jų naudos sveikatai ir teigiamo poveikio aplinkai (Ahnen ir kt., 2019). Gyvūniniais baltymais yra laikomi mėsos ir pieno produktai, tačiau tokių baltymų ištekliai yra riboti (Chardigny ir Walrand, 2016). Baltymų mitybos raciono pasirinkimą lemia tai, kad augaliniai ir gyvūniniai baltymai pasižymi skirtingomis savybėmis (Lynch ir kt., 2018).

Bendrai, gyvūninės kilmės maisto produktuose yra didesnis baltymų kiekis, lyginant su augalinės kilmės produktais (Chardigny ir Walrand, 2016). Augaliniuose produktuose baltymų kiekis priklauso nuo augalo rūšies. Ankštiniuose augaluose yra daugiau baltymų, lyginant su

grūdiniams (Wadhvani ir kt., 2014). Kadangi, augaliniuose produktuose bendras baltymų kiekis yra mažesnis, norint aprūpinti organizmą reikiamomis a.r., turi būti suvartojamas didesnis kiekis augalinių medžiagų (Koshland ir Haurowitz, 2019). Tačiau baltymų kiekis yra ne pagrindinis rodiklis kalbant apie baltymų vartojimo svarbą žmogaus organizmui (Chardigny ir Walrand, 2016). Ankštinių augalų produktuose randamas minimalus kiekis riebalų, priešingai negu gyvūniniuose baltymuose. Ankštiniuose augaluose randama apie 20-30 % baltymų ir tik 3 % riebalų. Šios taisyklės išimtis yra avinžirniai, kurių sudėtyje yra maždaug 15 % riebalų. Įrodyta, kad vartojant neskaldytus grūdus, sumažėja kūno svoris bei cholesterolio kiekis kraujyje (Ahnen ir kt., 2019).

Augaliniai baltymai yra vandenyje tirpių skaidulų ir vitaminų šaltinis. Tai svarbus baltymų kokybės kriterijus, nes šiais laikais su maistu suvartojamų organizmui naudingų medžiagų kiekiai neatitinka rekomenduojamų normų, pavyzdžiui reikalingas vitaminų kiekis per dieną yra 25-30 g (Chardigny ir Walrand, 2016). Taip pat įrodyta, kad ankštiniai augalai savo sudėtyje turi daug kalio, magnio, seleno bei folio rūgšties (Ahnen ir kt., 2019).

Vieną svarbiausių augalinių baltymų struktūrinių privalumų lemia tai, kad augalai, skirtingai negu gyvūnai, gali sintetinti visas aminorūgštis. Gyvūnai, įskaitant ir žmogų, gauna organines maistines medžiagas iš aplinkos (Koshland ir Haurowitz, 2019). Pastebėta, kad gyvūninės kilmės baltymų a.r. sudėtis yra artimesnė žmogaus organizme esančiai aminorūgščių įvairovei ir yra panaši į žmogaus audiniuose esančių baltymų proporcijas (Elmadfa ir Meyer, 2017). Akivaizdu, kad gyvūninių baltymų a.r. sudėtis nevisapusiškai patenkina žmogaus organizmo poreikius - kūno baltymų sintezei reikia visų aminorūgščių pusiausvyros. Tačiau grūdų baltymuose yra tik nedidelis kai kurių nepakeičiamų a.r. kiekis. Grūduose paprastai trūksta lizino. Ankštinių augalų baltymuose yra mažai sieros a.r., kurių yra daug grūdiniuose augaluose. Teigiama, kad tinkamas augalinės kilmės baltyminių maisto produktų derinys, galintis kompensuoti tam tikrų a.r. trūkumą, yra vienas geriausių raciono sprendimų (Chardigny ir Walrand, 2016). 1.2 lentelėje pateikta EAA sudėtis (mg/g baltymų) gyvūniniuose ir augaliniuose baltymuose bei FAO paskelbti rekomenduotini EAA kiekiai kūdikiams ir suaugusiems.

1.2 lentelė. EAA kiekis karvės pieno ir sojų pupelių baltymuose bei FAO paskelbtos rekomenduotinos normos, pagal Elmadfa ir Meyer (2017). SAA – sierą turinčios a.r.; AAA – aromatinės a.r.

Baltymai	Aminorūgštys (mg/g)								
	His	Ile	Leu	Lys	SAA	AAA	Thr	Trp	Val
Karvės pienas	27,0	60,0	97,3	78,8	33,9	95,8	44,8	13,9	66,7
Sojų pupelės	30,1	54,0	90,7	74,1	32,9	100,3	48,4	16,2	55,6
FAO reikalavimai kūdikiams	21,0	55,0	96,0	69,0	33,0	94,0	44,0	17,0	55,0
FAO reikalavimai vaikams > 3 m. ir suaugusiems	16,0	30,0	61,0	48,0	23,0	41,0	25,0	6,6	40,0

Nustatyta, kad nemažai augalinių baltymų pasižymi dideliu atsparumu virškinimo trakte esančioms proteazėms dėl specifinių struktūrinių savybių. Taip pat teigiama, kad ankštinių baltymų struktūrinis stabilumas daro įtaką skilimui *in vitro* ir aminorūgščių prieinamumui (Carbonaro ir kt., 2015). Augaliniai baltymai yra mažiau biologiškai prieinami dėl taninų, lektinų ar proteazės inhibitorių, esančių augalinių baltymų sudėtyje, kuriems yra reikalingas perdirbimas, kad būtų sumažintas jų neigiamas poveikis. Baltymų prieinamumą taip pat mažina augalų ląstelių sienelės, kurios žmogaus virškinimo trakte yra nepilnai suvirškinamos dėl fermentų, gebančių skaidyti celiuliozę, trūkumo (Elmadfa ir Meyer, 2017). Augaliniai baltymai, kurių sudėtyje yra didelis kiekis cisteino, yra gana atsparūs temperatūros pokyčiams (denatūracijai) bei proteolitinam skaidymui. Stabilumą lemia didelis kiekis disulfidinių jungčių (Carbonaro ir kt., 2015). Gyvūniniai maistiniai baltymai yra virškinami lengviau (Elmadfa ir Meyer, 2017). Akivaizdu, kad augaliniai baltymai nėra plačiai naudojami dėl sudėtingo augalinių žaliavų apdorojimo, kurį lemia baltymo struktūra, prastas a.r. prieinamumas bei technologijų trūkumas. Tačiau augaliniai baltymai laikomi potencialiu šaltiniu aukštos kokybės baltyminių produktų gavimui (Wadhvani ir kt., 2014). 2015 m. patariamasis mitybos komitetas (*angl.* Dietary Guidelines Advisory Committee) pateikė mokslinę ataskaitą, kurioje buvo rekomenduojama padidinti augalinių maisto produktų, tokių kaip grūdai bei ankštiniai augalai vartojimą (Ahnen ir kt., 2019).

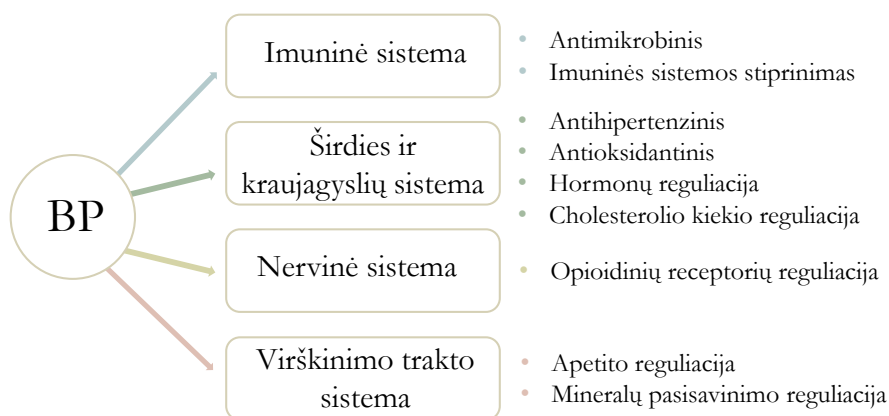
1.4 Augalinių baltymų hidrolizatai

Daugumos augalinių baltymų panaudojimą, kaip maistinių ingredientų, riboja jų struktūrinės savybės, lemiančios prastą tirpumą vandeninėse sistemose. Peptidinių jungčių skilimas hidrolizės reakcijų metu sąlygoja baltymo molekulinės masės sumažėjimą bei joninių grupių skaičiaus padidėjimą – veiksnius, palengvinančius baltymo molekulės tirpumą (Wouters ir kt., 2016). Toks augalinių baltymų modifikavimas juos hidrolizuojant, leidžia patobulinti maistinių baltymų funkcines savybes bei padeda pašalinti antimaistinius komponentus (Merz, 2015; Marinova ir kt., 2008).

Baltymų hidrolizatai yra naudojami funkcinio maisto gamyboje (Gavrilova ir kt., 2019). Terminas „funkcinis maistas“ apima maisto ir farmacijos pramonę; 1989 m. Jungtinėse Amerikos Valstijose, Stephen De Felice sąvoka „funkcinis maistas“ apibrėžė maistą ar maisto dalis, teikiančias naudą sveikatai, įskaitant ligų prevenciją (Carbonaro ir kt., 2015). Funkcinis maistas yra tinkamas įvairių gyventojų grupių vartojimui, pavyzdžiui, sportininkams, žindančioms ir nėščioms moterims, senyvo amžiaus žmonėms, vaikams (Gavrilova ir kt., 2019). Baltymų hidrolizatai naudojami maisto papildų, svorio kontrolės produktų ar net energetinių gėrimų gamyboje (Merz, 2015). Tačiau prioritetą teikiamas pacientams, turintiems

virškinimo sutrikimų ar ūmines bei lėtines kepenų ligas, tokias kaip Krono liga, pankreatitas, opinis kolitas ir kt. (Nguyen ir kt., 2015). Žinoma, kad baltymų hidrolizatai, kurių sudėtyje dominuoja dipeptidai ir tripeptidai bei laisvos aminorūgštys yra daug lengviau absorbuojami organizme, todėl vienas iš svarbiausių maisto pramonėje išsikeltų tikslų yra produktų, pasižyminčių lengvu virškinamumu, gamyba, kurie gali būti taikomi pacientams, turintiems maitinimosi sunkumų, pavyzdžiui tam tikrų traumų ar nudegimų atvejais (Merz, 2015; Gavrilova ir kt., 2019; Clemente, 2000). Taigi, baltymų hidrolizatai yra naudojami kaip papildomi maistiniai komponentai ir/ar kaip visavertė mityba (Merz, 2015).

Daugelis funkcinų baltymų savybių priskiriama biologiškai aktyviems peptidams (Rizzello ir kt., 2016). Bioaktyvūs peptidai (BP) yra mažos molekulinės masės molekulės, sudarytos iš 2-20 a.r. liekanų, bet kai kuriais atvejais a.r. skaičius gali būti didesnis (Marciniak ir kt., 2018). BP molekulinė masė yra mažesnė kaip 6000 Da. Peptidai natyvaus baltymo sekose yra neaktyvūs, tačiau atpalaiduojami fermentinės hidrolizės metu tampa bioaktyvūs. Organizme tokie peptidai absorbuojami žarnyne ar tiesiogiai patenka į kraują, o tai užtikrina jų biologinį prieinamumą *in vitro* ir fiziologinį poveikį tikslinėje vietoje (Karami ir Akbari-Adergani 2019). Teigiama, kad tokie hidrolizatai yra kur kas naudingesni ir pasižymi didesne maistine verte nei laisvųjų a.r. mišiniai (Nguyen ir kt., 2015). BP peptidų fiziologinis aktyvumas pateiktas 1.3 pav.



1.3 pav. Bioaktyvių peptidų fiziologinis aktyvumas, pagal Marciniak ir kt. (2018)

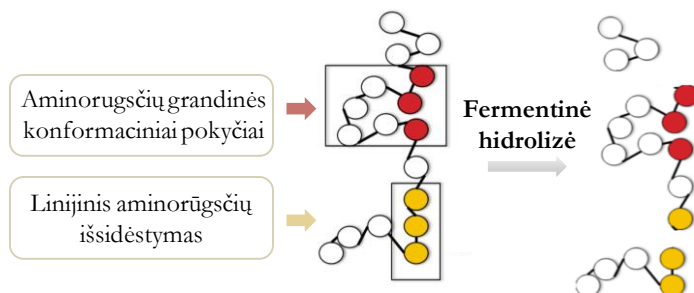
Kita svarbi visuomenės problema yra maisto netoleravimas, pasireiškiantis alerginėmis reakcijomis (Bychkov ir kt., 2019). Augalinių baltymų sudėtyje dažnai randama alergijas sukeliančių ar kitų antimaistinių medžiagų. Tokie veiksniai apriboja augalinių baltymų praktinį pritaikymą. Pavyzdžiui, neapdoroti augaliniai baltymai sukelia celiakiją (Hou ir kt., 2017), tai autoimuninis sutrikimas, kurį lemia per didelis imuninis atsakas į kviečių, miežių, rugių baltymą gliuteiną, pažeidžiantį plonosios žarnos audinius (Merz, 2015). Siekiant pašalinti antimaistinius komponentus, baltymai yra hidrolizuojami (Hou ir kt., 2017). Be to, baltymų hidrolizatai naudojami kaip hipoalerginiai mišiniai kūdikiams (Merz, 2015).

Hidrolizės reakcijos taip pat yra naudojamos sustiprinti baltymų skonio savybes, pagerinti putojimą, emulsiškumą, brinkimą ir kt. (Esteghlal ir kt., 2019). Peptidų skonio savybės priklauso nuo aminorūgščių sudėties (Sun, 2011). Pvz., D-asparaginas suteikia baltyminiams produktams kartumo, o L-asparaginas - saldumo pojūčius (Chajjamrus, 2002).

Taigi, baltymų hidrolizatų panaudojimas specifiniams preparatams yra augančio susidomėjimo sritis (Clemente, 2000). Nors dauguma medicininėms reikmėms skirtų hidrolizatų yra gaunami iš pieno baltymų, tačiau augaliniai baltymai tampa vis svarbesniu maistinių baltymų šaltiniu (Merz, 2015).

1.5 Augalinės kilmės žaliavų apdorojimo („pre-treatment“) svarba

Atsižvelgiant į baltyminio substrato struktūrinį sudėtingumą, sunku pasiekti optimalias fermentinės hidrolizės sąlygas dėl ribotos fermento ir substrato sąveikos (Marciniak ir kt., 2018). Nustatyta, kad sojos baltymai bei dauguma kitų augalinių baltymų yra gana atsparūs fermentinei hidrolizei dėl ypatingai glaudžios jų ketvirtinės, tretinės ar antrinės struktūros. Dėl šios priežasties didžioji dalis peptidinių jungčių yra sunkiai prieinamos proteazėms (Ozuna ir kt., 2015). 1.4 pav. pateikta grafinė iliustracija vaizduoja a.r. grandinės konformacijos svarbą fermentinės hidrolizės metu (Marciniak ir kt., 2018).



1.4 pav. Fermentinės hidrolizės efektyvumo ir aminorūgščių grandinės susilankstymo priklausomybė ⁶

Augalinės kilmės baltyminių hidrolizatų gamybos metu rekomenduojama atlikti išankstinį apdorojimą, siekiant sutrikdyti baltymo molekulės konformaciją, pažeidžiant tarpmolekulinius ir vidumolekulinius ryšius, ir taip atveriant peptidines jungtis, kurias gali skaidyti proteazės. Tokiu būdu, palengvinus fermento prieinamumą, atitinkamai didėja ir hidrolizės laipsnis (DH), tai yra suskaldytų peptidinių jungčių dalis, lyginant su bendru tokių jungčių kiekiu baltymo molekulėje (Hou ir kt., 2017, Pan ir kt., 2016). Daug dėmesio skiriama pramoninio proceso, kuris apjungtų baltymo molekulės modifikacijas, greitą hidrolizę ir mažą fermentinio preparato kiekį, optimizavimui. Literatūroje pateikiami apdorojimo metodai, paremti aukštu slėgiu, ultragarsu ar mikrobangomis (Marciniak ir kt., 2018).

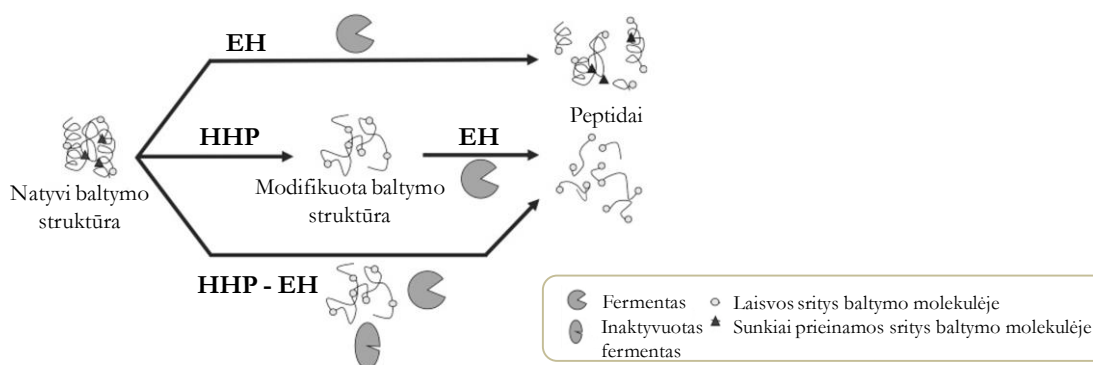
⁶ <https://ppic.cfans.umn.edu/research/current-research-projects>

Aukšto hidrostatinio slėgio (HHP) technologija yra švelnus neterminis metodas plačiai taikomas maisto perdirbimo pramonėje ar laboratorijose, siekiant modifikuoti maistinių baltymų fizikines ir chemines savybes (Zhao ir kt., 2018). Naudojant HHP paveikiami kovalentiniai ir silpni cheminiai ryšiai, lemiantys baltymų susilankstymą (1.6 pav) (Marciniak ir kt., 2018; Esteghlal ir kt., 2019). Modifikacijos metu nėra pridama jokių cheminių medžiagų į mišinį (Pan ir kt., 2016). Dėl šios priežasties HHP skatina natūralią baltymo denatūraciją ir moduliuoja baltymo-baltymo bei baltymo-tirpiklio sąveiką. Kadangi, HHP poveikis nedaro įtakos baltymo pirminei struktūrai, ji lieka nepakitusi. HHP veikia baltymų antrinę struktūrą, o struktūrinės modifikacijos gali būti grįžtamos ir negrįžtamos, priklausomai nuo slėgio parametrų ir baltymų savybių. Apdorojimas žemu slėgiu (< 400 MPa) padidina vandenilinių jungčių skaičių, o aukštas slėgis (> 400 MPa) jas ardo (1.5 pav.) (Marciniak ir kt., 2018).



1.5 pav. Aukšto ir žemo slėgio poveikis baltymo molekulę stabilizuojantiems silpniems cheminiams ir kovalentiniams ryšiams, pagal Marciniak ir kt. (2018)

Nustatyta, kad fermentinės hidrolizės metu, veikiant augalinės kilmės baltyminių tirpalą aukštu slėgiu, stebimas DH augimas (Sun, 2011). HHP padidina mažos molekulinės masės peptidų kiekį. Veikiant baltymus aukštu slėgiu, vyksta natyvos baltymo struktūros modifikacijos ir taip yra padidinamas substrato jautrumas fermentinei hidrolizei. 1.6 paveiksle yra pateiktas fermentinės hidrolizės efektyvumas (EH), kaip pirminę modifikaciją naudojant HPP, aukšto hidrostatinio slėgio veikiamą fermentinę hidrolizę (HHP-EH), bei baltymo hidrolizę, kada nėra taikoma HPP modifikacija (EH) (Marciniak ir kt., 2018).



1.6 pav. Maistinių baltymų fermentinės hidrolizės (EH) modifikavimo mechanizmai, naudojant aukštą hidrostatinį slėgį, kaip pirminį apdorojimą (HPP) ar vykdant abu procesus vienu metu (HPP-EH), pagal Marciniak ir kt. (2018)

Pastebėta, kad aukšto slėgio modifikacijos metu HHP-EH gali vykti proteazių inaktyvacija, lemianti proceso efektyvumo sumažėjimą. Baltymų apdorojimas aukštu slėgiu prieš fermentinę hidrolizę yra veiksminga, novatoriška ir ekologiška strategija, siekiant gauti efektyvią augalinių baltymų hidrolizę (Marciniak ir kt., 2018).

Kita naudojama technologija, augalinių baltymų fermentinės hidrolizės efektyvumui padidinti yra aukšto intensyvumo ultragarsas (HIU), kuriuo paveikus baltymo molekulę kinta baltymo konformacija, yra suardomi vandeniliniai ryšiai ir hidrofobinės sąveikos, o tai reiškia kad yra sutrikdoma tretinė ir ketvirtinė baltymo struktūra (Cheng ir kt., 2019). Nustatyta, kad sojos baltymų izoliato tirpalą, veikiant 15 min, 400 W galios ultragarsu, kartu su kontroliuojama papaino hidrolize, stipriai padidėjo substrato tirpumas. Taigi, veikiant ultragarsu, taip pat yra sukeltos struktūrinės baltymo modifikacijos, fermentas lengviau gali pasiekti peptidines jungtis, padidėja hidrolizės laipsnis ir biologinis aktyvumas (Ozuna ir kt., 2015).

Gohi ir kt. (2019) paskelbė naują augalinės kilmės baltymų apdorojimo būdą – tai modifikavimas mikrobangomis. Šildant baltymus mikrobangų krosnelėje baltymo molekulės struktūra yra modifikuojama, suardoma antrinė ir tretinė struktūros. Molekulės pakitimai priklauso nuo mikrobangų lauko intensyvumo. Atlikti tyrimai stebint mikrobangų įtaką lotoso sėklų baltymų fermentinės hidrolizės efektyvumui. Baltymai buvo veikiami 120 s, 800 W galios mikrobangomis. Nustatytos optimalios apdorotų baltymų hidrolizės sąlygos: baltymų koncentracija - 15 g/l, pH 5,5, temperatūra - 57 °C, o hidrolizės trukmė - 45 min. Modifikuotų baltymų DH padidėjo net 35,64 %. Akivaizdu, kad naudojant mikrobangas pasiekiamas aukštas hidrolizės efektyvumas, tačiau literatūroje pateikiama mažai išsamesnių duomenų apie mikrobangų taikymą baltymų hidrolizei (Gohi ir kt., 2019).

Modifikuotos struktūros baltymų fermentinės hidrolizės metu gali būti gaunamas aukštesnis DH laipsnis, proceso metu reikalingos mažesnės vandens, tačiau didesnės energijos sąnaudos, lyginant su įprastine fermentine hidrolize. Taip pat aukštas slėgis, ultragarsas ar mikrobangos gali neigiamai paveikti fermentinio preparato struktūrą ir jo aktyvumą hidrolizės metu (Gohi ir kt., 2019; Ozuna ir kt., 2015).

1.6 Augalinių baltymų hidrolizės būdai ir jų ypatumai

Baltymuose, skylant peptidinėms jungtims, susidaro įvairaus ilgio peptidų ir laisvų a.r. mišinys, kuris gali būti apibūdinamas hidrolizės laipsniu (DH) (Nguyen ir kt., 2015). DH yra viena iš svarbiausių baltymų hidrolizatų savybių (Merz, 2015). Augalinių baltymų hidrolizatai gaunami cheminės arba fermentinės hidrolizės metu (Clemente, 2000).

Cheminė hidrolizė atliekama rūgštinėmis arba šarminėmis sąlygomis (Merz, 2015). Rūgštinė yra seniausiai žinomas hidrolizės metodas (Sonawane ir Arya, 2017). Prancūzų

chemikas H. Branconnot jau 1920 m. aprašė baltymų hidrolizės metodą, kurio metu gali būti naudojamos HCl arba H₂SO₄. Šarminė hidrolizė yra vykdoma naudojant NaOH, KOH arba Ca(OH)₂ (Hou ir kt., 2017). Cheminės hidrolizės metu gali būti suskaidomi net visi peptidiniai ryšiai, esantys baltymo molekulėje ir gaunamas hidrolizatas, kurį 100 % sudaro laisvos a.r. (Colla ir kt., 2015). Nustatyta, kad visišką baltymo hidrolizę galima įvykdyti per 24 val, apdorojant izoliatą 6 M HCl tirpalu, 110 °C temperatūroje. Šarminė hidrolizė, siekiant suhidrolizuoti baltymus iki a.r., turėtų būti vykdoma 20 val, 105 °C temperatūroje ir naudojant šarmines medžiagas (Hou ir kt., 2017). Baltymus veikiant silpna rūgštimi ar šarmu ir žema temperatūra, įvyksta dalinė baltymų hidrolizė, kurios metu susidaro mažos bei didelės molekulinės masės peptidai (Sonklin ir kt., 2011). Peptidų, taikomų maisto pramonėje sintezei, paprastai naudojama 27-55 °C temperatūra ir trumpesnis hidrolizės laikas apie 4-8 val. Akivaizdu, kad cheminės reakcijos pasižymi mažu specifiskumu, todėl hidrolizės laipsnis yra sunkiai kontroliuojamas (Hou ir kt., 2017; Colla ir kt., 2015). Be to, optimalus hidrolizės laikas gali skirtis priklausomai nuo hidrolizuojamo baltymo struktūros (Chaijamrus, 2002).

Alternatyvus baltymų hidrolizės metodas, kurio metu nereikalingi dideli cheminių medžiagų kiekiai, reikalingos mažos energijos sąnaudos bei nesusidaro pašalinių medžiagų, kurias sunku pašalinti, yra fermentinė hidrolizė (Scott ir kt., 2014), pavyzdžiui, puikiai vykstanti neaukštoje 40-60 °C temperatūroje ir pH 6-8 (Clemente, 2000). Fermentinės hidrolizės metu gali būti naudojamas vienas fermentas ar tam tikrų fermentų mišinys. Hidrolizės parametrai, tokie kaip temperatūra, pH, buferinio tirpalo tipas ir koncentracija turi būti optimizuoti ir pritaikyti kiekvienam baltyminiam substratui ir fermentui ar fermentų mišiniui, siekiant užtikrinti efektyvų procesą (Rizzello ir kt., 2016). Buferinis tirpalas apsaugo nuo per didelių pH pokyčių, nes siekiant užtikrinti optimalų fermento aktyvumą, turi būti išlaikytas reikiamas tirpalo pH lygis (Sun, 2011; Aluko, 2018). Be to, fermentai pasižymi dideliu specifiskumu substratui, todėl sintetinat hidrolizatą, galima kontroliuoti hidrolizės laipsnį bei hidrolizato sudėtį (Merz, 2015). Pavyzdžiui, jei hidrolizuojamo baltymo molekulėje yra daug hidrofobinių a.r., siekiant gauti kuo aukštesnį hidrolizės laipsnį, fermentas turėtų būti pasirenkamas atsižvelgiant į jo specifiskumą šioms aminorūgštims. Kiekvieno proteolitinio fermento specifiskumas nurodo peptidines jungtis baltymo molekulėje, kurios bus suskaidomos (Hou ir kt., 2017). Pavyzdžiui, pepsinas skelia peptidines jungtis a.r. grandinėje ties fenilalaninu ar leucinu, papainas - ties lizinu ir fenilalaninu, pankreatinas - ties argininu, lizinu, tirozinu, triptofanu, fenilalaninu ir leucinu (Colla ir kt., 2015). Hrčkova M. ir kt. (2002) atliko sojų miltų hidrolizę, kurios metu buvo naudojamos skirtingos komercinės proteazės - Flavourzyme 1000 L, Novozym FM 2.0 L ir Alcalase 2.4 L FG. Nepaisant to, kad atskirai hidrolizuojant su kiekvienu iš šių fermentų sojų miltų hidrolizės laipsnis nebuvo labai aukštas, tačiau naudojant

šių proteazių mišinį, turinčių skirtingą specifiškumą, stebimas ženklus hidrolizės laipsnio padidėjimas. Akivaizdu, kad hidrolizuojant pasirinktą baltymą yra labai svarbus proteazių specifiškumas ir a.r. sudėtis baltymo molekulėje (Tavano, 2013). Skirtingų augalinių baltymų a.r. sudėtis pateikta 1.3 lentelėje.

1.3 lentelė. Aminorūgščių sudėtis liucernos ir sojų baltymuose g/100 g baltymų, pagal Colla ir kt. (2015)

Aminorūgštis	Liucernos baltymai	Sojų baltymai
Alaninas (<i>ALA</i>)	5,4	3,9
Argininas (<i>ARG</i>)	4,3	6,4
Asparto rūgštis (<i>ASP</i>)	15,5	11,1
Cisteinas (<i>CYS</i>)	2,2	1,4
Glutamo rūgštis (<i>GLU</i>)	8,2	18,3
Glicinas (<i>GLY</i>)	5,1	4,5
Histidinas (<i>HIS</i>)	3,9	2,6
Izoleucinas (<i>ILE</i>)	4,6	4,2
Leucinas (<i>LEU</i>)	8,1	8,0
Lizinas (<i>LYS</i>)	5,9	6,6
Metioninas (<i>MET</i>)	1,8	1,4
Fenilalaninas (<i>PHE</i>)	4,5	5,5
Prolinas (<i>PRO</i>)	9,4	5,2
Serinas (<i>SER</i>)	4,6	5,9
Treoninas (<i>THR</i>)	4,5	3,8
Triptofanas (<i>TRP</i>)	1,7	1,4
Tirozinas (<i>TYR</i>)	4,3	4,3
Valinas (<i>VAL</i>)	6,0	5,5

Cheminės hidrolizės metu gaunami mažesnės maistinės vertės produktai, lyginant su fermentine hidrolize (Clemente, 2000). Hidrolizuojant baltymus stipriomis rūgštimis ar šarmais visiškai prarandamos/sunaikinamos tam tikros aminorūgštys. Cheminės hidrolizės metu susidaro dideli glutamino, asparagino ir triptofano a.r. nuostoliai (Chaijamrus, 2002), nes glutaminas ir asparaginas yra atitinkamai paverčiami į glutamo ir asparto a.r. (Merz, 2015). Triptofanas yra visiškai sunaikinamas įprastinėmis proceso sąlygomis – baltymus veikiant 6 M HCl 24 val, 110 °C temperatūroje. Rūgštinės hidrolizės metu triptofano nuostoliai gali būti sumažinti naudojant mažesnės koncentracijos HCl ir keliant temperatūrą nuo 100 °C iki 125 °C, o pH nuo 6 iki 7. Kitos a.r., ilgėjant hidrolizės trukmei, gali būti taip pat sunaikinamos. Rūgštinės hidrolizės metu treoninas ir serinas mažėja palaipsniui (Chaijamrus, 2002). Vykstant šarminei hidrolizei, gali būti sumažinamas cisteino, arginino, treonino, serino, izoleucino ir lizino kiekis bei susidaryti toksiški peptidai, tokie kaip lizino-alaninas (Tavano, 2013). Be to, cheminė hidrolizė yra sunkiai kontroliuojamas procesas, kurio metu susidaro modifikuotos aminorūgštys – a.r. enantiomerai, t.y. L-formos a.r. gali būti pakeičiamos D-formos a.r., kurios yra biologiškai neaktyvios. Žinoma, kad natūraliai organizmuose gali būti sintetamos tik L-formos a.r. (McCarthy ir kt., 2013; Clemente, 2000). Įprastinėmis rūgštinės hidrolizės sąlygomis gaunamas hidrolizatas, kurį sudaro 50 % L-aminorūgštys ir 50 % D-aminorūgštys (Chaijamrus, 2002). Toks a.r. hidrolizatas gali būti toksiškas, o gyvi organizmai pasisavina tik

50 % aminorūgščių. Taip pat, cheminio proceso metu gali būti sunaikinami kiti karščiui jautrūs junginiai, tokie kaip vitaminai (Colla ir kt., 2015; Chaijamrus, 2002). Vienas iš būdų, siekiant sumažinti a.r. nuostolius ir išvengti toksiškų junginių susidarymo, yra naudoti fermentinę hidrolizę (Colantoni ir kt., 2017). Fermentinė hidrolizė yra kontroliuojamas procesas, kurio metu vyksta reakcijos pasižyminčios dideliu specifiskumu substratui, todėl yra eliminuojama toksiškų produktų – D-aminorūgščių - susidarymo galimybė (Chaijamrus, 2002). Taigi, fermentinės hidrolizės metu iš augalinių žaliavų gaunami aukštos kokybės hidrolizatai, pasižymintys tokia pačia a.r. sudėtimi kaip ir pirminė baltymo molekulė, ir yra išsaugomos visos baltymų maistinės savybės (Colantoni ir kt., 2017; Hou ir kt., 2017; Wouters ir kt., 2016).

Fermentinė hidrolizė yra ir ekologiškesnis bei ekonomiškesnis procesas, lyginant su chemine hidrolize, dėl mažo energijos poreikio, minimalaus šalutinių produktų susidarymo bei į aplinką išmetamo anglies dioksido kiekio (Colla ir kt., 2015). Rūgštinė hidrolizė, kurios metu yra naudojama druskos rūgštis (HCl) yra neutralizuojama NaOH. Neutralizacijai reikalingas didelis šarminių medžiagų kiekis, o galutinėje hidrolizato sudėtyje susidaro didelė neorganinių druskų koncentracija (Chaijamrus, 2002; Scott ir kt., 2014). Hidrolizatų, gautų rūgštinės hidrolizės būdu, sudėtyje randama iki 40 % druskų (Sonklin ir kt., 2011). Susidariusios druskos yra laikomos atliekomis, todėl atlikus rūgštinę hidrolizę vykdomas gryninimas, siekiant iš mišinio atskirti NaCl. Toks gryninimo procesas reikalauja didelių energijos sąnaudų (Scott ir kt., 2014). Fermentinės medžiagos yra lengvai inaktyvuojamos, keliant temperatūrą ar keičiant tirpalo pH, siekiant sustabdyti reakciją (Hou ir kt., 2017). Colantoni A. ir kt. (2017) įvertino fermentiniu ir cheminiu būdu susintetintų baltymų hidrolizatų gamybos proceso energijos suvartojimą ir poveikį aplinkai (1.4 lentelė). Rezultatai pateikti sunaudojamo iškastinio kuro energija MJ, siekiant suhidrolizuoti 1 kg baltymų; reikalingu vandens kiekiu kg/1 kg baltymų bei išmetamu CO₂ kiekiu g/1 kg baltymų. Kaip baltyminis substratas buvo naudojamas lubinų sėklų baltymų koncentratas fermentinės hidrolizės metu ir kolagenas cheminės hidrolizės metu. Fermentinė hidrolizė buvo vykdoma 60 °C temperatūroje, naudojant „Novozyme“ komercines proteazes. Cheminė hidrolizė buvo atliekama su HCl rūgštimi, esant 130 °C temperatūrai. Nustatytų parametrų rezultatai fermentinės hidrolizės ir cheminės hidrolizės metu, pateikti 1.4 lentelėje.

1.4 lentelė. Fermentinės ir cheminės hidrolizės metu sunaudojamos energijos, vandens bei išskiriamos į aplinką CO₂ emisijos kiekis, pagal Colantoni ir kt. (2017)

	Iškastinio kuro energija (MJ/kg)	CO ₂ emisija (g/kg)	Vanduo (kg/kg)
Fermentinė hidrolizė	3,6	215,9	11,7
Cheminė hidrolizė	17,2	874,5	59,7

Akivaizdu, kad fermentinė hidrolizė reikalauja mažesnių iškastinio kuro ir vandens sąnaudų bei susidaro mažesnis CO₂ emisijos kiekis proceso metu, lyginant su chemine hidrolize. Toki

dėsningumą lemia skirtingos hidrolizės sąlygos – cheminei hidrolizei reikalinga aukštesnė temperatūra, kuriai palaikyti naudojamas slėgis bei didesnė cheminių medžiagų koncentracija (Colantoni ir kt., 2017). Taigi, fermentinės hidrolizės metu yra gaunami grynesni produktai, sumažinami kaštai bei neigiamas poveikis aplinkai (Tavano, 2013).

Akivaizdu, kad maisto pramonėje fermentinės hidrolizės pritaikymas yra nuolat skatinamas, nes galutinis hidrolizatas nėra užteršiamas druskomis ar toksiškomis medžiagomis, o pats procesas yra ekologiškas, bei reikalaujantis nedidelių energijos sąnaudų, lyginant su chemine hidrolize (Rizzello ir kt., 2016). Tačiau, fermentinė hidrolizė gali sukelti tam tikrų sunkumų, tokių kaip fermento struktūros nestabilumas, mažas reakcijos greitis, žemas jautrumas substratui. Santykinai maži substrato struktūros pokyčiai gali slopinti proteazių aktyvumą (Tavano, 2013). Svarbu paminėti, kad kiekvienu individualiu atveju būtina nustatyti optimalias proceso sąlygas (McCarthy ir kt., 2013). Taip pat fermentinė hidrolizė reikalauja didelio kiekio fermentinių medžiagų, o tikslas atlikti viso baltymo hidrolizę, naudojant vieną proteazę vis dar yra nepasiekiamas. Tokie veiksniai apriboja fermentinio proceso praktinį pritaikymą pramonėje, siekiant suhidrolizuoti augalinius baltymus (Scott ir kt., 2014; Tavano, 2013). Taigi, fermentinė augalinių baltymų hidrolizė, pramoniniu mastu, vis dar išlieka plačia tyrimų sritimi (Hou ir kt., 2017).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Prietaisai ir priemonės

- Laminarinė traukos spinta „Flow Fast H“
- Laboratorinės svarstyklės „Kern EG“ ir „Kern ABJ“ (analitinės svarstyklės)
- Centrifugos „Eppendorf 5424R“ (rotorius r = 84 mm) ir „MIKRO 220R“ (rotorius r = 98 mm)
- Termostatinės vandens vonelės „Julabo TW8“ ir „Thermo Haake P5“
- Magnetinės maišyklės „Biosan MMS-3000“, „Fisherbrand isotemp“, „IKA RT 10“ (daugiavietė magnetinė maišyklė), „IKA C-MAG“ su termopora „IKA ETS“ ir magnetai
- Maišyklė „IKA MS 3 basic“
- pH-metras „Mettler Toledo“
- Spektrofotometras „Analytik Jena Spekol 2000“ ir stiklinė kiuvetė
- Purtyklė „Heidolph Vibramax 100“
- Vertikalios elektroforezės aparatas ir reguliuojamos nuolatinės įtampos šaltinis „Biometra P25T“
- Automatinės pipetės „Tipor-V“ ir „Eppendorf“
- Dujinis degiklis
- Termostatuojami inkubatoriai „BINDERE28“, „BiosanES20“, „IKA KS4000icontrol“
- Mikrobangų krosnelės „Daewoo“ ir „Scarlett“
- Traukos spinta „SCALA 1200“
- Dujų chromatografas „Shimadzu GC-2010“
- Ultragarso aparatas „BRANSON 2510“

2.2 Naudotos medžiagos ir tirpalai

2.2.1 Tyrimo objektas

Tyriamasis objektas – augaliniai liucernos miltai (LM). Tai žalsvos spalvos biri medžiaga, kurios sudėtyje yra 44 % baltymų, 19,6 % angliavandenių, 18 % pluošto, 10,7 % cukrų, 7,7 % riebalų. Gauta iš UAB Biomica (gamintojas Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)).

2.2.2 Fermentai

2.1 lentelė. Tyrimo metu naudojami komerciniai fermentai, jų aktyvumas ir gamintojas.

Fermentas	Fermentinis aktyvumas	Gamintojas
Vilzim Deter MIXD 520/180 D	Amilazinis ir proteazinis	„Biorro“
Vilzim PRO dry	Proteazinis	„Biorro“
Vilzim PRO conc dry	Proteazinis	„Biorro“
Vilzim AMY Tex L	Amilazinis	„Biorro“
Glucozyme L 300	Gliukoamilazinis	„Biorro“
Vilzim LPS L	Lipazinis	„Biorro“
Vilzim NSP	Ksilanazinis, celiulazinis, gliukanazinis, manazinis, pektinazinis ir galaktozidazinis	„Biorro“
Vilzim DETER MAX L	Proteazinis	„Biorro“

2.2.3 Proteazių aktyvumo nustatymo tirpalai

BB9 buferis. Atsveriamas 5,592 g KCl, 10 g Na₂SO₃, 1,546 g B(OH)₃ ir tirpinama 400 ml dH₂O, ant magnetinės maišyklės, kambario temperatūroje. pH privedamas iki 9, naudojant NaOH tirpalą ir buferis skiedžiamas iki 500 ml su dH₂O. Paruošto BB9 buferio galiojimo laikas yra 7 dienos, laikant šaldytuve (+4 °C).

TNBS reagentas. 10 ml 0,1 % 2,4,6-trinitrobenzeno sulfoninės rūgšties (TNBS) tirpalui pagaminti imama 0,2 ml 5 % TNBS tirpalo ir skiedžiama dH₂O iki 10 ml. TNBS reagentas turi būti ruošiamas šviežiai prieš atliekant eksperimentą ir laikomas tamsiame inde.

0,4 % N,N - dimetilkažeino (DMC) substrato tirpalas. Atsveriamas 0,2 g DMC ir ištirpinama 10 ml verdančiame dH₂O. Tirpalas maišomas ant magnetinės maišyklės, kaitinant 20 min, kol ištirpsta DMC, po to atvėsinamas iki kambario temperatūros. Lygiagrečiai ruošiama 20 ml tirpalo, kuriame yra 1,62 g Na₂B₄O₇ × 10H₂O ir 0,8315 g NaH₂PO₄ × 2H₂O, pH privedamas iki 8 naudojant NaOH. Abu tirpalai yra sumaišomi ir bendras mišinio tūris privedamas iki 50 ml. Gautas mišinys yra filtruojamas per Vatmano filtrą Nr. 54. Paruošto substrato galiojimo laikas yra 7 dienos, laikant šaldytuve (+4 °C).

Glicino tirpalas kalibracinei kreivei sudaryti. 0,01 M, 25 ml glicino tirpalo pagaminti atsveriamas 0,0188 g glicino ir tirpinama 25 ml dH₂O.

2.2.4 Buferiniai tirpalai

0,01 M HEPES buferinis tirpalas (pH 8). Atsveriamas 0,596 g HEPES ir tirpinama 200 ml dH₂O. Paruošto tirpalo pH privedamas iki 8, naudojant NaOH ir skiedžiama iki 250 ml su dH₂O.

0,01 M Natrio fosfatinis (Na₂HPO₄) buferinis tirpalas (pH 8). Atsveriamas 0,355 g Na₂HPO₄ ir tirpinama 200 ml dH₂O. Paruošto tirpalo pH privedamas iki 8, naudojant H₃PO₄ ir skiedžiama iki 250 ml su dH₂O.

0,01 M Tris-HCl buferinis tirpalas (pH 8). Atsveriamas 0,303 g Tris ir tirpinama 200 ml dH₂O. Paruošto tirpalo pH privedamas iki 8, naudojant HCl ir skiedžiama iki 250 ml su dH₂O.

0,01 M Kalio fosfatinis (K₂HPO₄) buferinis tirpalas (pH 8). Atsveriamas 0,436 g K₂HPO₄ ir tirpinama 200 ml dH₂O. Paruošto tirpalo pH privedamas iki 8, naudojant H₃PO₄ ir skiedžiama iki 250 ml su dH₂O.

2.2.5 Baltymų koncentracijos nustatymo Bradford'o metodu tirpalai

Bradford'o reagentas. 500 ml pagaminti, atsveriamas 50 mg „Coomassie Brilliant Blue G-250“ dažo ir tirpinama 55 ml 96 % etanolyje maišant ant magnetinės maišyklės, kambario temperatūroje visiškai tamsoje per naktį. Ištirpęs dažas sumaišomas su 67 ml 70 % H₃PO₄ tirpalu ir bendras mišinio tūris privedamas iki 500 ml su dH₂O. Paruoštas reagentas filtruojamas vakuumu per stiklinį filtrą ir laikomas tamsiame inde, šaldytuve (+4 °C).

0,15 M NaCl tirpalas. Atsveriamas 0,877 g NaCl druskos ir tirpinama 100 ml dH₂O.

0,5 mg/ml jaučio serumo albumino (JSA) standartas. JSA gaminamas naudojant 2 mg/ml koncentracijos JSA standartinį komercinį tirpalą, kuris yra skiedžiamas dH₂O santykiu 1:3.

2.2.6 Ksilanazinio aktyvumo nustatymui naudojami tirpalai

Arabinoksilano substratinis tirpalas. Atsveriamas 0,02 g arabinoksilano P-WAXYM (Megazyme) ir tirpinamas 0,8 ml 95 % etanolyje. Maišant magnetine maišykle į tirpalą pridedami 9 ml dH₂O ir reagentas toliau maišomas 10 min, kaitinant 100 °C temperatūroje, stiklinėlę uždengus aliuminio folija. Po 10 min, vis dar maišant, tirpalas paliekamas atvėsti iki kambario temperatūros. Kaitinimo metu dalis tirpalo nugaruoja, todėl substratui atvėsus bendras jo tūris privedamas iki 10 ml, naudojant dH₂O. Substrato galiojimo laikas yra kelios savaitės, laikant šaldytuve (+4 °C).

0,05 M acetatinis buferis (pH 5,5). 100 ml paruošti, atsveriamas 0,41 g natrio acetato ir tirpinamas 70 ml dH₂O. Tirpalo pH privedamas iki 5,5, naudojant acto rūgštį ir skiedžiama iki 100 ml su dH₂O.

Reagentas A. Ruošiami trys tirpalai: Na₂CO₃, glicino ir CuSO₄. Atsveriamas 40 g bevandenio Na₂CO₃ ir tirpinamas 600 ml dH₂O. 16 g glicino tirpinamas 100 ml dH₂O. 0,45 g CuSO₄ tirpinamas 100 ml dH₂O. Paruošti tirpalai sumaišomi tarpusavyje ir bendras mišinio tūris privedamas iki 1000 ml, naudojant dH₂O. Prieš vykdant reakciją, paruoštas reagentas A turi pastovėti per naktį. Tirpalo galiojimo laikas yra dvi savaitės ir jis yra laikomas kambario temperatūroje, tamsiame inde.

Reagentas B. Atsveriamas 1,2 g neokuproino ir tirpinamas 1000 ml dH₂O. Paruoštas reagentas B yra laikomas kambario temperatūroje, tamsiame inde ir yra tinkamas naudoti dvi savaites.

2.2.7 Baltymų elektroforezės ir gelių vizualizavimo „Coomassie“ dažų tirpalai

30 % akrilamido (AA) ir 0,8 % bis-akrilamido (BAA) tirpalas. 100 ml pagaminti, atsveriamas 29,2 g akrilamido ir ištirpinamas 70 ml dH₂O. Kitoje stiklinėlėje, 10 ml dH₂O ištirpinamas 0,8 g bis-akrilamido. Paruošti tirpalai sumaišomi ir bendras mišinio tūris skiedžiamas iki 100 ml tūrio ir filtruojamas. Procesas vykdomas traukos spintoje. Reagentas laikomas tamsiame inde, +4 °C temperatūroje.

1 M Tris-HCl (pH 6,8). 100 ml pagaminti, atsveriamas 12,1 g Tris ir tirpinamas 70 ml dH₂O. Naudojant HCl, tirpalo pH privedamas iki 6,8 ir skiedžiama iki 100 ml tūrio su dH₂O. Paruoštas buferis laikomas tamsiame inde, +4 °C temperatūroje.

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8). 100 ml pagaminti, atsveriamas 12,10 g Tris ir tirpinamas 70 ml dH₂O. Naudojant HCl, tirpalo pH privedamas iki 8,8 ir skiedžiama iki 100 ml tūrio su dH₂O. Paruoštas buferis laikomas tamsiame inde, +4 °C temperatūroje.

10 % NDS tirpalas. Atsveriamas 5 g NDS ir tirpinamas 40 ml dH₂O. Ištirpinus, tirpalo tūris praskiedžiamas iki 50 ml.

10 % amonio persulfato (APS) tirpalas. 10 ml reagento paruošti, 1,0 g APS ištirpinama 10 ml dH₂O. Tirpalas išpilstomas į 1,5 ml tūrio plastikinius mėgintuvėlius po 1 ml ir laikomas -20 °C temperatūroje.

10×koncentruotas baltymų elektroforezės buferinis tirpalas. Ruošiami trys tirpalai: glicino, Tris ir NDS. Atsveriami 72 g glicino ir tirpinama 380 ml dH₂O. Jei tirpalas lėtai tirpsta kaitinama, bet neužverdama. 15 g Tris reagento tirpinama 50 ml dH₂O. 5 g NDS tirpinama 20 ml dH₂O. Paruošti tirpalai sumaišomi tarpusavyje ir bendras mišinio tūris privedamas iki 500 ml su dH₂O. Baltymų elektroforezės buferinio tirpalo pH turi būti 8,3-8,6 ribose (nekoreguojamas). Elektroforezės metu naudojamas 1×koncentruotas buferinis tirpalas.

2×Elektroforetinis dažas. Ruošiamas tirpalas, kurio galutinė koncentracija yra 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % NDS, 25 % glicerolio, 0,01 % bromfenolio mėlynojo dažo. Mišinys laikomas kambario temperatūroje. Ruošiant baltymų elektroforezės NDS-PAGE metodu mėginius dažas papildomas 5 % 2-merkaptoetanolio ir laikomas -20 °C temperatūroje.

„Coomassie Blue R-250“ dažas. Paruošti 250 ml dažo tirpalą, 0,62 g dažo tirpinama 113 ml 96 % etanolyje ir sumaišoma su 23 ml 99,5 % acto rūgštimi. Mišinys skiedžiamas iki 250 ml su dH₂O, filtruojamas ir laikomas tamsiame inde kambario temperatūroje.

2.2.8 Mitybinės terpės

Agarizuota LB terpė. Atsveriami 25 g komercinės LB terpės ir 15 g agarų, reagentai sumaišomi ir tirpinami 1000 ml dH₂O. Paruoštas mišinys autoklavuojamas 1/20' režimu, t.y. 1 atm, 20 min ir 121 °C temperatūroje.

2.2.9 Guanidino hidrochlorido ir urėjos tirpalai

6 M guanidino hidrochlorido tirpalas. Atsveriami 4,8 g guanidino hidrochlorido ir tirpinama 10 ml dH₂O.

8 M urėjos tirpalas. Atsveriami 5,73 g urėjos (karbamido) ir tirpinama 10 ml dH₂O.

2.2.10 Baltymų išskyrimo tirpalai

0,1 M NaOH tirpalas (pH 10). Ruošiant 500 ml, 2 g NaOH tirpinami 400 ml dH₂O. Tirpalo pH privedamas iki 10, naudojant HCl ir skiedžiama iki 500 ml tūrio su dH₂O.

1 M HCl tirpalas. 8,18 ml konc. HCl skiedžiama iki 100 ml tūrio su dH₂O. Procesas vykdomas traukos spintoje, naudojant stiklinę 10 ml graduotą pipetę.

2 M NaOH tirpalas. Atsveriami 8 g NaOH ir tirpinami 100 ml dH₂O.

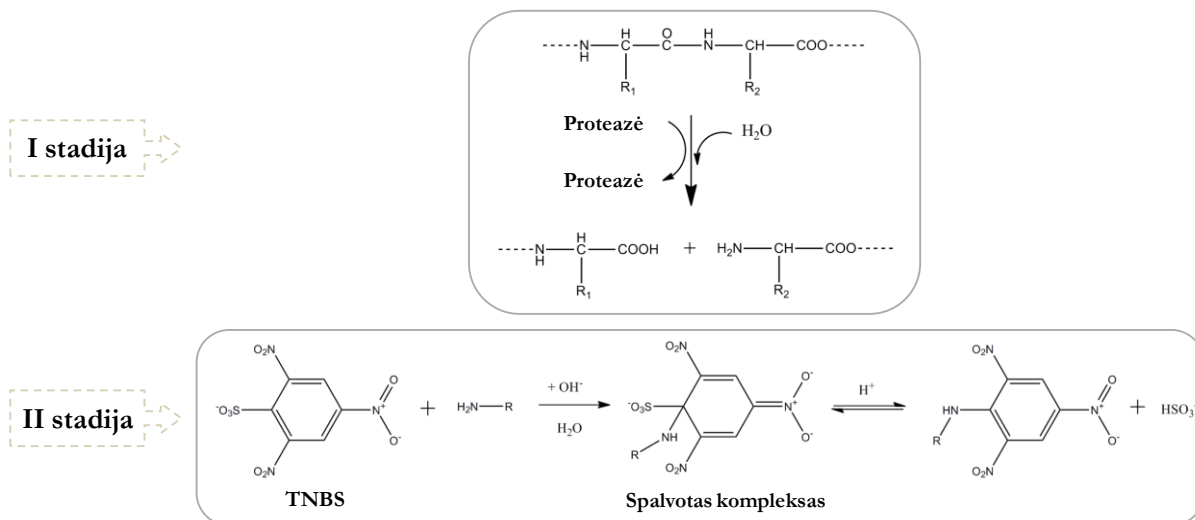
2.3 Metodai

2.3.1 Proteazių aktyvumo nustatymas su N,N-dimetilkazeinu

Proteazių aktyvumo matavimo metodika yra dviejų stadijų (2.1 pav.):

I stadija. Vykstant fermentinės hidrolizės reakcijai, proteazė suskaldo baltymo molekulėje esančias peptidines jungtis. Proteazės aktyvumui nustatyti, kaip substratas naudojamas N,N-dimetilkazeinas (DMC).

II stadija. Hidrolizės reakcijos produktuose esančios pirminės amino grupės reaguoja su TNBS ir sudaro spalvotus kompleksus, kurie sugeria šviesą esant bangos ilgiui $\lambda = 425$ nm.



2.1 pav. Proteazių aktyvumo nustatymo metodikos spalvinės reakcijos schema, pagal⁷

Metodas. Reakcija vykdoma konusiniame 10 ml tūrio mėgintuvėlyje, į kurį pilama 1 ml fermento tirpalo ir 1,5 ml BB9 buferio (2.2.3). Mišinys gerai sumaišomas ir 2 min kaitinamas termostatinėje vandens vonelėje, 50 °C temperatūroje. Tirpalui sušilus, po 2 min, pridedamas 1 ml substrato (DMC) (2.2.3) bei 0,25 ml TNBS (2.2.3) tirpalo ir toliau termostatuojama lygiai 25 min, 50 °C temperatūroje. Po 25 min mėgintuvėliai išimami iš vandens vonelės ir reakcija stabdoma pridedant 2,5 ml ledinio dH₂O. Mišiniui sušilus iki kambario temperatūros, maždaug po 20 min, matuojamas mėginio optinis tankis spektrofotometru, $\lambda = 425$ nm.

Kontrolė. Lygiagrečiai vykdoma kontrolinė reakcija, kurios sąlygos yra identiškos kaip ir tiriamųjų mėginių, o vietoje substrato į mėgintuvėlį pilamas 1 ml dH₂O.

Skaičiavimai. Fermento aktyvumas (U/ml) nustatomas pagal formulę:

$$\text{Aktyvumas} = \frac{\left(\left(\frac{\text{Abs}}{\text{tg } \alpha} \right) \times \frac{V_R}{V_F} \right)}{25}$$

čia:

Abs – sugertis ties A_{425} ;

tg α – kalibracinės kreivės nuokrypio kampas;

V_R – bendras reakcijos tūris, ml;

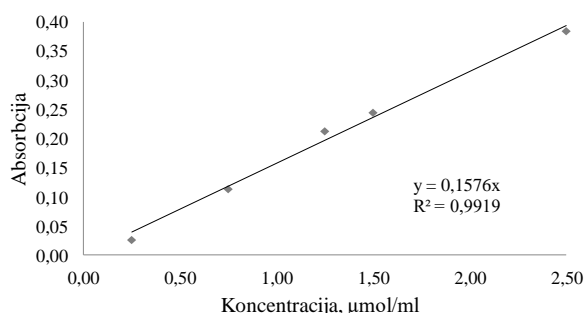
V_F – fermento kiekis, ml;

25 – reakcijos laikas, min;

⁷ Manual procedure for the Determination of protease activity using DMC substrate, Novozymes Analytical Method, 2004-11072-03, p. 1-10

Kiekvienas eksperimentas buvo kartojamas tris kartus, o išvesti gautų rezultatų vidurkiai neviršėjo standartinio nuokrypio daugiau negu 5 %.

Kalibracinei kreivei sudaryti naudojamas skirtingos koncentracijos glicino tirpalas.



2.2 pav. Kalibracinė kreivė fermentų proteaziniui aktyvumui nustatyti.

2.3.2 Buferinių tirpalų įtaka fermentų Vilzim PRO dry ir Vilzim PRO conc dry aktyvumui

Atsveriami 0,01 g fermentinio preparato ir tirpinama 100 ml buferinio tirpalo. Tyrimo metu naudojami 0,01 M buferiniai tirpalai: HEPES, natrio fosfatinis (Na_2HPO_4), Tris-HCl, kalio fosfatinis (K_2HPO_4) (2.2.4), kurių pH 8. Nustatomas fermentinių tirpalų Vilzim PRO dry (2.2.2) ir Vilzim PRO conc dry (2.2.2) proteazinis aktyvumas (2.3.1) tyrimo pradžioje – po 2 val ir po 26 val inkubacijos tiriamuosiuose buferiniuose tirpaluose. Stebimas fermentinių preparatų aktyvumo pokytis.

2.3.3 Baltymų koncentracijos nustatymas Bradford'o metodu

Prieš vykdant reakciją visų pirma turi būti patikrinamas Bradford'o reagentas (2.2.5): dažo absorbcija matuojama prie 465 nm ilgio bangos ir turi būti 1,3-1,5 ribose. Šiuo atveju, kaip kontrolė yra naudojamas dH_2O .

Metodas. Į mėgintuvėlį pilama 0,15 ml tiriamojo baltyminio tirpalo, 0,15 ml 0,15 M NaCl tirpalo (2.2.5) ir 3 ml Bradford'o reagento (2.2.5). Mišinys gerai sumaišomas ir inkubuojamas lygiai 2 min kambario temperatūroje. Po 2 min matuojama mėginio absorbcija 595 nm ilgio bangoje.

Kontrolė. Reakcijos kontrolinis mėginys paruošiamas sumaišant 0,3 ml 0,15 M NaCl tirpalo ir 3 ml Bradford'o reagento. Toliau reakcija vykdoma tomis pačiomis sąlygomis, kaip aprašyta anksčiau.

Skaičiavimai. Baltymo koncentracija nustatoma pagal formulę:

$$c = \frac{\text{Abs}}{\text{tg } \alpha} \times \frac{V_R}{V_M}$$

čia:

c – baltymų koncentracija tiriamajame tirpale, mg/ml;

Abs – sugertis ties A_{595} ;

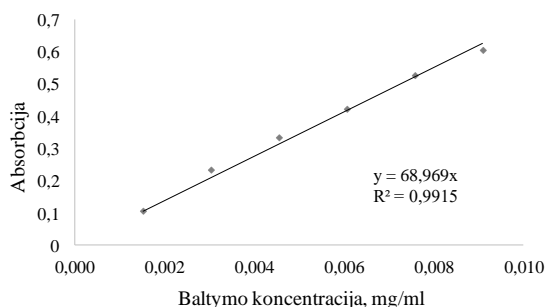
tg α – kalibracinės kreivės nuokrypio kampas;

V_R – bendras reakcijos tūris, ml;

V_M – mėginio tūris, ml;

Kiekvienas eksperimentas buvo kartojamas tris kartus, o išvesti gautų rezultatų vidurkiai neviršijo standartinio nuokrypio daugiau negu 5 %.

Kalibracinei kreivei sudaryti naudojamas jaučio serumo albumino (JSA) standartinis tirpalas.



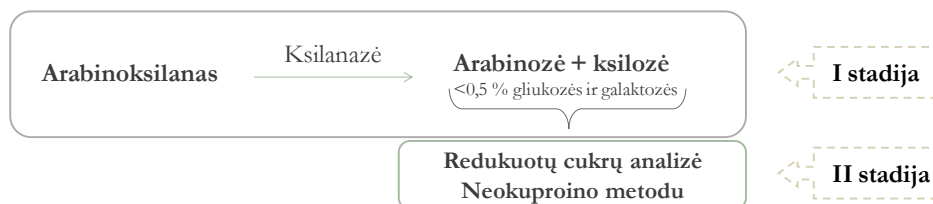
2.3 pav. Kalibracinė kreivė baltymų koncentracijai nustatyti Bradford'o metodu.

2.3.4 Ksilanazinio aktyvumo nustatymas

Ksilanazinio aktyvumo nustatymo metodika yra dviejų stadijų (2.4 pav.):

I stadija. Substratas arabinoksilanas fermentinės hidrolizės metu, naudojant tiriamąjį fermentą, turintį ksilanazinio aktyvumo, yra suskaidomas į arabinozę ir ksilozę. Ksilozė yra laikoma redukuotu cukrumi, dėl molekulėje esančios laisvos karbonilo grupės.

II stadija. Susidariusių redukuotų cukrų kiekis hidrolizate yra nustatomas Neokuproino metodu.



2.4 pav. Ksilanazinio aktyvumo nustatymo metodo schema.

• I stadija.

Metodas. Į 15 ml talpos biuksiuką įpilama 0,68 ml ksilanų substratinio tirpalo (2.2.6) ir 2,82 ml 0,05 M acetatinio buferio (pH 5,5) (2.2.6). Fermentinė reakcija inicijuojama pridėdant 0,5 ml, žinomos koncentracijos tiriamojo fermentinio tirpalo, kuris yra ruošiamas naudojant 0,05 M acetatinį buferį (pH 5,5) (2.2.6). Bendras reakcijos tūris turi būti 4 ml. Gautas mišinys inkubuojamas termostatuojamoje purtyklėje 40 °C temperatūroje, 10 min, purtant 220 aps/min greičiu. Reakcijos laikas pradedamas matuoti nuo fermentinio tirpalo įdėjimo. Inkubacijai pasibaigus nustatomas susidariusių redukuotų cukrų kiekis Neokuproino metodu (II stadija).

Kontrolė. Lygiagrečiai reakcija, kaip aprašyta anksčiau, vykdoma 0,68 ml arabinoksilano substratinio tirpalo užpylus 3,32 ml 0,05 M acetatiniu buferiu (pH 5,5).

• II stadija (Redukuotų cukrų analizė Neokuproino metodu).

Metodas. Reakcija vykdoma aukštame, 15 ml tūrio, mėgintuvėlyje, į kurį pilama 2 ml reagento A (2.2.6) ir 2 ml reagento B (2.2.6). Mėgintuvėlis dedamas į verdantį (~99 °C) vandenį ir

palaikomas maždaug minutę. Reakcija inicijuojama pridėdant į sušilusį mišinį 0,5 ml redukuojančių cukrų tirpalo, kuris buvo paruoštas I stadijos metu, įskaitant ir kontrolinį mėginį. Mėgintuvėlis užkemšamas ir inkubuojamas verdančiame (~99 °C) vandenyje lygiai 12 min. Reakcija stabdoma patalpinus mėgintuvėlį ledo vonelėje taip leidžiant jam ataušti iki kambario temperatūros. Papildomai, mėgintuvėliams auštant, į reakcijos mišinį įpilama 8 ml ledinio dH₂O ir sumaišoma. Spektrofotometru matuojamas mėginių optinis tankis, esant bangos ilgiui $\lambda = 450 \text{ nm}$.

Kontrolė. Kontrolinė reakcija vykdoma analogiškėmis sąlygomis, tik vietoje redukuotų cukrų tirpalo įpilama 0,5 ml dH₂O.

Skaičiavimai. Fermento ksilanazinis aktyvumas (U/ml) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{Aktyvumas} = \frac{\left(\frac{\text{Abs}}{\text{tg } \alpha} \times \frac{V_R}{V_F}\right)}{10} \times \text{Ferm. sk}$$

čia:

Abs – sugertis ties A₄₅₀, minus I stadijos kontrolė;

tg α – kalibracinės kreivės nuokrypio kampas, kurio reikšmė 1,2356 $\mu\text{mol/ml}$, pagal ksilozę (*atliko A. Veteikytė*)

10 – reakcijos laikas, min;

V_R – bendras reakcijos tūris, ml;

V_F – fermento kiekis, ml;

Ferm. sk – fermento skiedimas prieš reakciją, jeigu reikalinga;

Kiekvienas eksperimentas buvo kartojamas tris kartus, o išvesti gautų rezultatų vidurkiai neviršėjo standartinio nuokrypio daugiau negu 5 %.

2.3.5 Baltymų elektroforezė NDS-PAGE metodu

Elektroforezės mėginių paruošimas. Tiriamieji baltyminiai mėginiai prieš elektroforezę sumaišomi su elektroforetiniu dažu (2.2.7), sudėtyje turinčiu 5 % β -merkaptoetanolio, santykiu 1:1. Paruošti mėginiai denatūruojami, kaitinant juos termostatinėje vandens vonelėje 5 min, 95 °C temperatūroje. Po inkubacijos, paruošti tiriamieji mėginiai įnešami į koncentruojamojo gelio šulinėlius. Į šulinėlį suleidžiama po 20 μl tiriamojo mėginio. Į atskirą šulinėlį įnešamo molekulinės masės standarto tūris yra 3 μl .

Elektroforezės gelių paruošimas. Iš pradžių surenkamas elektroforezės gelių rėmelis, vidinius stiklo paviršius švariai nuvalius 96 % etanolio tirpalu. Po to, ruošiamas 12 % skiriamasis gelis, kurio sudėtis pateikta 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. NDS-PAGE 12 % skiriamąjo gelio sudėtis (2.2.7).

Reagentas	Tūris, μl
30 % akrilamido/bisakrilamido tirpalas	2000
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1250
10 % NDS	50
dH ₂ O	1585
10 % APS	25
TEMED	2,5

Į reakcijos mišinį pridėjus TEMED (2.2.7) prasideda NDS-PAGE skiriamąjo gėlio polimerizacija, todėl įpylus šį reagentą bendras reakcijos mišinys yra gerai sumaišomas ir nedelsiant supilamas tarp surinkto rėmelio stiklinių plokštelių. Ant viršaus užpilamas dH₂O ir gelis paliekamas polimerizuotis 20-30 min. Po polimerizacijos viršutinis dH₂O sluoksnius atsargiai nupilamas ir ruošiamas 4 % koncentruojamasis gelis, kurio sudėtis pateikta 2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. NDS-PAGE 4 % koncentruojamojo gėlio sudėtis (2.2.7).

Reagentas	Tūris, μl
30 % akrilamido/bisakrilamido tirpalas	335
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	625
10 % NDS	50
dH ₂ O	1500
10 % APS	12,5
TEMED	2,5

Analogiškai, kaip ir skiriamąjo gėlio atveju, paskutinis į reakcijos mišinį yra pilamas TEMED (2.2.7), visas gerai sumaišoma, atsargiai pilama tarp stiklo plokštelių ant skiriamąjo gėlio ir įstatomos pasirinkto dydžio šakutės. Paruoštas gelis polimerizuojasi 20-30 min. Pasibaigus polimerizacijai, šakutės yra atsargiai ištraukiamos, o gėlio rėmelis įstatomas į švėrią elektroforezės kamerą ir pritvirtinamas segtukais. Elektroforezės aparato talpos užpildomos 1×elektroforezės buferiniu tirpalu. Pašalinami tarp stiklelių susidarę oro burbuliukai. Į šulinėlius įnešami paruošti mėginiai ir molekulinės masės standartas. Leidžiama 120 V elektros srovė. Elektroforezė yra stabdoma proceso eigoje – mėginiams nepilnai pasiekus skiriamąjo gėlio apačią, likus maždaug 2 cm iki gėlio krašto.

Po NDS-PAGE elektroforezės gelis patalpinamas į plastikinį indelį ir plaunamas kelis kartus dH₂O. Po atplovimo gelis užpilamas „Coomassie Blue R-250“ dažu (2.2.7) ir purtoma 20 min, kambario temperatūroje, tamsoje. Po dažymo geliai blukinami kaitintame distiliuotame vandenyje, dažnai jį keičiant. Blukinimo metu inkubacija su dH₂O taip pat vykdoma ant purtyklės.

2.3.6 Liucernos miltų (LM) ir juose esančių baltymų hidrolizė

a) Metodas. Hidrolizė vykdoma 15 ml talpos biuksiukuose, į kuriuos atsveriamas 0,8 g liucernos miltų ir suspenduojama 10 ml 0,01 M kalio fosfatiniame (K₂HPO₄) buferyje, pH 8 (2.2.4). Į liucernos miltų tirpalą, atitinkamais laiko tarpais, pridedami fermentai (2.2.2), kurių kiekiai yra pateikti 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Liucernos miltų hidrolizės metu naudotų fermentų kiekiai.

Kiekis	Fermentas
Po 0,05 g	Vilzim Deter MIXD 520/180 D
	Vilzim PRO dry
Po 100 µl	Vilzim AMY Tex L
	Glucozyme L 300
	Vilzim LPS L
	Vilzim NSP
	Vilzim DETER MAX L

b) Metodas. Į 50 ml talpos ploksčiadugnes kolbutes atsveriami 2 g liucernos miltų ir suspenduojami 40 ml 0,01 M kalio fosfatiniame (K_2HPO_4) buferyje, pH 8 (2.2.4). Tam tikrais laiko tarpais pridedami fermentiniai preparatai: 250 µl Vilzim NSP (2.2.2) ir 0,2 g Vilzim PRO dry (2.2.2).

Hidrolizės mišiniai maišomi naudojant magnetinę maišyklę, kambario temperatūroje. Skirtingais laiko tarpais iš mišinio imami mėginiai, kartu su atitinkamomis kontrolinėmis reakcijomis, ir nustatomas hidrolizės laipsnis (DH).

Lygiagrečiai hidrolizės mišinių, identiškomis sąlygomis, kaip aprašyta aukščiau, vykdomos kontrolinės reakcijos:

a) Kontrolės.

- Liucernos miltų kontrolė – 0,8 g miltų atsveriami ir suspenduojama 10 ml 0,01 M kalio fosfatiniame (K_2HPO_4) buferyje, pH 8 (2.2.4).
- Fermentų kontrolė – sumaišomas atitinkamas, kaip ir hidrolizės mišinyje, fermentų kiekis bei sudėtis ir ištirpinama 10 ml 0,01 M kalio fosfatiniame (K_2HPO_4) buferyje, pH 8 (2.2.4).

b) Kontrolės.

- Liucernos miltų kontrolė – atsveriami 2 g miltų ir suspenduojami 40 ml 0,01 M kalio fosfatiniame (K_2HPO_4) buferyje, pH 8 (2.2.4).
- Fermentų kontrolė – 40 ml 0,01 M kalio fosfatiniame (K_2HPO_4) buferyje, pH 8 (2.2.4) ištirpinama 250 µl Vilzim NSP (2.2.2) ir 0,2 g Vilzim PRO dry (2.2.2).

Skaičiavimai.

$$Hidrolizės rezultatai = DH_{Hidrolizės\ mišinys} - (DH_{Kontrolė-liucernos} + DH_{Kontrolė-fermentų})$$

čia:

$DH_{Hidrolizės\ mišinys}$ – nustatytas hidrolizės laipsnis hidrolizės mišinyje, µmol/ml, kuris vėliau perskaičiuojamas į mmol/g;

$DH_{Kontrolė-liucernos}$ – nustatytas hidrolizės laipsnis kontroliniame liucernos miltų tirpale, µmol/ml, kuris vėliau perskaičiuojamas į mmol/g;

$DH_{Kontrolė-fermentų}$ – nustatytas hidrolizės laipsnis kontroliniame fermentų tirpale, µmol/ml, kuris vėliau perskaičiuojamas į mmol/g;

2.3.7 Hidrolizės laipsnio (DH) nustatymas

Hidrolizės laipsnis nustatomas remiantis fermentų aktyvumo įvertinimo metodika, kadangi TNBS reagentas reaguoja su pirminėmis laisvomis amino grupėmis tiriamajame mėginyje ir sudaro spalvotus kompleksus, absorbuojančius šviesą 425 nm bangos ilgyje.

Metodas. Į 10 ml talpos mėgintuvėlį įpilama 3,5 ml, tinkamo skiedimo, hidrolizės mišinio, mėgintuvėlis patalpinamas termostatinėje vandens vonelėje, 50 °C temperatūroje ir laikomas maždaug 2 min, kad tirpalas sušiltų. Po 2 min, įpilama 0,25 ml TNBS tirpalo (2.2.3), mišinys gerai sumaišomas, ir inkubuojamas 50 °C temperatūroje lygiai 25 min. Pasibaigus inkubacijai, mėgintuvėlis atsargiai išimamas iš vandens vonelės ir reakcija stabdoma pridedant 2,5 ml ledinio dH₂O. Reakcijos mišiniui pasiekus kambario temperatūrą, maždaug po 20 min, tirpalas yra išpilstomas į ependorfinius mėgintuvėlius ir centrifuguojamas 2 min, 20000×g, kambario temperatūroje, siekiant atskirti netirpias liucernos miltų nuosėdas. Supernatanto optinis tankis matuojamas spektrofotometru, esant bangos ilgiui 425 nm. Proceso metu hidrolizės laipsnis taip pat nustatomas ir fermentų bei liucernos miltų kontrolėms.

Kontrolė. Į mėgintuvėlį pilama 3,5 ml 0,01 M kalio fosfatinio (K₂HPO₄) buferio, pH 8 (2.2.4). Tolimesnė reakcijos eiga yra identiška, kaip ir tiriant hidrolizės mėginius.

Skaičiavimai. Hidrolizės laipsnis (μmol/ml) nustatomas pagal formulę:

$$DH = \frac{Abs}{\text{tg } \alpha} \times \frac{V_R, \text{ ml}}{V_M, \text{ ml}}$$

čia:

DH – hidrolizės laipsnis, μmol/ml, kuris vėliau perskaičiuojamas į mmol/g;

Abs – sugertis ties A₄₂₅;

V_R – bendras reakcijos tūris, ml;

V_M – mėginio tūris, ml;

tg α – kalibracinės kreivės nuokrypio kampas iš proteazių aktyvumo nustatymo metodikos (2.2 pav);

Kiekvienas eksperimentas buvo kartojamas tris kartus, o išvesti gautų rezultatų vidurkiai neviršėjo standartinio nuokrypio daugiau negu 5 %.

2.3.8 Mikrobiologinio užterštumo tyrimas hidrolizės mėginiuose

Agarizuota LB terpė (2.2.8) steriliai išpilstoma į Petri lėkšteles, po 20 ml. Ant sustingusios terpės užsėjama po 20 μl hidrolizės mišinio bei kontrolinių mėginių ir sklaistytuvu išskirstoma. Auginama 37 °C temperatūroje, per naktį.

2.3.9 Mikrobiologinio užterštumo šalinimo ir įvertinimo metodika

Fermentinio preparato tirpalo sterilinimas. 0,05 g Vilzim PRO dry (2.2.2) ir 100 μl Vilzim NSP (2.2.2) ištirpinama 10 ml 0,01 M kalio fosfatiniame (K₂HPO₄) buferyje, pH 8 (2.2.4). Fermentinis tirpalas sterilinamas filtruojant per 0,45 μm PVDF membraninį filtrą.

Mikrobiologinis užterštumas įvertinamas 20 µl mėginio užsėjant ant agarizuotos LB terpės. Inkubuojama per naktį, 37 °C temperatūroje.

Liucernos miltų sterilinimas. Į 250 ml talpos butelį atsveriamas 1 g liucernos miltų ir suspenduojamas 100 ml 0,01 M kalio fosfatiniame (K₂HPO₄) buferyje, pH 8 (2.2.4). Paruoštas tirpalas autoklavuojamas 0,8/30' režimu (30 min 80 °C temperatūroje) ir 20 µl užsėjama ant agarizuotos LB terpės. Inkubuojama 37 °C temperatūroje, per naktį.

2.3.10 Antimikrobinių medžiagų panaudojimo tyrimo metodika

Hidrolizės mėginių su antimikrobinėmis medžiagomis paruošimas. Į 15 ml talpos biuksiuką atsveriamas 0,8 g liucernos miltų, ir suspenduojama 10 ml 0,01 M kalio fosfatiniame (K₂HPO₄) buferyje, pH 8 (2.2.4). Į baltyminių tirpalą atsveriamas 0,05 g Vilzim PRO dry (2.2.2), bei pridedama 100 µl Vilzim NSP (2.2.2) ir 100 µl Vilzim LPS L (2.2.2). Toliau į kiekvieną tokį mišinį dedamas tam tikras kiekis antimikrobinės medžiagos, pateiktas 2.5 lentelėje.

2.5 lentelė. Antimikrobinių medžiagų pavadinimai ir kiekiai.

Medžiagos Nr.	Antimikrobinės medžiagos pavadinimas	Kiekis, g
1	Natrio nitritas	0,010
2	Natrio sulfitas	0,010
3	Kaprino rūgštis	0,086
4	Sorbo rūgštis	0,030

Hidrolizės mišinių su skirtingomis antimikrobinėmis medžiagomis mėginiai imami tik idėjus antimikrobinę medžiagą – po 0 val bei toliau vykdant procesą po 24 val ir 40 val. Kiekvienu laiko etapu 20 µl paimto mėginio yra steriliai užsėjama ant agarizuotos LB terpės (2.2.8), išskirstoma sklaistytuvu ir inkubuojama 37 °C temperatūroje per naktį.

Kontrolė. Kontrolinis hidrolizės mišinys ruošiamas lygiai taip pat kaip ir tiriamasis, tik į jį nėra dedama antimikrobinė medžiaga.

2.3.11 Natrio nitrito antimikrobinio poveikio priklausomybė nuo koncentracijos

Hidrolizės mėginių su natrio nitritu paruošimas. Mėginiai ruošiami analogiškai, kaip ir antimikrobinių medžiagų paieškos tyrimo metu (2.3.10). Į paruoštus tirpalus su liucernos miltais ir fermentiniais preparatais pridedama 0,01 g ir 0,05 g natrio nitrito. Po 0 val, 24 val ir 40 val iš analizuojamų tirpalų imama 20 µl ir steriliai užsėjama ant agarizuotos LB terpės (2.2.8) bei inkubuojama 37 °C temperatūroje per naktį.

2.3.12 Liucernos miltų fizikinio apdorojimo metodika

Metodas. Į 250 ml talpos butelį su kamsčiu atsveriami 4 g liucernos miltų ir suspenduojami 100 ml 0,01 M kalio fosfatiniame (K₂HPO₄) buferyje, pH 8 (2.2.4). Paruošti mišiniai yra veikiami 30 min 600 W galios mikrobangomis, ultragarsu, aukšta temperatūra virinant ir aukštu slėgiu autoklavuojant 0,8/30' režimu (30 min 80 °C temperatūroje). Po 30 min apdorotiems

miltams leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros bei visų bandinių tūris yra sulyginamas pridėdant kalio fosfatinio buferio – virinimo proceso metu bei veikiant mikrobangomis dalis tirpiklio išgaruoja. Į apdorotus mišinius pridėdama 500 µl Vilzim NSP (2.2.2) ir maišoma 16 val ant magnetinės maišyklės kambario temperatūroje. Po 16 val pridėdama 1 g proteazės Vilzim PRO dry (2.2.2). Naudojami fermentai yra sterilinami juos ištirpinant buferyje ir praleidžiant pro 0,45 µm PVDF membranių filtrą. Hidrolizės laipsnis nustatomas proceso pradžioje tik įdėjus fermentinį preparatą Vilzim NSP – po 0 val, po 16 val pridėjus Vilzim PRO dry bei vykdant procesą po 20 val ir 40 val. Tyrimo metu naudojami sterilūs indai, juos autoklavuojant 1/20' režimu, t.y. 1 atm, (20 min ir 121 °C temperatūroje).

Kontrolės.

- Liucernos miltų kontrolės - lygiagrečiai ruošiami identiški liucernos miltų tirpalai, apdorojami mikrobangomis, ultragarsu, aukštu slėgiu ir temperatūra tik į tokius tirpalus nėra dedami fermentiniai preparatai.
- Fermentų kontrolės - 100 ml 0,01 M kalio fosfatinio (K_2HPO_4) buferio, pH 8 (2.2.4) yra ištirpinama 500 µl Vilzim NSP (2.2.2) ir po 16 val pridėdama 1 g Vilzim PRO dry (2.2.2).

2.3.13 Liucernos baltymų apdorojimo guanidino hidrochloridu ir urėja metodika

0,8 g liucernos miltų suspenduojama 4 ml dH_2O ir pridėdama 2 ml guanidino hidrochlorido (6 M) (2.2.9) arba 2 ml urėjos tirpalo (8 M) (2.2.9). Inkubacija su guanidino hidrochloridu arba urėjos tirpalu vykdoma 1 val ant magnetinės maišyklės, kambario temperatūroje. Po 1 val baltymai atplaunami nuo guanidino hidrochlorido arba urėjos tirpalo – suspensija perkeliama į plastikinį 50 ml talpos mėgintuvėlį. Centrifūguojama 10 min, $20000\times g$, kambario temperatūroje. Po centrifūgavimo supernatantas nupilamas, o baltymai pakartotinai suspenduojami dH_2O ir centrifūguojami 10 min, $20000\times g$, kambario temperatūroje. Baltymų atplovimas su dH_2O kartojamas tris kartus. Po paskutinio centrifūgavimo supernatantas nupilamas, o šlapios nuosėdos suspenduojamos 10 ml 0,01 M kalio fosfatiname (K_2HPO_4) buferyje, pH 8 (2.2.4), nedideliais kiekiais surenkant visas nuosėdas iš plastikinio mėgintuvėlio į švarų 15 ml talpos biuksiuką.

2.3.14 Liucernos miltų nuriebalinimas

Liucernos miltų nuriebalinimas buvo atliekamas remiantis Hojilla-Evangelista (Hojilla-Evangelista ir kt., 2013) metodika, skirtą nuriebalinti dirvinės čiužutės (*Thlaspi arvense L.*) augaliniams miltams.

Metodas. Į kūginę 500 ml talpos kolbą su kamsčiu atsveriamą 50 g liucernos miltų, užpilama 200 ml heksano ir maišoma purtyklėje, 230 aps/min greičiu, 2 val, kambario temperatūroje. Po 2 val nuriebalinti miltai filtruojami vakuumu, naudojant celiuliozinį filtrą. Sausi liucernos miltai

paskirstomi ant švarių Petri lėkštelių plonu sluoksniu ir paliekami traukos spintoje, kambario temperatūroje, per naktį, kad heksano likutis išgaruotų.

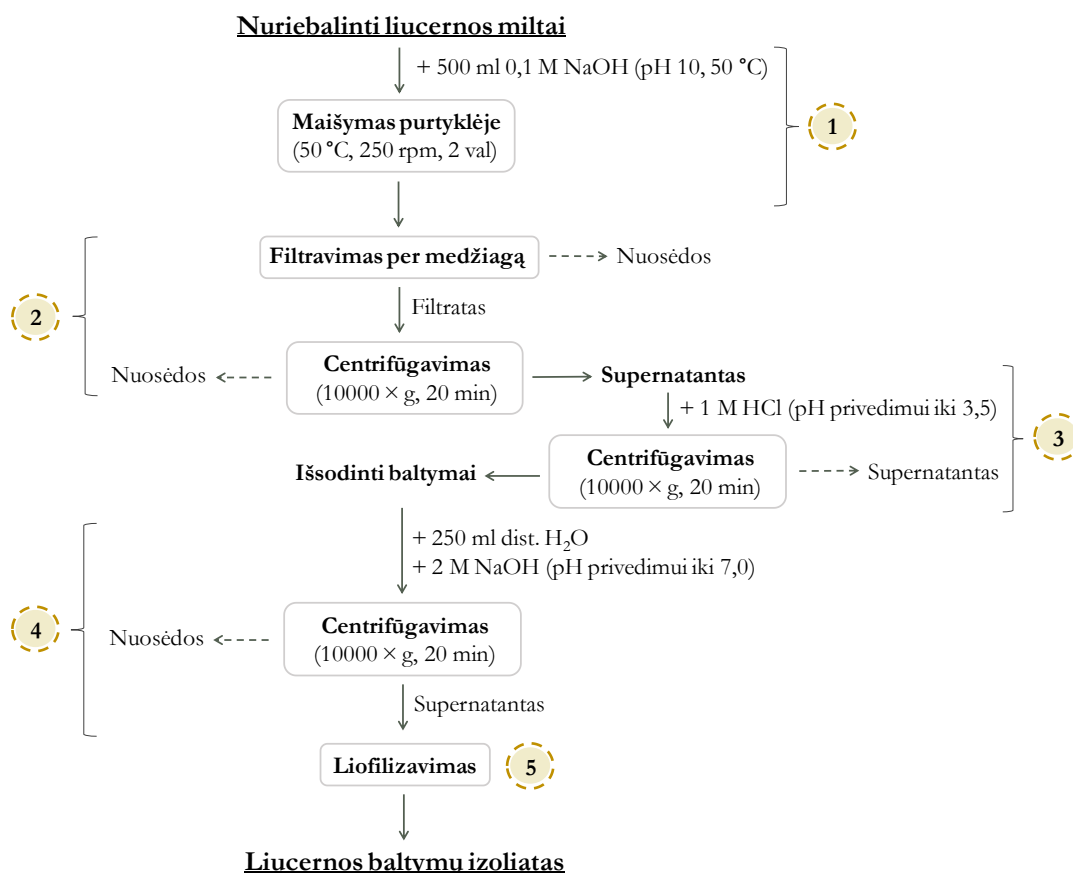
2.3.15 Dujų chromatografijos (GC) analizė

Po nuriebalinimo analizuojama heksane ištirpusių lipidų sudėtis. Analizė atliekama dujų chromatografu Schimadzu GC-2010. Paimamas 1,5 ml tūrio susidariusio ekstrakto mėginys, kuris centrifuguojamas ependorfiniame mėgintuvėlyje 10 min, 20000×g, kambario temperatūroje. Po centrifugacijos 1,5 μl gauto supernatanto suleidžiama į „*Rtx®-Biodiesel TG*“ kolonėlę.

„*Rtx®-Biodiesel TG*“ kolonėlės ilgis 10 m, o vidinis skersmuo 0,32 mm. Kaip nešančios dujos buvo naudotas helis, kurių srautas kolonėlėje buvo 4 ml/min. Iš pradžių kolonėlė buvo įšildoma iki 50 °C temperatūros, kuri palaikoma 1 min. Po to, temperatūra buvo pakeliama nuo 50 °C iki 180 °C, 15 °C/min greičiu ir išlaikoma 7 min. Galiausiai, temperatūra pakeliama nuo 180 °C iki 380 °C, 30 °C/min greičiu ir išlaikoma 5 min.

2.3.16 Baltymų išskyrimas iš nuriebalintų liucernos miltų

Baltymų išskyrimas iš augalinės kilmės miltų buvo atliekamas remiantis Hojilla-Evangelista (Hojilla-Evangelista ir kt., 2016) straipsnyje pateiktą schema, skirta baltymų išskyrimui iš liucernos miltų (2.5 pav).



2.5 pav. Liucernos baltymų išskyrimo iš liucernos miltų schema.

Metodas buvo atliekamas etapais:

1. 48,37 g nuriebalintų liucernos miltų (1,63 g buvo prarasti nuriebalinimo proceso metu) suspenduojami 500 ml 0,1 M, pH 10 NaOH tirpale (2.2.10), kuris prieš tai buvo pašildytas iki 50 °C temperatūros. Mišinys inkubuojamas termostatuojamoje purtyklėje 250 aps/min, 2 val, 50 °C temperatūroje.
2. Po 2 val, mišinys išimamas iš termostatuojamosios purtyklės ir filtruojamas per audinį (žr.2.5 pav. – medžiaga). Filtratas, kuriame yra ištirpę liucernos baltymai, surenkamas. Surinktas filtratas centrifuguojamas 10000×g, 20 min, kambario temperatūroje, siekiant visiškai pašalinti likusias netirpias priemaišas.
3. Po centrifūgavimo supernatantas surenkamas ir bendras tirpalo pH privedamas iki 3,5, naudojant 1 M HCl rūgštį (2.2.10), siekiant išsodinti liucernos baltymus. Po to tirpalas centrifuguojamas 10000×g, 20 min, kambario temperatūroje.
4. Po centrifūgavimo supernatantas nupilamas, o susidariusios nuosėdos surenkamos į 500 ml stiklinę, kruopsčiai jas atplaunant 250 ml dH₂O. Gauta tirpalo pH privedamas iki 7, naudojant 2 M NaOH (2.2.10), siekiant pakartotinai ištirpinti išskirtus liucernos baltymus.
5. Liucernos baltymų tirpalas išpilstomas į 50 ml talpos plastikinius mėgintuvėlius, po 20 ml, mėgintuvėliai uždengiami parafilmu juostelėmis ir užšaldomi -70 °C temperatūroje. Užšaldyti mėginiai patalpinami į liofilizatorių prieš tai padarius keletą skylučių parafilmu dangteliuose ir džiovinami šalčiu, -70 °C temperatūroje. Po džiovinimo gaunamas sausas liucernos baltymų izoliatas.

3. REZULTATAI

Tyrimo objektas. Liucerna (*Medicago sativa L.*) yra daugiametis žemės ūkio augalas, auginamas jau 2000 metų komerciniais tikslais, kaip pašarinė žaliava karvėms, grynaveisliams arkliams ir kitiems gyvūliams (Apostol ir kt., 2017; Hojilla-Evangelista ir kt., 2016). Auginami liucernos pasėliai 2009 m. sudarė apie 30 mln ha visame pasaulyje (Zhang ir kt., 2017). Neseniai nuspręsta liucerną įtraukti į žmonių maisto racioną, atsižvelgiant į didelį baltymų, skaidulinių medžiagų, mineralų (Ca, P, Fe, Mg, K, Zn, Cu, Se ir Mn), vitaminų (C, D, E, provitaminų – A, B1, B2, B6, B12, B9) ir nepakeičiamų aminorūgščių kiekį. Nustatyta, kad 100 g liucernos miltų yra geležies paros ir pusė kalio, kalcio ir magnio paros normos, atsižvelgiant į JAV maisto ir vaistų administracijos (FDA) pateiktas makroelementų ir mikroelementų rekomendacijas (Apostol ir kt., 2017). Taip pat, žinoma, kad 1 kg liucernos sauso ūglio randama 170-220 g baltymų, kuriuose yra net 18 skirtingų a.r., įskaitant aštuonias nepakeičiamas, o jų bendras procentingumas atitinka Jungtinių Tautų FAO rekomenduojamą suaugusiems vartotiną aminorūgščių santykį. Liucernos miltuose yra ypač didelis leucino, valino ir fenilalanino kiekis. Be to, yra įrodyta, kad liucernos lapuose yra didesnis baltymų kiekis nei kiaušiniuose ar jautienoje. Taigi, liucerna yra potencialus augalinių baltymų šaltinis, siekiant pakeisti gyvūninės kilmės produktus, tačiau viena pagrindinių problemų yra iki šiol nežinoma tiksli liucernos miltų biocheminė sudėtis, žinoma tik, kad augalinės priemaišos (angliavandeniai, riebalai, pluoštas ir kt.) sudaro net 56 %.

Liucernos panaudojimą riboja informacijos trūkumas apie baltymų išgavimą, ypač fermentinį, iš džiovintos liucernos bei šių baltymų hidrolizę (Apostol ir kt., 2017; Zhang ir kt., 2017). Pateikiama, kad JAV liucernos ūkininkų iniciatyva (USAFRI) skatinanti liucernos mokslinius tyrimus 2019 m. paskelbė konkursą „Fermentinis baltymų išskyrimas iš liucernos lapų“⁸. Be to, liucernos lapų baltymuose didžiausią dalį sudaro vandenyje tirpūs albumiai, kurių struktūra yra stabilizuojama disulfidiniais tilteliais (Zhang ir kt., 2017). Žinoma, kad didelis kiekis disulfidinių jungčių lemia atsparumą proteolitinam skaidymui dėl baltymo struktūros glaustumo ir sudėtingo proteazės prieinamumo prie peptidinių jungčių (Carbonaro ir kt., 2015). Norint pašalinti minėtus, veiksnius, tyrimo metu buvo siekiama optimizuoti LM išankstinį apdorojimą (*angl.* pretreatment), denatūruojant baltymus ir hidrolizuojant priemaišas, siekiant padidinti proteazės prieinamumą prie peptidinių jungčių.

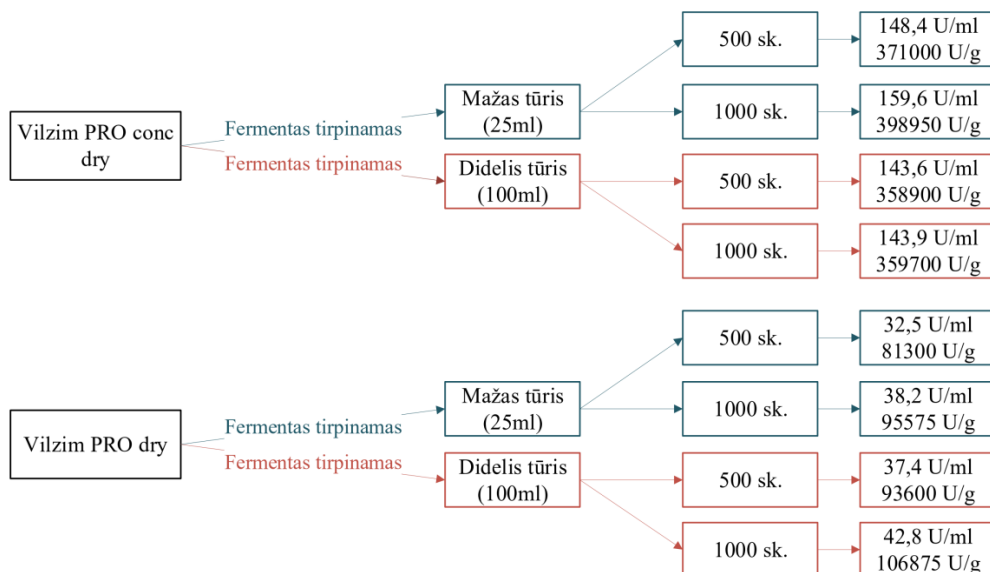
⁸ <https://www.progressiveforage.com/forage-production/management/alfalfa-checkoff-watch-enzyme-assisted-protein-isolation-from-alfalfa-leaves>

3.1 Proteazių aktyvumo tyrimai

3.1.1 Aktyvumo nustatymas

Liucernos baltymų hidrolizei vykdyti buvo pasirinktos maistinės komercinės proteazės, išskirtos iš *Bacillus licheniformis* - Vilzim PRO dry, ir koncentruotos formos proteazės atitikmuo - Vilzim PRO conc dry. Proteazės pasirinktos atsižvelgiant į jų kainą, skeliamų peptidinių ryšių specifiškumą, kadangi yra žinoma, kad endopeptidazės atpažįsta konkrečias a.r. ir procentinę a.r. sudėtį liucernos baltymuose (Li ir kt., 2013). Tyrimo metu naudojamų proteolitinių fermentų specifinės kirpimo sritys yra ties Trp, Tyr, Phe ir Leu a.r. Bendras šių a.r. kiekis liucernos baltymuose siekia net 18,6 %. Taip pat svarbu, kad trys iš keturių minėtų aminorūgščių, t.y. Trp, Phe ir Leu yra nepakeičiamos a.r., o Leu sudaro didžiausią procentinę dalį – 8,1 % tarp nepakeičiamų a.r. liucernos baltymuose.

Siekiant nustatyti optimalų fermentinių preparatų kiekį hidrolizės mišiniuose bei užtikrinti tolimesnių eksperimentų atsikartojamumą, pirmiausia buvo nustatytas pasirinktų komercinių proteazių, Vilzim PRO conc dry ir Vilzim PRO dry, aktyvumas (2.3.1), įvertinant pirminio praskiedimo įtaką gautų rezultatų tikslumui (3.1 pav).



3.1 pav. Vilzim PRO conc dry ir Vilzim PRO dry proteazinis aktyvumas ir pirminio praskiedimo įtaka gautų rezultatų tikslumui.

Akivaizdu, kad pirminį praskiedimą vykdant didesniame pradiniam tūryje (fermentinius preparatus tirpinant – 100 ml), gaunamas homogeniškesnis fermentinio preparato tirpalas ir mažesnės proteazinio aktyvumo paklaidos, nei tirpinant 25 ml tūryje. Abiem atvejais, Vilzim PRO conc dry ir Vilzim PRO dry, pirminio etapo metu proteazę ištirpinus 100 ml ir po to skiedžiant 500 kartų ar 1000 kartų, aktyvumai kito nežymiai, priešingai negu fermentus tirpinant 25 ml tūryje. Be to, lyginant gautus rezultatus, kai abu fermentai buvo skiesti 1000 ir 500 kartų, nepriklausomai nuo pirminio skiedimo, matoma, kad proteazinis aktyvumas yra didesnis skiedžiant 1000 kartų. To priežastis galėjo būti tai, kad norint stabilizuoti komercinių

proteazių aktyvumą, į jų sudėtį gamintojų yra pridedama grįžtamųjų inhibitorių, kurie paprastai jungiasi prie proteazės nekovalentinėmis sąveikomis ir gali būti pašalinti vykdant vis didesnius skiedimus. Tokie dėsningumai, manoma, galėjo nulemti proteazinio aktyvumo didėjimą. Taigi, atsižvelgiant į gautus rezultatus, nuspręsta pradine aktyvumo reikšme laikyti skiedimą, fermentinį preparatą tirpinant 100 ml ir skiedžiant 500 kartų.

3.1.2 Buferninių tirpalų įtaka aktyvumui

Fermentų aktyvumui didelę įtaką turi tirpalo pH, kuriame vyksta reakcija. Jei tirpalo pH eksperimento metu kinta plačiame diapazone, tikėtina, kad fermentas gali būti inaktyvuojamas, jeigu tirpalas tampa tokio pH, kuris fermentui yra nepalankus (Merz, 2015). Todėl ypatingai svarbu išlaikyti kuo stabilesnį pH lygį reakcijos mišiniuose. Žinoma, kad buferintos sistemos apsaugo tirpalą nuo staigių pH pokyčių ir gali būti naudojamos kaip priemonė palaikyti beveik pastovią pH reikšmę reakcijos metu (Rodrigeuz-Laguna ir kt., 2017). Taip pat, yra nustatyta, kad proteazių katalitinis aktyvumas gali kisti priklausomai nuo buferiuose esančių jonų (Merz, 2015). Siekiant atrinkti tinkamiausias buferintas sistemas naudojamoms proteazėms, išskirtoms iš *Bacillus licheniformis*, pirmiausia buvo išanalizuotos literatūroje pateiktos augalinių ir gyvūninių baltymų hidrolizės sąlygos, kurių metu buvo naudojamos proteazės išskirtos taip pat iš *Bacillus licheniformis* (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. Literatūros duomenimis, augalinių ir gyvūninių baltymų hidrolizių su *Bacillus licheniformis* proteaze metu naudoti buferiai, jų koncentracija ir pH.

Bufelis	Koncentracija, mM	pH	Literatūros šaltinis
Tris-HCl	75	7,5	Tarhan ir kt., 2016
Tris-HCl	75	8,0	Creusot ir Gruppen., 2007
Tris-HCl	50	8,5	Fenfen ir kt., 2017
K ₂ HPO ₄	10	6,0	Ageitos ir kt., 2006; Ageitos ir kt., 2007
Na ₂ HPO ₄	100	8,0	Aguilar ir kt., 2019

Remiantis literatūroje pateikiamais duomenimis, buvo nuspręsta įvertinti proteazių Vilzim PRO dry ir Vilzim PRO conc dry aktyvumus (2.3.1), inkubuojant fermentus 2 val ir 26 val Tris-HCl, kalio ir natrio fosfatiniuose buferiuose (2.3.2). Gauti santykiniai fermentų aktyvumo rezultatai nuo pradinės aktyvumo reikšmės pateikti 3.2 lentelėje.

3.2 lentelė. Vilzim PRO conc dry ir Vilzim PRO dry santykinis aktyvumas, po inkubacijos tiriamuosiuose buferiniuose tirpaluose.

Bufelis	Vilzim PRO conc dry		Vilzim PRO dry	
	Santykinis aktyvumas, %			
	Po 2 val	Po 26 val	Po 2 val	Po 26 val
Na ₂ HPO ₄	+19,7	+4,6	+45,6	+31,2
K ₂ HPO ₄	+26,4	+8,6	+27,2	+38,2
Tris-HCl	+18,1	+17,4	+14,8	-28,0

Iš 3.2 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad tiriamų fermentinių preparatų santykinio aktyvumo pokytis tiek po 2 val, tiek po 26 val yra teigiamas, naudojant natrio ir kalio fosfatinius buferius. Lyginant tarpusavyje K^+ ir Na^+ jonų įtaką proteazių aktyvumui, nustatyta, kad po 26 val Vilzim PRO conc dry ir Vilzim PRO dry proteazinis aktyvumas buvo aukštesnis kalio fosfatiname buferyje. Remiantis literatūros duomenimis, pateiktais 3.1 lentelėje, matyti, kad daugiausiai hidrolizės tyrimų buvo atliekama naudojant Tris-HCl buferį. Šio eksperimento metu Vilzim PRO dry proteazinis aktyvumas Tris-HCl buferiniame tirpale po 26 val sumažėjo net 28 %, o Vilzim PRO conc dry aktyvumas pakito nežymiai. Atsižvelgiant į gautus rezultatus bei į tai, kad Tris savo struktūroje turi gana aktyvių funkcinių grupių, kurių buvimas gali turėti įtakos analizės tyrimams, tolimesniems hidrolizės eksperimentams buvo pasirinktas kalio fosfatinis buferis.

3.2 Liucernos miltų (LM) ir juose esančių baltymų hidrolizė

Žinoma, kad hidrolizės metu, skylant peptidinėms jungtims ir susidarant laisvoms amino grupėms ar peptidams didėja ir baltymo molekulės tirpumas. Dėl šios priežasties, nuspręsta stebėti liucernos baltymų hidrolizę (2.3.6 b) laike, nustatant tirpių baltymų kiekį hidrolizės mišiniuose Bradford'o reagentu, kuris jungiasi prie laisvų pirminių amino grupių nekovalentine van der Valso sąveika ir sudaro spalvotus kompleksus (Brunelle ir kt., 2017). Pirmiausia buvo atliktas tyrimas, siekiant įvertinti pasirinktų proteazių gebėjimą hidrolizuoti liucernos baltymus, esančius augaliniuose miltuose, kuriuose yra pluoštą sudarančių priemaišų: įvairių cukrų, angliavandenių ir kt. (tiksliai biocheminė sudėtis nėra žinoma), lemiančių prastą peptidinių jungčių prieinamumą. Tyrimo pradžioje, ieškant optimalių LM baltymų hidrolizės sąlygų, pasirinkta nekoncentruota Vilzim PRO conc dry fermentinio preparato forma – Vilzim PRO dry. Lygiagrečiai buvo atliekama ir kita hidrolizės reakcija (2.3.6 b), kurios metu kartu su proteaze papildomai buvo naudojamas fermentinis preparatas Vilzim NSP, savo sudėtyje turintis ksilanazinį, celiuliazinį, gliukanazinį, mananazinį, pektinazinį ir galaktozidazinį aktyvumus, kadangi yra žinoma, kad ksilanas ir pektinas yra du pagrindiniai augalo ląstelių sienelės komponentai⁷. Rezultatai, gauti nustatant tirpių baltymų kiekį (2.3.3) hidrolizės mišiniuose po 0,5 val ir po 20 val pateikti 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. LM išankstinio apdoravimo Vilzim NSP įtaka liucernos baltymų hidrolizės rezultatams, į reakcijos mišinį dedant abu fermentinius preparatus tyrimo pradžioje.

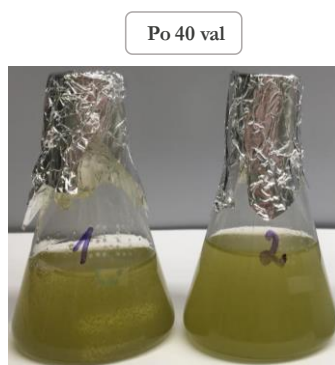
	Tirpių baltymų kiekis, mg/ml	
	Po 0,5 val	Po 20 val
LM + Vilzim PRO dry	0,015	0,023
LM + Vilzim PRO dry + Vilzim NSP	0,014	0,047

Didesnis tirpių baltymų kiekis buvo gautas LM ir juose esančių baltymų hidrolizei naudojant fermentų Vilzim PRO dry ir Vilzim NSP mišinį. Siekiant įsitikinti, ar tirpių baltymų kiekio padidėjimas po 20 val nebuvo susijęs su tuo, kad proteazė suhidrolizuoja mišinyje esantį Vilzim NSP fermentinį preparatą, atliktas dar vienas tyrimas. LM buvo inkubuojami su Vilzim NSP 16 val ir tik tada pridėdama Vilzim PRO dry proteazė. Rezultatai pateikti 3.4 lentelėje.

3.4 lentelė. LM baltymų hidrolizės rezultatai, priklausomai nuo Vilzim NSP pridėjimo laiko į hidrolizės mišinius.

	Tirpių baltymų kiekis, mg/ml		
	Po 16 val	Po 20 val	Po 40 val
LM + Vilzim PRO dry + Vilzim NSP	0,016	0,052	0,037

Gauti rezultatai parodė, kad abiejų hidrolizės reakcijų metu po 20 val susidaro panašus tirpių baltymų kiekis. Įdėjus Vilzim NSP ir Vilzim PRO dry į mišinį vienu metu (t.y. hidrolizės pradžioje) susidarė – 0,047 mg/ml tirpių baltymų (3.3 lentelė). Kitu atveju, Vilzim PRO dry buvo idėtas tik po 16 val (3.4 lentelė) susidarė – 0,052 mg/ml. Vadinas, liucernos baltymų hidrolizės metu Vilzim NSP nėra suhidrolizuojamas, o tirpių baltymų kiekio padidėjimą po 20 val galėjo nulemti tai, kad LM esančios augalinės priemaišos buvo iš dalies suskaidytos ir toks miltų apdorojimas leido proteazei lengviau pasiekti peptidines jungtis, esančias liucernos baltymų molekulėse. Tačiau, įdomu tai, kad nusprendus pamatuoti tirpių baltymų kiekį (2.3.3) po 40 val, buvo nustatytas tirpių baltymų kiekio sumažėjimas, nors vizualiai aiškiai buvo matoma, kad hidrolizė vyko (3.2 pav).



3.2 pav. LM ir juose esančių baltymų hidrolizės mėginiai po 40 val, naudojant Vilzim NSP ir Vilzim PRO dry. Kolbutės: **1** – LM (kontrolė); **2** – hidrolizės mišinys (LM + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry).

3.2 paveiksle, kolbutėje Nr. 1 matomas drumstas mišinys – tai kontrolinis tirpalas, kuriame yra tik LM suspenduoti buferiniame tirpale. Kolbutėje Nr. 2, kurioje vyko hidrolizė, aiškiai matoma, kad tirpalas yra daug homogeniškesnis, lyginant su kontroliniu tirpalu. Tapo akivaizdu, kad hidrolizė vyko ir nustatytų tirpių baltymų kiekis turėtų būti didesnis arba bent jau išlikti stabilus, todėl greičiausiai Bradford'o reagentas nėra tinkamas nustatyti tirpių baltymų kiekį liucernos baltymų hidrolizate.

Teiginiui pagrįsti išanalizuota literatūroje pateikta informacija apie Bradford'o metodiką. Galimai nustatytos dvi priežastys, leidžiančios abejoti Bradford'o reagento tinkamumu. Pirmoji

yra grindžiama reagento specifiškumu tam tikroms a.r. Yra žinoma, kad tik turinčios bazines šonines grandines (kaip Arg, His, Lys) bei aromatinės (Tyr, Trp, Phe) a.r. sudaro kompleksus su Bradford'o reagentu (Brunelle ir kt., 2017). Vadinasi, liucernos baltymų hidrolizate naudojant Vilzim PRO dry ar Vilzim PRO conc dry proteazes, specifiškai skeliančias peptidines jungtis ties Trp, Tyr, Phe ir Leu, Bradford'o reagentas reaguoja tik su laisvomis ar peptidų galuose esančiomis Trp, Tyr ir Phe a.r. Šių a.r. bendra procentinė dalis liucernos baltymuose yra tik 10,5 % iš kurių, Trp sudaro 1,7 %, Tyr – 4,3 % ir Phe – 4,5 %. Antroji priežastis yra tai, kad Bradford'o reagentas nesudaro kompleksų su laisvomis a.r., o peptido ar baltymo, sudarančio junginį su dažu, masė turi būti ne mažesnė kaip 3000 Da (Walker, 2002). Taigi, nuspręsta, kad Bradford'o metodika nėra patikima, nes reakcijos metu tirpale daugėja mažos molekulinės masės peptidų ar laisvų aminorūgščių kiekis, o hidrolizate didžiausią procentinę dalį (8,1 %) sudarančios laisvos ar peptidų galuose esančios Leu molekulės nereaguoja su dažu. Todėl tolimesnių tyrimų analizei buvo pasirinkta patikimesnė ir jautresnė TNBS metodika, naudojama laisvų amino grupių skaičiaus nustatymui hidrolizate. Svaria priežastimi buvo laikoma, kad TNBS sudaro kompleksus su įvairios molekulinės masės baltymų molekulėmis bei reaguoja su visomis a.r., priešingai negu Bradford'o reagentas.

Analogiškomis sąlygomis kaip aprašyta aukščiau, atliktas hidrolizės tyrimas (2.3.6 b), kurio metu LM 16 val buvo veikiami Vilzim NSP ir po to pridedama proteazė Vilzim PRO dry. Bendra hidrolizės trukmė buvo 40 val. Šį kartą, rezultatai buvo įvertinami TNBS metodika (2.3.7), apskaičiuojant hidrolizės laipsnį (DH) (3.5 lentelė).

3.5 lentelė. Hidrolizės laipsnio priklausomybė nuo fermentinės LM hidrolizės trukmės.

	Hidrolizės laipsnis (DH), mmol/g		
	Po 16 val	Po 20 val	Po 40 val
LM + Vilzim PRO dry + Vilzim NSP	0,37	0,64	0,00

Gauti rezultatai, nustatyti TNBS reagentu, parodė, kad po 40 val hidrolizės laisvų amino grupių kiekis nukrenta net iki 0,00 mmol/g. Tapo akivaizdu, kad hidrolizatų kiekis ženkliai sumažėja po 40 val, nepriklausomai nuo to, kokia metodika buvo stebimas proceso vyksmas (*detalesnis paaiškinimas pateiktas 3.4 skyriuje*). Tačiau, įvertinus galimas rezultatų paklaidas, nustatant tirpių baltymų kiekį Bradford'o metodu, tolimesnių tyrimų metu buvo nuspręsta naudoti patikimesnę ir jautresnę TNBS metodiką. Taip pat, buvo nutarta, kad LM apdorojus Vilzim NSP, liucernos baltymų hidrolizė vyksta tik iš dalies, t.y. proteazės prieinamumas prie peptidinių jungčių yra vis dar ribojamas augalinių priemaišų ar glaudžios liucernos baltymų struktūros. Nuspręsta, ieškoti kitų LM apdoravimo būdų, kurie leistų pasiekti kuo aukštesnį liucernos miltuose esančių baltymų hidrolizės laipsnį.

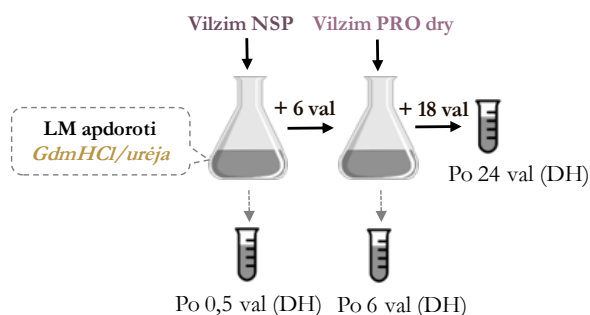
3.3 Liucernos miltų ar juose esančių baltymų išankstinis apdorojimas

3.3.1 Apdorojimas guanidino hidrochloridu (GdmHCl) ir urėja

Proteolizės efektyvumas gali būti ribojamas dėl ypatingai glaudžios liucernos baltymų struktūros. Denatūracijos metu yra sutrikdomos ketvirtinė, tretinė ir antrinė baltymo struktūros ir yra atveriamos pirminės struktūros peptidinės jungtys, taip padidinant galimybę proteazei pasiekti tikslines peptidines jungtis ir gauti aukštesnį hidrolizės laipsnį. Dažniausiai baltymų denatūravimui yra naudojami cheminiai reagentai, pvz., guanidino hidrochloridas (GdmHCl) ar urėja (karbamidas) (Lim ir kt., 2009). Siekiant įvertinti išankstinio liucernos miltuose esančių baltymų apdorojimo denatūravimo reagentais įtaką hidrolizės rezultatams, LM buvo inkubuojami 1 val su 6 M guanidino hidrochlorido ar 8 M urėjos tirpalais (2.3.13). Po inkubacijos mėginiai buvo gerai atplaunami dH₂O, kad neliktų denatūrantų, kurie galėtų įtakoti hidrolizės efektyvumą. Toliau, apdoroti LM, buvo hidrolizuojami (2.3.6 a) (3.3 pav):

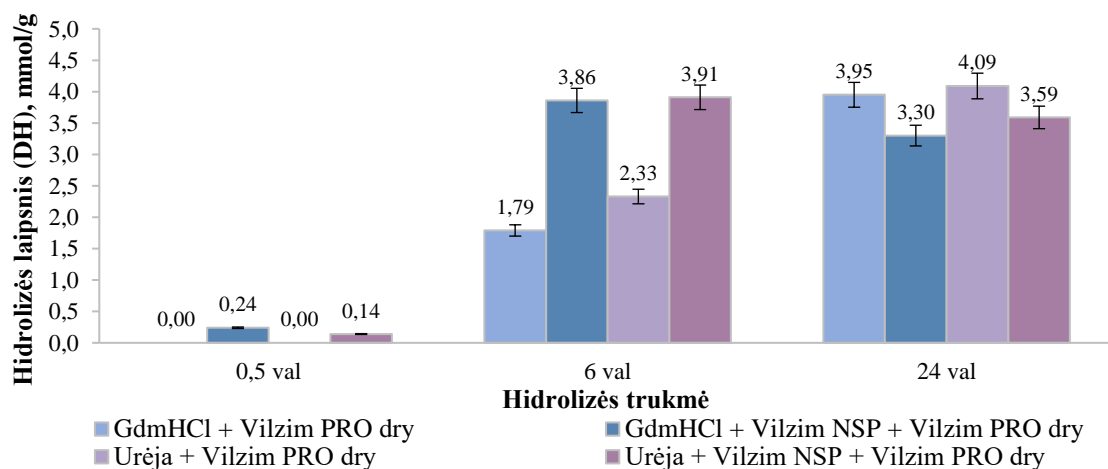
i) su Vilzim NSP ir po 6 val pridėdant Vilzim PRO dry;

ii) po 6 val tik su Vilzim PRO dry;



3.3 pav. LM esančių baltymų hidrolizės schema, išankstinio apdorojimo metu veikiant denatūruojančiais agentais – guanidino hidrochloridu (GdmHCl) ar urėja (karbamidu).

Hidrolizės rezultatai buvo nustatyti po 0,5 val, 6 val ir 24 val, įvertinant laisvų amino grupių skaičių (2.3.7) hidrolizate (3.4 pav).



3.4 pav. Denatūruojančių agentų naudojimo įtaka liucernos baltymų hidrolizės efektyvumui.

Iš 3.4 pav. pateiktų duomenų matyti, kad hidrolizuojant iš anksto denatūruotus baltymus, pasiekiamas ženkliai aukštesnis hidrolizės laipsnis, nei vykdant procesą su neapdorotais LM

esančiais baltymais. Tapo akivaizdu, kad sutrikdžius liucernos baltymo antrinę, tretinę ir ketvirtinę struktūras, peptidinės liucernos baltymų jungtys tapo lengviau prieinamos proteazei. Lyginant tarpusavyje naudotus denatūravimo agentus - guanidino hidrokloridą ir urėją, tiek po 6 val, tiek po 24 val, aukštesnis hidrolizės laipsnis buvo gautas LM baltymus apdorojus urėjos tirpalu. Be to, po 6 val į mišinius tik pridėjus proteazės, hidrolizės laipsnis buvo daug aukštesnis LM papildomai paveikus Vilzim NSP. Vadinasi, proteolizė vyko daug efektyviau bent iš dalies suardžius miltuose esančias augalines priemaišas. Taigi, tyrimo metu, buvo nustatyta, kad išankstinis LM apdorojimas denatūruojančiais agentais turi didelę įtaką proteolizės efektyvumui ir, kad labai svarbu užtikrinti proteazės prieinamumą prie peptidinių jungčių, norint gauti kuo aukštesnį hidrolizės laipsnį.

3.3.2 Apdorojimas lipolizininiais fermentais

Žinoma, kad liucernos miltų sudėtyje randama net 7,7 % riebalų, kurie gali būti liucernos baltymų hidrolizę slopinančiu faktoriumi. Šių riebalų pašalinimui buvo nuspręsta nenaudoti cheminių metodų, o pasitelkti riebalus hidrolizuojantį fermentą – lipazę. Siekiant išsiaiškinti liucernos baltymų hidrolizės efektyvumo priklausomybę nuo išankstinio LM apdoravimo lipaze buvo atliktas tyrimas (2.3.6 a), kurio metu LM 6 val buvo veikiami dviejų fermentinių preparatų – lipazės Vilzim LPS L ir anksčiau teigiamus rezultatus davusiu Vilzim NSP fermentų mišiniu. Po 6 val inkubacijos, buvo pridėdama proteazė Vilzim PRO dry. Hidrolizės rezultatai pateikti 3.6 lentelėje.

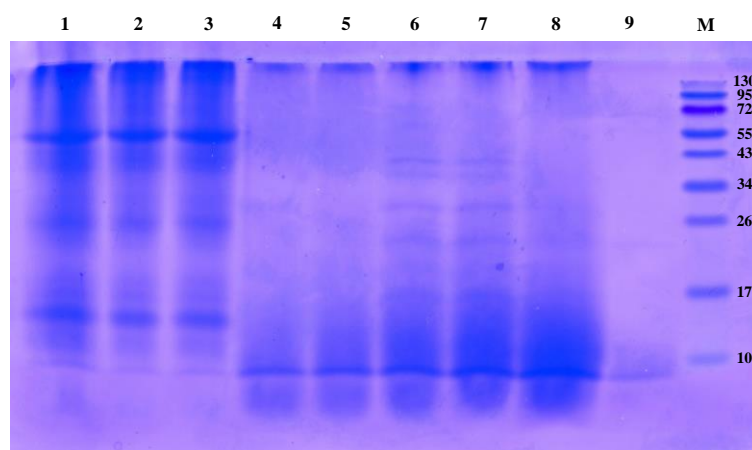
3.6 lentelė. LM išankstinio apdoravimo lipaze ir Vilzim NSP įtaka baltymų hidrolizės rezultatams.

	Hidrolizės laipsnis (DH), mmol/g		
	Po 0,5 val	Po 6 val	Po 24 val
LM + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry	0,21	4,60	4,04

Pagal 3.6 lentelėje pateiktus duomenis, pastebėta, kad išankstinio apdoravimo metu, LM veikiant lipaze ir Vilzim NSP, po 6 val gaunamas gana aukštas hidrolizės laipsnis – 4,60 mmol/g, kuris yra netgi didesnis, nei gautas LM esančius baltymus paveikus urėja ir LM esančias priemaišas - Vilzim NSP (3.4 pav.). Hidrolizės rezultatai, leido teigti, kad LM esančios lipidų molekulės trukdo pasiekti aukštą hidrolizės laipsnį ir proceso metu turi būti pašalintos, nes suhidrolizavus miltuose esančius riebalus ir LM papildomai apdorojus fermentu Vilzim NSP, proteolizės efektyvumas ženkliai išaugo.

Gauti gana geri LM esančių baltymų hidrolizės rezultatai, proceso metu taikant išankstinį apdorojimą, paskatino atlikti NDS-PAGE analizę (2.3.5), kuri leido įvertinti realų hidrolizate esančių peptidų ar laisvų a.r. pasiskirstymą pagal dydį. Kadangi yra žinoma, kad atliekant NDS-PAGE baltymų krūvis ar susilankstymas neturi įtakos, o baltymai pasiskirsto gelyje

atsižvelgiant tik į grandinės ilgį. Hidrolizatų, gautų apdorojant LM denatūravimo agentais (3.3.1) bei lipaze (3.3.2) NDS-PAGE analizės rezultatai pateikti 3.5 pav.



3.5 pav. LM esančių baltymų hidrolizatai ir kontroliniai mėginiai po 24 val trukusios hidrolizės, kurios metu taikytas išankstinis apdorojimas denatūruojančiais agentais bei lipaze. *Takeliai:* **1** – LM (kontrolė); **2** – LM apdoroti GdmHCl (kontrolė); **3** – LM apdoroti urėja (kontrolė); **4** – LM apdoroti GdmHCl + Vilzim PRO dry; **5** – LM apdoroti urėja + Vilzim PRO dry; **6** – LM apdoroti GdmHCl + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; **7** – LM apdoroti urėja + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; **8** – LM + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; **9** – Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry (kontrolė); **M** – molekulinės masės dydžių standartas, kDa.

Rezultatai pateikti 3.5 pav. aiškiai parodo, kad LM baltymai, kurie yra matomi kontroliniuose (1-3) takeliuose, yra suhidrolizuojami į mažesnės molekulinės masės peptidus ar netgi laisvas aminorūgštis. Hidrolizatai gauti veikiant LM baltymus denatūruojančiais agentais, pateikti 4-7 takeliuose, o 8 takelyje gauti LM veikiant lipaze. Lyginant kontrolinius mėginius 2-3 takeliuose su tiriamaisiais mėginiais 4-5 takeliuose, aiškiai matomos susidariusios mažos molekulinės masės baltymų sancaupos 17-10 kDa intervale. LM papildomai apdorojus Vilzim NSP (mėginiai 6-7 takeliuose) matyti didesnių peptidų žymės 43-17 kDa intervale, bei gausus kiekis mažos molekulinės masės peptidų ties 17-10 kDa žymėmis. Tačiau didžiausias kiekis mažos molekulinės masės peptidų matomas 8-tame takelyje, kai LM buvo apdorojami lipaze.

Abiejų tyrimų metu, t.y., apdorojus LM baltymus denatūruojančiais agentais ar priemaišas lipaze bei papildomai veikiant Vilzim NSP, nustatyta hidrolizės laipsnio reikšmė smarkiai išauga, lyginant su 3.2 eksperimento rezultatais, kai LM buvo apdorojami tik Vilzim NSP. Taigi, galima drąsiai teigti, kad šios papildomos miltų apdorojimo priemonės yra veiksmingos, norint pasiekti kuo didesnę liucernos baltymų hidrolizės efektyvumą.

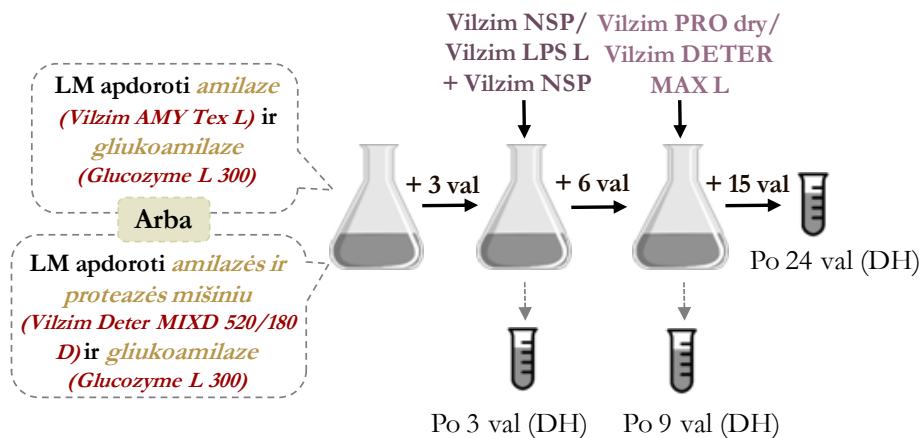
3.3.3 Apdorojimas amilaze ir gliukoamilaze

Siekiant išgauti dar aukštesnį hidrolizės laipsnį, išankstinio miltų apdorojimo metu, nuspręsta panaudoti amilazius ir gliukoamilazinius aktyvumus turinčius fermentinius preparatus (2.3.6 a), kuriais tikėtasi sumažinti miltinių priemaišų – angliavandenių kiekį, suskaidant juos iki cukrų ir taip dar labiau atverti liucernos baltymų peptidines jungtis. Žinoma, kad amilazė polisacharidus suskaldo į mažesnės molekulinės masės dimerus, trimerus, o

gliukoamilazė hidrolizuoja susidariusius junginius iki cukrų (Horvathova ir kt., 2000). Tyrimo metu buvo atliekamos dvi lygiagrečios eksperimentinės serijos (3.6 pav):

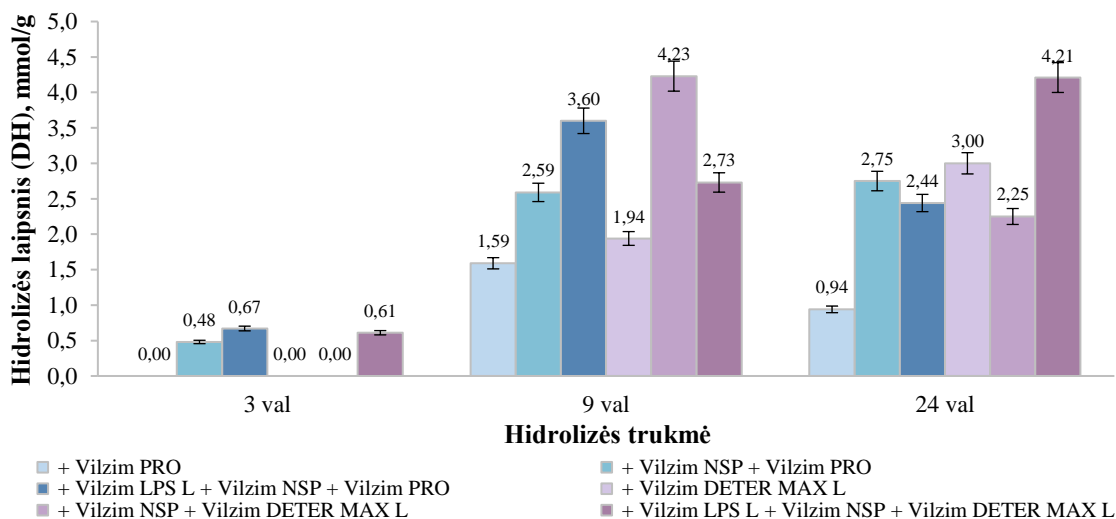
i) LM 1 val buvo veikiami α -amilaze Vilzim AMY Tex L ir po to dar 2 val gliukoamilaze Glucozyme L 300;

ii) LM 1 val buvo veikiami amilazės ir proteazės mišiniu ir po to dar 2 val gliukoamilaze.



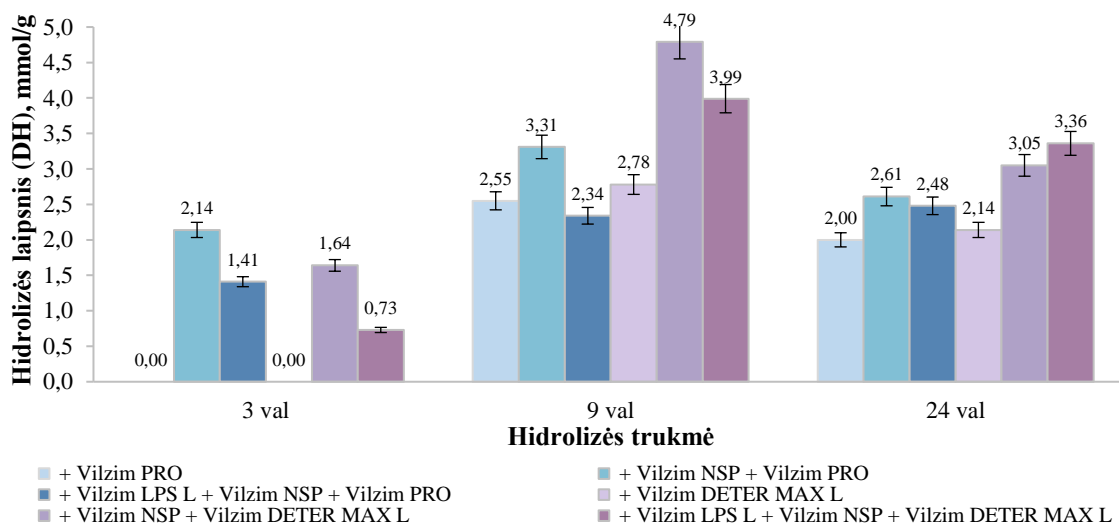
3.6 pav. LM apdoravimo amilaze ir gliukoamilaze schema.

Po 3 val, į abu mišinius buvo pridamas Vilzim LPS L ir Vilzim NSP fermentinių preparatų mišinys arba tik Vilzim NSP. Inkubacija buvo vykdoma 6 val. Galiausiai, taip apdoroti LM 15 val buvo veikiami proteaze Vilzim PRO dry. Analogiškas tyrimas buvo atliktas veikiant kita proteaze - Vilzim Deter MAX L, kuri yra pritaikyta augalinės kilmės baltymų, tokių kaip sojos, kakavos ir kt. hidrolizei. Hidrolizės rezultatai gauti LM apdorojus amilaze **Vilzim AMY Tex L** ir gliukoamilaze **Glucozyme L 300** bei naudojant abi proteazes pateikti 3.7 paveiksle.



3.7 pav. Išankstinio LM apdoravimo amilaze **Vilzim AMY Tex L** ir gliukoamilaze **Glucozyme L 300** hidrolizės rezultatai priklausomai nuo hidrolizės trukmės.

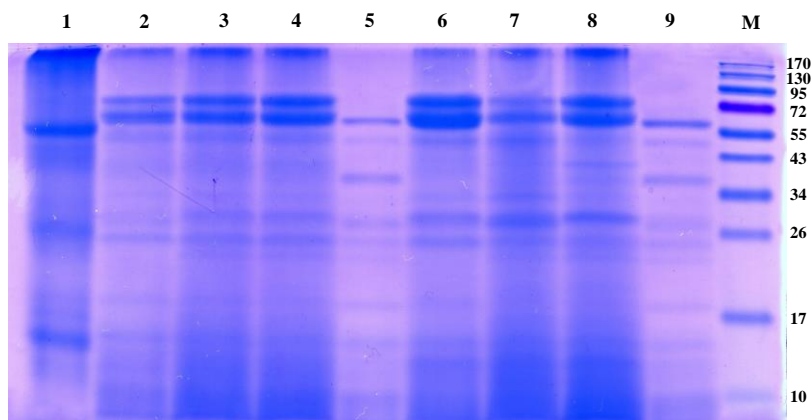
Baltymų hidrolizės laipsnis nustatytas po 3 val, 9 val ir 24 val antrosios eksperimentinės serijos metu, LM apdorojus **Vilzim Deter MIXD 520/180 D** bei gliukoamilaze **Glucozyme L 300** pateiktas 3.8 pav.



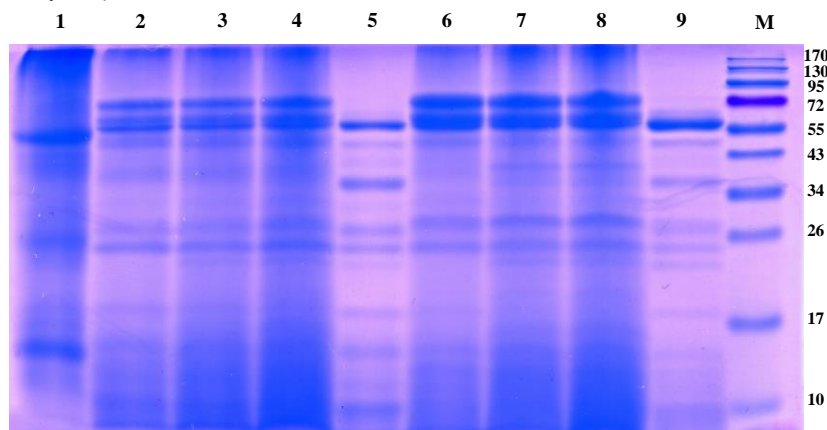
3.8 pav. Išankstinio LM apdorojimo amilaze ir proteaze **Vilzim Deter MIXD 520/180 D** bei gliukoamilaze **Glucozyme L 300** hidrolizės rezultatai priklausomai nuo hidrolizės trukmės.

Sudarytose diagramose, 3.7 pav. ir 3.8 pav., matomas nežymus rezultatų išsibarstymas, tačiau akivaizdu, kad visais atvejais po 9 val įdėjus proteazės, stebimas staigus hidrolizės laipsnio padidėjimas. Vadinasi, atlikus LM apdorojimą amilazinį ir gliukoamilazinį aktyvumą turinčiais fermentais, priemaišose esantys angliavandeniai buvo hidrolizuojami, o liucernos baltymų molekulės tapo lengviau prieinamoms proteazėms. Aukščiausias hidrolizės laipsnis – 4,79 mmol/g (3.8 pav.), buvo nustatytas LM apdorojus amilazės/proteazės mišiniu, gliukoamilaze ir veikiant Vilzim NSP bei proteaze Vilzim DETER MAX L. Ši proteazė pasirinkta tyrimams, nes specifikacijoje yra nurodyta, kad gali hidrolizuoti augalinės kilmės (sojos ir kakavos) baltymus. Lygiagrečiai atlikus proteolizę su Vilzim PRO dry, aukščiausias hidrolizės laipsnis (3,60 mmol/g), buvo gautas apdorojant LM amilaze ir gliukoamilaze bei veikiant Vilzim LPS L, ir Vilzim NSP (3.7 pav). Tačiau, visais atvejais, po 24 val buvo stebimas hidrolizės laipsnio sumažėjimas (*detalesnis paaiškinimas pateiktas 3.4 skyriuje*). Taigi, apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad liucernos miltuose esančių baltymų hidrolizę vykdant su proteaze Vilzim DETER MAX L, kuri skirta augalinių baltymų hidrolizei, gautas nežymiai aukštesnis hidrolizės laipsnis, lyginant su Vilzim PRO dry, kuri skirta pramoniniam maisto apdorojimui.

Tyrimo metu, taip pat atlikta NDS-PAGE analizė (2.3.5). Hidrolizatų bei kontrolinių mėginių, kada LM buvo apdorojami amilaze Vilzim AMY Tex L ir gliukoamilaze Glucozyme L 300 baltymų išsidėstymas pagal dydį pateiktas 3.9 pav., o amilazės ir proteazės mišiniu Vilzim Deter MIXD 520/180 D bei gliukoamilaze Glucozyme L 300 – 3.10 pav.



3.9 pav. LM hidrolizatai ir kontroliniai mėginiai po 24 val trukusios hidrolizės, kurios metu taikytas išankstinis apdorėjimas amilaze Vilzim AMY Tex L ir gliukoamilaze Glucozyme L 300. *Takeliai:* **1** – LM (kontrolė); **2** – Apdoroti LM + Vilzim PRO dry; **3** – Apdoroti LM + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; **4** – Apdoroti LM + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; **5** - Vilzim AMY Tex L + Glucozyme L 300 + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry (kontrolė); **6** – Apdoroti LM + Vilzim DETER MAX L; **7** – Apdoroti LM + Vilzim NSP + Vilzim DETER MAX L; **8** – Apdoroti LM + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim DETER MAX L; **9** - Vilzim AMY Tex L + Glucozyme L 300 + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim DETER MAX L (kontrolė); **M** – molekulinės masės dydžių standartas, kDa.



3.10 pav. LM hidrolizatai ir kontroliniai mėginiai po 24 val trukusios hidrolizės, kurios metu taikytas išankstinis apdorėjimas amilazės ir proteazės mišiniu Vilzim Deter MIXD 520/180 D bei gliukoamilaze Glucozyme L 300. *Takeliai:* **1** – LM (kontrolė); **2** – Apdoroti LM + Vilzim PRO dry; **3** – Apdoroti LM + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; **4** – Apdoroti LM + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; **5** - Vilzim Deter MIXD 520/180 D + Glucozyme L 300 + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry (kontrolė); **6** – Apdoroti LM + Vilzim DETER MAX L; **7** – Apdoroti LM + Vilzim NSP + Vilzim DETER MAX L; **8** – Apdoroti LM + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim DETER MAX L; **9** - Vilzim Deter MIXD 520/180 D + Glucozyme L 300 + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim DETER MAX L (kontrolė); **M** – molekulinės masės dydžių standartas, kDa.

Iš 3.9 pav. ir 3.10 pav. matyti, kad LM, apdorojus amilaze ir gliukoamilaze, baltymai esantys miltuose buvo suhidrolizuoti iki įvairaus molekulinio dydžio, nuo 72 kDa iki 10 kDa ar mažesnių, peptidų. Kontroliniuose 5 ir 9 takeliuose buvo leidžiami fermentiniai preparatai. Matoma, kad dalis peptidų esančių 2-4 bei 6-8 takeliuose sutampa su žymėmis, esančiomis kontroliniuose fermentų mėginiuose, todėl tokie persidengiantys peptidai nėra laikomi liucernos baltymų hidrolizės rezultatu. Taip pat, išanalizavus 2-4 ir 6-8 takelius, aiškiai matomos tik jiems būdingos gausios mažų peptidų sancaupos, esančios 17-10 kDa intervale. Be abejonės, tai yra suhidrolizuoti liucernos miltuose esantys baltymai. Hidrolizės mėginiai matomi 4 ir 8 takeliuose buvo gauti LM apdorojus amilazinį ir gliukoamilazinį aktyvumą

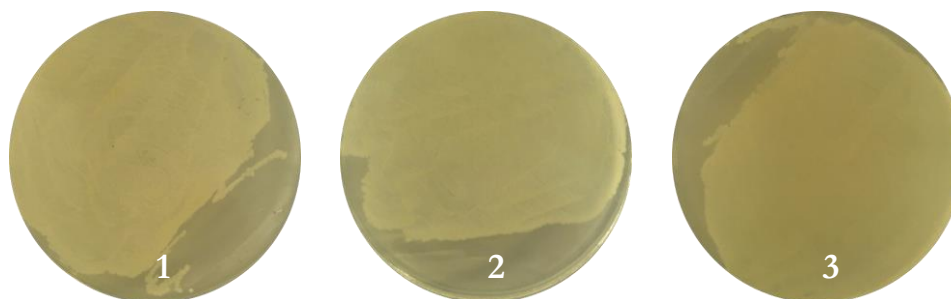
turinčiais fermentais bei lipaze, Vilzim NSP ir proteaze. Stebint šių takelių vaizdą geliuose, matyti, kad juose esančios mažų peptidų sankaupos yra ryškiausios. Be to, lyginant 2-4 takelius su 6-8, geliuose matomas labai panašus suhidrolizuotų baltymų išsidėstymas pagal dydį. Todėl daroma išvada, kad abi proteazės tiek Vilzim DETER MAX L, tiek Vilzim PRO dry geba vienodai efektyviai hidrolizuoti augalinės kilmės - liucernos baltymus.

Apibendrinant svarbu paminėti, kad LM apdorojimas amilazini ir gliukoamilazini aktyvumą turinčiais fermentais leido pasiekti šiek tiek aukštesnį miltuose esančių baltymų hidrolizės laipsnį, nei veikiant LM denatūruojančiais agentais ar lipaze. Tačiau beveik visų tyrimų metu pastebima, kad po 24 val hidrolizės laipsnis sumažėja. Buvo padaryta prielaida, kad vykstant hidrolizės reakcijai, tirpaluose galimai pradeda augti mikroorganizmai, kurie baltymų hidrolizatus naudoja kaip maistines medžiagas. Todėl tolesniame etape buvo atliekami mikrobiologiniai tyrimai.

3.4 LM hidrolizatų mikrobiologinio užterštumo tyrimas

3.4.1 Mikrobiologinio užterštumo šalinimas

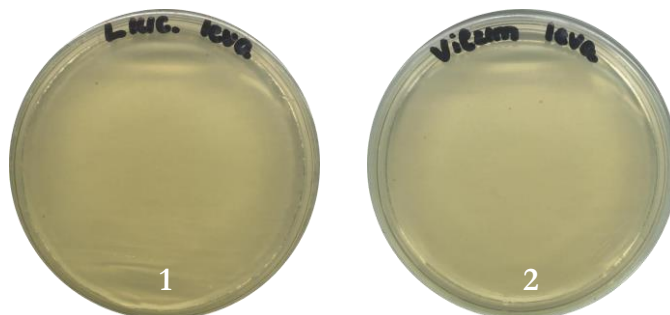
Naudojant mikrobiologinės kilmės fermentus ir augalinės kilmės miltus, hidrolizės mėginiuose gali atsirasti mikrobiologinis užterštumas. Literatūroje teigiama, kad sausuose miltuose, esantis minimalus drėgmės kiekis, negali palaikyti mikroorganizmų augimo, tačiau neatmetama galimybė, kad jie ilgą laiką išlieka ramybės būsenoje ir pradeda daugintis tik atsiradus tam palankioms sąlygoms (Rose ir kt., 2012). Todėl, buvo manoma, kad hidrolizės laipsnio sumažėjimas gali būti siejamas su mikroorganizmais, kurie auga ir dauginasi proceso metu bei gali naudoti susidariusius peptidus, cukrus ar aminorūgštis kaip maistinę medžiagą. Nuspręsta LM hidrolizatų bei kontrolinius mėginius po 24 val trukusios hidrolizės (2.3.6 b) užsėti ant sterilios LB terpės (2.3.8). Užsėjus mėginius, lėkštelės buvo inkubuojamos 37 °C temperatūroje per naktį (3.11 pav).



3.11 pav. Mikrobiologinis užterštumas po 24 val hidrolizės. Lėkštelės: 1 – LM (kontrolė); 2 – LM + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; 3 – Vilzim NSP + Vilzim PRO dry (kontrolė).

Iš 3.11 pav. matyti, kad visuose tirpaluose, tiek kontroliniuose, kuriuose yra tik LM ar tik tyrimo metu naudoti fermentiniai preparatai, tiek hidrolizės mišinyje proceso metu atsiranda gausios mikroorganizmų kolonijos. Tai suprantama, nes tiek miltai, tiek fermentiniai preparatai

atliekant eksperimentą nebuvo sterilinami. Nuspręsta, kad prieš atliekant hidrolizę, LM tirpalą reikia autoklavuoti, o fermentinių preparatų mišinį, kurį sudaro Vilzim NSP ir Vilzim PRO dry, praleisti pro sterilų 0,45 µm PVDF membraninį filtrą (2.3.9). Tokiu būdu išsterilinti tirpalai buvo vėl patikrinti. Atitinkamas abiejų tirpalų kiekis buvo užsėtas ant LB terpės ir inkubuota 37 °C temperatūroje per naktį (3.12 pav.).



3.12 pav. Sterilintų tirpalų mikrobiologinio užterštumo rezultatas. *Lėkštelės:* **1** – LM sterilinti autoklavuojant; **2** – Vilzim NSP + Vilzim PRO dry praleisti pro 0,45 µm PVDF membraninį filtrą.

3.12 pav. matyti, kad sterilinus tirpalus, mikrobiologinis užterštumas išnyksta. Todėl nuspręsta tolimesnę LM hidrolizę vykdyti, visų pirma sterilinant naudojamus tirpalus bei indus.

Ankstesnių tyrimų metu nustatėm, kad po filtracijos fermentinių preparatų tirpalas buvo sterilus, galima spėti, kad mikroorganizmai esantys tirpale yra sulaikomi membranos paviršiuje. Tačiau žinoma, kad filtro poros gali sulaikyti ne tik mikroorganizmus bet ir baltymo molekules, o sterilinant fermentinius preparatus ypatingai svarbu neprarasti fermentinio aktyvumo. Teoriškai sterilinimo metu naudojant 0,45 µm PVDF membraninį filtrą, fermentinių preparatų aktyvumas turėtų išlikti nepakitęs, nes baltymų molekulės nepraeina tik pro smulkesnės kaip 0,1 µm poros. Tačiau žinant, yra svarbus fermentinių preparatų aktyvumo išlaikymas hidrolizės procesų metu, vis dėl to, buvo nuspręsta nustatyti ar kinta Vilzim NSP (2.3.4), Vilzim PRO dry ir Vilzim PRO conc dry (2.3.1) aktyvumas prieš ir po sterilinimo membraniniais filtrais. Gauti rezultatai pateikti 3.7 lentelėje.

3.7 lentelė. Fermentinių preparatų Vilzim NSP ir Vilzim PRO dry aktyvumo pokytis sterilinimo metu, naudojant 0,45 µm PVDF membraninį filtrą.

Fermentas		Aktyvumas, U/ml
Vilzim PRO dry	Prieš filtraciją	39,7
	Po filtracijos	38,9
Vilzim PRO conc dry	Prieš filtraciją	136,9
	Po filtracijos	133,0
Vilzim NSP	Prieš filtraciją	1065,7
	Po filtracijos	957,6

Rezultatai parodė, kad fermentinių preparatų aktyvumai prieš filtraciją ir po filtracijos kinta nežymiai. Galima teigti, kad 0,45 µm PVDF membraninis filtras pilnai praleidžia baltymines

medžiagas, fermentinių preparatų aktyvumas nėra slopinamas ir taip sterilinti fermentai gali būti naudojami hidrolizės procese.

3.4.2 Hidrolizės tyrimas apdorojant LM slėgiu, mikrobangomis, ultragarsu ir aukšta temperatūra

Siekiant eliminuoti mikrobiologinio užterštumo įtaką hidrolizės rezultatams, buvo atliktas dar vienas tyrimas, kurio metu prieš hidrolizę LM buvo apdorojami aukštu slėgiu autoklavuojant. Taip pat, literatūroje pateikiama eksperimentų, kuriuose augalinės kilmės baltymai, išankstinio apdorojimo metu yra veikiami mikrobangomis, ultragarsu ir aukšta temperatūra virinant (Marciniak ir kt., 2018; Gohi ir kt., 2019). Žinoma, kad taikant fizikinį apdorojimą medžiagos yra ne tik sterilinamos, bet ir išvyniojamos ar net denatūruojamos baltymų molekulės, ir taip gali būti pagerinamas proteazių prieinamumas prie peptidinių jungčių. LM buvo veikiami 30 min kiekviena apdorojimo technika (2.3.12). Po apdorojimo tirpalai buvo atvėsunami ir tik tada pridedamas fermentas Vilzim NSP, siekiant išvengti fermento inaktyvavimo. Po 16 val į mišinį buvo pridedama proteazė Vilzim PRO dry. Visų eksperimentinių serijų metu buvo naudojami sterilinti fermentinių preparatų tirpalai bei indai. Gauti hidrolizės rezultatai pateikti 3.8 lentelėje.

3.8 lentelė. LM išankstinio apdorojimo fizikiniais metodais įtaka hidrolizės rezultatams.

Apdorojimo technika	Hidrolizės laipsnis (DH), mmol/g			
	Po 0,5 val	Po 16 val	Po 24 val	Po 40 val
Autoklavavimas	0	0	0	0
Mikrobangos	0	0	0,043	0
Ultragarasas	0	0	0	0
Virinimas (<i>aukšta temperatūra</i>)	0	0,005	0	0

Pagal 3.8 lentelėje pateiktus rezultatus matyti, kad LM esančių baltymų hidrolizė nevyksta, apdorojus miltus slėgiu, mikrobangomis, ultragarsu ar aukšta temperatūra. Literatūroje pateikti apdorojimo eksperimentai buvo vykdomi su baltymų izoliatais, tačiau šio eksperimento metu naudojamas substratas yra bendrame miltų mišinyje, todėl manoma, kad veikiant LM slėgiu, mikrobangomis, ultragarsu ar aukšta temperatūra įvyksta priemaišinių medžiagų, esančių miltų sudėtyje, agregacija, baltymų molekulės aplimpa ir tampa visiškai neprieinamos naudojamiems fermentams. Taip pat, literatūroje teigiama, kad terminis liucernos baltymų apdorojimas daro neigiamą įtaką baltymų funkcinėms savybėms. Autorių nustatyta, kad liucernos lapuose esančių baltymų denatūracijos temperatūra buvo 57 °C, kurią pasiekus sumažėja vandenilinių jungčių ir joninių grupių gebėjimas prisijungti prie vandens molekulių, kas lemia prastą baltymų tirpumą vandeninėse sistemose. Manoma, kad įvyksta baltymų termoagregacija (Zhang ir kt., 2017).

Kadangi buvo nustatyta, kad hidrolizės laipsnis pradeda mažėti jau po 24 val, buvo nuspręsta patikrinti ar mikroorganizmų kiekis nedidėja proceso eigoje. Dėl šios priežasties, hidrolizės bei kontroliniai mėginiai, gauti LM išankstinio apdorojimo metu paveikus aukštu slėgiu (autoklavavus) (2.3.12) buvo užsėti ant sterilios LB terpės (2.3.8). Fermentinių preparatų mėginiai prieš tyrimą buvo sterilinti filtruojant. Mikrobiologinis užterštumas tikrintas po 40 val trukusios hidrolizės. Užsėtos lėkštelės inkubuotos 37 °C temperatūroje per naktį (3.13 pav).



3.13 pav. Hidrolizės mėginių, išankstinio apdorojimo metu paveiktų aukštu slėgiu autoklavuojant, mikrobiologinio užterštumo tyrimo rezultatas, po 40 val trukusios hidrolizės. *Lėkštelės:* **1** – LM (kontrolė); **2** – LM + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; **3** – Vilzim NSP + Vilzim PRO dry (kontrolė).



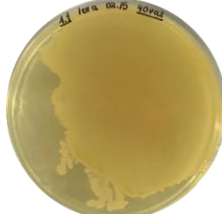







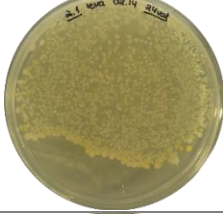
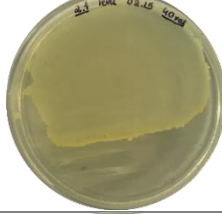



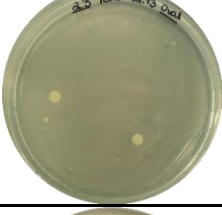

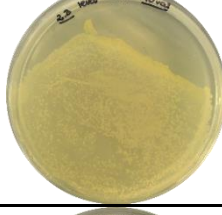
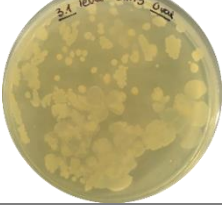
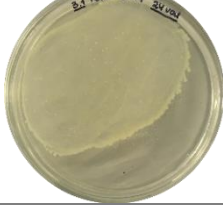

Atlikus tyrimą matyti, kad mikrobiologinis užterštumas atsiranda proceso eigoje, net ir tirpaluose, kurie buvo sterilinti hidrolizės pradžioje. Kadangi, tyrimo atlikimas idealiai steriliomis sąlygomis yra sudėtingas, žvelgiant į masto padidinimo etapą ir pareikalautų didelių eksplotavimo išlaidų bei energetinių sąnaudų, buvo nuspręsta ištirti antimikrobinių medžiagų, kurios sustabdytų bakterijų vystymąsi hidrolizės proceso eigoje, panaudojimą.

3.4.3 Antimikrobinių medžiagų panaudojimo tyrimas


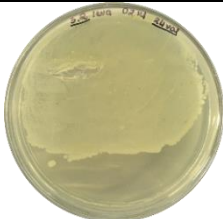
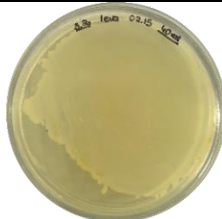










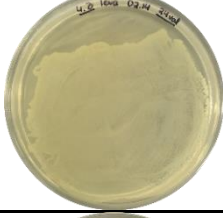


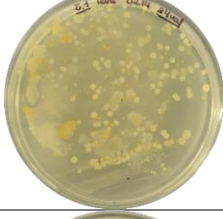

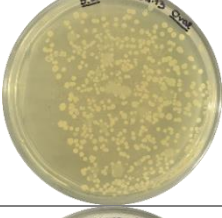

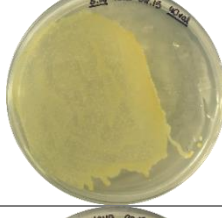
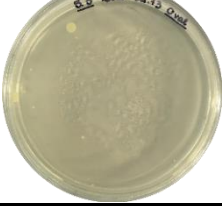
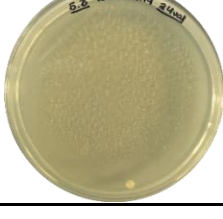
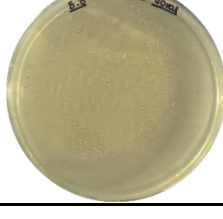
Kadangi baltymų hidrolizatų panaudojimas susijęs su maisto pramonės sektoriumi, suprantama, kad naudojamos antimikrobinės medžiagos turėtų būti aprobuotos. Remiantis Davidson M. P., 2005 „Antimicrobials in food“ knygoje pateiktomis antimikrobinių medžiagų, naudojamų maisto gamyboje, kategorijomis bei laboratorijoje turimais resursais nuspręsta ištirti natrio nitrito (*kategorija -nitritai*), natrio sulfito (*sulfitai*), kaprino rūgšties (*vidutinio ilgio grandinės riebalų rūgštys*) ir sorbo rūgšties (*sorbo rūgštis ir sorbatai*) antimikrobinį poveikį (2.3.10), stebint mikrobiologinio užterštumo kitimą LM hidrolizės mėginiuose. Kiekviena antimikrobinė medžiaga kartu su fermentiniais preparatais į mišinius buvo dedama tyrimo pradžioje, o medžiagų koncentracijos pasirinktos atsižvelgiant į ES nustatytus didžiausius ir leistinus naudoti maisto produktuose kiekius. LM baltymų hidrolizė buvo atliekama apdorojant miltus Vilzim NSP ir Vilzim LPS L fermentais bei pridedant Vilzim PRO dry proteazę. Mikrobiologinis užterštumas buvo stebimas užsėjant hidrolizės mėginius bei kontrolinius liucernos ir fermentinių preparatų mėginius ant sterilios LB terpės bei inkubuojant lėkšteles 37 °C temperatūroje per naktį. Periodiniai sėjimai atliekami proceso pradžioje (0 val), po 24 val ir po 40 val hidrolizės. Lygiagrečiai buvo stebimas mikrobiologinio užterštumo kitimas

kontrolinėje eksperimentinėje serijoje, kurios metu į tiriamuosius mišinius nebuvo dedama jokia antimikrobinė medžiaga. Tyrimo rezultatai pateikti 3.9 lentelėje.

3.9 lentelė. Antimikrobinų medžiagų įtaka mikrobiologinam užterštumui (lentelės tęsinys kitame puslapyje).

Mišinio sudėtis	Mikrobiologinis užterštumas		
	Po 0 val	Po 24 val	Po 40 val
Kontrolė (LM)			
Kontrolė (LM + Vilzim NSP + Vilzim LPS L + Vilzim PRO dry)			
Kontrolė (Vilzim NSP + Vilzim LPS L + Vilzim PRO dry)			
Natrio nitritas (LM)			
Natrio nitritas (LM + Vilzim NSP + Vilzim LPS L + Vilzim PRO dry)			
Natrio nitritas (Vilzim NSP + Vilzim LPS L + Vilzim PRO dry)			
Natrio sulfitas (LM)			


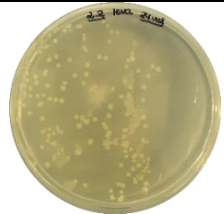


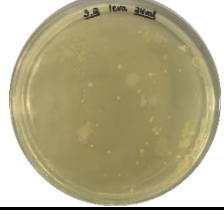
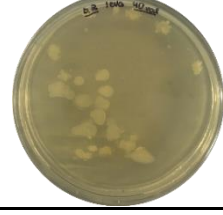
3.9 lentelės tęsinys. Antimikrobinų medžiagų įtaka mikrobiologinam užterštumui.

Mišinio sudėtis	Mikrobiologinis užterštumas		
	Po 0 val	Po 24 val	Po 40 val
<i>Natrio sulfitas</i> (LM + Vilzim NSP + Vilzim LPS L + Vilzim PRO dry)			
<i>Natrio sulfitas</i> (Vilzim NSP + Vilzim LPS L + Vilzim PRO dry)			
<i>Kaprino rūgštis</i> (LM)			
<i>Kaprino rūgštis</i> (LM + Vilzim NSP + Vilzim LPS L + Vilzim PRO dry)			
<i>Kaprino rūgštis</i> (Vilzim NSP + Vilzim LPS L + Vilzim PRO dry)			
<i>Sorbo rūgštis</i> (LM)			
<i>Sorbo rūgštis</i> (LM + Vilzim NSP + Vilzim LPS L + Vilzim PRO dry)			
<i>Sorbo rūgštis</i> (Vilzim NSP + Vilzim LPS L + Vilzim PRO dry)			

Tyrimo metu, buvo dar kartą patvirtintas faktas, kad hidrolizės proceso eigoje atsiranda mikrobiologinis užterštumas. Kontrolinėje bandinių serijoje, kurios metu mikroorganizmų dauginimasis nebuvo slopinamas antimikrobinėmis medžiagomis, lėkštelėse akivaizdžiai matomos gausios mikroorganizmų kolonijos. LM ir fermentų kontrolinėse lėkštelėse matomas mikroorganizmų augimas leidžia teigti, kad užterštumo šaltiniu gali būti tiek fermentiniai preparatai, tiek liucernos miltai. Taip pat, tyrimo metu paaiškėjo, kad stipriausiu antimikrobinu poveikiu, slopinant užterštumą tiksliniuose (hidrolizės) mišiniuose, pasižymėjo natrio nitritas. Įdomu, tai kad įdėjus natrio nitritą į fermentų ir LM kontrolinius mėginius, mikrobiologinio užterštumo problema nebuvo išsprendžiama. Natrio sulfitas ir kaprino rūgštis mišiniuose esančių mikroorganizmų gyvybingumo visai neslopino. Be to, nustatyta, kad sorbo rūgštis pasižymėjo ypatingai stipriu antimikrobinu poveikiu, slopinant mikroorganizmų dauginimąsi fermentinių preparatų Vilzim NSP, Vilzim LPS L ir Vilzim PRO dry mišinyje. Apibendrinant tyrimą, svarbu paminėti, kad eksperimento tikslas buvo rasti antimikrobinį agentą, kuris neleistų susidaryti mikroorganizmų kolonijoms hidrolizės mėginiuose ir įvertinti, ar hidrolizės laipsnio sumažėjimas proceso eigoje yra susijęs su atsirandančiu mikrobiologiniu užterštumu. Todėl tolimesnių tyrimų metu nuspręsta naudoti natrio nitritą.

Ankstesnio tyrimo metu į mišinius buvo dedama, didžiausia leistina maisto produktuose naudoti natrio nitrito koncentracija - 1000 µg/ml, atitinkamai 0,01 g/10 ml, pagal ES sudarytus teisės aktus, pagrįstus daugiamečiais specialistų stebėjimais bei tyrimais. Tačiau analizuojant gautus rezultatus, matyti, kad mikrobiologinis užterštumas naudojant 0,01 g/10 ml natrio nitrito yra slopinamas, bet ne visiškai panaikinamas. Todėl, buvo nuspręsta natrio nitrito kiekį padidinti penkis kartus (2.3.11), iki 0,05 g/10 ml, ir vykdant hidrolizės reakciją tomis pačiomis sąlygomis įvertinti mikrobiologinio užterštumo pokyčius. Rezultatai pateikti 3.10 lentelėje.

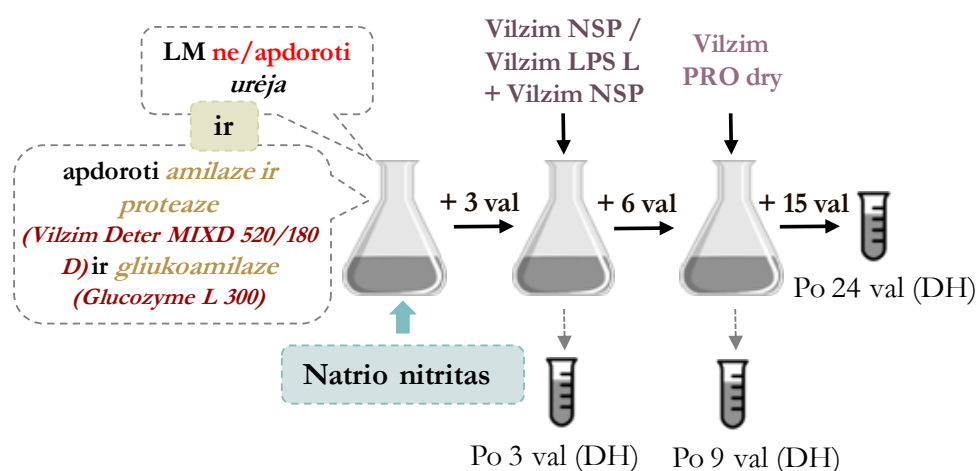
3.10 lentelė. Natrio nitrito antimikrobinio poveikio priklausomybė nuo koncentracijos, dedant į hidrolizės mišinius 0,01 g/10 ml ir 0,05 g/10 ml.

Mišinio sudėtis ir natrio nitrito koncentracija	Mikrobiologinis užterštumas		
	Pradinis (0 val)	Po 24 val	Po 40 val
Natrio nitrito koncentracija 0,01 g/10 ml (LM + Vilzim NSP + Vilzim LPS L + Vilzim PRO dry)			
Natrio nitrito koncentracija 0,05 g/10 ml (LM + Vilzim NSP + Vilzim LPS L + Vilzim PRO dry)			

Iš 3.10 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad padidinus natrio nitrito koncentraciją iki 0,05 g/10 ml mikrobiologinis užterštumas yra slopinamas šiek tiek stipriau, nei naudojant 0,01 g/10 ml. Kadangi šio etapo metu, ypatingai svarbu įvertinti hidrolizės efektyvumo priklausomybę nuo mikrobiologinio užterštumo ir užtikrinti kuo aukštesnę LM baltymų hidrolizės laipsnį, tolimesnės hidrolizės metu nuspręsta naudoti didesnę - 0,05 g/10 ml natrio nitrito koncentraciją.

3.4.4. LM hidrolizės tyrimas, panaudojant natrio nitritą

Eksperimentiškai nustatyta, kad natrio nitritas neleidžia susidaryti gausioms mikroorganizmų kolonijoms hidrolizės mėginiuose. Dėl šios priežasties nuspręsta atlikti LM hidrolizę į reakcijos ir kontrolinius mišinius dedant 0,05 g/10 ml natrio nitrito. Šio tyrimo metu taikytas LM išankstinis apdorojimas. LM esantys baltymai buvo veikiami urėja (2.3.13), o miltuose esantys angliavandeniai skaidomi, naudojant amilazės ir proteazės mišinį Vilzim Deter MIXD 520/180 D, bei gliukoamilazę Glucozyme L 300, atitinkamai LM fermentiniais preparatais veikiant 1 val ir 2 val (2.3.6 a) (3.14 pav).



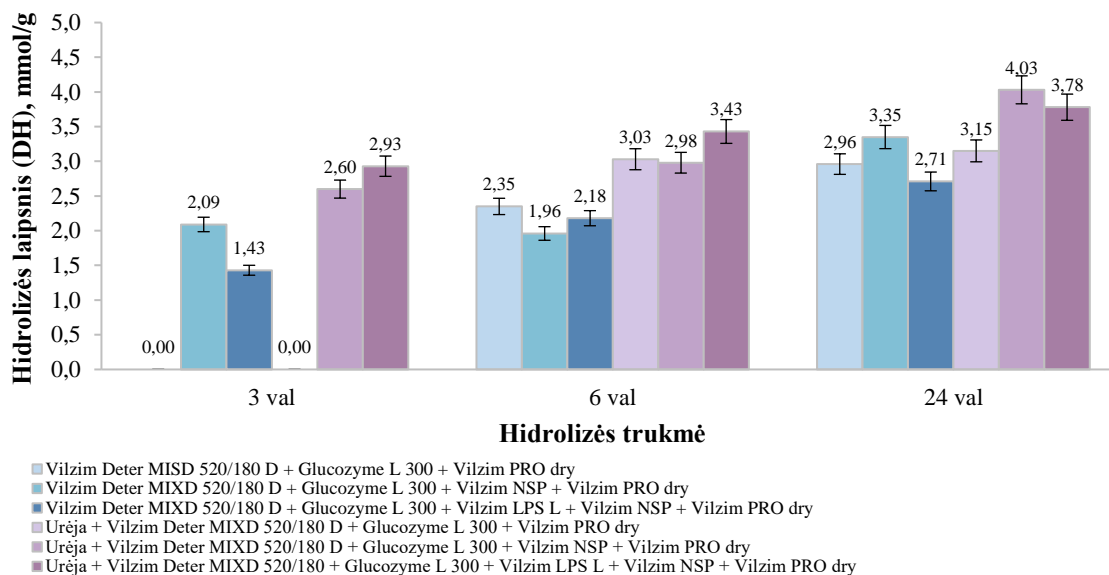
3.14 pav. Hidrolizės schema, proceso metu naudojant natrio nitritą ir taikant LM išankstinį apdorojimą.

Po apdorojimo urėjos tirpalu ir polisacharidus skaidančiais fermentais, LM 6 val buvo veikiami lipaze Vilzim LPS L ir fermentų mišiniu Vilzim NSP (2.3.6 a). Buvo manoma, kad papildoma miltuose esančių priemaišų (lipidų ir pluoštą sudarančių makromolekulių) hidrolizė dar labiau atvers liucernos baltymų peptidines jungtis ir padės pasiekti kuo aukštesnę hidrolizės laipsnį. Galiausiai, baltymų hidrolizė buvo vykdoma naudojant Vilzim PRO dry proteazę. Lygiagrečiai buvo atlikti tyrimai, kai po apdorojimo urėja, amilaze ir gliukoamilaze į tirpalą buvo dedama:

- Vilzim NSP ir Vilzim PRO dry (nenaudojama lipazė);
- Vilzim PRO dry (nenaudojama lipazė ir Vilzim NSP).

Nuspręsta naudoti įvairius fermentinių preparatų kokteilius, siekiant nustatyti optimaliausias hidrolizės sąlygas, kadangi ankstesnių tyrimų rezultatai gali būti klaidinantys dėl proceso metu atsirandančio mikrobiologinio užterštumo. Taip pat, atlikta dar viena lygiagreti eksperimentinė

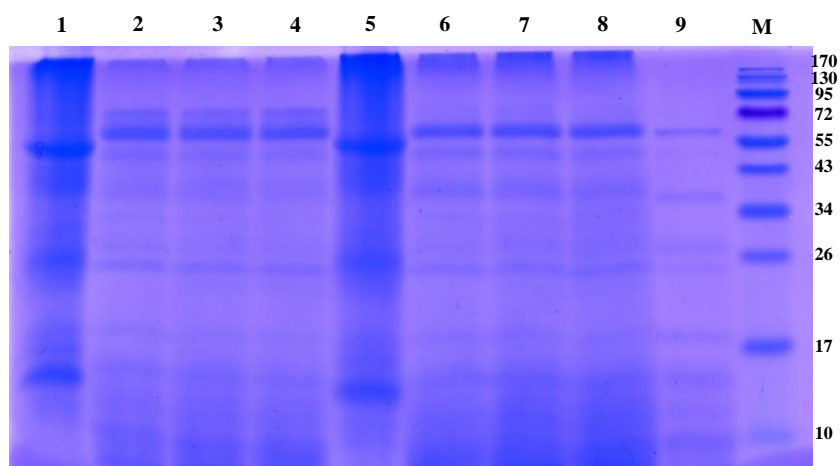
serija, išankstinio apdoravimo metu nedenatūruojant liucernos baltymų urėjos tirpalu. Toks sprendimas priimtas, nustatant, kad po fizikinės LM esančių baltymų denatūracijos (3.4.2) proteolizė nevyksta. Šios eksperimentinės serijos metu (nenaudojus urėjos tirpalo) LM buvo hidrolizuojami identiškais fermentinių preparatų mišiniais, kaip aprašyta anksčiau. Aptartų hidrolizė rezultatai pateikti 3.15 pav.



3.15 pav. Natrio nitrito antimikrobinio poveikio įtaka LM hidrolizės rezultatams.

Atlikus tyrimą matyti, kad vykdant LM hidrolizę, esant natrio nitritui, po 24 val visais atvejais buvo stebimas hidrolizės laipsnio kilimas. Taip pat, akivaizdu, kad išankstinio apdoravimo metu veikiant LM denatūruojančiu agentu – urėja, LM esantys baltymai yra hidrolizuojami lengviau, nes gaunamas aukštesnis hidrolizės laipsnis. Be to, tyrimo metu LM buvo veikiami skirtingais fermentinių preparatų kokteiliais po denatūravimo urėjos tirpalu ir apdoravimo amilaze ir gliukoamilaze. 3.15 pav matoma, kad aukščiausias hidrolizės laipsnis – 4,03 mmol/g buvo gautas papildomai LM paveikus su Vilzim NSP ir proteaze Vilzim PRO dry. Hidrolizės metu naudojant lipazę, Vilzim NSP ir proteazę, po 24 val nustatytas hidrolizės laipsnis (3,78 mmol/g) nežymiai skyrėsi nuo aukščiausios, tyrimo metu gautos, DH reikšmės. Šis skirtumas tarp dviejų aukščiausių tyrimo metu nustatytų hidrolizės laipsnių buvo 5 % paklaidos ribose. Taip pat, svarbu atsižvelgti į 3.3.2 skyriuje pateiktus rezultatus, kurie aiškiai parodė, kad LM išankstinio apdoravimo metu naudojant lipazę, gaunamas ženklus hidrolizės laipsnio padidėjimas. Taigi, apibendrinant šį tyrimą galima drąsiai teigti, kad urėjos tirpalas padeda atverti peptidines liucernos baltymų jungtis, tikslingai veikdamas glaudžią baltymo struktūrą, o visi tyrimo metu išbandyti fermentiniai išankstinio apdoravimo būdai, įskaitant LM veikimą amilaze, gliukoamilaze, lipaze ir Vilzim NSP taip pat buvo veiksmingi. Be to, svarbu paminėti, kad po 24 val nustatytas hidrolizės laipsnio augimas reiškia, kad mikrobiologinio užterštumo problema buvo sėkmingai išspėsta naudojant natrio nitritą.

Siekiant vizualizuoti hidrolizės metu susidariusius peptidus ir jų pasiskirstymą pagal dydį, buvo atlikta NDS-PAGE analizė (2.3.5). Rezultatai pateikti 3.16 paveiksle.



3.16 pav. LM hidrolizatai, po 24 val trukusios hidrolizės, kurios metu buvo naudojamas natrio nitritas. *Takeliai:* **1** – LM (kontrolė); **2** – LM + Vilzim Deter MIXD 520/180 D + Glucozyme L 300 + Vilzim PRO dry; **3** – LM + Vilzim Deter MIXD 520/180 D + Glucozyme L 300 + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; **4** – LM + Vilzim Deter MIXD 520/180 D + Glucozyme L 300 + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; **5** – LM apdoroti urėja (kontrolė); **6** – LM apdoroti urėja + Vilzim Deter MIXD 520/180 D + Glucozyme L 300 + Vilzim PRO dry; **7** – LM apdoroti urėja + Vilzim Deter MIXD 520/180 D + Glucozyme L 300 + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; **8** – LM apdoroti urėja + Vilzim Deter MIXD 520/180 D + Glucozyme L 300 + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry; **9** – Vilzim Deter MIXD 520/180 D + Glucozyme L 300 + Vilzim LPS L + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry (kontrolė); **M** – molekulinės masės dydžių standartas, kDa.

3.16 pav., 2-4 bei 6-8 takeliuose matoma, kaip visų eksperimentinių serijų metu buvo suhidrolizuojami liucernos miltuose esantys baltymai (1 ir 5 takeliai). Pastebėtas gana aiškus skirtumas lyginant hidrolizatuose susidariusių peptidų kiekį, kurių molekulinė masė buvo nuo 17 kDa iki 10 kDa. LM baltymus apdorojus urėja (6-8 takeliai) matomos gausesnės mažų hidrolizatų sancaupos. Taip pat, akivaizdu, kad išskirtinai tik 2-4 takeliuose esantys peptidai ties 72 kDa žyme, susidaro išankstinio apdoravimo metu nedenaūravus liucernos baltymų. Mėginiai, kuriuose nustatyti auksčiausi hidrolizės laipsniai buvo leidžiamj į 7 ir 8 takelius. Matoma, kad ūiuose hidrolizatuose susidarė didesnis kiekis nuo 43 kDa iki 26 kDa dydžio peptidų. Taigi, išanalizavus NDS-PAGE, galima teigti, kad gauti hidrolizės rezultatai, nustatant DH, atitinka gelyje matomus hidrolizatų profilius, nes ryškiausios peptidų žymės buvo stebimos 7 ir 8 takeliuose.

Apibendrinant gautus rezultatus galima teigti, kad mikrobiologinio užterštumo problema buvo sėkmingai išspręsta į hidrolizatų mišinius pridėjus antimikrobinį agentą – natrio nitritą. Stebint hidrolizės laipsnio pokyčius laike, po 24 val nustatytas DH didėjimas. Tačiau, tyrimo metu, nustatytos auksčiausios hidrolizės laipsnio vertės - 4,03 mmol/g ir 3,78 mmol/g nežymiai skyrėsi nuo ankstesnių tyrimų metu gautų DH verčių. Pavyzdžiui, LM baltymus apdorojus urėjos tirpalu ir LM esančias priemaišas Vilzim NSP po 6 val nustatytas hidrolizės laipsnis buvo – 3,91 mmol/g, o veikiant lipaze ir Vilzim NSP – 4,60 mmol/g. Taip pat, svarbu prisiminti, kad naudojami proteolitiniai fermentai liucernos baltymo molekulę kerpa tik ties Trp, Tyr, Phe

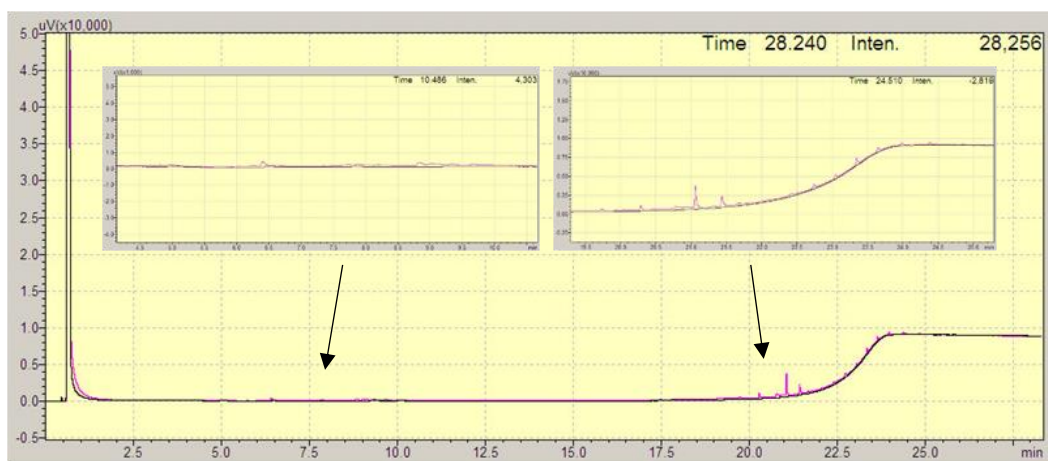
ir Leu. Todėl galima spėti, kad hidrolizės metu buvo pasiektos optimalios apdorojimo proceso sąlygos ir maksimali liucernos baltymų hidrolizė, kuri gali įvykti naudojant Vilzim PRO dry proteazę. Be to, tolimesnių tyrimų metu buvo planuojama atlikti LM baltymų hidrolizę su Vilzim PRO conc dry - koncentruotu fermento Vilzim PRO dry atitikmeniu. Buvo tikėtasi, kad LM baltymų hidrolizę nustatytomis optimaliomis sąlygomis bus galima įvykdyti naudojant mažesnius koncentruoto fermento kiekius. *Tačiau dėl šalyje paskelbto karantino ir apriboto darbo laboratorijose tyrimai buvo sustabdyti.*

3.5 Liucernos baltymų išskyrimas

Žinoma, kad miltinės priemaišos, esančios LM sudėtyje bei ypatingai glaudi baltymo struktūra gali slopinti proteolizės efektyvumą, dėl riboto proteazės prieinamumo prie peptidinių jungčių. Nustačius optimalias LM apdorojimo sąlygas baltymo molekulė gali būti išlaisvinama ir tapti lengviau prieinama, o suardžius ketvirtinę, tretinę ir antrinę struktūrą yra atveriamos peptidinės jungtys. Taip apdorotus baltymus paveikus proteaze būtų gaunama maksimali baltymo hidrolizė, kuri yra įmanoma atsižvelgiant į proteazės specifiškumą. Taigi, norint įsitikinti ar atlikto tyrimo metu buvo nustatytos optimalios LM apdorojimo sąlygos ir pasiektas auksčiausias hidrolizės laipsnis, naudojant Vilzim PRO dry, nuspręsta atlikti baltymų išskyrimą. Liucernos baltymų izoliatą suhidrolizavus Vilzim PRO dry taptų aišku ar anktesnių tyrimų metu buvo pasiekta visiška baltymo proteolizė.

3.5.1 Liucernos miltų nuriebalinimas

Eksperimentiškai yra parodyta, kad augaliniai miltai turėtų būti nuriebalinti prieš baltymų išskyrimą. Katyal M. ir kt. palygino nuriebalinimo proceso įtaką išskirtų kviečių baltymų kiekiui. Nustatyta, kad iš nuriebalintų kviečių miltų buvo išskirta daugiau baltymų (Katyal ir kt., 2019). LM nuriebalinimas (2.3.14) atliktas remiantis lipidų tirpumu organiniuose tirpikliuose. Tyrimo metu buvo naudojamas heksanas, atsižvelgiant į tirpiklio savybes, tokias kaip stabilumą ir virimo temperatūrą - 68,74 °C, kuri yra pakankamai aukšta, kad būtų galima dirbti laboratorinėmis sąlygomis kambario temperatūroje ir pakankamai žema, siekiant lengvai pašalinti tirpiklį iš susidariusio produkto. Eksperimento metu LM buvo suspenduojami heksane ir maišomi purtyklėje, kambario temperatūroje. Siekiant bent vizualiai nustatyti heksane ištirpusių lipidų sudėtį atlikta ekstrakto dujų chromatografijos (GC) analizė (3.17 pav).



3.17 pav. Susidariusio ekstrakto, po LM nuriebalinimo, GC analizės rezultatai. Juoda kreivė – heksano tirpalas (kontrolė); Rožinė kreivė - heksano tirpalas po ekstrakcijos.

Nors ir mažais kiekiais, GC analizė leido aptikti digliceridus ir trigliceridus, atitinkamai 5-10 min ir 17-25 min, interavuose. Galima teigti, kad ekstrakcija buvo atlikta sėkmingai, kadangi yra žinoma, kad digliceridai ir trigliceridai yra pagrindinės augalinio aliejaus sudedamosios dalys (Moldoveanu ir Chang, 2011).

3.5.2 Liucernos miltuose esančių baltymų izoliacija

Nuriebalinus LM, buvo atliktas liucernos baltymų išskyrimas šarminio ekstrahavimo/izoelektrinio nusodinimo būdu (2.3.15). Pirmosios stadijos metu miltai buvo ištirpinti šarminiame tirpale (pH 10), o netirpi dalis atskirta filtruojant ir po to centrifūguojant. Kito etapo metu ištirpę baltymai buvo išsodinami pasiekus liucernos baltymų izoelektrinį tašką (pH 3,5). Išsėdę baltymai buvo surinkti centrifūguojant ir pakartotinai ištirpinti, privedus tirpalo pH iki 7. Galiausiai gautas išgrynintas liucernos baltymų tirpalas buvo išdžiovintas liofilizuojant (3.18 pav).



3.18 pav. Liucernos baltymų izoliatas gautas šarminio ekstrahavimo/izoelektrinio nusodinimo būdu.

Susidarę liucernos baltymų milteliai buvo žalsvos-rusvos spalvos. Planuota izoliato hidrolizė su Vilzim PRO dry ir Vilzim PRO conc dry nebuvo atlikta, *dėl susiklosčiusios COVID-19 situacijos*. Todėl galima tik spėti, kad suhidrolizavus išgrynintus liucernos baltymus būtų gautas panašus hidrolizės laipsnis kaip ankstinių tyrimų metu - maždaug 4 mmol/g. Tokiu

atveju, būtų patvirtina hipotezė, kad atliktas LM apdorojimo tyrimas leido maksimaliai pašalinti augalines priemaišas. Ir apibendrinant būtų galima teigti, kad LM esančių baltymų hidrolizė vyko efektyviausiai, LM baltymus apdorojus urėjos tirpalu bei fermentiniais preparatais - Vilzim Deter MIXD 520/180 D (amilaze ir proteaze) + Glucozyme L 300 (gliukoamilaze) + Vilzim LPS L (lipaze) + Vilzim NSP + Vilzim PRO dry.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Apžvelgus gautus rezultatus, nustatyta, kad hidrolizuojant augaliniuose miltuose esančius baltymus, ypatingai svarbu užtikrinti sąveiką tarp fermento ir substrato. Miltuose esančios priemaišos – įvairūs cukrūs ir angliavandeniai buvo suskaidomi amilazės ir gliukoamilazės pagalba. Pluoštą sudarančios makromolekulės hidrolizuojamos fermentų mišiniu – Vilzim NSP turinčiu ksilanazinį, celiuliazinį, gliukanazinį, mananazinį, pektinazinį ir galaktozidazinį aktyvumus. Sudėtyje esantys lipidai buvo veikiami lipaze. O apdorojimas cheminiais reagentais, tokiais kaip guanidino hidrochloridas ir urėja padėjo sutrikdyti liucernos baltymų ketvirtinę, tretinę ir antrinę struktūras. Po tokių LM modifikacijų buvo palengvintas proteazės prieinamumas prie peptidinių jungčių. Tačiau, sunku įvertinti, ar LM apdorojimo metu buvo pasiektos optimaliausios sąlygos, kadangi literatūroje trūksta duomenų apie tikslią liucernos miltų biocheminę sudėtį. Todėl tolimesnių tyrimų metu yra siūloma optimizuoti LM apdorojimą, išbandant skirtingas naudotų fermentinių preparatų bei denatūravimo medžiagų kombinacijas, eiliškumą ir veikimo laikus.

Be to, tyrimo metu pastebėta, kad hidrolizės laipsnis mažėja ilgėjant hidrolizės trukmei. Pavyzdžiui, po 6 val ar po 9 val mėginiuose nustatytos hidrolizės laipsnio vertės buvo didesnės nei pamatavus po 24 val. Įrodyta, kad tokius DH pokyčius lėmė proceso metu atsirandantis mikrobiologinis užterštumas. Mikroorganizmams dauginantis susidarę baltymų hidrolizatai buvo naudojami kaip maistinė medžiaga. Taip pat nustatyta, kad natrio nitritas pasižymi gebėjimu slopinti hidrolizės mėginiuose atsirandantį mikrobiologinį užterštumą ir hidrolizės laipsnis reakcijų metu tendencingai auga. Tiesa, atliekant mikrobiologinius tyrimus su natrio nitritu bei didinant jo koncentraciją, užterštumas buvo tik slopinamas, bet ne visiškai pašalinamas. Dėl šios priežasties būtų naudinga identifikuoti mikroorganizmus, augančius hidrolizės mėginiuose ir tikslingai parinkti antimikrobinę medžiagą ar medžiagų derinį, leidžiantį visiškai pašalinti mikrobiologinio užterštumo problemą ar bakteriocidiškai veikti tik tuos mikroorganizmus, kurie maitinasi baltymų hidrolizatais.

Įrodyta, kad liucernos miltuose esančių baltymų hidrolizės metu, naudojant natrio nitritą, mikrobiologinis užterštumas buvo slopinamas, tačiau lūkesčiai, kad ilgėjant hidrolizės trukmei bus nustatytas drastiškas hidrolizės laipsnio kylimas nepasitvirtino. Po 24 val nustatytos

aukščiausios DH vertės (4,03 mmol/g ir 3,78 mmol/g) nežymiai skyrėsi nuo DH reikšmių, kurios buvo gautos po 6 val, hidrolizės metu nenaudojant antimikrobinės medžiagos. Todėl buvo iškelta hipotezė, kad atliekant tyrimą pasiektos optimalios LM apdorojimo sąlygos ir visiška baltymo hidrolizė, kuri yra imanoma naudojant proteazę Vilzim PRO dry. Įvertinant tai, kad proteolizės metu baltymo molekulė yra skeliama tik ties Trp, Tyr, Phe ir Leu aminorūgštimis. Išsikeltai hipotezei patvirtinti, buvo nuspręsta išskirti liucernos baltymus ir atlikti baltymų izoliato proteolizę su Vilzim PRO dry. Buvo tikėtasi, kad hidrolizės rezultatai bus artimi DH reikšmėms, nustatytoms proceso metu taikant išankstinį LM apdorojimą. Tačiau dėl neplanuotai nutraukto darbo laboratorijose tyrimas buvo sustabdytas. Be to, hipotezei pasitvirtinus, verta apsvarstyti paliūlymą, liucernos baltymų hidrolizei naudoti labiau specifinę proteazę, atsižvelgiant į liucernos baltymuose esantį a.r. procentingumą. Taip pat, tyrimo metu rezultatų stebėjimui buvo pasirinkta metodika įvertinanti laisvų amino grupių skaičių tirpale, tačiau tolimesnių tyrimų metu būtų tikslinga naudoti HPLC ar HPLC-MS metodikas, leidžiančias įvertinti į kokius peptidus yra suhidrolizuojami baltymai.

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad komercinių proteazių Vilzim PRO dry ir Vilzim PRO conc dry, išskirtų iš *Bacillus licheniformis*, aktyvumai išlieka stabiliausi kalio fosfatiniame buferyje.
2. Įvertinus dviejų metodikų Bradford'o ir TNBS tinkamumą liucernos baltymų hidrolizės nustatymui, pasirinkta antroji, paremta 2,4,6-trinitrobenzeno sulfoninės rūgšties sąveika su laisvomis amino grupėmis.
3. Nustatyta, kad LM apdorojus urėjos tirpalu, amilazės ir proteazės mišiniu Vilzim Deter MIXD 520/180 D, gliukoamilaze Glucozyme L 300, lipaze Vilzim LPS L ir fermentų mišiniu Vilzim NSP, miltuose esantys baltymai yra hidrolizuojami efektyviau.
4. Atlikus mikrobiologinio užterštumo tyrimą nustatyta, kad natrio nitritas geba slopinti mikroorganizmų augimą liucernos miltų hidrolizate.

REZULTATŲ SKLAIDA

Konferencijos:

Ieva Gudonytė, J. Krutkevičius, I. Matijošytė. *Investigation of enzymatic hydrolysis of plant proteins*, The Coins 2020, Vilnius, Lietuva, *stendinis pranešimas*;

PADĖKA

Esu dėkinga visam VU Biotechnologijos instituto Taikomosios biokatalizės sektoriui, o ypatingai jo vadovei dr. Ingai Matijošytei už suteiktą galimybę dirbti laboratorijoje, pasidalintą patirtį ir žinias bei pagalbą rašant magistrinį darbą. Dėkoju dr. Justui Lazutkai už atliktą liucernos baltymų liofilizavimą. Taip pat noriu padėkoti įmonei UAB BIOMICA už tyrimams parūpintus liucernos miltus.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Ieva Gudonytė

Magistro baigiamasis darbas

Augalinės kilmės baltymų fermentinės hidrolizės tyrimas

SANTRAUKA

Prognozuojama, kad iki 2050 m. spartus gyventojų populiacijos augimas lems tradicinių baltyminių produktų, tokių kaip pieno ir mėsos, trūkumą visame pasaulyje. Siekiant išvengti baltymų stokos, pramonė yra nuolatos skatinama ieškoti alternatyvių baltyminių šaltinių. Pagrindine alternatyva yra laikomi augaliniai baltymai dėl didelio vitaminų ir skaidulinių medžiagų kiekio. Tačiau žinoma, kad augalinų žaliavų sudėtyje nemažą procentinę dalį sudaro sunkiai virškinamos priemonės, pvz., celiuliozė, o patys augaliniai baltymai pasižymi ypatingai glausta ir sudėtingai skaidoma struktūra. Tyrimo metu buvo siekiama pritaikyti tinkamą fermentinių preparatų derinį, kuriuo veikiant augalinius miltus būtų suskaldomos nepageidaujamos priemonės bei padidintas augalinės kilmės baltymų, kaip maistinių ingredientų, pritaikomumas juos suhidrolizavus. Fermentiniai procesai turi daug pranašumų prieš cheminius procesus, ypač maisto pramonėje.

Tyrimo objektu pasirinkti liucernos miltai, dėl jų sudėtyje randamo didelio kiekio baltymų. Tačiau nežinoma liucernos augalo biocheminė sudėtis apsunkina miltuose esančių priemonių suskaidymą. Šio darbo tikslas buvo suhidrolizuoti liucernos baltymus bei parinkti kuo optimaliausias liucernos miltų fermentinio apdorojimo sąlygas.

Liucernos baltymų hidrolizės rezultatai buvo vertinami nustatant hidrolizės laipsnį (DH). Geriausi rezultatai buvo gauti, liucernos miltus apdorojus amilazės ir proteazės mišiniu Vilzim Deter MIXD 520/180 D, gliukoamilaze Glucozyme L 300, lipaze Vilzim LPS L ir fermentų mišiniu Vilzim NSP bei pačius miltų baltymus denatūravus urėjos tirpalu ir galiausiai juos paveikus maistine komercine proteaze Vilzim PRO dry. Atlikus mikrobiologinio užterštumo tyrimus nustatyta, kad natrio nitritas geba slopinti mikroorganizmų augimą liucernos baltymų hidrolizate.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Ieva Gudonytė

Master thesis

Investigation of enzymatic hydrolysis of plant proteins

SUMMARY

It is predicted that by 2050 rapid growth of population will lead to a worldwide shortage of traditional protein products, such as meat and dairy. To avoid protein shortages, the industry is constantly seeking for alternative sources of protein. Plant proteins are considered as the main alternative due to their high content of vitamins and fiber. However, plant raw materials are known to contain a significant percentage of indigestible impurities, such as cellulose, which limit the use of plant-based flour as a dietary protein. Another problem is the particularly compact and poorly degraded structure of the plant protein. It is important to select the right combination of enzymes for the hydrolysis of impurities, which could lead to the increased availability of proteins in plant flour. Furthermore, the enzymatic hydrolysis of proteins would improve their nutritional properties. Protein hydrolysates are more easily absorbed by the body and are not contaminated with toxic substances during the enzymatic process, in contrast to chemical hydrolysis.

Alfalfa protein flour was chosen as the object of research due to the high amount of protein found in it. However, the degradation of impurities in alfalfa flour is complicated by the unknown biochemical composition of the alfalfa plant. The aim of this work was to hydrolyze alfalfa proteins and to select the most optimal conditions for the enzymatic pretreatment of alfalfa flour.

The results of hydrolysis of alfalfa proteins were evaluated by determining the degree of hydrolysis (DH). The best results were obtained by pretreating alfalfa flour with a mixture of amylase and protease Vilzim Deter MIXD 520/180 D, glucoamylase Glucozyme L 300, lipase Vilzim LPS L and enzyme mixture Vilzim NSP and denaturing the flour proteins with urea solution, followed hydrolysis with commercial protease Vilzim PRO dry. Studies on microbiological contamination have shown that sodium nitrite was able to inhibit the growth of microorganisms in alfalfa protein hydrolyzate.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Ageitos J. M.,** Vallejo J. A., Poza M., Villa T. G., **2006.** Fluorescein thiocarbamoyl-kappa-casein assay for the specific testing of milk-clotting proteases, *Journal of Dairy Science*, 89, 3770-3777. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72418-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72418-3)
- Ageitos J. M.,** Vallejo J. A., Sestelo A. B. F., Poza M., Villa T. G., **2007.** Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2250-2213. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03460.x>
- Aguilar A.,** Twardowski T., Wohlgemuth R., **2019.** Bioeconomy for sustainable development, *Biotechnology Journal*, 14, 1-11. <https://doi.org/10.1002/biot.201800638>
- Aguilar A.,** Wohlgemuth R., Twardowski T., **2018.** Preface to the special issue bioeconomy, *New Biotechnology*, 40, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.06.008>
- Aguilar J. G. S.,** Castro R. J. S., Sato H. H., **2019.** Production of antioxidant peptides from pea protein using protease from *Bacillus licheniformis* LBA 46, *International Journal of peptide research and therapeutics*, 26, 435-443. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09849-9>
- Ahnen R. T.,** Jonnalagadda S. S., Slavin J. L., **2019.** Role of plant protein in nutrition, wellness, and health. *Nutrition Reviews*, 77, 735-747. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz028>
- Aluko R. E.,** **2018.** Food protein-derived peptides: production, isolation, and purification. *Proteins in food processing*, 2, 389-412. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00016-4>
- Apostol L.,** Iorga S., Mosoiu C., Racovita R. C., Niculae M. O., Vlasceanu G., **2017.** Alfalfa concentrate – a rich source of nutrients for use in food products. *Journal of international scientific publications*. 5, 66-73.
- Bychkov A. L.,** Gavrilova K. V., Bychkova E. S., Akimenko Z. A., Chernonosov A. A., Kalambet Y. A., Lomovskii O. I., **2019.** Fractionation and hydrolysis of proteins of plant raw materials obtaining functional nutrition products. *Materials science and engineering*, 479, 1-7. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/479/1/012001>
- Birner R.,** **2017.** Bioeconomy Concepts, in: Iris Lewandowski (Eds.), *Bioeconomy: shaping the transition to a sustainable, biobased economy*. E-Publishing Inc., Vokietija, pp. 17-38.
- Boland M. J.,** Rae A. N., Vereijken J. M., Meuwissen M. P. M., Fischer A. R. H., Boekel M. A. J. S., Rutherford S. M., Gruppen H., Moughan P. J., Hendriks W. H., **2013.** The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends in food science & technology*, 29, 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.07.002>
- Brickley M. ir Ives R.,** **2008.** Secondary osteopenia and osteoporosis. *The bioarchaeology of metabolic bone disease*, 7, 185-216. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370486-3.00007-X>
- Brunelle E.,** Le A. M., Huynh C., Wingfield K., Halamkova L., Agudelo J., Halamek J., **2017.** Coomassie Brilliant Blue G-250 dye: an application for forensic fingerprint analysis, *Analytical chemistry*, 89, 4314-4319. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00510>
- Carbonaro M.,** Maselli P., Nucara A., **2015.** Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food research international*, 76, 19-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.007>
- Case L. P.,** Daristotle L., Hayek M. G., Raasch M. F., **2011.** Protein and amino acids. in: *Canine and feline nutrition*, third ed. E-Publishing Inc., Maryland Heights, pp. 21-25.
- Chaijamrus S.** Enzymatic hydrolysis of renewable vegetable proteins to amino acids [disertacija]. Tailandas: The University of Hanover, **2002.**
- Chardigny J. M. ir Walrand S.,** **2016.** Plant protein for food: opportunities and bottlenecks. *Oilseeds & fats crops and lipids*, 23, 1-6. <https://doi.org/10.1051/ocl/2016019>
- Cheng Y.,** Donkor O. P., Ren X., Wu J., Agyemang K., Ayim I., Ma H., **2019.** Effect of ultrasound pretreatment with mono-frequency and simultaneous dual frequency on the mechanical properties and microstructure of whey protein emulsion gels. *Food hydrocolloids*, 89, 434-442. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.007>
- Clemente A.,** **2000.** Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in food science & technology*, 11, 254-262. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00007-3)

- Colantoni A.,** Recchia L., Bernabei G., Cardarelli M., Roupael Y., Colla G., **2017.** Analyzing the environmental impact of chemically-produced protein hydrolysate from leather waste vs. enzymatically-produced protein hydrolysate from legume grains. *Argiculture*, 7, 1-9. <https://doi.org/10.3390/argiculture7080062>
- Colla G.,** Nardi S., Cardarelli M., Ertani A., Lucini L., Renaud C., Roupael Y., **2015.** Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 28-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>
- Creusot N. ir Gruppen H.,** **2007.** Hydrolysis of whey protein isolate with *Bacillus licheniformis* protease: fractionation and identification of aggregating peptides, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55, 9241-9250. <https://doi.org/10.1021/jf071584s>
- Elmadfa I. ir Meyer A. L.,** **2017.** Animal proteins as important contributors to a healthy human diet. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5, 111-131. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022943>
- Esteghlal S.,** Gahrue H. H., Niakousari M., Barba F. J., Bekhit A. E. D., Mallikarjuan K., Roohinejad S., **2019.** Bridging the knowledge gap for the impact of non-thermal processing on proteins and amino acids. *Foods*, 8, 262-284. <https://doi.org/10.3390/foods8070262>
- Fenfen L.,** Zhao Q., Sun-Waterhouse D., Zhao M., **2017.** Characterization of a salt-tolerant aminopeptidase from marine *Bacillus licheniformis* SWJS33 that improves hydrolysis and debittering efficiency for soy protein isolate, *Food chemistry*, 214, 347-353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.028>
- Gavrilova K.,** Bychkov A., Bychkova E., Akimenko Z., Chernonosov A., Yurii K., Lomovskii O., **2019.** Mechanically activated hydrolysis of plant-derived proteins in food industry. *Foods and raw materials*, 7, 255-263. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-255-263>
- Gohi A. C. F. B.,** Du J., Zeng H. Y., Cao X. J., Zou K. M., **2019.** Microwave pretreatment and enzymolysis optimization of the lotus seed protein. *Bioengineering*, 6, 1-13. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6020028>
- Hojilla-Evangelista M. P.,** Evangelista R. L., Isbell T. A., Selling G. W., **2013.** Effects of cold-pressing and seed cooking on functional properties of protein in pennycress (*Thlaspi arvense L.*) seed and press cakes, *Industrial Crops and Products*, 45, 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.026>
- Hojilla-Evangelista M. P.,** Selling G. W., Hatfield R., Digman M., **2016.** Extraction, composition, and functional properties of dried alfalfa (*Medicago sativa L.*) leaf protein. *Journal of the science of food and agriculture*, 97, 882-888. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7810>
- Hou Y.,** Yin Y., Wu G., **2015.** Dietary essentiality of „nutritionally non-essential amino acids“ for animals and humans. *Experimental biology and medicine*, 240, 8, 997-1007. <https://doi.org/10.1177/1535370215587913>
- Hou Y.,** Wu Z., Dai Z., Wang G., Wu G., **2017.** Protein hydrolysates in animal nutrition: industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of animal science and biotechnology*, 8, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>
- Hughes G. J.,** Ryan D. J., Mukherjea R., Schasteen C.S., **2011.** Protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS) for soy protein isolates and concentrate: criteria for evaluation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 12707-12712. <https://doi.org/10.1021/jf203220v>
- Karami Z. ir Akbari-Adergani B.,** **2019.** Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of food science and technology*, 56, 535-547. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4>
- Katyal M.,** Singh N., Viridi A. S., Kaur A., Ahlawat A. K., Singh A. M., Bajaj R., **2019.** Comparative analysis of native and defatted flour from hard, extraordinarily soft, and medium-hard wheat varieties for protein solvation, pasting, mixing, and dough rheological behavior, *Journal of food science*, 85, 65-76. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14944>
- Koshland D. E. ir Haurowitz F.,** **2019.** Protein. in: Encyclopædia Britannica. E-Publishing Inc., URL: <https://www.britannica.com/science/protein>
- Li D.,** **2013.** Proteins from land plants – potential resources for human nutrition and food security. *Trends in food science & technology*, 32, 25-42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.005>
- Li Q.,** Yi L., Marek P., Iverson B. L., **2013.** Commercial proteases: present and future, *FEBS letters*, 587, 1155-1163. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>

- Li-Chan E.C.Y. ir Lacroix I.M.E., 2018.** Properties of proteins in food systems: an introduction. *Proteins in Food Processing*, 2, 1-25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00002-4>
- Lim W. K.,** Rosgen J., Englander W. S., **2009.** Urea, but not guanidinium, destabilizes proteins by forming hydrogen bonds to the peptide group, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 2595-2600. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812588106>
- Lynch H.,** Johnston C., Wharton C., **2018.** Plant-based diets: considerations for environmental impact, protein quality, and exercise performance. *Nutrients*, 10, 1-16. <https://doi.org/10.3390/nu10121841>
- Lonnie M.,** Hooker E., Brunstrom J. M., Corfe B. M., Green M. A., Watson A. W., Williams E. A., Stevenson E. J., Penson S., Johnstone A. M., **2018.** Protein for life: review of optimal protein intake, sustainable dietary sources and the effect on appetite in ageing adults. *Nutrients*, 10, 1-18. <https://doi.org/10.3390/nu10030360>
- Marciniak A.,** Suwal S., Naderi N., Pouliot Y., Doyen A., **2018.** Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. *Trends in food science & technology*, 80, 198-198. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.013>
- Marinova M.,** Cuc Kim Thi N., Tchobanov B., **2008.** Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by food grade proteinases and aminopeptidases of plant origin. *Biotechnology & biotechnological equipment*, 22, 835-838. <https://doi.org/10.1080/13102818.2008.10817563>
- McCarthy A. L.,** O'Callaghan Y. C., O'Brien N. M., **2013.** Protein hydrolysates from agricultural crops - bioactivity and potential for functional food development. *Agriculture*, 3, 112-130. <https://doi.org/10.3390/agriculture3010112>
- Merz M.** Enzymatic hydrolysis of plant proteins using food-grade peptidases [disertacija]. Vokietija: The University of Hohenheim; **2015.**
- Moldoveanu S. C. ir Chang Y., 2011.** Dual analysis of triglycerides from certain common lipids and seed extracts, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 2137-2147. <https://doi.org/10.1021/jf104114p>
- Nguyen T. Q. H.,** Nguyen N. P. D., Nguyen P. M., Dong T. A. D., **2015.** Enteral tube feeding nutritional protein hydrolysate production under different factors by enzymatic hydrolysis. *International journal of scientific & technology research*, 4, 250-256.
- Ozuna C.,** Paniagua-Martinez I., Castano-Tostado E., Ozimek L., Amaya L. S. L., **2015.** Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food research international*, 77, 685-696. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.015>
- Pan A. D.,** Zeng H. Y., Alain C. F. B. G., Feng B., **2016.** Heat-pretreatment and enzymolysis behavior of the lotus seed protein. *Food chemistry*, 201, 230-236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.069>
- Pellis A.,** Cantone S., Ebert C., Gardossi L., **2018.** Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. *New Biotechnology*, 40, 154-169. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.005>
- Rizzello C. G.,** Tagliacruzchi D., Babini E., Rutella G. S., Taneyo S. D. L., Gianotti A., **2016.** Bioactive peptides from vegetable food matrices: research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of functional foods*, 27, 549-569. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.023>
- Rodríguez-Laguna N.,** Rojas-Hernandez A., Ramirez-Silva M. T., Moya-Hernandez R., Gomez-Balderas R., Romero-Romo M. A., **2017.** The conditions needed for a buffer to set the pH in a system, *Advantages in titration techniques*, 1-21. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69003>
- Rose D. J.,** Bianchini A., Martinez B., Flores R. A., **2012.** Methods for reducing microbial contamination of wheat flour and effects on functionality, *Cereal foods world*, 57, 104-109. <https://doi.org/10.1094/CFW-57-3-0104>
- Scott E. L.,** Bruins M. E., Sanders J. P. M., **2014.** Bio-based chemicals from biorefining: protein conversion and utilisation. *Advances in biorefineries*. 22, 721-735. <https://doi.org/10.1533/9780857097385.2.721>
- Sonawane S. K. ir Arya S. S., 2017.** Plant seed proteins: chemistry, technology and applications. *Current research in nutrition and food science*. 6, 461-469. <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.6.2.20>
- Sun X. D., 2011.** Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. *Intrnational journal of food science & technology*, 46, 2447-2459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02785.x>

- Tarhan O.**, Spotti M. J., Schaffter S., Corvalan C. M., Campanella O. H., 2016. Rheological and structural characterization of whey protein gelation induced by enzymatic hydrolysis, *Food Hydrocolloids*, 61, 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.042>
- Tavano L. O.**, 2013. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 90, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
- Vitunskienė V.**, Aleknevičienė V., Miceikienė A., Čaplikas J., Miškinis V., Pilvere I., Makutėnienė D., Dabkienė V., Lekavičius V., Qistad K., Ramanauskienė N., Kargytė V., Jazepčikas D., Serva E., Markelytė A., 2017. Lithuanian Bioeconomy Development Feasibility Study. Aleksandras Stulginskis University, Kaunas, 1-17 p. ISBN 978-609-449-126-9.
- Wadhwa A. A.**, Jadhav A. I., Arsul V. A., 2014. Plant proteins applications: a review. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 3, 702-712.
- Walker J. M.** 2002. The Protein Protocols Handbook. Humana Press, University of Hertfordshire, Hatfield, 16-22 p.
- Wen C.**, Zhang J., Yao H., Zhou J., Duan Y., Zhang H., Ma H., 2019. Advances in renewable plant-derived protein source: the structure, physicochemical properties affected by ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, 53, 83-98. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.036>
- Wohlfahr J.**, Ferchaud F., Gabrielle B., Godard C., Kurek B., Loyce C., Therond O., 2019. Characteristics of bioeconomy systems and sustainability issues at the territorial scale. A review. *Journal of Cleaner Production*, 232, 898-909. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.385>
- Wolfe R. R.**, Cifelli A. M., Kostas G., Kim I. Y., 2017. Optimizing protein intake in adults: interpretation and application of the recommended dietary allowance compared with the acceptable macronutrient distribution range. *Advances in nutrijon*, 8, 266-275. <https://doi.org/10.3945/an.116.013821>
- Wouters A. G. B.**, Rombouts I., Fierens E., Brijs K., Delcour J. A., 2016. Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15, 786-800. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12209>
- Wu G.**, 2016. Dietary protein intake and human health. *Food & Function*, 7, 1251-1265. <https://doi.org/10.1039/C5FO01530H>
- Zhang W.**, Grimi N., Jaffrin Y. M., Ding L., Tang B., 2017. A short review on the research progress in alfalfa leaf protein separation technology, *Journal of chemical technology & amp; Biotechnology*, 92, 2894-2900. <https://doi.org/10.1002/jctb.5364>
- Zhao F.**, Zhang D., Li X., Dong H., 2018. High-pressure homogenization pretreatment before enzymolysis of soy protein isolate: the effect of pressure level on aggregation and structural conformations of the protein. *Molecules*, 23, 1775-1789. <https://doi.org/10.3390/molecules23071775>