



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Gerda Cilišauskaitė

**GELTONOSIOS GRINDELIJOS IR GRIKIŲ ŽIEDŲ BEI LAPŲ
EKSTRAKTŲ CHEMINĖS SUDĖTIES, ANTIOKSIDACINIŲ IR
ANTIMIKROBINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAI**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Doc. dr. Audrius Pukalskas

KAUNAS, 2016

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**GELTONOSIOS GRINDELIJOS IR GRIKIŲ ŽIEDŲ BEI LAPŲ
EKSTRAKTŲ CHEMINĖS SUDĖTIES, ANTIOKSIDACINIŲ IR
ANTIMIKROBINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAI**

Baigiamasis magistro projektas
Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

Vadovas

(parašas) Doc. dr. Audrius Pukalskas
(data)

Recenzentas

(parašas) Lekt. dr. Vaida Kitrytė
(data)

Projektą atliko

(parašas) Gerda Cilišauskaitė
(data)



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos

(Fakultetas)

Gerda Cilišauskaitė

(Studento vardas, pavardė)

Maisto mokslas ir sauga (621E40001)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Geltonosios grindelijos ir grikių lapų bei žiedų ekstraktų cheminės sudėties,
antioksidacinių ir antimikrobinių savybių tyrimai“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 16 m. birželio 13 d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Gerdos Cilišauskaitės**, baigiamasis projektas tema „Geltonosios grindelijos ir grikių žiedų bei lapų ekstraktų cheminės sudėties, antioksidacinių ir antimikrobinių savybių tyrimai“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Turinys

IŽANGA	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1. Geltonoji grindelija savybės	10
1.2. Geltonosios grindelijos atliktų darbų apžvalga	10
1.2.1. Geltoną grindeliją sudarančių junginių apžvalga	11
1.3. Grikių augalo savybės	14
1.4. Su grikių žiedais ir lapais atliktų tyrimų apžvalga	15
1.4.1. Grikių lapuose ir žieduose nustatytų junginių apžvalga.....	16
1.5. Natūralūs ekstraktai ir jų panaudojimas maiste.....	18
1.6. Antioksidantai ir jų tipai.....	19
1.6.1. Sintetiniai antioksidantai	19
1.6.2. Natūralūs antioksidantai	19
1.7. Antioksidacinis efektas	20
1.8. Natūralių antimikrobinių medžiagų panaudojimas maiste.....	21
1.9. Mėsos mikroflora	22
1.9.1. <i>Staphylococcus Aureus</i> mikroorganizmas.....	22
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	23
2.1. Tyrimo objektai ir medžiagos	23
2.2. Ekstraktų analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu.....	25
2.3. Ekstraktų analizė aukšto efektyvumo skysčių chromatografija ir 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvuoju radikalu	26
2.4. Ekstrakcija dalijamajame piltuve dviem nesimaišančiais tirpikliais.....	27
2.5. Plonasluoksnė chromatografija ant silikagelio plokštelės.....	28
2.6. Frakcionavimas silikagelio kolona.....	29
2.7. Ekstraktų ir frakcijų antioksidacinio aktyvumo nustatymas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvojo radikalo sujungimo metodu	29

2.8. Ekstraktų ir frakcijų antioksidacinio aktyvumo nustatymas 2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties) metodu	30
2.9. Oksipreso metodas	31
2.10. Ekstraktų antimikrobinių savybių tyrimai	31
2.10.1. Difuzijos agare metodas	31
2.10.2. Ekstraktų antimikrobinių savybių tyrimas mėsos sultyse	32
2.10.3. Ekstraktų antimikrobinis tyrimas mėsoje	35
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	36
3.1. Ekstraktų ir frakcijų išėigos	36
3.2. Cheminės sudėties nustatymas ir aktyvių junginių identifikavimas	37
3.2.1. Junginių identifikavimas grikių lapų ir žiedų ekstraktuose	37
3.2.2. Junginių identifikavimas geltonosios grindelijos ekstraktuose ir frakcijose	38
3.2.3. Ekstraktų analizė aukšto efektyvumo skysčių chromatografija ir 2,2-difenil-1- pikrilhidrazilo laisvuju radikalu	40
3.2.4. Plonasluoksnė chromatografija ant silikagelio plokštelės	40
3.3. Antioksidacinės ekstraktų ir frakcijų savybės	41
3.3.1. Ekstraktų ir frakcijų antioksidacinio aktyvumo nustatymas 2,2-difenil-1- pikrilhidrazilo laisvojo radikalo sujungimo metodu	41
3.3.2. Ekstraktų ir frakcijų antioksidacinio aktyvumo nustatymas 2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties) metodu	41
3.3.3. Oksipreso metodas	41
3.4. Mikrobiologiniai tyrimai	43
3.4.1. Difuzijos agare metodas	43
3.4.2. Ekstraktų antimikrobinių savybių tyrimas mėsos sultyse	44
3.4.3. Ekstraktų antimikrobinis tyrimas mėsoje	46
IŠVADOS	49
BIBLIOGRAFINĖS NUORODOS	50
PRIEDAI	55

Cilišauskaitė Gerda. Geltonosios grindelijos ir grikių lapų bei žiedų ekstraktų cheminės sudėties, antioksidacinių ir antimikrobinių savybių tyrimai. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas doc. dr. Audrius Pukalskas; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslų kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: *Grindelia squarrosa*, *Fagopyrum esculentum*, antioksidacinis, antimikrobinis.

Kaunas, 2016. 06. 13.

SANTRAUKA

Magistro baigiamajame darbe buvo tirti du augalai – Geltonoji grindelija (*Grindelia squarrosa*) ir grikių augalas (*Fagopyrum esculentum*). Darbe išnagrinėta literatūra ir moksliniai straipsniai susiję su šių augalų tyrimais. Aptarta augalų cheminė sudėtis ir pagrindiniai junginiai.

Ekstraktai buvo pagaminti ekstrakcijos karštu vandeniu, pagreitintos ekstrakcijos ir Soksleto būdais, su skirtingo poliškumo tirpikliais. Geriausias išėigas parodė geltonosios grindelijos metanolinis pagreitintos ekstrakcijos tirpikliu ekstraktas. Buvo ištirta abiejų augalų ekstraktų cheminė sudėtis. Grindelijos augalo ekstraktuose identifikuoti 7 junginiai: fenolinės rūgštys (chlorogeno, chino, 3,5-dikafeoilchino, (5Z,11 α ,13E)-11-Hidroksi-9,15-dioksoprostano-5,13-dien-1-oik rūgštis), kumarinai (skutelarinas), flavonoidas (5,7-dihidroksi-3,4,5-trimetoksi-flavonas, 3,7,4'-tri-O-metilkvercetinas). Grikių lapų ir žiedų ekstraktuose buvo identifikuoti 9 fenoliniai junginiai: fenolinės rūgštys (chino, chlorogeno, kavos, galo), flavonoidai (katechinas, kvercetinas), flavonoidų glikozidai (rutinas, kvercitrinas), kumarino glikozidas (skopolinas) ir triterpenas (skvalenas). Ekstraktų ir frakcijų antioksidacinio aktyvumo nustatymas buvo patikrintas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvojo radikalo sujungimo, 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties) ir oksipreso metodais. Geriausia antioksidacinį aktyvumą parodė grikių lapų Soksleto būdu pagamintas etanolinis ekstraktas. Atlikus difuzijos agarė metodą abiejų augalų ekstraktai parodė antimikrobinį aktyvumą prieš *Staphylococcus aureus*. Geltonosios grindelijos vandens ekstraktas parodė didžiausią įtaką *Staphylococcus aureus* mikroorganizmui jautienos farše, patogeninio mikroorganizmo augimas buvo sumažintas 36%.

Cilišauskaitė, Gerda. *Investigation of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of extracts of curlycup gumweed and leaves and blossoms of buckwheat: Master's thesis in Food Science and Safety / supervisor assoc. prof. Audrius Pukalskas. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.*

Research area and field: Technological Sciences, Food Technology

Key words: *Grindelia squarrosa*, *Fagopyrum esculentum*, antioxidant, antimicrobial.

Kaunas, 2016. 06. 13.

SUMMARY

The *Master's* thesis contains of the examination of two plants - curlycup gumweed (*Grindelia squarrosa*) and buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). The paper analyzed literature and scientific articles, which includes studies using curlycup gumweed and buckwheat plants. The chemical composition and the most important compounds of plants are reviewed.

Extracts were made few ways – extraction with hot water, accelerated solvent extraction and Soxhlet extraction with different polarity extrahents. The biggest yield showed curlycup gumweed methanol accelerated solvent extract. The chemical compositions of both plants extracts were analyzed. The main important compounds in *Grindelia squarrosa* extracts were quinic, 3,5-di caffeoylquinic, (5Z,11 α ,13E)-11-Hydroxy-9,15-dioksopropa-5,13-dien-1-oic acids, scutellarin, 5,7-dihydroxy-3,4,5-trimethoxy-flavone, 3,7,4'-tri-O-methyl quercetin and in *Fagopyrum esculentum* extracts – quinic, chlorogenic, caffeic, gallic acids, catechin, quercetin, quercitrin, scopolin, squalene. Using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical assay and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) techniques the best antioxidant activity showed buckwheat leaf Soxhlet ethanol extract. Agar well diffusion method demonstrated both plant antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. Curlycup gumweed water extract shows the biggest impact of *Staphylococcus aureus* in beef meat, the growth of pathogenic microorganism was reduced 36%.

SANTRUMPOS

- ABTS** - 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis);
- AE-g** - geltonosios grindelijos Soksleto acetoninis ekstraktas ;
- ASE** - pagreitinta ekstrakcija tirpikliu (angl. Accelerated solvent extraction);
- DPPH** - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas;
- EAF-g** - geltonosios grindelijos metanolinio ekstrakto *tert*-butilmetileteriu frakcija ;
- EC50** - efektyvi koncentracija (angl. effective concentration);
- EE-g** - geltonosios grindelijos Soksleto rektifikuoto etilo alkoholio ekstraktas;
- EE-ž** - grikių žiedų Soksleto rektifikuoto etilo alkoholio ekstraktas ;
- EE-I** - grikių lapų Soksleto rektifikuoto etilo alkoholio ekstraktas ;
- EF-g** - geltonosios grindelijos metanolinio ekstrakto eterio frakcija ;
- ESCh** - efektyvioji skysčių chromatografija;
- HF-g** - geltonosios grindelijos metanolinio ekstrakto heksano frakcija ;
- IP** - indukcinis periodas;
- ME-g₁** - geltonosios grindelijos metanolinis ekstraktas, pagamintas pagreitintos ekstrakcijos ;
- ME-g₂** - geltonosios grindelijos Soksleto metanolinis ekstraktas;
- SD** - standartinis nuokrypis (angl. Standard deviation)
- TEAC** - trolokso ekvivalento antioksidantinė galia (angl. Trolox equivalent antioxidant capacity);
- TLC** - plonasluoksnė chromatografija (angl. Thin layer chromatography) ;
- UPLC/ESI-QTOF-MS** - ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodas (angl. ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization/quadrupole-time-of-flight high-definition mass spectrometry method) ;
- UV** - ultravioletiniai spinduliai (angl. Ultraviolet radiation)
- VE-g** - geltonosios grindelijos vandeninis ekstraktas ;
- VE-I** - grikių lapų vandeninis ekstraktas ;
- VE-ž** - grikių žiedų vandeninis ekstraktas ;
- VF-G** - geltonosios grindelijos metanolinio ekstrakto vandens frakcija ;

IŽANGA

Produktai gaunami iš gamtos, vadinami natūraliais [1]. Kintant gyvenimo būdui, žmonės atsisąžia į natūralių ir sveikų produktų vartojimą. Didėjant vartotojo suvokimui ir informacijos sklaidai apie maisto produktų saugumą bei galimą naudą ar žalą žmogaus sveikatai, paskutiniu metu padidėjo poreikis panaudoti augalus ir jų ekstraktus kaip konservantus [2]. Kadangi junginiai, esantys augaliniuose ekstraktuose, natūraliai susidaro maisto produktų apdorojimo metu, bei augalinė žaliava žmonių vartojama jau nuo seno, vartotojas teigiamai priima šią naują ir pasitiki augalinių ekstraktų saugumu. Dėl teigiamo vartotojo požiūrio į natūralius ekstraktus, jie tampa daug žadančia alternatyva maisto priedų rinkoje [3].

Įprastai maisto produktai apdorojami termiškai, taip užtikrinamas vegetatyvinių mikroorganizmų sunaikinimas [3]. Tačiau maisto kokybę nusako tokie rodikliai kaip skonis, kvapas, spalva, tekstūra ir maistinė vertė [4]. Atliekant terminį apdorojimą taip pat įvyksta nepageidaujamos reakcijos, kurios neigiama linkme pakeičia pagrindinius kokybės rodiklius. Nors įprastai prieskoniai ir žolelės dedamos tik norint pagerinti produkto skonį, tačiau jos gali padėti apsaugoti maistą nuo užkrečiamų mikroorganizmų. Žinoma, norint išgauti geriausią produkto apdorojimo efektą ir produkto kokybę konservuojant maistą, konservavimą natūraliomis augalinėmis žaliavomis galima sujungti ir su kitomis neterminėmis technologijomis [5].

Taip pat kovojant prieš maisto oksidaciją į maistą gali būti dedami stipriai veikiantys sintetiniai antioksidantai, tokie kaip butilhidroksianizolis (BHA), butilhidroksitoluenas (BHT.), *tert*-butilhidrochinonas (TBHQ,) ir propil galatas (PG). Tačiau abejojama dėl šių sintetinių antioksidantų saugumo yra galvojama, kad jie pasižymi toksiškumu. Nors jų panaudojimo kiekiai yra ribojami, vis dar manoma, kad po ilgo jų vartojimo galimos neigiamos pasekmės žmogaus organizmui [6]. Natūralūs antioksidantai dažniausiai gaunami iš augalinės žaliavos, o jų antioksidacinis stiprumas svyruoja priklausomai nuo augalo cheminės sudėties ir auginimo sąlygų. Taip pat natūralūs ekstraktai pasižymi priešūždegiminėmis, raminančiomis, mažinančiomis raumenų skausmus ir kitomis organizmui naudingomis savybėmis [2].

Spalvos pokyčiai, pašaliniai kvapai, susidarantys gleivės – tai pagrindiniai mėsos mikrobino gedimo rodikliai. Dėl jos cheminės sudėties, apsaugoti mėsą ir pratęsti jos galiojimo laiką yra sudėtinga užduotis [7]. Tačiau natūralūs augaliniai ekstraktai, turi gausybę biologiškai aktyvių junginių, kurie kiekvienas pasižymi skirtingomis savybėmis ir gali apsaugoti mėsos produktus nuo mikrobino gedimo, o taip pat pristabdyti oksidaciją ir išlaikyti ar net pagerinti juslines savybes [8]. Tad šis netradicinis konservavimo būdas plėtojamas, norint patenkinti ir technologinį ir vartotojo poreikį.

Todėl savo darbe tikrinsiu *Grindelia squarrosa* ir *Fagopyrum esculentum* augalų natūralių ekstraktų cheminę sudėtį, antioksidacinę stiprumą ir antimikrobinę veikimą prieš mėsoje esančius ir maisto apsinuodijimą sukeliančius patogeninius mikroorganizmus.

Darbo tikslas – ištirti geltonosios grindelijos ir grikių žiedų bei lapų cheminę sudėtį bei patikrinti šių augalų ekstraktų antioksidacinių ir antimikrobinių savybių stiprumą, atsižvelgti į šių natūralių ekstraktų galimą panaudojimą maisto produktuose.

Darbo tikslui pasiekti suformuluoti šie uždaviniai:

1. Pagaminti geltonosios grindelijos ir grikių lapų bei žiedų ekstraktus, Soksleto, pagreitinotos ekstrakcijos tirpikliu ir ekstrakcijos karštu vandeniu būdais ir nustatyti gautų ekstraktų išėigas;
2. Nustatyti geltonosios grindelijos ir grikių žiedų bei lapų ekstraktų cheminę sudėtį ;
3. Nustatyti geltonosios grindelijos ir grikių žiedų bei lapų ekstraktų ir atskirų junginių antioksidacinę aktyvumą įvairiais *in vitro* ir chromatografiniais metodais;
4. Nustatyti geltonosios grindelijos ir grikių žiedų bei lapų ekstraktų antimikrobinę poveikį difuzijos agarė metodu;
5. Nustatyti geltonosios grindelijos ekstraktų poveikį *Staphylococcus Aureus* mikroorganizmui mėsoje;

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Geltonoji grindelija savybės

Geltonoji grindelija (*Grindelia squarrosa* (Pursh) Dunal) – tai geltonžiedė gėlė, priklausanti *Asteracea* šeimai, auganti iki 30 cm aukščio, žydinti nuo birželio iki rugsėjo, sausuose arba pusiau sausuose dirvožemiuose, gavusi genties vardą pagerbiant rusų botaniką D.H. Grindel [9]. *Grindelia* gentis apima apie 60 skirtingų augalo rūšių, kilusių iš Šiaurės Amerikos. Geltonoji grindelija vietinių buvo naudojami kaip vaistažolė gydyti nuo įvairių ligų: pradedant nuo išbėrimo baigiant vėžiniais susirgimais. Šiais laikais *Grindelia* genties augalai naudojami daugelyje vaistinių preparatų padedančių nuo kosulio ir astmos. Geltonoji grindelija laikoma efektyviu vaistu nuo nepastovios temperatūros, kurią sukelia maliarijos liga, taip pat kovoja ir su kitais maliarijos simptomais, pavyzdžiui sumažina padidėjusią blužnį [10].



1 Pav. Geltonoji grindelija

1.2. Geltonosios grindelijos atliktų darbų apžvalga

El. Shamy, Ali ir kt. [10] tyrė *Grindelia squarrosa* eterinių aliejų sudėtį. Eteriniai aliejai sudaro 0,2 % šio augalo antžeminės dalies. Žieduose yra didžiuliai kiekiai α -pineno ir žymus kiekis limoneno, o lapuose dominuoja limoneno junginys, o α -pineno randama gerokai mažiau.

Slawomila, Nowakas ir kt. [11] pagamintus *Grindelia squarrosa* žiedų ir lapų ekstraktus analizavo TLC ir ESCh metodais. Taip identifikavo šio augalo lapuose ir žieduose, esančias fenolines rūgštis, pateiktas 1 lentelėje.

1 lentelė. Polifenolinės rūgštys, esančios *Grindelia squarrosa* lapuose ir žieduose

Polifenolinės rūgštys	Galo	Protokatechino	<i>p</i> -hidroksibenzoinė	<i>p</i> -hidroksifenilacto	Chlorogeno	Vanilino	<i>Trans</i> - kavos <i>Cis</i> - kavos	<i>p</i> -kumaro	<i>Trans</i> -ferulinė <i>Cis</i> - ferulinė	Elago	Salicilo
<i>Grindelia s.</i> Lapai	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	+
<i>Grindelia s.</i> Žiedai	-	+	+	-	+	+	++	+	++	+	+

Tai benzoinių rūgščių dariniai (galo, protokatechino, *p*-hidroksibenzoinė, vanilino, elago, *p*-hidroksifenilacto, salicilo) ir cinaminės rūgštys (kavos, *p*-kumaro, ferulinė ir chlorogeno). Galo ir *p*-hidroksibenzoinė rūgštys buvo rastos *Grindelia s.* lapuose, o žieduose – ne.

1.2.1. Geltonąją grindeliją sudarančių junginių apžvalga

Aptariamoms Slawomila Nowakas ir kt. [11] tyrime nustatytos polifenolinės rūgštys, esančios geltonosios grindelijos lapuose ir žieduose ir du pagrindiniai junginiai rasti eteriniuose aliejuose, kuriuos tyrinėjo El. Shamy Ali ir kt. [10].

Galo rūgštis

Galo rūgštis (3,4,5- trihidroksibenzoinė rūgštis (2 Pav.)) tai polifenolinė rūgštis, natūraliai randama perdirbtuose gėrimuose – raudoname vyne ir žalioje arbatoje. Ji yra plačiai paplitusi augalų karalystėje, randama lapuose (uogų), šaknyse ir žievėse (granatose ir riešutuose). Taip pat ji randama ir medžiuose, tokiuose kaip ąžuolas (*Quercus robur*), kaštonas (*Castanea sativa L.*) ir daugelyje kitų.

Ši rūgštis pasižymi natūraliomis ir stipriomis antioksidacinėmis, antimutageninėmis, antikancerogeninėmis, antialerginėmis, antibakterinėmis, priešuždegiminėmis savybėmis. Galo rūgštis gali veikti kaip prooksidatorius, priklausomai nuo tam tikrų metalų jonų koncentracijos. Manoma, kad galo rūgštis yra svarbi užkertant piktybinių vėžio ląstelių augimą gyvame organizme [12].

Protokatechino rūgštis

Protokatechino (3,4-dihidrobenzoinė rūgštis (2 Pav.)) – tai polifenolinė rūgštis, plačiai paplitusi ir natūraliai randama daugelyje valgomųjų augalų, naudojamų liaudies medicinoje. Tai gerai žinomas junginys žmonių mityboje, randamas sėlenose, ruduosiuose ryžiuose (*Oryza sativa L.*) ir svogūnuose (*Allium cepa L.*). Ši rūgštis randama vaisiuose: slyvose (*Prunus domestica L.*), agrastuose (*Ribes uvacrispa L.*), vynuogėse (*Vitis vinifera*) ir riešutuose, pvz. migdoluose (*Prunus amygdalus*). Protokatechino rūgštis randama daugelyje produktų gautų iš augalų: alyvuogių aliejus ir vynas, bei daugumoje prieskonių ir žolelių.

Nustatyta, jog ši rūgštis pasižymi antioksidaciniu, antibakteriniu, priešvėžiniu aktyvumu, padeda nuo diabeto, senėjimo, virusinių susirgimų, veikia kaip priešuždegiminis agentas, padeda gerinti širdies veiklą, apsaugo kepenų veiklą ir nervų sistemą [13].

p-hidroksibenzoinė rūgštis

p-hidroksibenzoinė rūgštis (4-hidroksibenzoinė rūgštis (2 Pav.)) – tai polifenolinė rūgštis, randama kokosuose, specifiniuose aliejuose, vyne, vanilėje, čiobrelių meduje.

p-hidroksibenzoinė rūgštis pasižymi priešvėžinėmis savybėmis, estrogeniniu ir stipriu antioksidaciniu veikimu [14].

p-hidroksifenilacto rūgštis

p-hidroksifenilacto (4-hidroksifenilacto rūgštis (2 Pav.)) – tai polifenolinė rūgštis dažniausiai randama alyvuogių aliejuje.

Ji pasižymi antioksidaciniu veikimu, antivirusinėmis, antikancerogeninėmis, ir priešuždegiminėmis savybėmis [15].

Vanilino rūgštis

Vanilino rūgštis (4-hidroksi-3-metoksibenzoinė rūgštis (2 Pav.)) – tai fenolinis junginys, randamas valgomuosiuose augaluose ir vaisiuose, kamieno žievėje (*Ambrurana cearensis*), šaknyse (*Angelica sinensis*), kinų medicinoje naudojamose žolelėse (*Scrophularia sambucifolia*), augalų lapų ekstraktuose (*Ginko biloba*). Vanilinė rūgštis oksiduoja iš vanilino, kuris naudojamas kaip kvapioji medžiaga.

Šis junginys pasižymi stipriomis antioksidacinėmis, antimikrobinėmis savybėmis. Manoma, kad pasižymi ir priešvirusiniu aktyvumu, tačiau šis veikimo mechanizmas nėra iki galo išaiškintas [16][17].

Elago rūgštis

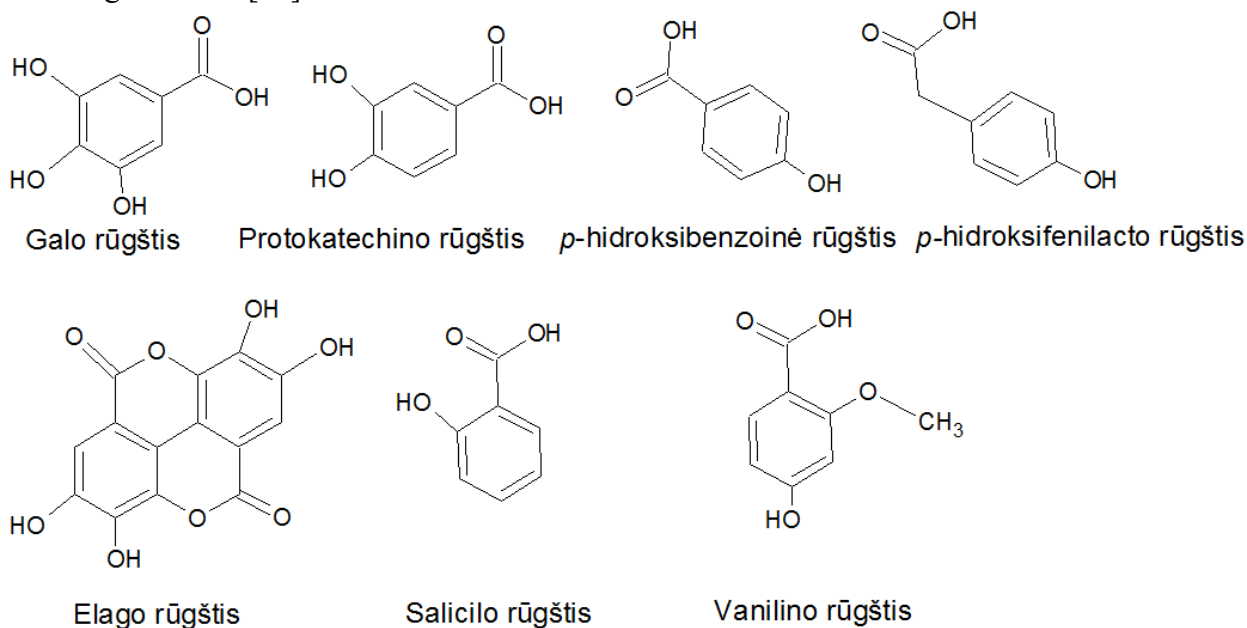
Elago rūgštis (Benzoarinė rūgštis (2 Pav.)) – polifenolinė rūgštis, randama granatose, juodosiose avietėse, braškėse, riešutuose ir migdoluose. Elago rūgštis gaunama hidrolizuojantis elago taninams, esant atitinkamoms sąlygoms.

Šis antrinis metabolitas pasižymi įvairiomis teigiamomis savybėmis žmogaus organizmui: antivirusinėmis, antikancerogeninėmis, antioksidacinėmis ir priešuždegiminėmis [18].

Salicilo rūgštis

Salicilo rūgštis (2-hidroksibenzoinė rūgštis (2 Pav.)) – polifenolinė rūgštis, randama vaisiuose, daržovėse ir prieskoniuose. Ši rūgštis, esanti įvairiuose augaluose, pasižymi svarbia funkcija – apsauga nuo ligų sukėlėjų

Salicilo rūgštis pasižymi naudingomis savybėmis žmogui: antioksidacinėmis ir priešuždegiminėmis [19].



2 Pav. Grindelijose aptiktų benzoinės rūgšties darinių formulės

Chlorogeno rūgštis

Chlorogeno rūgštis (3-(3,4-dihidroksicinamono) chinano rūgštis (3 Pav.)) – polifenolinė rūgštis, randama laisvoje arba surištoje formoje, dviskilčių augalų lapuose ir vaisiuose, įskaitant ir kavos pupeles [20]. Viename puodelyje kavos yra apie 190 mg chlorogeno rūgšties (laikant, kad viename puodelyje įdedama 10g kavos). Chlorogeno rūgštis randama vyšniose, abrikosuose, persikuose, slyvose ir jų koncentracija apytiksliai yra 50–500 mg/kg., taip pat jos yra bulvėse apie 34–140 mg/kg, obuolių sultyse -120–310 mg/l [21].

Šis junginys pasižymi šiomis savybėmis: antioksidacinėmis, antikancerogeninėmis, priešvėžinėmis, priešuždegiminėmis, antibakterinėmis, kovojančiomis prieš ŽIV savybėmis [20][21].

Kavos rūgštis

Kavos rūgštis (3,4-dihidroksicinamono rūgštis (3 Pav.)) – polifenolinė rūgštis, randama daugumoje vaisių, daržovių ir tam tikruose augaluose, dažniausiai ne kaip laisvas junginys, o kaip esterio konjugatas – dažniausiai chlorogeno rūgštyje. Rūgštis randama sultyse (obuolių, vynuogių, kriaušių ir t.t.) ir vyne. Obuolių sultyse jos galima rasti iki 10 mg/l. Baltame vyne randama apie 2,5ml/l kavos rūgšties [22].

Nustatyta, jog šis junginys pasižymi antioksidacinėmis, priešvėžinėmis, priešuždegiminėmis ir antibakterinėmis savybėmis.[21].

p-kumaro rūgštis

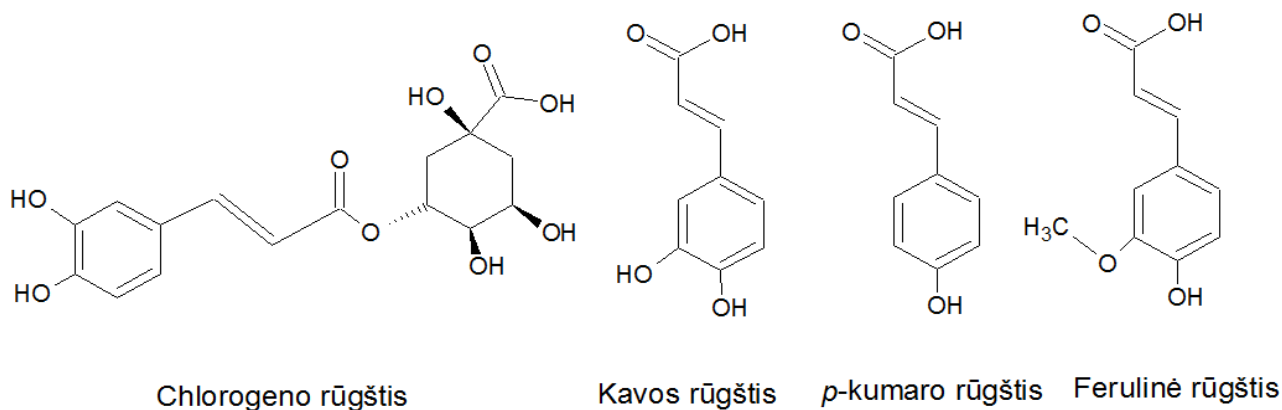
Kumaro rūgštis (4-hidroksicinamono rūgštis (3 Pav.))– tai polifenolinis junginys, randamas daugelyje valgomų augalų: morkose, pomidoruose, riešutuose ir česnakuose. Jo taip pat galima rasti vyne ir acte.

Kumaro dariniai pasižymi dideliu biologiniu aktyvumu, tokiu kaip antioksidacinės, antimikrobinės, profikatinės prieš ŽIV (žmogaus imunodeficito virusas), priešvėžinės, raumenis atpalaiduojančios, priešuždegiminės, antikoaguliacinės savybės [23].

Ferulinė rūgštis

Ferulinės rūgštis (3-metoksi, 4-hidroksicinamono rūgštis (3 Pav.)) tai polifenolinė rūgštis randama visų augalų ląstelių sienelėse, esančioje lignoceliuliozėje, pavyzdžiui, pektine ir lignine. Ferulinė rūgštis randama kavos, obuolių, riešutų ir apelsinų sėklose, taip pat ryžių, kviečių ir avižų sėklose ir ląstelių sienelėse.

Ši rūgštis pasižymi biologiniu aktyvumu: antioksidaciniu, priešvirusiniu, antimikrobinu, antialerginiu, kepenis apsaugančiu, priešvėžiniu ir prieštrombinu [24].



3 Pav. Grindelijose aptiktų cinaminės rūgšties darinių formulės

α -pinenas

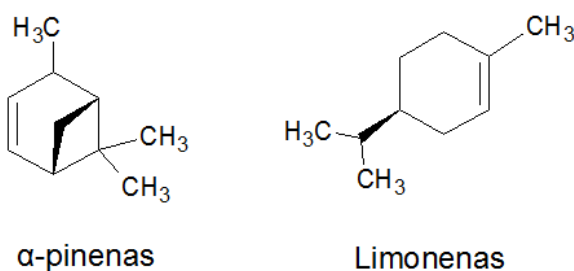
α -pinenas ((+)- α -pinenas (4 Pav.)) – tai biciklinis monoterpenas ir plačiausiai gamtoje paplitęs terpenas. Jis randamas daugelyje eterinių aliejų, gaunamų iš augalų. Pinenas yra pagrindinis *Sideritis spp* ir *Salvia spp.* augalinių aliejų komponentas, pasižymintis aktyvumu prieš *Staphylococcus aureus* mikroorganizmą.

α -pinenas pasižymi priešūždegiminėmis ir bronchus plečiančiomis savybėmis. Jis yra laikomas plataus spektro antibiotiku [25].

Limonenas

Limonenas (\pm)-limonenas (4 Pav)) – tai visų monoterpenų pirmtakas, antras pagal paplitimą gamtoje terpenas. Daugiausiai randamas citrinose ir kitų citrusinių vaisių eteriniuose aliejuose.

Naudojamas gydyti depresijai, taip pat kaip priešvėžinis agentas, gerina skrandžio ir stemplės veiklą. Netoksiškas ir alergijas nesukeliantis junginys [25].



4 Pav. Grindelijose aptiktų terpenų darinių formulės

1.3. Grikių augalo savybės

Grikių augalas (*Fagopyrum esculentum*) – tai baltažiedis augalas, priklausantis *Polygonaceae* šeimai, užauga iki 125cm aukščio. Žinoma apie 15 grikių rūšių, kurios gausiausiai auga daugelyje Azijos valstybių, taip pat kai kuriose šiaurės Europos šalyse. Auga tik šiltuoju periodu, užauga per trumpą 10-12 savaičių laikotarpį, jo privalumas kaip augalo, kad gali augti

nederlingose vietovėse. Lapai ir ūgliai naudojami kaip lapinės daržovės, o iš grikių žiedų ir žalių lapų ekstrahuojamas rutinas, kuris naudojamas medicinoje [26].

Fagopyrum augalai gerai žinomi kaip vaistažolės, jų užpilas yra naudojamas, norint sumažinti aukštą kraujo spaudimą. Žolelių ekstraktas taip pat naudojamas prieš kojų edemą ir diabetą. Lapai ir ūgliai naudojami kaip salotinės daržovės, jų paruošimas panašus kaip ir špinatų. Kinijoje, Indijoje ir Nepale išdžiovinti arba marinuoti lapai taip pat naudojami kaip daržovė. Japonijoje, grikių žiedymas naudojami kaip funkcinis maistas, dėl didelio rutino kiekio. *Fagopyrum esculentum* laikomas vertingu augalu agronomijos ir farmacijos srityse. Grikliai pasižymi naudingomis savybėmis, tokiomis kaip antioksidacinės ir priešvėžinės. Rutino ir kvercetino junginiai, esantys grikių augale, padeda išvengti kepenų uždegimo, veikdami kaip antioksidantai ir priešuždegiminiai agentai prieš oksidaciją, kuri sukelia kepenų žalą [26] [27].



5 Pav. Grikių augalas

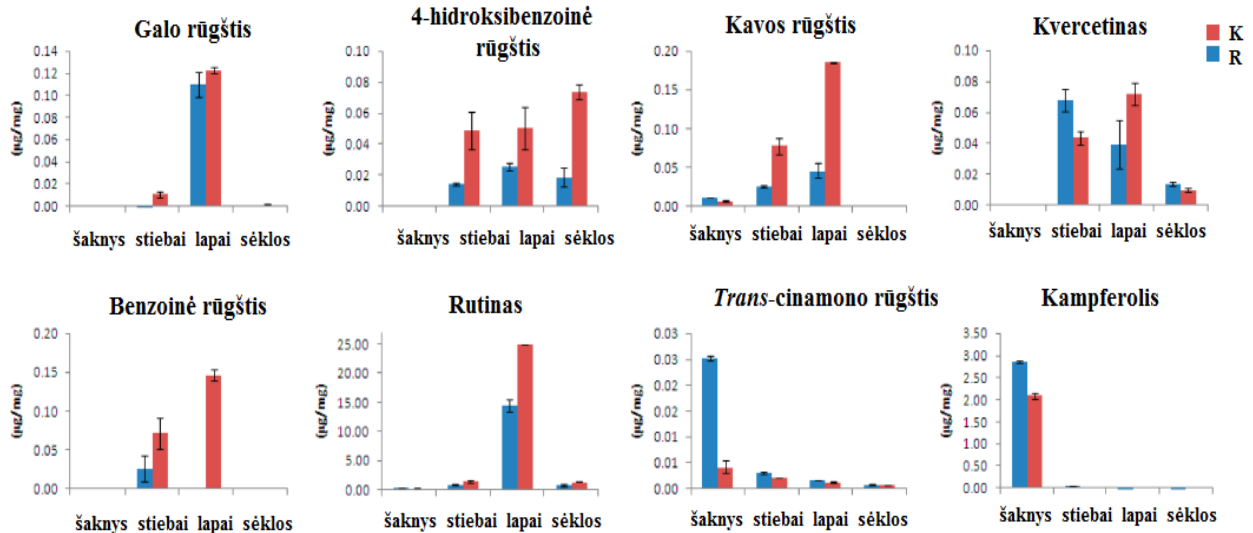
1.4. Su grikių žiedais ir lapais atliktų tyrimų apžvalga

Xiaohua, Li ir kt. [28] ištyrė, kokie fenolinių junginiai ir jų kiekiai yra *Fagopyrum esculentum* lapuose ir žieduose. Didesni junginių kiekiai yra randami žieduose, grikių žiedai ir lapai yra didžiulis rutino šaltinis, taip pat nemažai randama (-)-epigallocatechino. Lapuose gausu chlorogeno rūgšties ir (-)-epikatechino. Rutinas vienas pagrindinių indikatorių įvertinant grikių kultivaro kokybę [29].

2 lentelė. Fenolinių junginių kiekiai grikių žieduose ir lapuose [28]

Junginiai	Kiekis žieduose (mg /100 mg sausos masės±SD)	Kiekis lapuose (mg /100 mg sausos masės±SD)
Galo rūgštis	8,41±1,15	5,37±1,51
(-)- epigalokatechinas	199,28±20,08	309,26±19,03
Chlorogeno rūgštis	907,65±15,10	13,07±2,18
(-)-katechino hidratas	137,82±9,12	3,02±0,21
Kavos rūgštis	3,46±0,07	2,38±0,07
(-)-epikatechinas	536,48±14,20	103,20±5,72
Kvercetinas	1,37±0,01	-
Ferulinė rūgštis	-	2,27±0,03
Rutinas	6809,37±147,23	5524,71±236,30

Kitame savo tyrime Xiaohua, Li ir kt. [29] palygino polifenolinių junginių kiekį dvejuose *Fagopyrum esculentum* kultivaruose: įprastiniame (K) ir su dideliu rutino kiekiu (R). Analizė atlikta ESCh metodu ir grikių lapuose buvo aptiktos galo, 4-hidroksibenzoinė, kavos, benzoinė rūgštys, taip pat rutinas ir kvercetas.



6 Pav. Biologiškai aktyvių junginių susikaupimas *Fagopyrus esculentum* augale [29]

Iš grafikų matome, kad daugiausiai šiame augale yra junginio rutino, net ir įprastiniame grikiu augale jo aptinkama apie 13 μg/mg. Galo, 4-hidroksibenzoinės, kavos rūgščių ir kvercetino aptinkami kiekiai yra nedideli, tačiau pastebima, kad jie visuomet didesni aukšto rutino lygio kultivare. Benzoinė rūgštis aptinkama tik aukšto rutino lygio kultivare, *trans*-cinamono rūgštis ir kampferolis, randami tik šaknyse.

Kalinova, Jana ir kt [27] tyrinėjo α-tokoferolio, skvaleno, epikatechino ir rutino junginių pasiskirstymą ir kiekius augalo dalyse, priklausomai nuo auginimo sąlygų, metų, vietos ir augalo brandos periodo.

1.4.1. Grikių lapuose ir žieduose nustatytų junginių apžvalga

Aptariami Xiaohua, Li ir kt [28], [29] bei Kalinova, Jana ir kt. [27] tyrimuose nustatyti junginiai ir jų savybės.

α-tokoferolis

Nemaži kiekiai α-tokoferolių yra randama lapuose, šaknyse ir žieduose. Lapuose, jų yra daugiausiai, dėl to, jog šis junginys yra pagrindinis vitamino E komponentas, kuris randamas lapų chloroplastuose. α-tokoferolių kiekiai grikių lapuose yra panašūs kaip ir dilgelėse, kurie yra nuo 240 mg/kg sausos masės gegužės mėnesį iki 1070 mg/kg birželio ir liepos mėnesiai ir 550 mg/kg lapkričio mėnesį. Rekomenduojama tokoferolių dienos dozė yra 10mg, tai reiškia, kad iš 10g grikių lapų įmanoma gauti 1/10 tokoferolių dienos normos. Tačiau, patiriami didžiuliai tokoferolių nuostoliai apdoravimo metu. [27] (7 Pav.).

Skvalenas

Gausiausiai skvalenas aptinkamas žydėjimo periode. Didžiausi šio junginio kiekiai randami lapuose. Skvaleno kiekiai grikiuose stipriai priklauso nuo kritulių kiekio, temperatūros ir gaunamos saulės kiekio. Todėl Kalinova, Jana ir kt [27] atliktas tyrimas rodo, kad vienu metų augale skvaleno lapuose buvo mažiau, nei kad stiebuose.

Skvaleno junginys – izoprenoidas, turintis 6 izopreno vienetus, kurios nulemia šio junginio antioksidacines savybes. Skvalenas apsaugo ląsteles prieš radikalus, stiprina imuninę sistemą ir sumažina riziką susirgti įvairių rūšių vėžiu [27] (7 Pav.).

Katechinas

Katechinai paprastai randami vaisiuose, tačiau didžiausi kiekiai katechinų yra juodajame šokolade. Daržovėse randami katechinų kiekiai yra nedideli, išskyrus rabarbarus, žirnius ir pupas. Grikių žieduose, katechinų kiekis netgi didesni nei juodajame šokolade (327–502 mg/kg). Epikatechinų kiekis grikių lapuose išauga sužydėjimo laikotarpyje, o tuomet sumažėja.

Epikatechinas veikia kaip mažo tankio lipidų oksidacijos inhibitorius, taip pat gali mažinti ląstelių proliferaciją ir kontroliuoti kancerogenų metabolizmą [27] (7 Pav.).

Rutinas

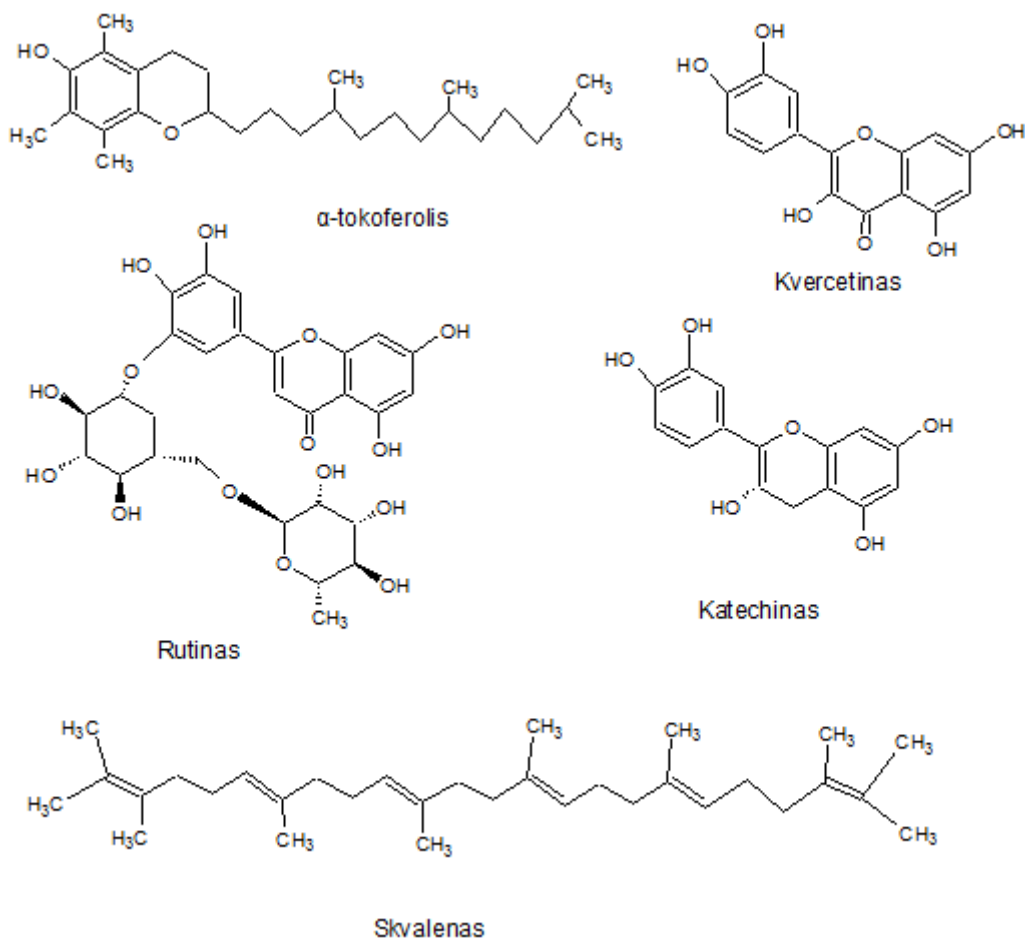
Grikių lapai ir žiedai yra didžiausi rutino šaltiniai augale. Rutinas pasižymi prieš uždegiminius, prieš vėžinius, širdį apsaugančiomis ir raumenis atpalaiduojančiomis funkcijomis.

Rutino kiekis grikių augale priklauso tik nuo temperatūros. Suvartojus 10 g šviežių grikių lapų organizmas gautų apie 180–350mg rutino, o tai laikoma gydomąja rutino doze. Rekomenduoja dienos dozė nėra nustatyta, tačiau bendra flavonoidų dienos dozė yra 2,6–13 mg. Flavonoidai augale padeda augalui atlaikyti prastas aplinkos sąlygas, taip pat jie veikia kaip kompensacijos mechanizmai, taip apsaugodami fotosintezės aparatą [27] (7 Pav.).

Kvercetas

Kvercetas tai vienas labiausiai gamtoje paplitusių flavonoidų. Jis gausiai randamas daugumoje vaisių ir daržovių.

Jis naudojamas gydant diabetą, sumažina kasos β -ląstelių sužalojimą, sistolinį kraujo spaudimą, kraujo plazmos lipidų kiekį ir gliukozės kiekį kraujyje [30] (7 Pav.).



7 Pav. Grikiuose randamų junginių formulės

1.5. Natūralūs ekstraktai ir jų panaudojimas maiste

Natūralus ekstraktas tai cheminis junginys ar medžiaga išgauta iš gyvo organizmo, tai gali būti ekstraktai išgauti iš augalų audinių ar mikroorganizmų. Šis apibrėžimas leidžia suprasti, kad bet kuri biologinė molekulė yra natūralus produktas, bet apskritai šis terminas skirtas antriniam metabolitams (katarinoidams, fitosterinams, fenoliniams junginiams, alkaloidams ir t.t.), gautiems iš gyvų organizmų [31].

Jeigu ekstraktas naudojamas maisto produkte, reikia laikytis HN 132:2013 [32] iškeltų reikalavimų naudojamies ekstrahentams. Ekstrahentai naudojami pagal geros praktikos gamybą (GMP), t.y. jeigu jų panaudojus lieka tik technologiškai neišvengiami ir nekeltys grėsmės žmonių sveikatai likučiai arba darinių kiekiai.

Ekstrahentų sąrašas, kuriuos galima naudoti apdorojant žaliavas, maisto produktus, maisto komponentus ar maisto ingredientus [33]:

- Vanduo
- Propanas
- Butanas
- Etilacetatas

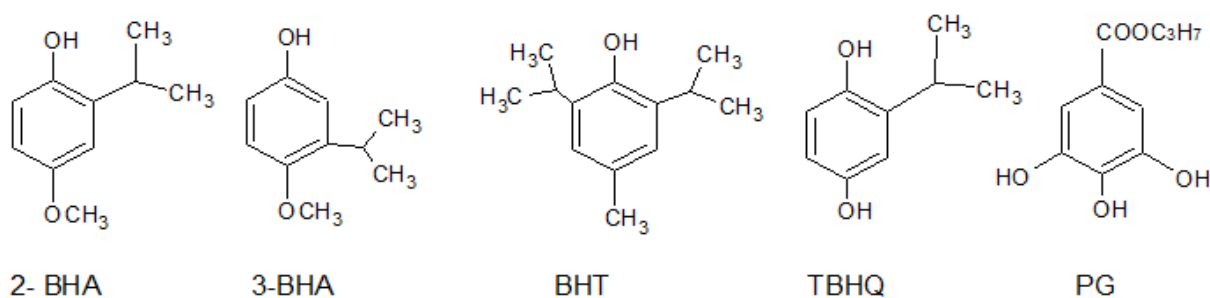
- Etanolis
- Anglies dioksidas
- Acetonas (draudžiama naudoti acetoną rafinuoiant alyvų išspaudų aliejų)
- Anglies dioksidas

1.6. Antioksidantai ir jų tipai

„Antioksidantai – medžiagos, kurios prailgina maisto produktų galiojimo terminą ir apsaugo juos nuo gedimo, kuri sukelia oksidacija, pavyzdžiui, riebalų gaižumo ir spalvos pakitimų“ [1333/2008]. [33]. Jie skirstomi į dvi grupes: sintetinius ir natūralius antioksidantus.

1.6.1. Sintetiniai antioksidantai

Vieni populiariausių sintetinių antioksidantų yra fenoliniai junginiai, tokie kaip butilhidroksianizolis (BHA, E320), *tert*-butilhidrochinonas (BHT, E321), butilhidrokvinonas (TBHQ, E319) ir galo rūgšties esteriai, pvz. propil galatas (PG, E310), jų formulės pavaizduotos 8 paveikslėlyje.



8 Pav. Maisto pramonėje naudojami sintetiniai antioksidantai

Šių keturių pagrindinių sintetinių antioksidantų kiekis pagal GMP yra ribojamas iki 0,02% maisto produkto riebaluose. Šie antioksidantai buvo tikrinami dėl toksiinių savybių, tačiau pamatyti ar jie tikrai daro žalą organizmui galima tik po ilgo jų vartojimo, todėl jų vartojimas yra apribotas. Nuo 1980 metų natūralūs antioksidantai tapo alternatyva sintetiniams [6].

1.6.2. Natūralūs antioksidantai

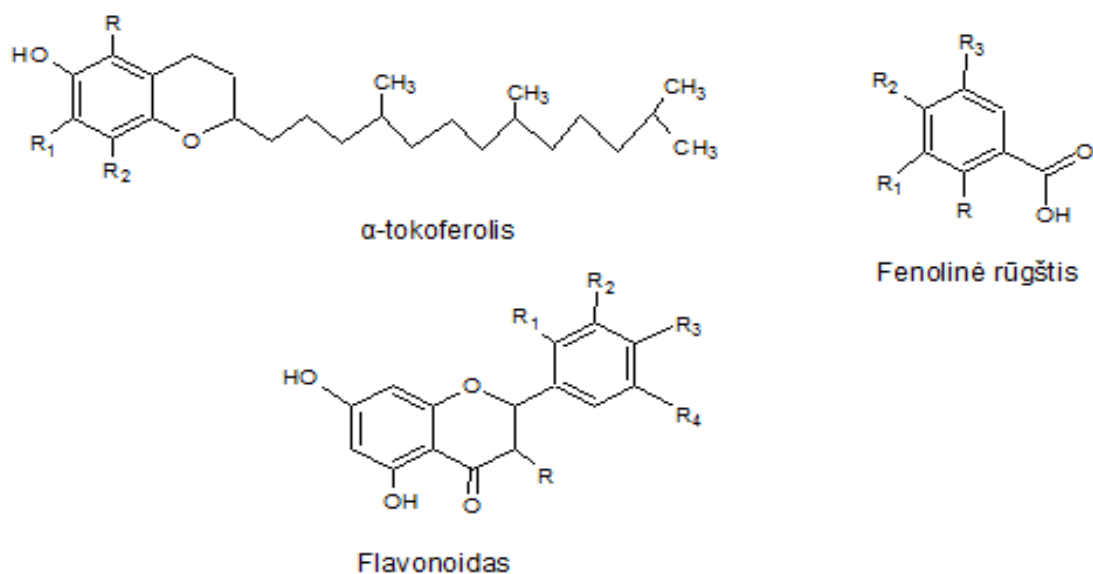
Natūralūs antioksidantai randami praktiškai visų augalų audiniuose, mikroorganizmuose netgi ir gyvūnų audiniuose. Didžioji natūralių antioksidantų dauguma yra fenoliniai junginiai, o svarbiausios grupės – tokoferoliai, flavonoidai ir fenolinės rūgštys.

Tokoferoliai geriausiai žinoma ir plačiausiai naudojama antioksidantų grupė. Jie skirstomi į tokoferolius (toc) ir tokotrienolius (toc3), kiekviena iš šių grupių turi 4 izomerus (α -, β -, γ - ir δ -). Svarbiausias junginys yra α -tokoferolis. Tokoferoliai maiste yra palyginti silpni antioksidantai. Reakcijos metu su laisvaisiais radikalais jie paverčiami į chinonus ar kitus junginius, taip pat ir į kopolimerus su oksiduotais lipidais (9 Pav).

Flavonoidai sudaro didelę fenolinių junginių grupę, natūraliai susidarančių augaluose. Flavonoidų junginių sudaro du aromatiniai žiedai, sujungti su trijų anglių alifatine gradine, kuri

suformuoja pirano arba furano žiedą. Flavonoidai, įskaitant flavonus, flavonolius, izoflavonus, flavononus ir chalkonus, randami visų aukštesniųjų augalų audiniuose. Flavonai ir flavonoliai randami augaluose dažniau nei flavonai ir yra aptinkami augalų lapuose ir žiedlapiuose. Apie 90% flavonoidų augaluose aptinkami glikozidų formose. Dažniausiai aptinkami flavonoidai yra spigeninas, liuteolinas, kvercitrinas ir kampferolis (9 Pav.).

Fenolinės rūgštys tai natūralūs antioksidantai randami daugelyje augalų, kai kuriose grybų rūšyse. Junginį sudaro aromatinis žiedas su prisijungusia karbosi rūgšties grupe. Fenolinės rūgštys skirstomos į monohidroksibenzoines, dihidroksibenzoines ir trihidroksibenzoines rūgštis. Dažniausiai randamos augaluose rūgštys yra: kavos, chino, chlorogeno, vanilino [2] (9 Pav.).



9 Pav. Natūralių antioksidantų grupės

1.7. Antioksidacinis efektas

Antioksidantai maiste yra apibrėžiami kaip medžiagos, kurios gali atidėti, sulėtinti arba apsaugoti maistą nuo apkartimo arba kito skonio pablogėjimo, kurį sukelia oksidacija. Oksidacijos sulėtinimas tuo pačiu pratęsia maisto galiojimo terminą. Tačiau antioksidantų pridėjimas į maistą jau įvykus oksidacijai yra nebeefektyvus sustabdyti apkartimą.

Antioksidantai gali slopinti arba lėtinti oksidaciją dviem būdais ir pagal tai skirstomi į dvi rūšis:

- Pirminiai antioksidantai – grandines nutraukiantys, t.y. laisvųjų radikalų akceptoriai;
- Antriniai antioksidantai – tiesiogiai neprisijungia laisvųjų radikalų;

Kai kurie antioksidantai veikia dvejopai ir vadinami daugiafunkciniais antioksidantais.

Pirminiams antioksidantams priklauso fenolinės rūgštys, tokios kaip vitaminas E (α – tokoferolis). Antriniais antioksidantais veikia keletos mechanizmų principais, įskaitant jonų surišimo metodą, deguonies prijungimą, hiperperoksidų pakeitimą į kitus junginius, absorbuojant UV spindulius arba deaktivuojant singletinį deguonį.

Paprastai antriniai antioksidantai veiksmingi esant antram šalutiniam komponentui. Pavyzdžiui, izoliuojantis agentas citrinų rūgštis yra efektyvi esant metalų jonams, o redukuojantis agentas askorbo rūgštis yra efektyvi tik tuomet jei yra tokoferolis ar kitas pirminis antioksidantas [2].

1.8. Natūralių antimikrobinių medžiagų panaudojimas maiste

Natūralių produktų naudojimas gydymo tikslais nuo seno paplitęs visame pasaulyje. Šiuo metu žinoma daugiau kaip 1340 augalų, kurie yra laikomi antimikrobinių junginių šaltiniais. Bet daugiau nei 250000 augalų rūšių aprašomi kaip turintys bioaktyvių junginių. Daugeliu atveju natūralių ekstraktų biologiškas aktyvumas pagrįstas sinergizmu tarp skirtingų junginių. Be to, manoma, kad ekstraktų toksiškumas yra didesnis jei medžiagos yra išgrynintos. Ekstraktų antimikrobinis aktyvumas yra susietas su jame esančiais junginiais, tokiais kaip terpenai, eteriniai aliejai, kumarinai ir flavonoidai [1].

Norint maisto produktuose sunaikinti vegetatyvinius mikroorganizmus, jis paprastai yra termiškai apdorojamas, temperatūra svyruoja nuo 60-100° C, apdoravimo trukmė nuo kelių sekundžių iki kelių minučių. Šio proceso metu dideli energijos kiekiai perduodami maistui, tačiau ši energija gali sukelti nereikalingas reakcijas, tokias kaip nepageidaujamas skonis ir sumažėjusi maistinė vertė. Antimikrobiniai junginiai, esantys maiste, gali pratęsti maisto galiojimo laiką apdorotam arba neapdorotam maisto produktui sumažinant mikrobinį augimą arba gyvybingumą. Įprastai prieskoniai ir žolelės dedamos pakeisti arba pagerinti skonį, tačiau kai kurios medžiagos prisideda prie augalų apsisaugojimo prieš užkrečiamus organizmus. Natūralios antimikrobinės medžiagos maisto konservavime gali būti naudojamos vienos arba kartu su kitomis neterminėmis technologijomis [3].

Maistiniai, medicininiai, vaistiniai augalai ir iš jų gauti esencijos aliejai ir izoliuoti junginiai turi didžiulį kiekį antrinių metabolitų, kurie gali sumažinti arba slopinti bakterijų, mielių ir pelėsių augimą. Daugumą šių junginių vis dar yra tyrinėjami ir vis dar nenaudojami komerciškai. Augalų esencijos aliejai ir junginiai dažniausiai inhibuoja prieš Gram teigiamas nei Gram neigiamas bakterijas. Tikslus antimikrobinio veikimo mechanizmas nėra žinomas. Fenolinių junginių efektas gali priklausyti nuo koncentracijos. Esant mažai koncentracijai, fenoliai veikia fermentų aktyvumą, ypač tų fermentų, kurie susiję su energijos gamyba, o didelė fenolių koncentracija gali sukelti baltymų denatūraciją.

Augalų ekstraktų ir esencijos aliejų antimikrobinis aktyvumas priklauso nuo botanikos šaltinio, nuėmimo laiko, vystymosi stadijos ir ekstrakcijos metodo. Norint pritaikyti natūralių antimikrobinių savybių turinčių ekstraktų panaudojimą, reikia ištirti iš išsiaiškinti kokie junginiai prieš kokius mikroorganizmus veikia stipriausiai, sukurti junginių kombinacijas, kurios veiktų sinergistiškai bei optimizuoti maisto apdoravimo ir laikymo sąlygas [4].

1.9. Mėsos mikroflora

Smulkinta mėsa yra ypatingai jautri mikrobiniam gedimui dėl didelio maisto komponentų kiekio ir vandens aktyvumo. Mikrobinis gedimas sukelia mėsos spalvos pokyčius, pašalinius kvapus bei ant mėsos susidaro gleivės. Šie mėsos pokyčiai priklauso nuo mėsos kompozicijos, higienos sąlygų, pakavimo proceso ir laikymo sąlygų [7]. Norint užtikrinti, kad mėsa būtų sveika ir saugi vartoti bei pratęsti jos galiojimo laiką, reikia atidėti arba sustabdyti patogeninių organizmų augimą [8].

Įvairūs augalai paskutiniu metu yra tyrinėjami ne tik dėl savo didelio gydomojo potencialo, bet ir dėl panaudojimo kaip natūralių konservantų. Atsižvelgiant į tai, kad augalai sudaryti iš biologiškai aktyvių junginių, kurie turi daug naudingų savybių žmonių sveikatai. Dauguma aromatinių ir vaistinių augalų sudaryti iš skirtingų cheminių junginių, kurių kiekvienas pasižymi skirtingomis savybėmis ir veikla. Mėsa ir mėsos produktai gali būti lengvai užteršiami mikroorganizmais ir sudaryti sąlygas patogenų augimui, kurie gali sukelti pavojingas per maistą plintančias ligas [34].

1.9.1. *Staphylococcus Aureus* mikroorganizmas

St. Aureus mikroorganizmas, kuris gamina toksinus, daugiausiai randamas mėsoje, paukštienoje, kiaušiniuose, pieno produktuose ir konservuotose grybuose. Jis gali augti net prie labai mažo vandens aktyvumo. Optimalios laboratorinės sąlygos augti *St. Aureus* yra 37 °C temperatūra, intervale 7–48 °C. Tačiau, kai jos auga maiste, šios ribos gali būti mažesnės. Kadangi reikia didelio kiekio mikroorganizmų, jog jis sukeltų ligą, dažniausiai mėginiuose reikia nustatyti organizmų koncentraciją, o ne naudoti jautraus aptikimo metodą. Metodai tinkami nustatyti *St. Aureus* yra aprašyti standartuose ISO6888-1 [35] ir ISO6888-2 [36]. [37].

Tyrimus stengiantis natūraliais konservantais sumažinti arba sustabdyti *St. Aureus* augimą mėsoje, tiksliau smulkintoje jautienoje, atliko Djenane, Djemel ir kt.[34]. Šiuo atveju buvo naudoti *Lavandula* ir *Mentha* augalų eteriniai aliejai, dėl savo cheminėje sudėtyje turimų junginių, šie augalai ne tik slopino *St. Aureus* mikroorganizmo augimą, bet ir kartu veikė kaip antioksidantai ir taip pratęsė mėsos galiojimo laiką.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1. Tyrimo objektai ir medžiagos

2.1.1. Medžiagos ir reagentai

Metanolis, heksanas, acetonas, etilo acetatas, terbutilmetileteris, skruzdžių rūgštis, acetonitrilas, NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, KCl, NaOH, ABTS reagentas, K₂S₂O₈, DPPH reagentas (Sigma Aldrich, JAV).

BP agaras (Italiana S.r.l., Milan, Italija), P.C.A. TSN agaras, PS agaras, kiaušinio trynio emulsija (Laboratorios Conda, Madridas, Ispanija), ringerio tirpalas, MRS agaras, MH agaras, NAI agaras, BHI agaras, TSB, TSA, PS CFC priedas (Oxoid LTD, Hemšyras, Anglija), glicerolis (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, Prancūzija).

Maistinis rektifikuotas etilo alkoholis 96,3% alk., pagaminta ir išpilstyta UAB „Stumbras“, Kaunas, Lietuva. Premium „Daumantų“ majonezas be E, gamintojas UAB „Daumantai LT“, Kėdainiai, Lietuva. Rafinuotas „Obelių“ rapsų aliejus, gamintojas UAB „Rukola“, Vilnius, Lietuva. Jautienos faršas „AlCampo“, Ispanija.

Tiriant antimikrobinę ekstraktų aktyvumą, indikatoriniais mikroorganizmais pasirinkti: *E.Coli* (CECT 99), *E.Coli* (CECT 501), *St.Aureus* (CECT 25923), *St.Aureus* (CECT Promise30), *St.Aureus* (CECT 10), *St.Aureus* (CECT 30), *St.Aureus* (CECT 103), *B.Cereus* (CECT 147), *L.Mesenteroides* (CECT 119CN19), *L.Mesenteroides* (CECT 396), *W.Viridescens* (CECT 283), *W.Viridescens* (CECT 144), *P.Putida* (CECT 324), *Listeria innocua* (CECT 910), *B.Thermosphacta* (CECT 847), *Salmonella* (CECT 9B9), *Y.Enterocolica* (CECT 354), *S.Sonnei* (CECT 853), *C.Jenuni* (CECT 496), *C.Perfringers* (CECT 376).

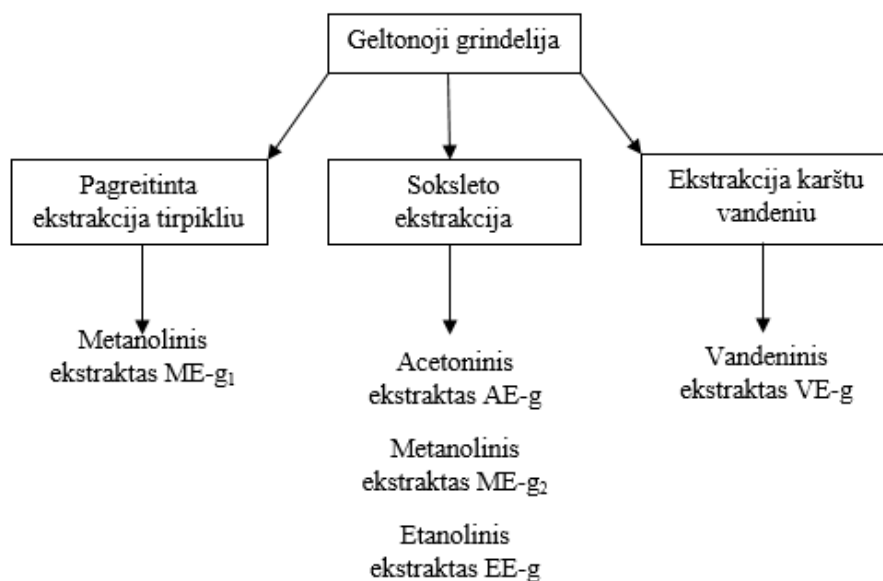
2.1.2. Tyrimo objektai ir ekstraktų gamyba

Magistro darbe buvo tiriami du skirtingi augalai:

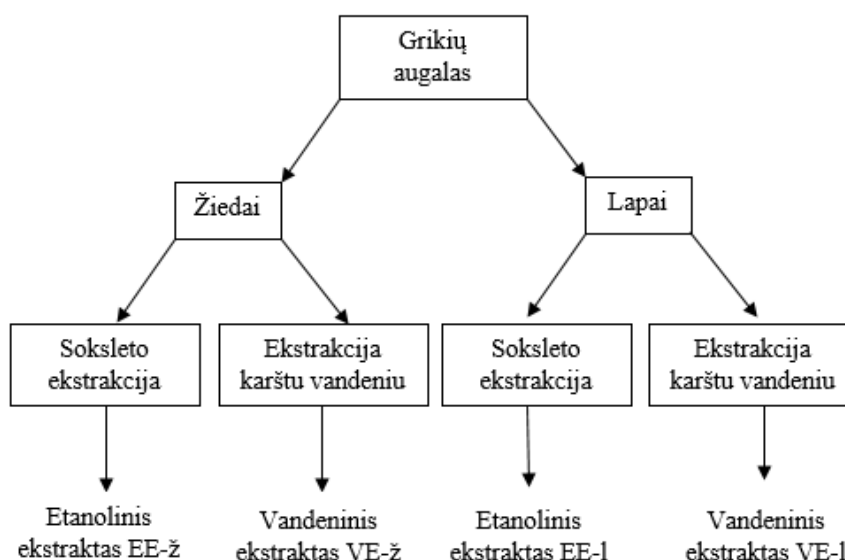
- Geltonoji grindelija (*Grindelia squarrosa* (Pursh) Dunal) 2013 08 06, auginta Kauno botanikos sode. Ekstraktai gaminami iš žiedų ir lapų neatskiriant.
- Grikis (*Fagopyrum esculentum*), 2014 09 12, augintas Kauno botanikos sode. Augalas atskiriamas į dvi dalis – žiedus ir lapus.

Augalai išdžiovinti, prieš pradėdant darbus išrenkami stambūs koteliai, ir augalinė žaliava smulkinama malūne „TEFAL SEB 8100“ (S.A. SEBm Dion, Prancūzija), naudojamas sietelis 1mm.

10 paveikslėlyje pateikiama geltonosios grindelijos, o 11 paveikslėlyje grikių žiedų ir lapų ekstraktų gaminimo schemas.



10 Pav. Geltonosios grindelijos ekstraktų gamybos schemą



11 Pav. Grikų lapų ir žiedų ekstraktų gamybos schemą

Pagreitinta ekstrakcija tirpikliu

Ruošiamas ME-g₁ pagreitinotą ekstrakciją būdu. Pagreitinotai ekstrakcijai buvo naudojamas ekstraktorius „ASE 350“ (TurboVap, Latvija). Svarstyklėmis „KERN770“ sveriami 5g smulkintos žaliavos į celę ir maišoma su 2g aktyvios žemės. Naudojamas tirpiklis metanolis, ekstrakcija vyksta 65°C temperatūroje, 5val. Gautas ekstraktas sukonzentruojamas ir išdžiovinamas nugarinant tirpiklį vakuuminiame - rotaciniame garintuve, BUCHI R-114 (Buchi labortechnik AG, Konstanz, Šveicarija), palaikant 40°C temperatūrą.

Ekstrakcija karštu vandeniu

Ruošiami VE-ž, VE-l, VE-g ekstraktai karštu vandeniu. Atskirai atsveriami svarstyklėmis „KERN770“, po 30g smulkintos žaliavos, užpilama 600ml ultra švaraus vandens ir kaitinama ant

magnetinės elektrinės maišyklės „Agimixt“ (Interlab, Lietuva) kol pasiekia 80°C temperatūrą. Visą laiką maišant magnetine maišykle, 30min vykdoma ekstrakcija, tuomet laukiama kol ekstraktas atvės ir filtruojama per filtro popierių Biuchnerio piltuve - „Funnel Buchner“ (VWR International, JAV). Gauti ekstraktai perpilami į 500ml talpos liofilizavimui skirtas kolbas, užšaldomi su skystu azotu -121°C temperatūroje ir tuomet sukonzentruojami ir išdžiovinami liofilizatoriumi, proceso trukmė apie 18val.

Sokseleto ekstrakcija

Ruošiami EE-ž, EE-l, EE-g, ME-g₂, AE-g ekstraktai Sokseleto aparate (Behr Labor-technil, Duseldorfas, Vokietija). Svarstyklėmis atsveriami po 12g žaliavos į patronus, užpilama 200ml tirpiklio, kai jis užverda ekstrakcija vykdoma 3 val. Gauti ekstraktai sukonzentruojami ir išdžiovinami nugarinant tirpiklį vakuuminiame - rotaciniame garintuve BUCHI R-114 (Buchi labortechnik AG, Konstanz, Šveicarija), palaikant 40°C temperatūrą. Ekstraktų pavadinimai su atitinkamais tirpikliais ir temperatūromis pateikti 3 lentelėje.

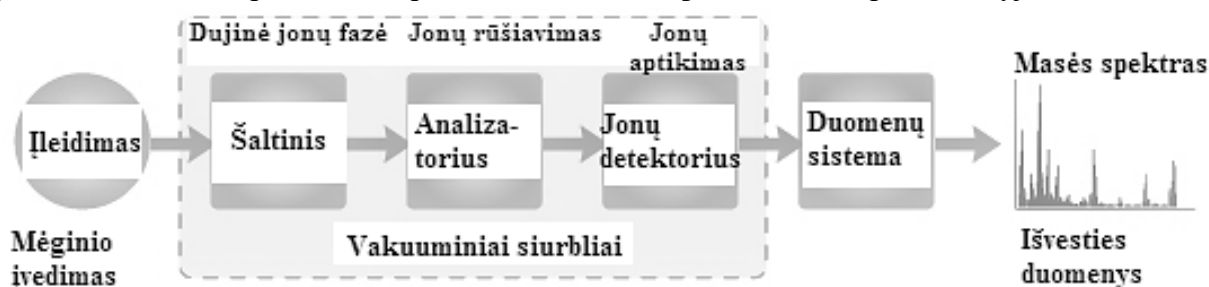
3 lentelė. Sokseleto gautiems ekstraktams naudotas tirpiklis ir virimo temperatūra.

Ekstraktai	Naudotas tirpiklis	Virimo temperatūra, °C
EE-ž; EE-l; EE-g	Rektifikuotas etilo alkoholis	80
ME-g ₂	Metanolis	65
AE-g	Acetonas	60

2.2. Ekstraktų analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu

Ekstraktų chromatografinė analizė buvo atlikta Waters Acquity sistema (Waters, Milford, JAV), kuri buvo sujungta su hibridiniu kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru (angl. Q-TOF) (Bruker Daltonic, Brėmenas, Vokietija). Analičių skirstymas atliktas atvirkščių fazių analitine kolonėle Acquity BEH C18, 2,1 × 100 mm, sorbento dalelių dydis - 1,7 μm (Waters, Milford, JAV), kuri buvo palaikoma 40 °C temperatūroje.

Metodas atliktas remiantis D. Detata ir kt. [38] straipsniu, šiuo atveju naudotos sąlygos pateikiamos toliau apraše. Principinė metodo schema pateikiama 12 paveikslėlyje.



12 Pav. UESCh-Q-TOF metodo principinė schema

Geltonosios grindelijos ekstraktai buvo skristyti 50 mm ilgio kolonėlėje, A eliuentas – 0,4% skruzdžių rūgštis; B – 100 % acetonitrilas. Eliucijos trukmė – 12 min. Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min., įleidžiamas tūris – 1 µL. Sudarytas gradientas pateikiamas 4 lentelėje.

4 Lentelė. Q-TOF metode grindelijos ekstraktams naudojamas gradientas

Laikas, min	Tirpiklis A%	Tirpiklis B%
0	100	0
9	0	100
10	0	100
11	100	0
12	100	0

Grikių žiedų ir lapų ekstraktams skristyti buvo naudojama 50 mm ilgio kolonėlėje, A eliuentas – 1% skruzdžių rūgštis; B – 100 % acetonitrilas. Eliucijos trukmė – 12 min. Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min., įleidžiamas tūris – 1 µL. Sudarytas gradientas pateikiamas 5 lentelėje

5 Lentelė. Q-TOF metode grindelijos ekstraktams naudojamas gradientas

Laikas, min	Tirpiklis A%	Tirpiklis B%
0	100	0
5	85	15
7	0	50
9	0	100
10	0	100
11	100	0
12	100	0

Iš kolonėlės išeinantys junginiai aptikti diodų matricos detektoriumi (DMD) esant 100 – 500nm bangos ilgiui. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas neigiamos elektrinės jonizacijos režimu, kurio parametrai buvo kontroliuojami HyStar programine įranga. Jonizacija buvo atlikta naudojant + 4000 V įtampą, fragmentavimo celės įtampa 3 eV, azoto dujos buvo naudotos kaip išpurškiančios (slėgis 2 bar) ir džiovinančios dujos, kurių tėkmės greitis 10 l/min. Tarpusavyje derinant pilno skenavimo ir MS/MS modelius buvo apskaičiuotos tikslios junginių molekulinės formulės intervale - m/z 100 – 1500, kai skenavimo greitis buvo 2,5 Hz. Taikant MS/MS modelį buvo patvirtinti junginiai, kurių negalima vienareikšmiškai identifikuoti.

2.3. Ekstraktų analizė aukšto efektyvumo skysčių chromatografija ir 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvuojų radikalų

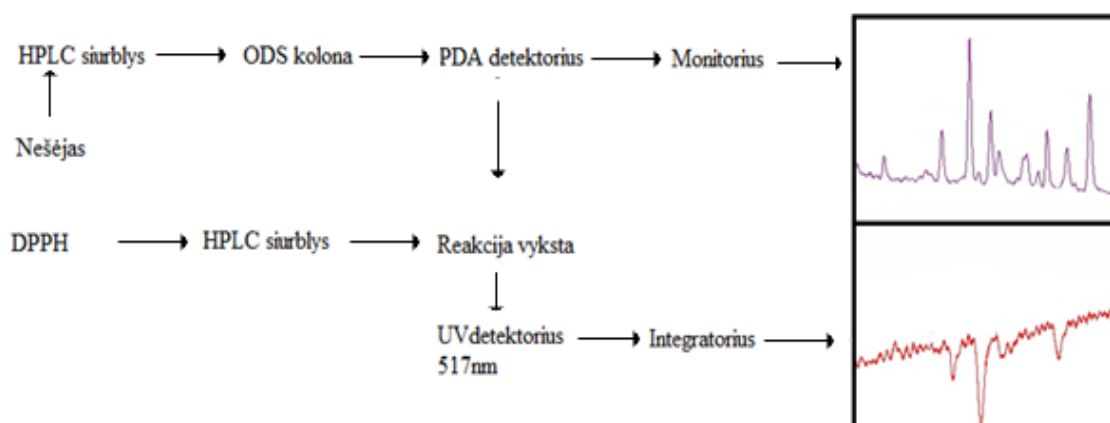
ECSh-DPPH metodas buvo atliekamas I. Koleva ir kt. [39] atliktų metodų pagrindu su tam tikromis modifikacijomis. Gradientas buvo optimizuotas ir gautos tokios skirstymo sąlygos:

mobiliuos fazės tėkmės greitis buvo 1ml/min., tirpiklis A - 0,4% skruzdžių rūgštis, o tirpiklis B – 100% acetonitrilas Sudarytas gradientas pateikiamas 6 lentelėje

6 lentelė. ECSH-DPPH metode grindelijos ekstraktams naudojamas gradientas

Laikas, min	Tirpiklis A%	Tirpiklis B%
0	90	10
30	70	30
50	0	100
55	0	100
58	90	10
60	90	10

Šis metodas buvo panaudotas nustatyti ekstraktų radikalų sujungėjus. ECSH-DPPH metodas buvo sukombinuotas naudojant metanolinį DPPH• radikalo tirpalą, kurio koncentracija 10mg/ml. ESCh išskirti aktyvus junginiai reaguoja su DPPH• radikalu postkolonoje ir spalvos išblukimas užfiksuojamas kaip neigiamas pikas prie 517nm. Principinė metodo schema pateikiama 13 paveiklėlyje.

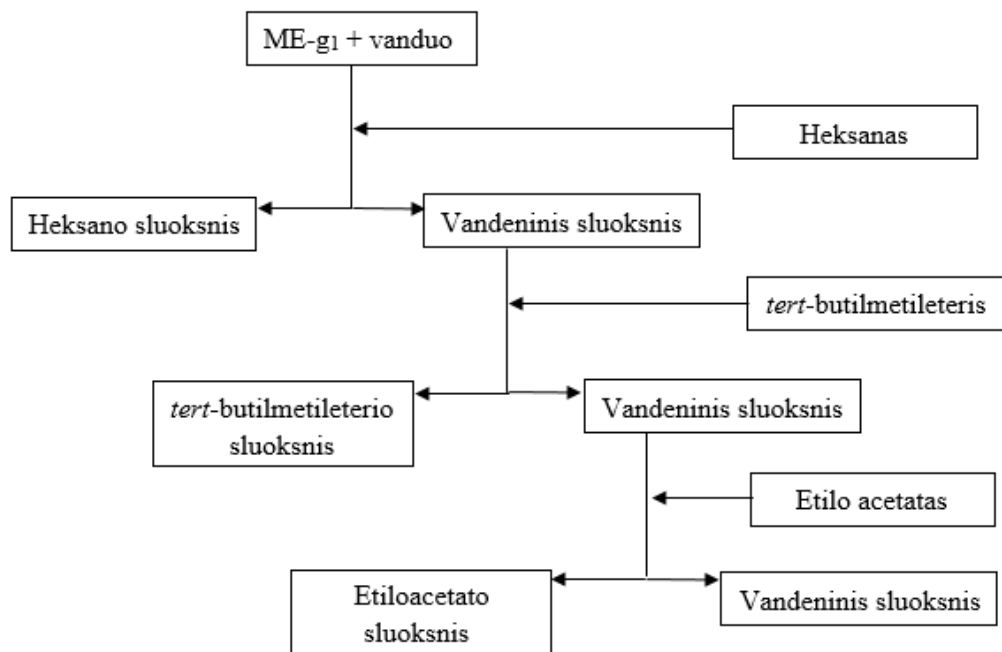


13 Pav. ECSH-DPPH metodo principinė schema

2.4. Ekstrakcija dalijamajame piltuve dviem nesimaišančiais tirpikliais

Šiai ekstrakcijai naudojamas ME-g₁ norint geriau išskirstyti junginius su pasirinktais tirpikliais. 3,8881g ekstrakto ištirpinama 500ml vandens ir supilama į 1000ml talpos dalijamąjį piltuvą „SIMAX“. Žaliava paeiliui ekstrahuojama heksanu, *tert*-butilmetileteriu ir etiloacetatu. Ant vandeninio ekstrakto tirpalo pilama 100ml heksano, supurtoma ir paliekama nusistovėti. Atsiskyrus dviems sluoksniams į atskirą kolbą nuleidžiamas apatinis heksano sluoksnis. Ekstrakcija su heksanu kartojama tol, kol su heksanu nebeišiekstrahuoja medžiagos, tai galima matyti pagal mažėjantį heksano spalvos intensyvumą. Iš viso buvo panaudota 400ml heksano. Toliau tokiu pačiu būdu medžiaga ekstrahuojama *tert*-butilmetileteriu ir etiloacetatu, kurių buvo panaudota po 350ml.

Surinktos heksano, *tert*-butilmetileteriu ir etiloacetato frakcijos sukonzentruojamos, išdžiovinant vakuuminiam-rotaciniame garintuve. Likusi vandens frakcija užšaldoma skystu azotu -121°C temperatūroje ir liofilizuojama, proceso trukmė apie 18 val. 14 paveikslėlyje pateikta metanolinio ekstrakto frakcionavimo schema.



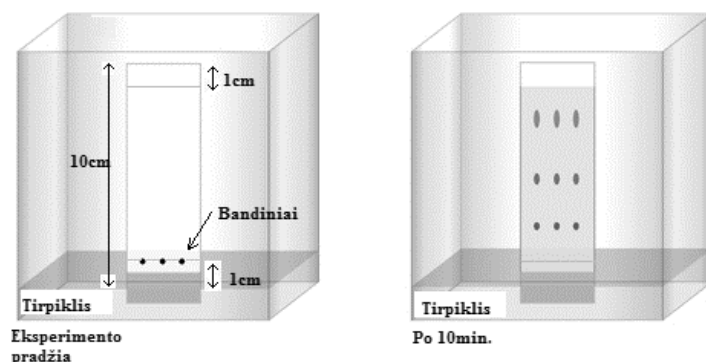
14 Pav. ME-g₁ frakcionavimo schema

2.5. Plonasluoksnė chromatografija ant silikagelio plokštelės

Aktyvių junginių ištyrimui bei nustatymui, kokiomis sąlygomis jie geriausiai pasiskirsto, ME-g₁ ir gautoms metanolinės frakcijoms buvo taikoma plonasluoksnė chromatografija ant silikagelio plokštelės, remiantis J. Wang ir kt. 2006 [40] su nežymiais pakeitimais. Šio eksperimento metu buvo naudojami nevienodo poliškumo tirpikliai, vardinant nuo mažiausio poliškumo – heksanas, etiloacetatas, metanolis ir vanduo. Jie supilstomi skirtingais santykiais ir buvo ieškomas geriausias santykis kiekvienai frakcijai.

Kiekvienos frakcijos 1mg buvo ištirpintas 1ml metanolio, panaudojant ultragarso vonelę „Ultrasonics“ (ASTRA-SON, JAV) ir stiklo kapiliaru užnešama ant chromatografijos plokštelės. Plokštelė pamerkiama į stiklinėje paruoštą eliuentų mišinį, taip kad tirpiklis neapsemtų bandinių, stiklinė uždengiama ir laukiama kol junginiai pasiskirstys plokštelėje.

Plokštelė išimama, išdžiovinama ir apšvieta UV lempa „CAMAG UV CABINET 4“ (Opsytec, Vokietija) 254nm ir 365nm ilgio bangomis, pažymimi atskirti junginiai. Plokštelė nupurškiama DPPH• radikalu ir stebima, kurie junginiai turėjo antiradikalinį aktyvumą. 15 paveikslėlyje pateikiamas pavyzdys, kaip atrodo frakcijų skirstymas ant silikagelio plokštelės, kairėje pusėje paruošta plokštelė su ką tik uždėtais bandiniais, dešinėje jau išsiskirstę junginiai ant plokštelės.



15 Pav. Frakcijų skirstymai ant silikagelio plokštelės

2.6. Frakcionavimas silikagelio kolona

Efektyviam metanolinio ekstrakto heksano frakcijos aktyviųjų junginių išskyrimui atliekamas frakcionavimas kolonoje su silikageliu, remiantis J. D. Fair ir kt. [41] straipsniu, su tam tikromis modifikacijomis. Keičiant tirpiklį nuo mažiausiai polinio iki poliškiausio galima išskirti didelį skaičių frakcijų su jose atsiskyrusiais junginiais. Tirpikliai parenkami pagal skirstymo ant silikagelio plokštelės duomenis. 16 paveikslėlyje matomas frakcionavimas silikagelio kolonoje.

Paruošiamas 200ml eluentų mišinys, jį sudaro 90% heksano ir 10% etiloacetato. Kolona užpildoma 100g silikagelio ir paruoštu eluentų mišiniu.

Skirstymas atliekamas po 24val, kad susigulėtų silikagelis ir būtų geresnis skirstymas. 1,007 g HF-g frakciją ištirpiname 5 ml tirpiklio, kurį sudaro 90% heksano ir 10% etilo acetato ir paruoštas bandinys užnešamas ant kolonos. Kolona paeiliui plaunama didėjančio poliškumo tirpikliais ir renkamos frakcijos į 15ml mėgintuvėlius. Tirpikliai keičiami atsižvelgiant į tai, kaip išsiplauna silikagelio spalva, bei tikrinant surenkamų fazių aktyvumą. Pirmiausiai supilamas 500ml tirpiklis, kurį sudaro 90% heksano ir 10% etilo acetato, tuomet 300ml tirpiklio, kurį sudaro 75% heksano ir 25% etilo acetato. Frakcijų aktyvumas nustatomas užnešant stiklo kapiliaru ant silikagelio plokštelės ir užpurškiant DPPH• radikalu.



16 Pav. Frakcionavimas silikagelio kolonoje

2.7. Ekstraktų ir frakcijų antioksidacinio aktyvumo nustatymas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvojo radikalo sujungimo metodu

Ekstraktų ir frakcijų antioksidacinis aktyvumas buvo matuojamas remiantis A. Von Gadow ir kt. [42] metodu, jo pakeitimai aprašomi toliau tekste. Eksperimentui ruošiami ekstraktų tirpalai metanolyje – 0,01 g ekstrakto ištirpinamas 2 ml metanolio. Iš paruoštų tirpalų toliau ruošiami

bandiniai su metanolio skiedimo būdu. Paruošti bandiniai maišomi su DPPH• radikalo tirpalu santykiu 1:19 (0,05 ml bandinio su 0,95 ml radikalo).

DPPH• radikalo tirpalui paruošti 0,0059g radikalo ištirpinama 250 ml metanolio.

Matavimai atliekami spektrofotometru „GENESYS 8“ (Spectronics instruments, Rochester, JAV). Nulinei reikšmei nustatyti išmatuota absorbcija pagal metanolį

Atliekami standartinės kreivės matavimai, matuojant sumaišytą DPPH radikalo tirpalą su metanolio santykiais 1:0, 4:1, 2:1, 1:1, 1:4. Visi matavimai atliekami 1 cm kiuvetėje esant 515 nm bangos ilgiui.

Antioksidacijos efektas yra proporcingas DPPH• spalvos išnykimui bandinyje. DPPH• susiformavimo prisijungiant vandenilį iš antioksidanto, violetinė spalva pasikeičia į geltoną

Ekstraktų ir frakcijų bandinių absorbcija matuojama praėjus 30 minučių po sumaišymo su DPPH• radikalo tirpalu. Apskaičiuojamas bandinių absorbcijos sumažėjimas lyginant su tuščiu bandiniu. Iš gautų reikšmių grafiškai nustatomas antioksidanto kiekis, reikalingas 50 proc. pradinės DPPH• koncentracijos sujungti. DPPH• radikalų sujungimo rezultatai pateikiami kaip efektyvi koncentracija (EC_{50}), Brand-Williams ir kt. [43].

2.8. Ekstraktų ir frakcijų antioksidacinio aktyvumo nustatymas 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties) metodu

ABTS radikalo katijonas gaunamas oksiduojantis ABTS su kalio persulfatu. Pirmiausiai paruošiamas fosfatinis buferinis druskos tirpalas (PBS): 8,18 g NaCl, 0,27g KH_2PO_4 , 1,42 Na_2HPO_4 ir 0,15 g KCl ištirpinama 1 l ultra švaraus vandens. Tirpalo pH turi būti 7,4, jei jis per mažas pridedama NaOH. Tuomet pasveriamas 0,0549g ABTS reagento, kuris ištirpinamas 50ml paruošto PBS tirpalo ir jis sumaišomas su 0,0038g $K_2S_2O_8$ druskos, kuri buvo ištirpina 200μL distiliuoto vandens. Taip gaunamas pradinis ABTS tirpalas, jis turi būti laikomas tamsoje, kambario temperatūroje 16-17val kol susidaro reikiama spalva. Tokiomis sąlygomis laikomas radikalas išlieka stabilus daugiau nei dvi paras.

ABTS tirpalas skiedžiamas PBS tirpalu, kol jo absorbcija esant 734nm bangos ilgiui tampa $0,800 \pm 0,030$. 1mg ekstrakto ištirpinama 1 ml metanolio, tuomet atliekami ekstrakcijų ir frakcijų skiedimai su PBS tirpalu. Paruošti 20μg ekstraktų tirpalai pilami į kiuvetes ir pilama 980μg ABTS tirpalo bei matuojama tirpalų absorbcija prie 734nm bangos ilgio po 6min nuo supilstymo. Prieš pradėdant naudotis spektrofotometru „GENESYS 8“ (Spectronics instruments, Rochester, JAV), reikia nustatyti nulinę reikšmę su PBS tirpalu.

Rezultatai pateikiami TEAC (trolokso ekvivalento antioksidantinė galia) dydžiu, jį apskaičiavus iš sudarytų grafikų, metodas, skaičiavimai ir rezultatų pateikiamas atliekami remiantis R. Re ir kt. [44] aprašymu.

2.9. Oksipreso metodas

Aliejaus ir riebalų stabilumas oksidacijai, priklausomai nuo priedų, tirtas instrumentiniu Oksipreso metodu, nustatant indukcijos periodą (IP). 5g bandinio (pasveriamą 0,001g tikslumu) patalpinama į reakcijos celę. Oksidacijos temperatūra palaikoma 120°C, o deguonies slėgis 0,5MPa (5 bar). Indukcinis periodas gaunamas oksidacijos kinetikos kreivės lūžio taške.

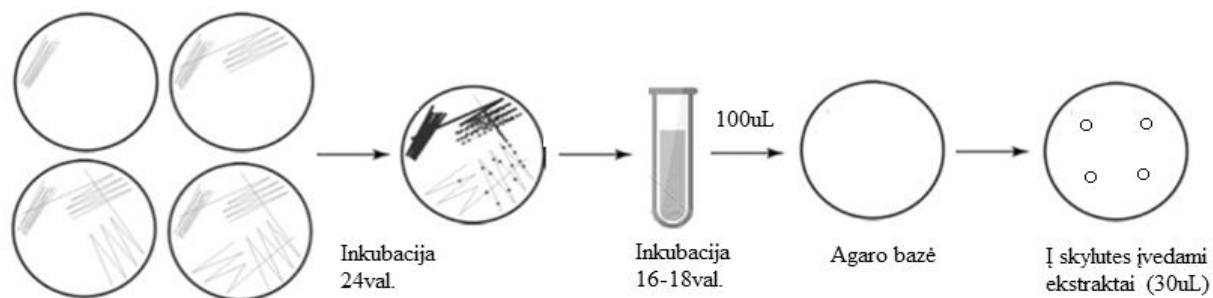
2.10. Ekstraktų antimikrobinių savybių tyrimai

Su patogeniniais mikroorganizmais buvo dirbama II klasės biologinės saugos kabinoje – TELSTAR bio II Advanced (Telstar, Spain). Terpių sterilizavimui naudojama autoklavas – „Certoclav EL 12/18“ (Berger, Danija). Mėginių susmulkinimui buvo naudojamas Smasher™ (bioMerieux, France), mėginiai skirti smulkinimui buvo dedami į specialius maišelius - Bag Page + microperforated filter 400ml (Interscience, Prancūzija). Mėginių suplakimui mėgintuvėliuose buvo naudojamas maišytuvas VWR 115/230V Power Unit (VWR International Eurolab S.L., Barcelona, Ispanija). Mėgintuvėlių ir Petri lėkštelių inkubavimui buvo naudoti termostatai „SHELLAB SL-1535“ (Medwov, Ispanija).

2.10.1. Difuzijos agare metodas

Augalų ekstraktų EE-ž, EE-l, VE-ž, VE-l, EE-g, VE-g poveikis bakterijų padermėms buvo tiriamas difuzijos agare metodu aprašytu Ashafa, A.O.T. ir kt. [45] su tam tikrais pakeitimais aprašytais toliau tekste. Tyrimams buvo pasirinktos bakterijos, kurios dažniausiai randamos žalioje mėsoje. Eksperimentas vykdomas patogenu laboratorijoje, antiseptinėmis sąlygomis.

Iš šaldiklio paimamos parinktos kultūros. Jos sėjamos į paruoštas ir sužymėtas Petri lėkštelėse esančias terpes. Sėjama su kilpele. Lėkštelės pagal bakterijų rūšį paskirstomos į atitinkamus termostatus ir laukiama 24 val, kol užaugs bakterijos. Išaugusi izoliuota kolonija įsodinama į mėgintuvėlį su paruošta skysta terpe be agaro ir laikoma per naktį atitinkamuose termostatuose. Eksperimento dieną, kiekvienas mėgintuvėlis, kuriame yra išaugę mikroorganizmai yra suplakamas ir paimama 100µl, kuris su pipete įvedamas į iš vakaro paruoštas agaro bazes sužymėtose Petri lėkštelėse ir išlyginamas lazdele. Sustingus turiniui lėkštelėse yra padaromos skylės ir 0,2 g/ml augalų ekstraktų koncentracijos įvedamos į terpes. 17 paveikslėlyje pateikiama eksperimento schema.



17 Pav. Difuzijos agare eksperimento schema

Augalų ekstraktų antimikrobinės medžiagos difuzijos būdu sklinda į terpę ir kontaktuoja su testuojamu organizmu. Gautos slopinimo zonos skersmuo išmatuojama milimetrais ir pagal skersmenį galima nuspręsti ekstraktų antimikrobinių savybių stiprumą. P.C.A., NAI, MRS, TSA, BHI, MH, BP, Columbia – tai agarai, terpės, kuriose atitinkamai nuo jų sudėties ir inkubacijos temperatūros, auga tam tikri mikroorganizmai, pateikti 7 ir 8 lentelėje.

Difuzijos agare metodui, pasirinktų bakterijų sąrašas, su jų augimui tinkančiomis agaro terpėmis bei inkubacijos temperatūromis pateikiamos 7 lentelėje.

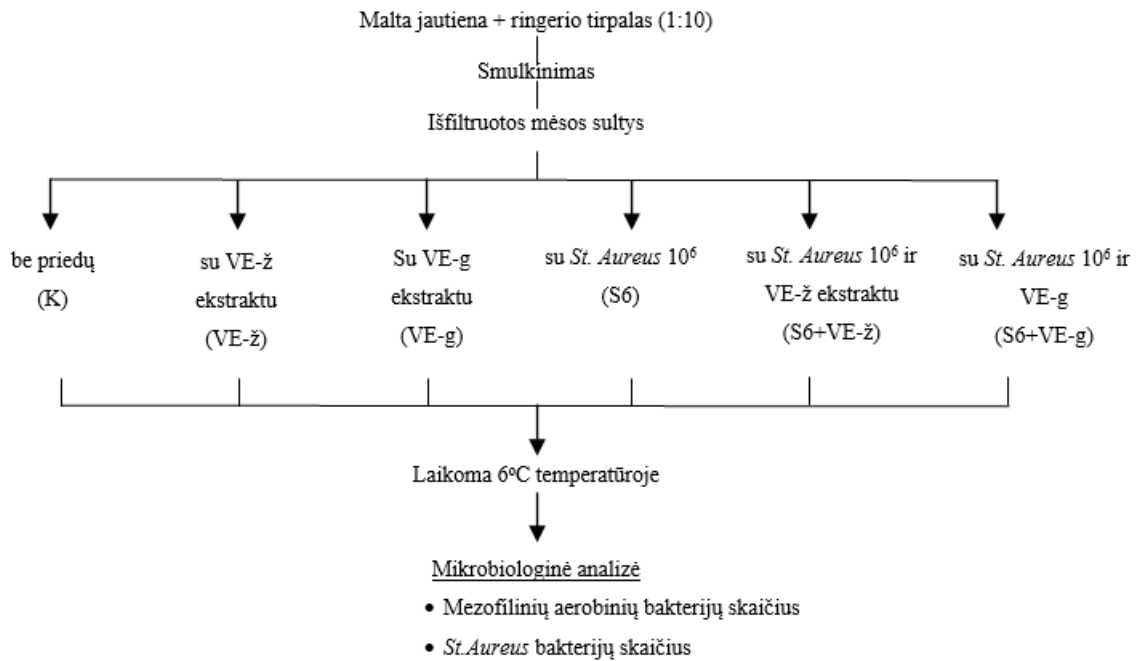
7 lentelė. Difuzijos agare metodui naudoti mikroorganizmai ir jų augimo sąlygos

Mikroorganizmai	Numeris	Bakterijos augimo terpė (agaras)	Inkubacijos temperatūra, °C	Per naktį laikoma mikroorganizmo augimo terpė mėgintuvėlyje	Agaro bazė
<i>E.Coli</i>	Cect 99	NAI	37	BHI (b)	MH
<i>E.Coli</i>	Cect501		37		
<i>St.Aureus</i>	Cect 25923		37		
<i>St.Aureus</i>	Promise30		37		
<i>B.Cereus</i>	Cect147		30		
<i>L.Mesenteroides</i>	119CN19	MRS	30	MRS (b)	MRS
<i>L.Mesenteroides</i>	Cect396		30		
<i>W.Viridescens</i>	Cect283		30		
<i>W.Viridescens</i>	Cect144		30		
<i>P.Putida</i>	Cect 324	TSA	26	TSA (b)	TSA
<i>Listeria imocia</i>	Cect 910		37	BHI(b)	MH
<i>B.Thermosphacta</i>	Cect847	BHI	26		
<i>Salmonella</i>	9B9	BHI	37	BHI (b)	MH
<i>Y.Enterocolica</i>	Cect 354		37		
<i>S.Sonnei</i>	Cect 853		37		
<i>C.Jenuni*</i>	Cect496		42		Columbia
<i>C.Perfringers*</i>	Cect376		37		TSA

*Speciali atmosfera. C. Jenuni – mikroaerofilinė atmosfera. C. Perfringers – anaerobinė atmosfera.
(b) – skysta terpė, be agaro.

2.10.2. Ekstraktų antimikrobinių savybių tyrimas mėsos sultyse

Eksperimento metu patikrinama mėsos sulčių, mėsos sulčių su *St. Aureus* S6 koncentracija mikrofloros, bei antimikrobinės VE-g ir VE-g ekstraktų sąlybės. 18 paveikslėlyje pateikiama eksperimento schema.



18 Pav. Ekstraktų antimikrobinų savybių tyrimo mėsos sultyse eksperimento schema

Pasveriamą 10g maltos jautienos faršo į specialų plastikinį maišelį su filtru, įpilama 90ml ringerio tirpalo ir gerai susmulkinama Stomacher aparate. Gautos išsifiltravusios mėsos sultys paskirstomos į 6 mėgintuvėlius po 10ml. Paruošiami 6 mėgintuvėliai su bandiniais: kontrolė (K), mėsos sultys su 10% VE-ž ekstraktu (VE-ž), mėsos sultys su VE-g ekstraktu (VE-g), mėsos sultys su *St. Aureus* 10⁶ ksv/ml (S6), mėsos sultys su *St. Aureus* 10⁶ ksv/ml ir 10% VE-ž ekstraktu (VE-ž) ir mėsos sultys su *St. Aureus* 10⁶ ksv/ml ir 10% VE-g ekstraktu (VE-g).

St. Aureus S6 koncentracijos paruošimas

Eksperimentui buvo naudojamos 4 skirtingos *St. Aureus* padermės: *St. Aureus* 25923, *St. Aureus* 103, *St. Aureus* 30, *St. Aureus* 10. Šios padermės buvo pasėtos į NAI lėkšteles ir inkubuojamos, po 24 val. iš kiekvienos Petri lėkštelės paimama izoliuota kolonija ir pasėjama į iš anksto paruoštus 4 mėgintuvėlius su 10ml BHI(b) ir laikomos inkubatoriuje 16-18 val. (6 lentelė)

Po 16-18 val išlaikytų mėgintuvėlių turinys, kurių koncentracija yra 10¹⁰ ksv/ml yra gerai išmaišomas ir kiekvieno atskirai išmatuojamas optinis tankis, tuomet pagal formulę (1) suskaičiuojamas reikalingas kiekis mililitrais iš šio mėgintuvėlio ir ringerio tirpalo kiekis mililitrai pagal (2) formulę.

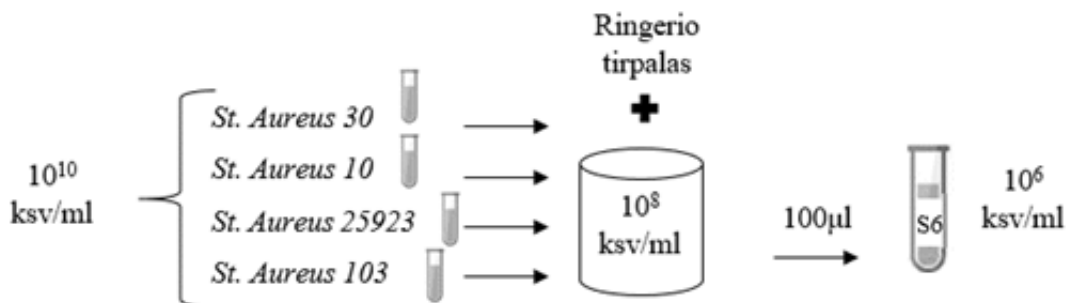
$$x, ml = \frac{0,5}{O.T.} * 10 \quad (1)$$

x – reikalingas kiekis mililitrais iš tBHI (b) mėgintuvėlių su *St. Aureus*

O.T. – optinis tankis

$$Ringerio\ tirpalo\ kiekis, ml = 10 - x \quad (2)$$

Reikiami kiekiai pipete supilami į sterilizuotą buteliuką ir tirpalo koncentracija yra 10^8 ksv/ml. Atliekami tolimesni skiedimai: 100μl iš sterilizuoto buteliuko supilami į 10ml mėsos sulčių, gaunama 10^6 ksv/ml koncentracija. 19 paveikslėlyje pateikiama *St. Aureus* (S6) 10^6 ksv/ml koncentracijos paruošimo schema.



19 Pav. *St. Aureus* (S6) 10^6 ksv/ml koncentracijos paruošimo schema

Bandinių ėmimo laikai t_0 (iš karto paruošus mėginius), t_1 (po 5 val.), t_2 (po 9 val.), t_3 (po 24 val.), t_4 (po 32 val.), t_5 (po 48 val.).

BP agare aptinkami užaugę *St. Aureus* mikroorganizmai, P.C.A. agare – suskaičiuojama mezofilinių aerobinių bakterijų skaičius, nustatantis bendrą mikrobiologinę taršą maisto produkte.

Patikrinimui ar koncentracija paruošta teisingai, t_0 bandinio ėmimo metu, iš sterilizuoto buteliuko, kuriame koncentracija 10^8 ksv/ml, atliekamas laipsniškas skiedimas į paruoštus mėgintuvėlius su 9ml. ringerio tirpalu. Iš -6 skiedimo, su pipete 100μL mėgintuvėlio turinio supilama į Petri lėkštelę su BP agaru, išlyginama lazdele ir inkubuojama termostate (7 lentelė).

Eksperimento metu, kiekvieno mėginio ėmimo metu, 1ml kiekvieno bandinio skiedžiama ringerio tirpiklyje ir laipsniškai skiedžiant, paruošiamos pasirinktos koncentracijos. Tuomet iš atitinkamų skiedimų su pipete imama po 1ml ir supilama į Petri lėkštelę ir užpilama 20ml P.C.A. agaru, tuomet lėkštelės turinys gerai sumaišomas. BP terpei, su pipete imama po 100μL kiekvieno mėginio ir supilama į iš anksto paruoštas lėkšteles su BP agaru, mėginys agaro paviršiuje tolygiai paskirstomas lazdele. Lėkštelės inkubuojamos atitinkamose temperatūrose termostatuose (7 lentelė). Po mėginio paėmimo jie laikomi 6°C temperatūroje.

Praėjus inkubavimo laikui suskaičiuojamas lėkštelėse išaugusių mikroorganizmo kiekis. Tuomet pagal formulę (3) suskaičiuojamas kolonijas sudarantys vienetai mililitre (ksv/ml):

$$\frac{ksv}{ml} = \frac{k}{v \times 10^x}; \quad (3)$$

k – suskaičiuotų kolonijų kiekis;

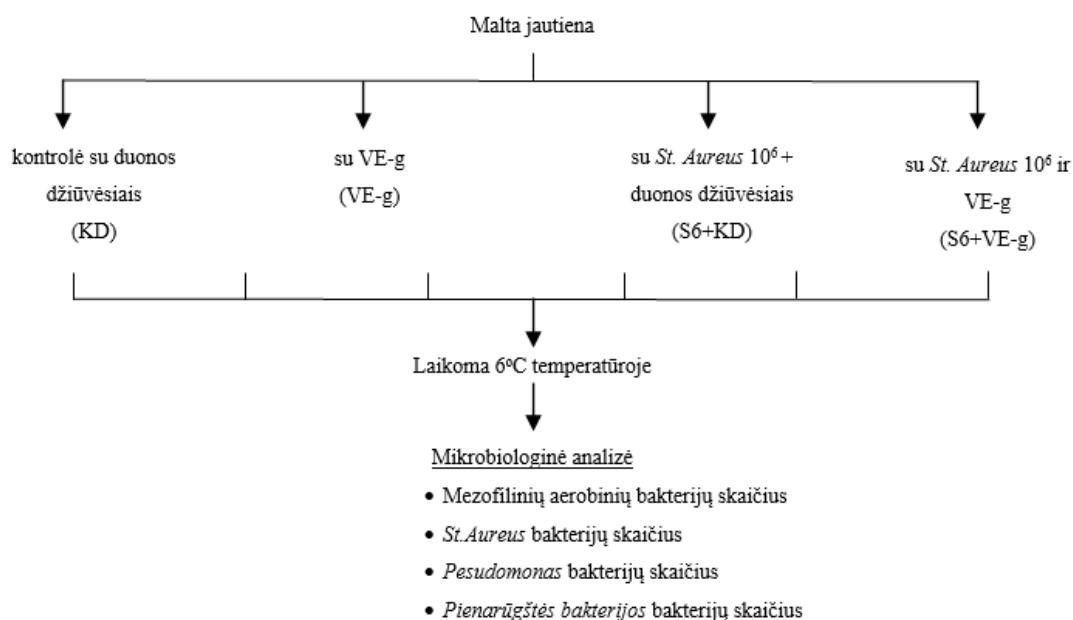
v – į lėkštelę įvesto mėginio tūris, ml;

x – skiedimo laipsnis;

Suskaičiuojamas dešimtainis logaritmas \log_{10} (ksv/ml), kadangi eksperimentas kartojamas du kartus, išvedamas vidurkis ir braižoma grafinė priklausomybė, nuo eksperimento mėginių ėmimo dienų. Taip pat suskaičiuojama standartinis nuokrypis, kuris pavaizduojamas grafike.

2.10.3. Ekstraktų antimikrobinis tyrimas mėsoje

Eksperimento metu patikrinamas VE-g ekstrakto antimikrobinės savybės jautienos farše. Paruošiami penkios skirtingos mėsos kukulių po 5g partijos: malta mėsa su 10% duonos džiūvėsėlių (KD), malta mėsa su 10% VE-g ekstraktu (VE-g), malta mėsa su *St. Aureus* 10^6 ksv/ml ir duonos džiūvėsėliais (S6+KD), malta mėsa su *St. Aureus* 10^6 ksv/ml ir 10% VE-g ekstraktu (S6+VE-g). Eksperimentas vykdomas D0 (mėginių paruošimo dieną), D3, D4, D5 (trečią, ketvirtą ir penktą dieną po mėginių paruošimo) tuo pačiu laiku. Eksperimento tvarka analogiška 2.10.2. eksperimentui, tik antimikrobinis aktyvumas patikrinamas prieš 4 skirtingus mikroorganizmus. 20 paveikslėlyje, pateikiama eksperimento schema.



20 Pav. Ekstraktų antimikrobinio tyrimo mėsoje eksperimento schema

Kiekvieno bandinio ėmimo metu atliekama mikrobiologinė analizė, 8 lentelėje pateikti lėkštelėse tiriami ir skaičiuojami mikroorganizmai, atitinkamos jų terpės, inkubavimo temperatūros ir laikas. Skaičiavimai ir duomenų apdorojimas analogiškas 2.10.2. eksperimentui.

8 lentelė. Mikrobiologiniai parametrai

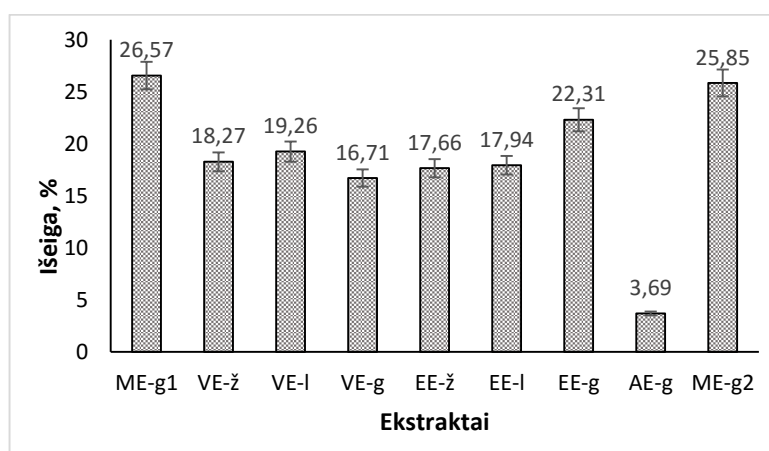
Mikroorganizmai	Mikroorganizmo augimo terpė (agaras)	Temperatūra, °C	Inkubavimo laikas, val
<i>St. Aureus</i>	BP	37	48
Mezofiliniai aerobiniai	P.C.A.	30	72
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> agaras	30	24
Pienarūgštės bakterijos	MRS agaras	30	72

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

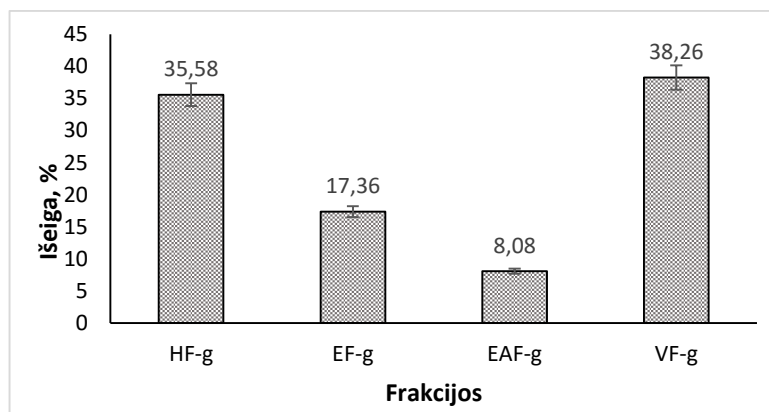
3.1. Ekstraktų ir frakcijų išeigos

Atliekant ekstrakciją Soksleto ir ASE aparatu pasveriami naudojamos žaliavos kiekiai bei rotaciniame garintuve išdžiovintų ekstraktų kiekiai. Gaminant vandeninius ekstraktus, pasveriamą naudojamą žaliavą ir liofilizuotas ekstraktas. Tuomet apskaičiuojama išdžiovintų ekstraktų išeiga. 21 paveikslėlyje pateikiamos ekstraktų išeigos.

Atliekant ekstrakciją dalijamajame piltuve su dviem nesimaišančiais tirpikliais, eksperimento pradžioje pasveriamas ME-g₁ ekstrakto kiekis bei gautų, sukonzentruotų HF-g, EF-g, EAF-g ir liofilizuotos VF-g kiekiai, tuomet apskaičiuojamos gautos išeigos. Šios išeigos pateikiamos 22 paveikslėlyje.



21 Pav. Ekstraktų išeigos



22 Pav. Frakcijų išeigos

Gaminant ekstraktus iš *Grindelia squarrosa* žaliavos, didžiausia išeiga pasiekama ekstraktą gaminant ASE aparatu su metanolio tirpikliu - 26,57 % (ME-g₁), o acetoninio ekstrakto išeiga mažiausia – 5,69% (AE-g). O ME-g₁ ekstrakto frakcijos didžiausia išeiga yra vandeninės frakcijos – 35,58% (VF-g). Tuo tarpu gaminant ekstraktus iš *Fagopyrum esculentum* žiedų ir lapų, išeigos skyrėsi labai nežymiai, tačiau vandeninių ekstraktų išeigos (VE-ž, VE-l), atitinkamai 18,27% ir 19,26% yra šiek tiek didesnės nei etanolinių (EE-ž, EE-l) – 17,66% ir 17,94%.

3.2. Cheminės sudėties nustatymas ir aktyvių junginių identifikavimas

UESCh-Q-TOF metodu buvo nustatyti, kokie junginiai yra grikių lapų ir žiedų bei geltonosios grindelijos ekstraktuose. Junginiai buvo identifikuojami pagal apskaičiuotą molekulinio jono formulę, molekulinę jono masę, UV spektrą bei sulaikymo laiką. Ekstraktų ir frakcijų bei standartų chromatogramos pateikiamos 1 priede.

3.2.1. Junginių identifikavimas grikių lapų ir žiedų ekstraktuose

Grikių lapuose ir žieduose buvo identifikuoti 9 fenolinai junginiai: fenolinės rūgštys (chino, chlorogeno, kavos, galo), flavonoidai (katechinas, kvercetas), flavonoidų glikozidai (rutinas, kvercitrinas), kumarino glikozidas (skopolinas), ir triterpenas (skvalenas). 9 lentelėje parodytas junginių pasiskirstymas EE-I, VE-I, EE-ž ir VE-ž ekstraktuose.

9 lentelė. Identifikuotų junginių pasiskirstymas grikių lapų ir žiedų ekstraktuose

Identifikuoti junginiai	Chino rūgštis (1)	Galo rūgštis (2)	Chlorogeno rūgštis (3)	Skopolinas (4)	Kavos rūgštis (5)	Katechinas (6)	Rutinas (7)	Kvercitrinas (8)	Kvercetas (9)	Skvalenas (10)
EE-I	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
VE-I	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
EE-ž	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
VE-ž	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Ekstrahentai (vanduo ir rektifikuotas etilo alkoholis), neturėjo didelės įtakos skirtingų junginių išsieksravimui, tačiau etanoliniuose ekstraktuose (EE-I ir EE-ž) identifikuojamas kvercitrinas, o vandeniniuose (VE-I ir VE-ž) kvercetas. Taip pat tik VE-I ir VE-ž ekstraktuose buvo identifikuotas skvalenas.

Remiantis Xiaohua, Li ir kt [28] tyrimais, lapuose ir žieduose buvo identifikuoti tie patys junginiai: rutinas, ir chlorogeno rūgštis. Kvercetas buvo identifikuotas tik žieduose, o kavos ir galo rūgštys tiek žieduose, tiek ir lapuose.

Kalinova, Jana ir kt [27] identifikavo ir išskyrė, keturis svarbiausius junginius grikių antžeminėje dalyje: α -tokoferolį, rutiną, skvaleną ir epikatechiną ir stebėjo jų pasiskirstymą 2004m. ir 2005m. augalo dalyse priklausomai nuo auginimo sąlygų (temperatūra, kritulių kiekis, augalo brandos periodas), o kitame savo tyrime Kalinova, Jana ir kt [47] nustatė katechino, kvercetino ir izokvercitrino junginių pasiskirstymą grikių augalo dalyse priklausomai nuo augalo brandos (prieš žydėjimą, žydėjimo ir nuėmimo laikotarpiu) ir auginimo metų – 2004 ir 2005. Rezultatai parodė, kad tiek skirtingi metai, tiek augalo brandos periodas turi didelę įtaką junginių kiekiams žieduose ir lapuose, pavyzdžiui 2005 metų grikių lapuose katechinas visai nebuvo

aptiktas. Rutino kiekiai augalo lapuose ir žieduose priklauso tik nuo auginimo temperatūros, o tuo tarpu skvaleno kiekis stipriai priklauso nuo kritulių kiekio, temperatūros ir gaunamos saulės kiekio.

Šie tyrimai galėtų paaiškinti, kodėl EE-1, EE-ž, VE-1, VE-ž ekstraktuose nebuvo aptikta tam tikrų junginių, kurie buvo aptikti jau minėtuose tyrimuose ir identifikuota keletas naujų junginių – chino rūgštis ir skopolinas. Tai fenoliniai junginiai, kurie pasižymi antioksidacinėmis savybėmis.

10 lentelėje, pateikiami identifikuotų junginių duomenys: sulaikymo laikas, jono formulė, molekulinė jono masė ir molekulinė masė.

10 lentelė. Identifikuotų junginių EE-1, EE-ž, VE-ž, VE-1 ekstraktuose duomenys

Identifikuotas junginys	Sulaikymo laikas, min	Jono formulė	Molekulinė jono masė	Molekulinė masė	UV spektrai, nm
1	0,7	C ₇ H ₁₁ O ₆	191,0561	192,1672	242-325
2	2,7	C ₇ H ₅ O ₅	169,0142	170,1204	242-325
3	3,3	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,0878	354,3096	242-325
4	4,2	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,0875	354,3097	-
5	4,3	C ₉ H ₇ O ₄	179,0569	180,1572	242-325
6	5,0	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	289,0712	290,2683	-
7	6,1	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609,1444	610,5184	254-354
8	6,4	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447,0931	448,3778	-
9	7,0	C ₁₅ H ₉ O ₇	301,0363	302,2363	254-366
10	8,6	C ₃₀ H ₄₉	409,2364	410,7184	-

3.2.2. Junginių identifikavimas geltonosios grindelijos ekstraktuose ir frakcijose

Grindelijos augale identifikuoti 7 junginiai: fenolinės rūgštys (chlorogeno, chino, 3,5-dikafeoilchino, (5Z,11α,13E)-11-Hidroksi-9,15-dioksopropa-5,13-dien-1-oik rūgštis), kumarinai (skutelarinas), flavonoidas (5,7-dihidroksi-3,4,5-trimetoksi-flavonas, 3,7,4'-tri-O-metilkvercetas). Junginių identifikavimui taip pat buvo praleista keletas junginių standartų: chlorogeno ir 3,5-dikafeoilchino rūgštys, kurių sulaikymo laikai atitinkamai buvo – 1,7 min ir 2,6min., kurie sutapo su sulaikymo laikais augalo ekstraktuose. 11 lentelėje parodytas junginių pasiskirstymas VE-g, EE-g, ME-g₁, HF-g, EA-g, EAF-g, AE-g ekstraktuose.

Junginių pasiskirstymas priklauso nuo ekstrahentų, jų koncentracijos ir poliškumo. Šiuo atveju tirpiklių poliškumas nuo didžiausio iki mažiausio yra: vanduo, metanolis, etanolis, etiloacetatas, acetonas, eteris, heksanas. Daugiausia junginių identifikuota VE-g, EE-g, ME-g₁ ekstraktuose, kur ekstrakcijoms buvo panaudoti poliškiausi tirpikliai, o mažiausiai junginių identifikuota HF-g frakcijoje, atitinkama heksanas mažiausiai poliškas ekstrahentas.

11 lentelė. Identifikuotų junginių pasiskirstymas geltonosios grindelijos ekstraktuose ir frakcijose

Identifikuoti junginiai	Chino rūgštis (11)	Chlorogeno rūgštis (12)	Skutelarinas (13)	3,5-di kafeoilchino rūgštis (14)	5,7-dihidroksi-3,4,5-trimetoksi-flavonas(15)	3,7,4-tri-O-metilkercecinas (16)	(5Z, 11α, 13E)-11-Hidroksi-9,15-dioksoprost-5,13-dien-1-oik rūgštis (17)
VE-g	+	+	+	+	+	+	-
EE-g	+	+	+	+	+	+	-
ME-g ₁	+	+	+	+	+	+	-
HF-g	-	-	-	+	+	-	+
EF-g	-	-	-	+	-	+	+
EAF-g	-	-	+	+	+	+	+
AE-g	-	-	-	-	+	+	+

Slawomila, Nowakas ir kt. [11] aptiko Grindelijos lapų ir žiedų ekstraktuose 11 fenolinių rūgščių ir tyrė jų pasiskirstymą bei kiekius augale. Cheminė sudėtis priklauso nuo augalo auginimo vietos ir sąlygų, todėl *Grindelia squarrosa* tirtame augale identifikuotos tik 5 fenolinės rūgštys.

Terpenai tai aromatiniai angliavandeniliai, gaunami dažniausiai iš spygliuočių augalų arba identifikuojami eteriniuose aliejuose[48][49], tačiau Timermann, N. Barbara ir kt. [50] *Grindelia squarrosa* lapų ir žiedų dichlormetano ekstrato frakcijose identifiko ne tik flavonoidus, bet ir terpenus. Šiuo atveju *Grindelia squarrosa* ekstraktuose nebuvo aptikta terpenų ar jų darinių.

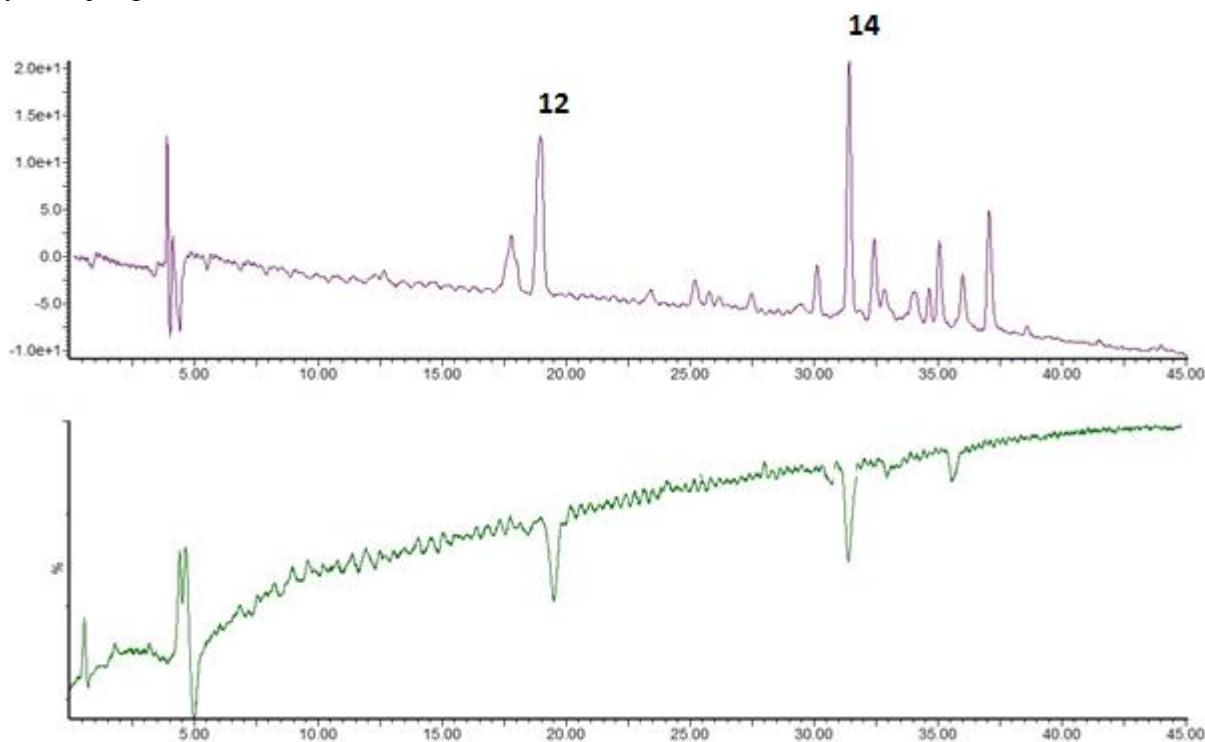
12 lentelėje, pateikiami identifikuotų junginių duomenys: sulaikymo laikas, jono formulė, molekulinė jono ir junginio masė.

12 lentelė. Identifikuotų junginių duomenys

Identifikuotas junginys	Sulaikymo laikas, min	Jono formulė	Molekulinė jono masė	Molekulinė masė	UV spektrai
11	0,7	C ₇ H ₁₁ O ₆	191,0562	192,1671	242-325
12	1,7	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,0885	354,3093	242-325
13	2,4	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂	461,0713	462,3602	-
14	2,7	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1203	516,4514	242-325
15	4,5	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	343,0827	344,3159	-
16	4,9	C ₂₀ H ₂₇ O ₆	363,1804	364,4338	254-366
17	5,6	C ₂₀ H ₂₉ O ₅	349,2012	350,4497	-

3.2.3. Ekstraktų analizė aukšto efektyvumo skysčių chromatografija ir 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvuju radikalu

Realaus laiko ECSH-DPPH metodo esmė tokia, jog antioksidantai, esantys ekstrakte sureaguoja su DPPH• radikalu ir toje vietoje, kur išeina aktyvus junginys, gaunama neigiama absorbcija. Vienu metu užrašomi du UV spektrai – ekstrakto ir ekstrakto su DPPH•. 23 paveikslėlyje pateikiama ME-g₁ ECSH UV ir DPPH• realaus laiko chromatogramos, su pažymėtais aktyviais junginiais.



23 Pav. ECSH UV ir DPPH• realaus laiko ME-g₁ chromatogramos

Iš gautos chromatogramos matyti, kad didžiausia neigiama absorbcija gauta apie 19 ir 32 minutę ir sutampa su aukščiausiomis ekstrakto smailėmis. Nustatyta, kad šios smailės atitinkamai priklauso chlorogeno ir 3,5-dikafeilchino rūgštims, todėl galima daryti išvadą, kad šios rūgštys yra radikalų sujungėjos. Šios dvi rūgštys identifikuotos kaip radikalų sujungėjos ME-g₁ ir VF-g ekstraktuose. EAF-g ir HF-g radikalų sujungėju identifikuota tik 3,5-dikafeilchino rūgštis, EF-g frakcijoje nė viena iš rūgščių nebuvo aptikta. Likusios chromatogramos pateikiamos 2 priede.

3.2.4. Plonasluksnė chromatografija ant silikagelio plokštelės

Geriausias bioaktyvių junginių skirstymas HF-g frakcijai buvo su tirpikliu, kurį sudarė 70% etiloacetato ir 30% heksano. HF-g frakcijai atliekamas fracionavimas silikagelio kolonoje, gautų frakcijų aktyvumas patikrinamas panaudojus silikagelio plokštelių analizę. Nustatyta, kad aktyviausios ir bendrais junginiais pasižyminčios fazės yra 5-11, jos apjungiamos ir išgarinamos, naudojant vakuuminį-rotacinį garintuvą BUCHI R-114 (Buchi labortechnik AG, Konstanz, Šveicarija).

Iš 5-11 frakcijų paskaičiuota išėiga, kuri yra – 16,4 %. Toks kiekis, kuris buvo gautas po frakcionavimo, nebuvo pakankamas toliau suplanuotiems tyrimams vykdyti, todėl tolesniuose tyrimuose ši surinkta frakcija nebuvo panaudota.

3.3. Antioksidacinės ekstraktų ir frakcijų savybės

3.3.1. Ekstraktų ir frakcijų antioksidacinio aktyvumo nustatymas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvojo radikalo sujungimo metodu

Absorbcijos pokyčio reikšmės naudojamos standartinis antioksidantas – troloksas, kalibracinei kreivei sudaryti ir tiriamo junginio DPPH• radikalų sujungimo aktyvumas išreiškiamas kaip standartiniam antioksidantui ekvivalentiška koncentracija. Kuo mažiau antioksidanto masės dalių reikia, kad sumažinti pradinės DPPH• koncentracijos radikalo absorbciją 50%, tuo ekstrakto antioksidacinės savybės yra stipresnės.

Sudaroma grafinė DPPH• radikalo tirpalo su metanolium priklausomybė nuo optinio tankio (kalibracinė kreivė), kuri pateikiama 3 priede. Sudaromi kiekvieno ekstrakto ir frakcijos grafikas ir apskaičiuojamas EC₅₀ dydis. Rezultatai pateikiami 13 lentelėje.

Pagal EC₅₀ dydį, galima daryti išvadas, jog geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymi EE-1 ir EE-ž ekstraktai, atitinkamai 0,0152mg/ml ir 0,0149mg/ml, kurių EC₅₀ dydis yra mažesnis ir už standartinio antioksidanto trolokso, kurio EC₅₀ buvo gautas – 0,0632mg/ml.

3.3.2. Ekstraktų ir frakcijų antioksidacinio aktyvumo nustatymas 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties) metodu

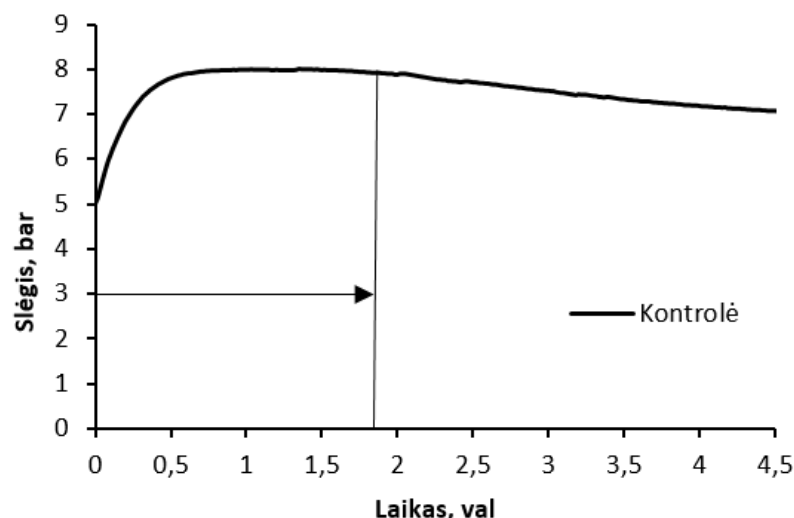
TEAC apskaičiuojamas iš grafikų, šiuo atveju kuo didesnė trolokso ekvivalento antioksidacinė galia, tuo stipresnėmis antioksidacinėmis savybėmis pasižymi ekstraktas.

Sudaroma grafinė trolokso koncentracijos priklausomybė nuo sujungimo galios (kalibracinė kreivė), kuri pateikiama 3 priede. Sudaromi kiekvieno ekstrakto ir frakcijos grafikas ir apskaičiuojamas TEAC dydis. Rezultatai pateikiami 13 lentelėje.

Geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymi EE-1 ir EE-ž ekstraktai, kurių TEAC dydžiai atitinkamai 11,98 (mmol Trolokso/g) ir 12,25 (mmol Trolokso/g).

3.3.3. Oksipreso metodas

Indukcinis periodas parodo riebalų oksidacijos lygį, kuo jis didesnis, tuo oksidacinės ekstrakto savybės didesnės. Oksipreso rezultatai gaunami kreivėse, iš kurių nustatomas IP. Kontrolė buvo naudojamas Premium „Daumantų“ majonezas be E ir išmatuotas jo IP yra 1,87val. ir jo grafikas pateikiamas 24 paveikslėlyje.



24 Pav. Oksipresu užrašyta kontrolinio bandinio oksidacijos kinetikos kreivė

4 priede pateikiamos ekstraktų ir frakcijų oksipresu užrašytos oksidacijos ir kinetikos ir indukcinio periodo nustatymo kreivės. Didžiausias IP buvo EE-ž ir EE-l ekstraktų, atitinkamai 2,40val. ir 2,50val., o mažiausias ME-g₁ -1,19val. Likę rezultatai pateikiami 13 lentelėje.

13 lentelė. DPPH^{*}, ABTS ir oksipreso metodų rezultatai

Ekstrakto arba frakcijos pavadinimas	DPPH [*] EC ₅₀ (mg/ml)	ABTS TEAC (mmol Trolokso/g)	Oksipresas IP, val
ME-g ₁	2,4902	1,57	1,19
VE-ž	0,3215	6,21	2,18
VE-l	0,7926	5,56	2,34
VE-g	1,2754	4,49	2,24
EE-ž	0,0152	11,98	2,40
EE-l	0,0149	12,25	2,50
EE-g	2,4369	4,58	2,31
AE-g	2,7117	1,47	1,72
ME-g ₂	2,4061	1,53	-
EF-g	2,6525	0,78	1,98
EAF-g	3,0256	0,91	1,54

Visų metodų rezultatuose, stipriausią antioksidacinę aktyvumą parodė EE-l, EE-ž ir VE-ž ir VE-l ekstraktai, tai galėjo nulemti jų sudėtyje, esančios fenolinės rūgštys. Olszewska, A. Monika ir kt. [51] ABTS metodu išmatavo kavos rūgštis, galo rūgštis, kvercetino, katechino TEAC (mmol Trolokso/g) dydžius, kurie atitinkamai yra – 10,37, 22,36, 12,41, 9,51. Etanolinių ekstraktų antioksidacinės savybės didesnės galimai dėl to, jog sudėtyje yra kvercetino, kurio TEAC didesnis už katechino junginio, kuris išsiektahavo vandeniniuose ekstraktuose. EE-l ir EE-ž ekstraktų

antioksidacinės savybės yra netgi stipresnės už sintetinių antioksidantų: BHA, BHT ir TBHQ, kurių TEAC atitinkamai lygūs 7,09 mmol Trolokso/g, 2,56 mmol Trolokso/g, ir 6,01 mmol Trolokso/g [51].

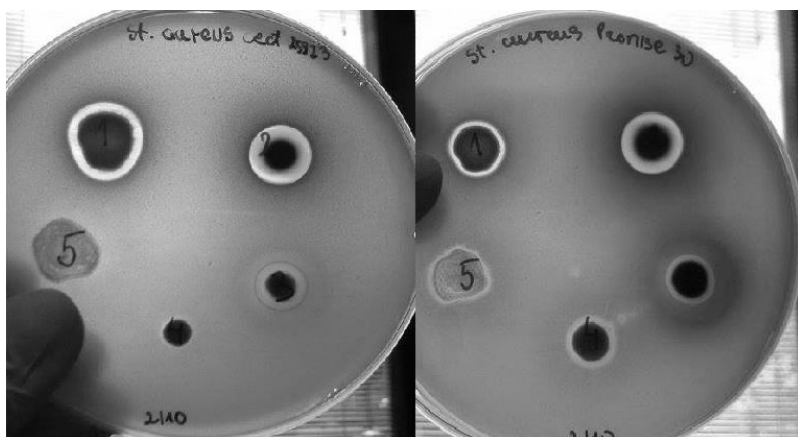
Geltonosios grindelijos ekstraktai, nepasižymėjo geromis antioksidacinėmis savybėmis. ME-g₁, VE-g, EE-g ekstraktuose išsiekstrahavo trys fenolinės rūgštys, tad ekstraktų antioksidacinis stiprumas šiek tiek didesnis už AE-g ekstraktą, kuriame identifikuota tik viena fenolinė rūgštis.

3.4. Mikrobiologiniai tyrimai

3.4.1. Difuzijos agare metodas

Augalų ekstrakte, esančios antimikrobinės medžiagos geba difunduoti į terpes ir sąveikauti su Petri lėkštelėse šviežiai testui pasėtais mikroorganizmais. Priklausomai nuo slopinimo zonų diametro, galima spręsti augalo ekstrakto antimikrobinių savybių stiprumą, todėl šias zonas išmatuojame.

25 paveikslėlyje pateikiami difuzijos agare metodo rezultatai su *St. Aureus* ir *Bacillus cereus* patogeniniais mikroorganizmais, kuriuose matomos slopinimo zonos.



25 Pav. Difuzijos agare metodo rezultatų pavyzdys su *St. Aureus* ir *Bacillus cereus*

Difuzijos agare rezultatai pateikiami lentelėje, esančioje 4 priede, su kiekvienu ekstraktu kiekvienam mikroorganizmui buvo atlikti trys pakartojimai, jei ekstraktas neparodo antimikrobinių savybių, stulpelyje žymima minusu (-), jei parodė pliusu (+) ir parašomas slopinimo zonos diameteras.

14 lentelėje pateikiami susiaurinti rezultatai su bakterijomis, kurioms ekstraktai parodė antimikrobinį poveikį, pateikiant slopinimo zonos diametro vidurkį su standartiniu nuokrypiu.

14 lentelė. Ekstraktų antimikrobinis poveikis (slopinimo zonos skersmuo agarų terpėje \pm SD, mm)

Mikroorganizmo pavadinimas	<i>St.Aureus</i> Cect 25923	<i>St.Aureus</i> Promise3	<i>B.Cereus</i> Cect147	<i>L.Mesenteroides</i> Cect396	<i>B.Thermosphacta</i> Cect847	<i>C.Jenuni</i> Cect496	<i>C.Perfringers</i> Cect376
EE-I	5,1 \pm 0,6	2,6 \pm 0,3	2,3 \pm 0,6	n	0,7 \pm 0,3	6,3 \pm 0,5	n
EE-ž	4,6 \pm 0,6	4,3 \pm 0,5	3,5 \pm 0,6	n	1,3 \pm 0,2	7,5 \pm 1,0	n
EE-g	3,3 \pm 0,7	5,1 \pm 0,4	2,4 \pm 0,6	1,2 \pm 0,2	2,3 \pm 0,3	22,0 \pm 2	2,1 \pm 0,2
VE-I	2,3 \pm 0,3	2,3 \pm 0,3	3,5 \pm 0,4	n	0,9 \pm 0,1	5,3 \pm 1,0	n
VE-ž	3,8 \pm 0,3	2,5 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	n	1,1 \pm 0,1	2,8 \pm 0,8	n
VE-g	5,5 \pm 0,5	4,5 \pm 0,4	1,8 \pm 0,8	0,6 \pm 0,3	1,7 \pm 0,3	24,6 \pm 3,0	1,7 \pm 0,3

n – nebuvo slopinimo zonos

Geriausias antimikrobinis poveikis ekstraktai parodė prieš *St. Aureus*, *B. Cereus*, *B. Thermosphacta*, *C. Jenuni* mikroorganizmus. Pagal slopinimo zonos diametrus, galima galimai išskirti VE-g ekstraktą, kaip turintį geriausias antimikrobinis savybes.

Atsižvelgiant į rezultatus tolimesniems mikrobiologiniams tyrimams pasirenkamas *St. Aureus* mikroorganizmas. Padaromas trumpas eksperimentas su 4 skirtingomis *St. Aureus* padermėmis ir VE-g ekstrakto skirtingomis koncentracijomis, tam kad nuspręsti kokią ekstraktų koncentraciją naudoti tolimesniuose eksperimentuose. Rezultatai pateikiami 15 lentelėje, nuspręsta pasilikti prie pradinės koncentracijos 0,2g/ml.

15 lentelė. Skirtingų VE-g ekstraktų koncentracijų poveikis slopinimo zonos skersmeniui

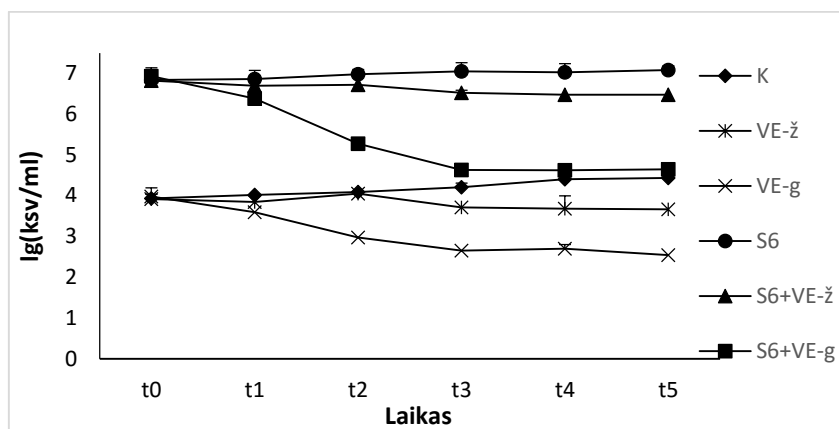
	0,2g/ml	0,1g/ml	0,05g/ml	0,025g/ml	0,0125g/ml
<i>St.Aureus</i> 10	+ 7mm	+ 2mm	+ 0,2mm	-	-
<i>St.Aureus</i> 30	+ 10mm	+ 3mm	+ 0,5mm	-	-
<i>St.Aureus</i> 103	+ 11mm	+ 7mm	+ 1mm	-	-
<i>St.Aureus</i> 25923	+ 6mm	+ 4mm	+ 0,5mm	-	-

3.4.2. Ekstraktų antimikrobinis poveikis tyrimas mėsos sultyse

Patikrinama S6 koncentracija, -6 skiedimą, kolonijų skaičius – 61. Šis rezultatas patvirtina, kad *St.Aureus* koncentracijų skiedimai buvo atlikti teisingai.

St. Aureus

Atlikus skaičiavimus BP agare, gaunamos K, VE-ž; VE-g, S6; S6+VE-ž ir S6+VE-g priklausomybės, pateiktos 26 paveikslėlyje.



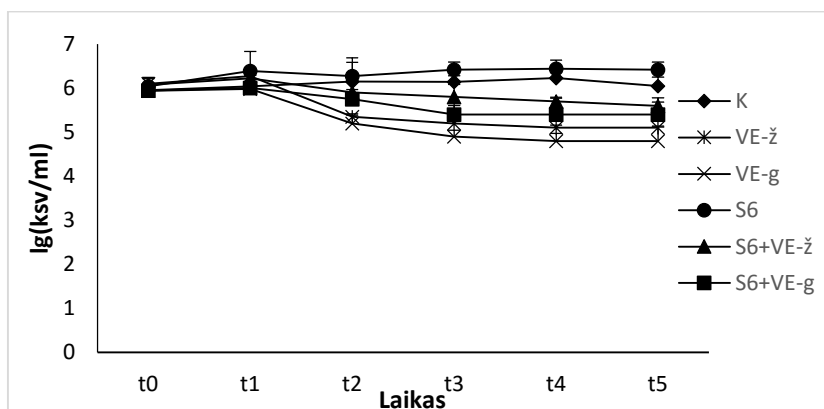
26 Pav. Grafikas, parodantis *St Aureus* augimą bandiniuose

K, VE-ž, VE-g bandiniuose yra apie 43% mažesnis *St. Aureus* kiekis nei bandiniuose S6 ir S6+VE-ž, S6-VE-4. Ši priklausomybė išlieka panaši visuose bandinio ėmimo laikuose. K ir S6, esančių *St. Aureus* kiekis beveik nekinta, matomas nežymus augimas.

Bandiniai su ekstraktais rodo didelį antimikrobinį aktyvumą. t3 laike, VE-ž yra 12,5%, o VE-g – 38,2% mažesnis *St. Aureus* kiekis nei K, o S6+VE-ž yra 11,5% bei S6+VE-g – 39,5% mažesnis *St. Aureus* kiekis nei S6. Daroma išvada, kad abu ekstraktai turi antimikrobinį aktyvumą prieš *St. Aureus* mikroorganizmą, tačiau VE-ž ekstrakto aktyvumas yra nežymus, o VE-g – labai stiprus. Todėl tolimesniame tyrime su jautienos faršu buvo naudojamas tik VE-g ekstraktas.

Mezofiliniai aerobiniai mikroorganizmai

Atlikus skaičiavimus P.C.A. agare, gaunamos K, VE-ž; VE-g, S6; S6+VE-ž ir S6+VE-g priklausomybės, pateiktos 27 paveikslėlyje.



27 Pav. Grafikas, parodantis mezofilinių aerobinių mikroorganizmų augimą bandiniuose

Ekstraktų efektas matomas t3 laike ir tolygiai išsilaiko iki paskutinio bandinio ėmimo. VE-g ir VE-ž bandiniuose mezofilinių aerobinių mikroorganizmų kiekis yra atitinkamai- 12% ir 8% nei K, o S6+VE-g ir S6-VE-ž bandiniuose atitinkamai mažiau 13,8% ir 7% lyginant su S6+KD.

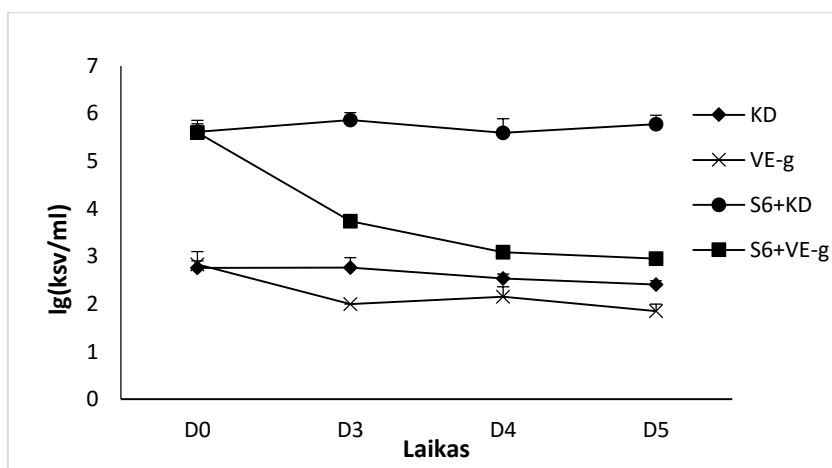
Žymaus mikroorganizmų augimo skirtumo, priklausančio nuo įvestos *St. Aureus* koncentracijos į mėginius nepastebėta. Daroma išvada, kad ekstraktas VE-g pasižymėjo stipresnėmis antimikrobinėmis savybėmis.

3.4.3. Ekstraktų antimikrobinis tyrimas mėsoje

Eksperimentui atlikti naudojamas šviežias jautienos faršas. HN 26:2006 [52] teigia, kad maisto produktuose, pateikiamuose rinkoje patogeninių mikroorganizmų 25g arba ml neturi būti.

St. Aureus

Atlikus skaičiavimus BP agare, gaunamos KD, VE-g, S6+KD ir S6+VE-g priklausomybės, pateiktos 28 paveikslėlyje.



28 Pav. Grafikas, parodantis *St Aureus* augimą bandiniuose

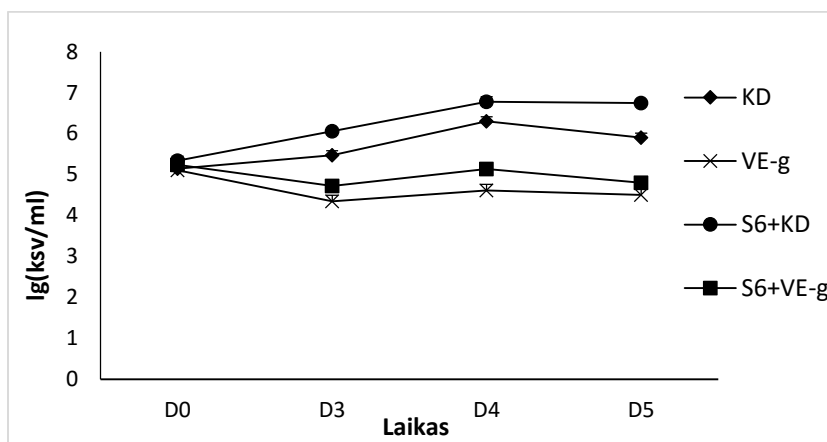
Iš kontrolės (KD) linijos galime teigti, kad mėsoje, esantis *St. Aureus* kiekis nėra didelis ir eksperimento metu, per 5 dienas beveik nesikeičia. Tai reiškia, kad mėsa buvo šviežia ir kadangi laikymo temperatūra buvo 6°C.

D3 laiku VE-g yra 22% mažesnis *St.Aureus* kiekis, nei KD. Lyginant S6+KD ir S6+VE-g linijas, pradinis *St.Aureus* kiekis žinoma yra toks pats, tačiau jau D3 matome apie 36% *St. Aureus* bakterijų kolonijų sumažėjimą bandinyje su ekstraktu, tai įrodo jog VE-g ekstraktas turi stiprių antimikrobinę savybių prieš *St.Aureus*.

D. Djenane ir kt. [34] atliko dviejų augalų *L.angustifolia* ir *M. peperita* eterinių aliejų antimikrobinę tyrimą, prieš *St. Aureus* mikroorganizmą maltoje jautienoje. Eksperimentas buvo vykdomas 9 dienas, bandiniai laikomi 9±1°C temperatūroje. Bendras *St. Aureus* kiekis mėsoje yra 9% didesnis, nei mano tirtame eksperimente, o kontrolėje (maltoje jautienoje) mikroorganizmas pradeda sparčiai augti nuo 5 dienos, o eteriniai aliejai savo antimikrobinę aktyvumą parodo nuo pat pirmos dienos ir jis nebekinta nuo 6 dienos. 9 dieną abiejų augalų ekstraktai lyginant su kontrole, nuslopino *St. Aureus* augimą net iki 32,22%. Tai nulėmė eterinių aliejų sudėtyje, esantys linalolo ir linolo acetato bei mentolio ir metiono junginiai.

Pienarūgštės bakterijos

Atlikus skaičiavimus MRS agare, gaunamos KD, VE-g, S6+KD ir S6+VE-g priklausomybės, pateiktos 29 paveikslėlyje.

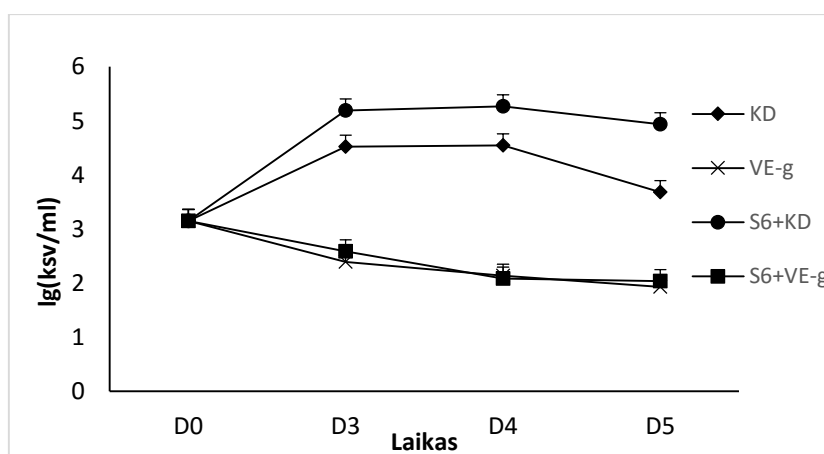


29 Pav. Grafikas, parodantis pienarūgščių bakterijų augimą bandiniuose

D4 matomas didžiausias pienarūgščių bakterijų kiekis bandiniuose. Bandiniuose su VE-g ekstraktu pienarūgščių bakterijų yra 26,8% mažiau, nei tą pačią dieną KD bandiniuose. O S6+VE-g bandinyje, pienarūgščių bakterijų kiekis yra 24,14% mažiau nei S6+KD mėginyje. Tai parodo, kad VE-g ekstraktas turi savybę slopinti pienarūgščių bakterijų augimą mėsoje. Taip pat, pastebėta sinergija tarp *St. Aureus* ir pienarūgščių bakterijų augimo, nes bandiniuose, kuriuose buvo įvesta *St.Aureus* koncentracija, pienarūgščių bakterijų skaičius buvo didesni nei tuose, kuriuose nebuvo, pavyzdžiui S6+KD bandinyje, pienarūgščių bakterijų skaičius yra 10,89% didesnis nei KD bandiniuose.

Pseudomonas

Atlikus skaičiavimus PS agare, gaunamos KD, VE-g, S6+KD ir S6+VE-g priklausomybės, pateiktos 31 paveikslėlyje.



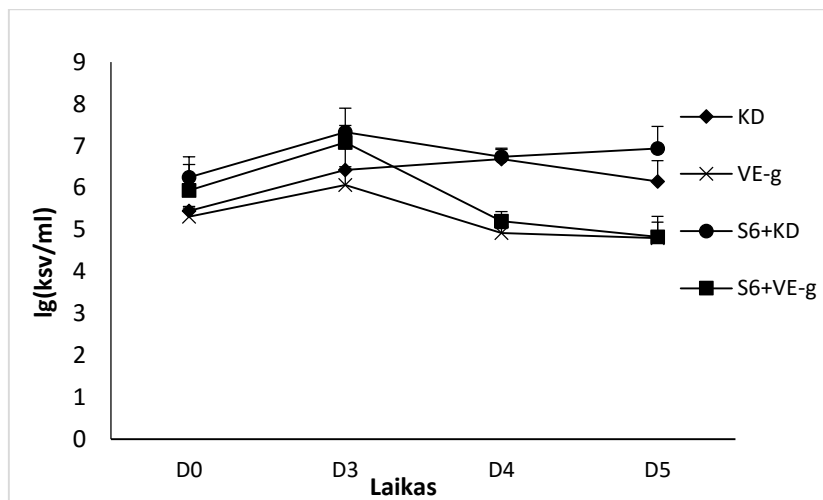
31 Pav. Grafikas, parodantis *Pseudomonas* augimą bandiniuose

Bandinių su ekstraktu efektas matomas jau D3, D4 jis yra didžiausias, o D5 išlieka stabilus ir vienodas kaip prieš tai buvusią dieną. Lyginant KD ir VE-g kreives D4 dieną, *Pseudomonas* yra

net 52,3% mažiau VE-g bandinyje, o S6+VE-g net 60,4% mažesnis nei S6+KD. VE-g ekstraktas slopino *Pseudomonas* bakterijų augimą.

Mezofiliniai aerobiniai mikroorganizmai

Atlikus skaičiavimus P.C.A. agare, gaunamos KD, VE-g, S6+KD ir S6+VE-g priklausomybės, pateiktos 32 paveikslėlyje.



32 Pav. Grafikas, parodantis Mezofiliniai aerobiniai mikroorganizmų augimą bandiniuose

Didžiausias efektas matomas D4. VE-g bandinyje mezofilinių aerobinių mikroorganizmų kiekis yra mažesnis 20,1% nei KD, o S6+VE-g bandinyje mažiau 18,6% lyginant su S6+KD. Žymaus mikroorganizmų augimo skirtumo, priklausančio nuo įvestos *St. Aureus* koncentracijos į mėginius nepastebėta.

Geltonosios grindelijos VE-g ekstrakto stiprus antimikrobinis veikimas, siejamas su jo cheminė sudėtimi. Lucarini, Rodrigo ir kt. [53] tyrė *Asteraceae* šeimos augalą – *Gochnatia pulchra* ir jos antimikrobines savybes prieš patogeninius mikroorganizmus. Geriausius rezultatus ekstraktai parodė prieš *St. Aureus*, o šis aktyvumas buvo susietas su dviem junginiais – skutelarinu ir 3,5-dikafeoilchino rūgštimi. Šie du junginiai aptikti *Grindelia squarrosa* VE-g ekstrakto, todėl daroma išvada, kad skutelarinas ir 3,5-dikafeoilchino rūgštis galimai nulėmė stiprų VE-g ekstrakto antimikrobinį aktyvumą prieš *St. Aureus* patogeninį mikroorganizmą.

IŠVADOS

1. Grikių žiedų ir lapų, išeigos skyrėsi labai nežymiai, tačiau vandenių žiedų ir lapų ekstraktų išeigos, atitinkamai 18,27% ir 19,26% yra šiek tiek didesnės nei etanolinių – 17,66% ir 17,94%. Grindelijos ekstraktų, pagamintų iš antžeminės augalo dalies, didžiausia išeiga pasiekama ekstraktą gaminant pagreitintos ekstrakcijos tirpikliu metodu su metanolio tirpikliu - 26,57% (ME-g₁), o acetoninio ekstrakto išeiga mažiausia – 5,69% (AE-g). O ME-g₁ ekstrakto frakcijos didžiausia išeiga yra vandeninės frakcijos – 35,58% (VF-g).
2. Grikių lapuose ir žieduose buvo identifikuoti 9 fenolinai junginiai: fenolinės rūgštys (chino, chlorogeno, kavos, galo), flavonoidai (katechinas, kvercetas), flavonoidų glikozidai (rutinas, kvercitrinas), kumarino glikozidas (skopolinas) ir triterpenas (skvalenas). Grindelijos augale identifikuoti 8 junginiai: fenolinės rūgštys (chlorogeno, chino, 3,5-dikafeilchino, (5Z, 11 α , 13E)-11-Hidroksi-9,15-dioksoprostano-5,13-dien-1-oik rūgštis), kumarinai (skutelarinas), flavonoidas (5,7-dihidroksi-3,4,5-trimetoksi-flavonas, 3,7,4'-tri-O-metil-kvercetas).
3. Grindelijos metanoliniame ekstrakte, pagamintame pagreitintos ekstrakcijos tirpikliu būdu, vandens frakcijoje identifikuoti du aktyvūs junginiai - chlorogeno ir 3,5-dikafeoilchino rūgštis. Heksano, *tert*-butilmetileterio frakcijoje identifikuota tik 3,5-dikafeoilchino rūgštis, o etilo acetato frakcijoje aktyvių junginių nebuvo identifikuota. Geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo grikių lapų ir grikių žiedų etanoliniai ekstraktai, kurių EC₅₀ dydžiai, atitinkamai 0,0152 mg/ml ir 0,0149 mg/ml, o TEAC – 11,98 (mmol Trolokso/g) ir 12,25 (mmol Trolokso/g).
4. Geriausią antimikrobinį poveikį vandeniniai ir etanoliniai grikių žiedų ir lapų bei grindelijos ekstraktai parodė prieš *Staphylococcus Aureus* patogeninį mikroorganizmą. Stipriausiu poveikiu prieš šį mikroorganizmą pasižymėjo geltonosios grindelijos ir grikių žiedų vandeniniai ekstraktai.
5. Jautienos mėsoje vandeninis geltonosios grindelijos ekstraktas, *Staphylococcus Aureus* mikroorganizmo augimą trečią bandymo dieną nuslopino 36%, tokį stiprų antimikrobinį veikimą, galimai nulėmė ekstrakte, esantys skutelarinas ir 3,5-dikafeoilchino rūgštis.
6. Grikių žiedų ir lapų etanoliniai ekstraktai po papildomų toksiškumo tyrimų gali būti naudojami kaip natūralūs antioksidantai maiste, nes turėjo didesnę antioksidacinę aktyvumą nei sintetiniai antioksidantai, o Grindelijos vandeninis ekstraktas, galėtų būti panaudojamas, kaip antimikrobinis agentas mėsos produktuose prieš *Staphylococcus Aureus* patogeninį mikroorganizmą.

BIBLIOGRAFINĖS NUORODOS

1. ABDEL-RAHMAN, Ali et al. The Safety and Regulation of Natural Products Used as Foods and Food Ingredients. *Toxicological sciences*. 2011, vol. 123, no. 2, p. 333-348.
2. PRATT, E. Dan ir Betram, J.F. HUDSON. *Food antioxidant*. Springer Netherlands .1990.
3. CALVO, M.A. et al. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Formatex Research Center, 2011, vol. 13. ISBN 978-84-939843-2-8
4. TIWARI, Brijesh et al. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, vol. 57, no. 14, p. 5987-6000.
5. SALLAM, K. I. ir K. SAMEJIMA. Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. *Food Science and Technology*. 2004, vol. 37, p. 865–871.
6. POKORNY, Jan, Nelly YANISHLIEVA ir Michael H. GORDON. *Antioxidants in Food: Practical Applications*. Boca Raton, USA, CRS press, 2001. ISBN 0849312221
7. STOOPS, J. et al. Bacterial community dynamics during cold storage of minced meatpackaged under modified atmosphere and supplemented with different preservatives. *Food Microbiology*. 2015, vol. 48, p. 192-199.
8. FRIEDRICH, L et al. Influence of various preservatives on the quality of minced beef under modified atmosphere at chilled storage. *Meat Science*. 2008, vol. 79, p. 332-343.
9. BRINKER, Francis. Topical uses for Grindelia species. *Journal of the American Herbalists Guild*. 2006, vol. 6, no. 2, p. 6-11.
10. EL-SHAMY, A. M, et al. Essential Oil Composition of Three Grindelia Species. *Journal of Essential Oil Research*. 2000, vol. 12, no. 5, p. 631-634.
11. SLAWOMYRA, Nowak ir Izabela RYCHLINSKA. Phenolic acids in the flowers and leaves of Grindelia robusta Nutt. and Grindelia squarrosa Dun. (Asteraceae). *Acta poloniae pharmaceutica*. 2012, vol. 69, no. 4, p. 693-698. ISSN 0001-6837.
12. CHOUBEY, Sneha et al. Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: A patent review. *Pharmaceutical patent analyst*. 2015, vol. 4, no. 4, p. 305-315.
13. KAKKAR, Sahil ir BAIS, Souravh. A review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology*. 2014.
14. SPILIOTI, Eliana et al. Phenolic Acid Composition, Antiatherogenic and Anticancer Potential of Honeys Derived from Various Regions in Greece. *PLoS ONE*. 2014, vol. 9, no. 4.

15. PAPADOPOULOS, George ir Dimitrios BOSKOU. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1991, vol. 68, no. 9.
16. CALIXTO-CAMPOS, Cassia et al. Vanillic Acid Inhibits Inflammatory Pain by Inhibiting Neutrophil Recruitment, Oxidative Stress, Cytokine Production, and NFκB Activation in Mice. *Journal of natural products*. 2015, vol. 78, no. 8, p. 1799-1808.
17. DELISI, Rikardo et al. One-Pot, Clean Synthesis of Vanillic Acid from Ferulic Acid Article ·*Chemistry select*. 2016, vol. 1, no. 3, p. 626-629.
18. SEPULVEDA, I. et al. Effect of different polyphenol sources on the efficiency of ellagic acid release by *Aspergillus Niger*. *Revista Argentina de microbiología*. 2016, vol. 47, no. 1, p.1-7.
19. RANDJELOVIĆ, Pavle et al. The Beneficial Biological Properties of Salicylic Acid. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2015, vol. 32, no. 4., 259-265.
20. HUSSEIN, Mohd Zobir et al. Controlled In Vitro Release of the Anticancer Drug Chlorogenic Acid Using Magnesium/Aluminium-Layered Double Hydroxide as a Nanomatrix. *Journal . Science of Advanced Materials*. 2016, vol. 8, no. 3, p.501-513.
21. SCALBERT, Augustin ir Gary WILLIAMSON. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The journal of nutrition*, 2014.
22. ABDEL-MOTTALEB, Mohamed. DFT Studies of Caffeic Acid Antioxidant: Molecular Orbitals and Composite Reactivity Maps Correlation with Photophysical Characteristics and Photochemical Stability. *Journal of Chemistry*. 2016.
23. LANDETE, Jose. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, function and health. *Food Research International*. 2011, vol. 44, no. 4, p. 1150-1560.
24. MUBARAK, Shaikh et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel coumarin incorporated triazoles as antitubercular, antioxidant and antimicrobial agents. *Medicinal Chemistry Research*. 2016, vol. 25, no. 4.
25. RUSSO, Ethan. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal Of Pharmacology*. 2011, vol. 163, p. 1344-1364.
26. CAMPBELL, C.G.. *Buckwheat. Fagopyrum esculentum Moench*. Bioersity International.1997, vol. 93. ISBN 92-9043-345-0.
27. KALINOVA, Jana, Jan TRISKA ir Nadezda VRCHOTOVA. Distribution of Vitamin E, Squalene, Epicatechin, and Rutin in Common Buckwheat Plants (*Fagopyrum esculentum Moench*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.2006, vol. 54, p. 5330-5335.

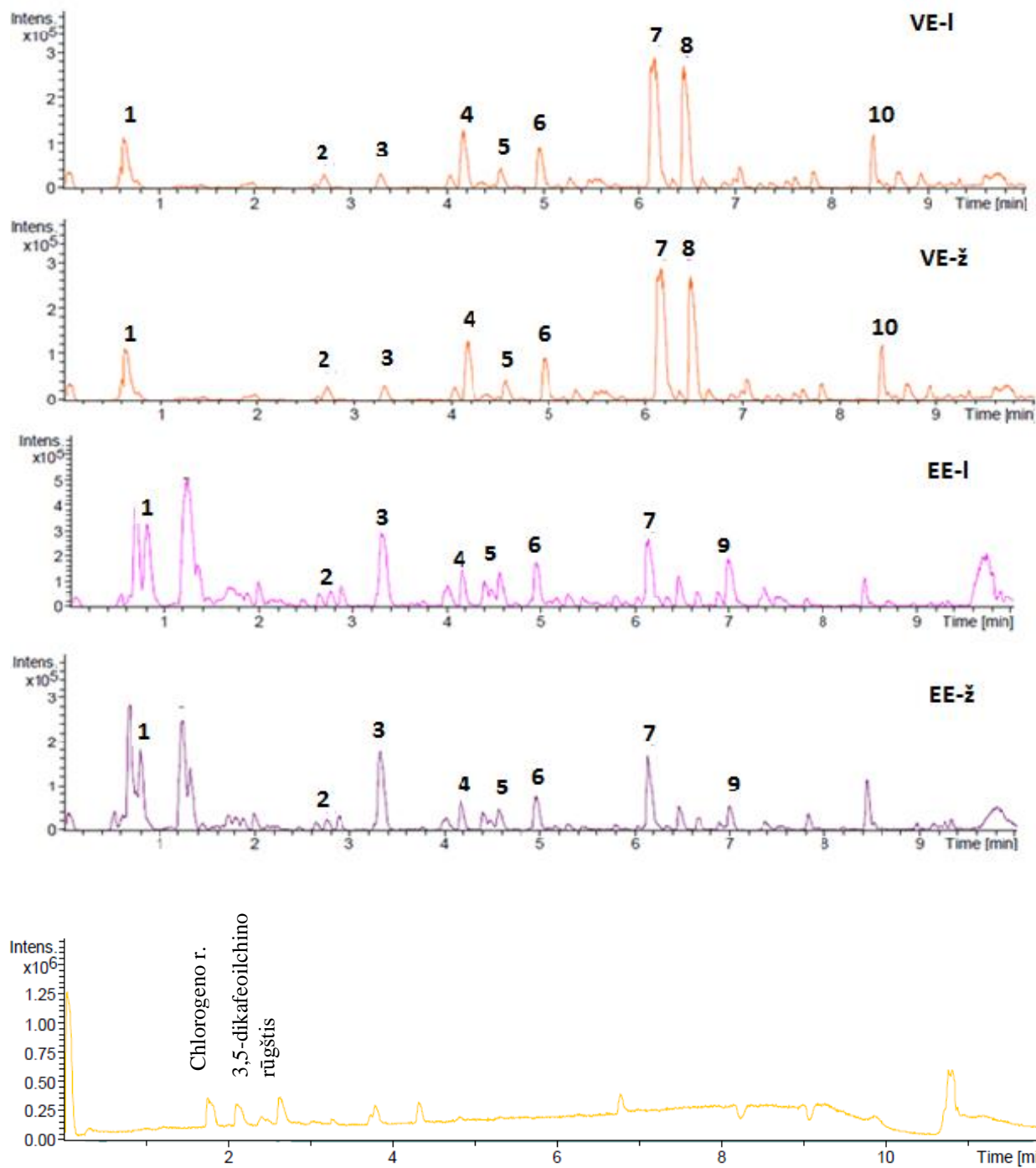
28. XIAOHUA, Li et al. Comparative Analysis of Flavonoids and Polar Metabolite Profiling of Tanno-Original and Tanno-High Rutin Buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, vol. 62, p. 2701–2708.
29. XIAOHUA, Li et al. Differential expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of phenolic compounds in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, vol. 58.
30. MOSAWY, Sapha et al. The flavonols quercetin and 3', 4'- dihydroxyflavonol reduce platelet function and delay thrombus formation in a model of type 1 diabetes. *Diabetes & Vascular Disease Research*. 2014, vol. 11, no. 4.
31. BART, Hans-Jorg ir Stephan, PILTZ. *Industrial Scale Natural Products Extraction*, 1st Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. ISBN 978-3-527-32504-7.
32. HN 132:2013, „Maisto produktų ir maisto ingredientų gamyboje leidžiami naudoti ekstrahentai“. Vilnius: Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministerija, 2013.
33. EUROPOS PARLAMENTO IR TARYBOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 1333/2008 2008 m. gruodžio 16 d. dėl maisto priedų.
34. D. DJENANE, M. Djemel et al. Antioxidant and antibacterial effects of Lavandula and Mentha essential oils in minced beef inoculated with E. coli 157:H7 and S. Aureus during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science*. 2012, vol. 92, p. 667–674. ISSN 0309-1740.
35. ISO 6888-1:1999+Amd 1:2003. Maisto ir pašarų mikrobiologija. Koagulazę gaminančių stafilokokų (*Staphylococcus aureus* ir kitų rūšių) skaičiavimas. Bendrasis metodas. 1 dalis. Metodas, naudojant standžiąją Baird-Parkerio terpę (*Tapatus* ISO 6888-1:1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) -- Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. *Turi Lietuvos Standarto Statusą*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2003.
36. ISO 6888-2:1999+Amd 1:2003. Maisto ir pašarų mikrobiologija. Koagulazę gaminančių stafilokokų (*Staphylococcus aureus* ir kitų rūšių) skaičiavimas. Bendrasis metodas. 2 dalis. Metodas, naudojant triušų kraujo plazmos fibrinogeno agarą terpę (*Tapatus* ISO 6888-2:1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) -- Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium. *Turi Lietuvos Standarto Statusą*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2003.
37. DIKEMAN, Michael ir Carrick, DEVINE. *Encyclopedia of meat sciences*, 2nd Edition, Academic Press, 2014, p. 376-381. ISBN 9780123847348.

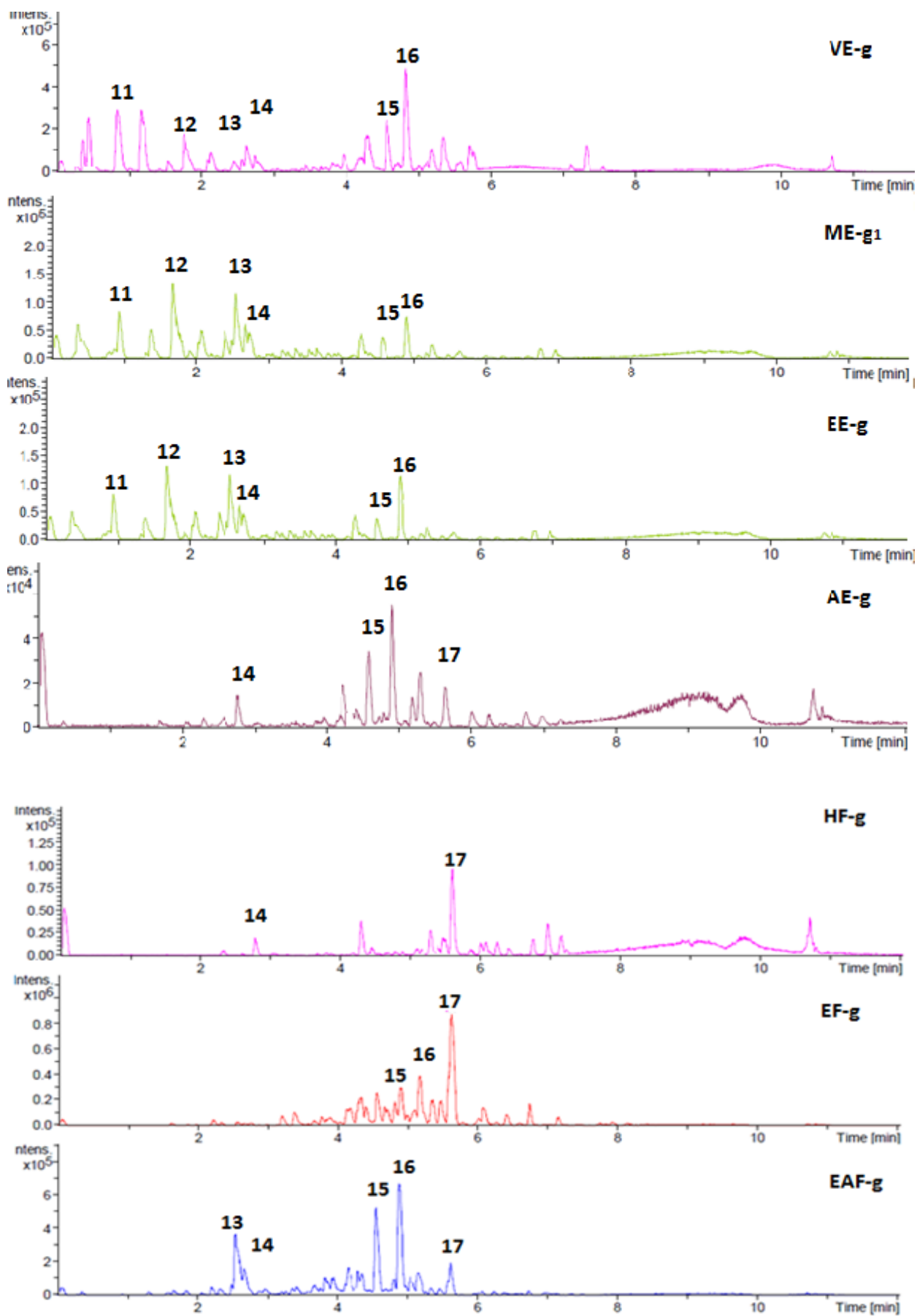
38. D. DETATA, P. COLLINS, A. MCKINLEY. Fast liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-qtof-MS) method for the identification of organic explosives and propellants. *Forensic Science International*. 2013, vol.223, p. 63-74.
39. KOLEVA, Irina, Harm A. G. NIEDERLANDER ir Teris A. VAN BEEK. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. *Analytical Chemistry*. 2000, vol. 72, no. 10, p. 2323-2328.
40. J. WANG, Y. YONG-DE, T. FENG, S. JIA. TLC Screening for Antioxidant Activity of Extracts from Fifteen Bamboo Species and Identification of Antioxidant Flavone Glycosides from Leaves of Bambusa. textilis McClure. *Molecules*. 2012, vol. 17, p. 12297-12311. ISSN 1420-3049.
41. J. D. FAIR, C.M. KORMOS. Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data. *Journal of Chromatography A*. 2008, vol. 1211, p. 49-54.
42. A. VON GADOW, E. JOURBERT, C.F. HANSMANN. Comparison of antioxidant activity of rooibos tea (*Asphalatus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food chemistry*. 1997, vol. 19, p. 73-77. ISSN 0308-8146.
43. W. BRAND-WILLIAMS, M.E. CUVELIER, C. BERSET. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 1995, 25–30. ISSN 0975-1491.
44. R. RE, N. PELLEGRINI, A. PROTEGGENTE, A. PANNALA, M. YANG, C. RICE-EVANS. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 1999, vol.26, p. 1231-1237.
45. Z. REBLOVÁ. The effect of temperature on the antioxidant activity of tocopherols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2006, vol. 108, p. 858–863.
46. A.O.T. ASHAFI, A. J. AFOLAYAN. Chemical composition and antimicrobial activity of the oil from *Chrysocoms ciliata L* leaves. *Journal of medicinal plant research* 3. 2009, p. 390-394. ISSN 1996-0808.
47. KALINOVA, Jana and Nadezda VRCHOTOVA. Level of Catechin, Myricetin, Quercetin and Isoquercitrin in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*), Changes of Their Levels during Vegetation and Their Effect on The Growth of Selected Weeds. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, vol. 57, no. 7, p. 2719-2725.
48. MARTIN, Diane M.; Jonathan GERSHENZON and Jörg, BOHLMANN. Induction of Volatile Terpene Biosynthesis and Diurnal Emission by Methyl Jasmonate in Foliage of Norway Spruce. *Plant Physiology*. 2003, vol. 132, no. 3, p. 1586-1599.
49. PICHERSKY, E. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. *Science* . 2006, vol. 311, p. 808–811.

50. TIMMERMANN, N. Barbara, Joseph J. HOFFMANN, Shivanad D. JOLAD and KarlH SCHRAM. Grindelane diterpenoids from grindelia squarrosa and g. Camporum. *Phytochemistry*. 1984, vol. 24, no. 5, p. 1031-1034.
51. OLSZEWSKA, A. Monika, Anna PRESLER ir Piotr MICHEL. Profiling of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Dry Extracts from the Selected Sorbus Species. *Molecules*. 2012, vol.17, p. 3093-3113. ISSN 1420-3049
52. HN 26:2006, „Maisto produktų mikrobiologiniai kriterijai“. Vilnius: Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministerija, 2006.
53. LUCARINI R. et al. Antibacterial and anti-inflammatory activities of an extract, fractions, and compounds isolated from *Gochnatia pulchra* aerial parts. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*. 2015, vol 48, no.9 p. 822-830.

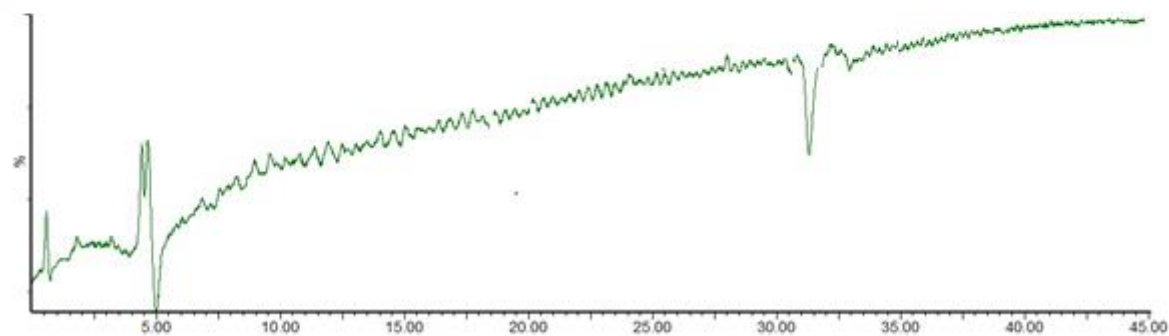
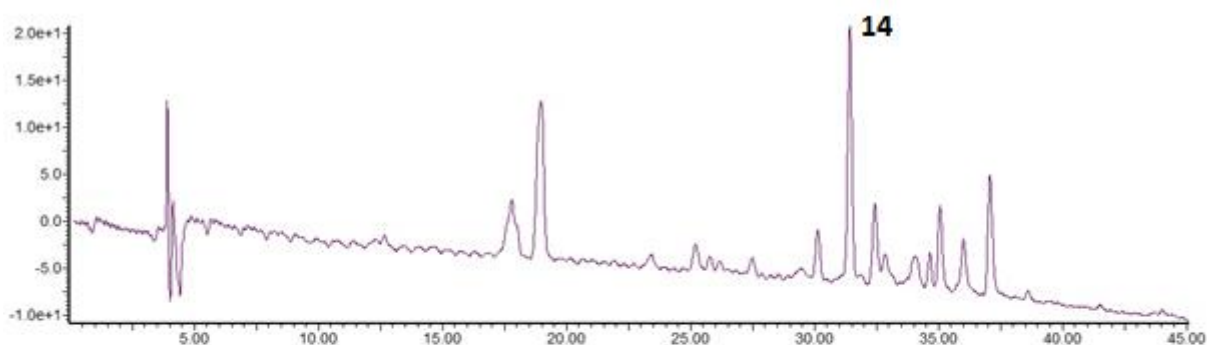
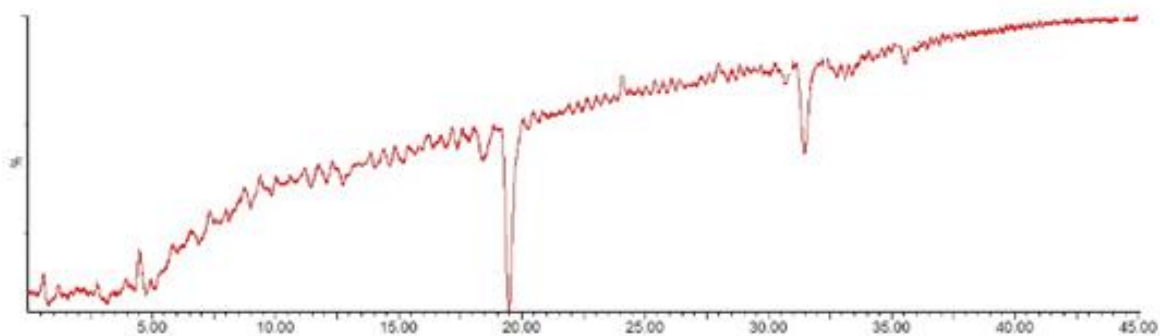
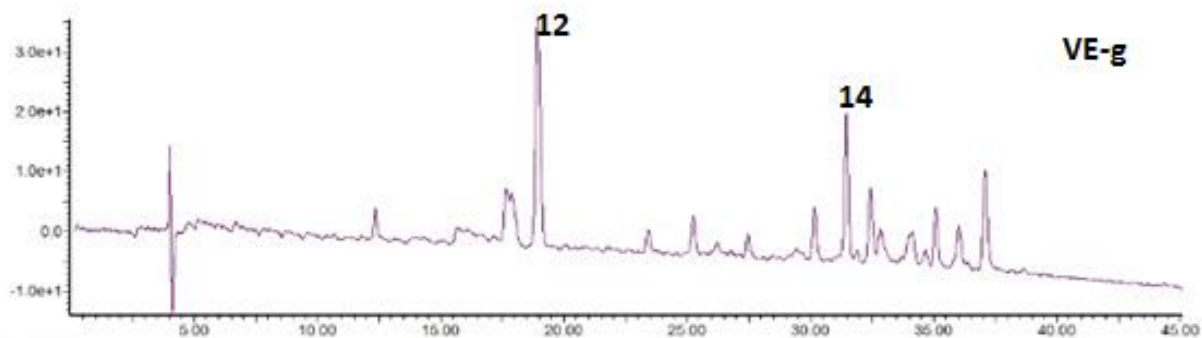
PRIEDAI

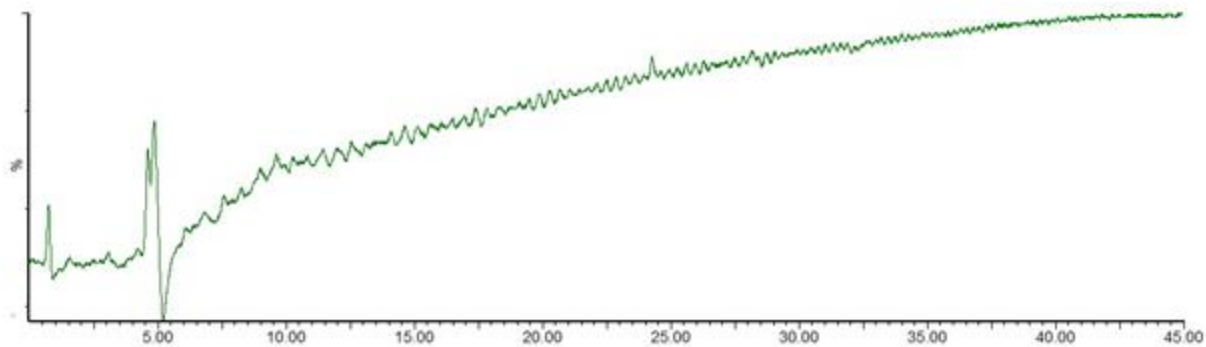
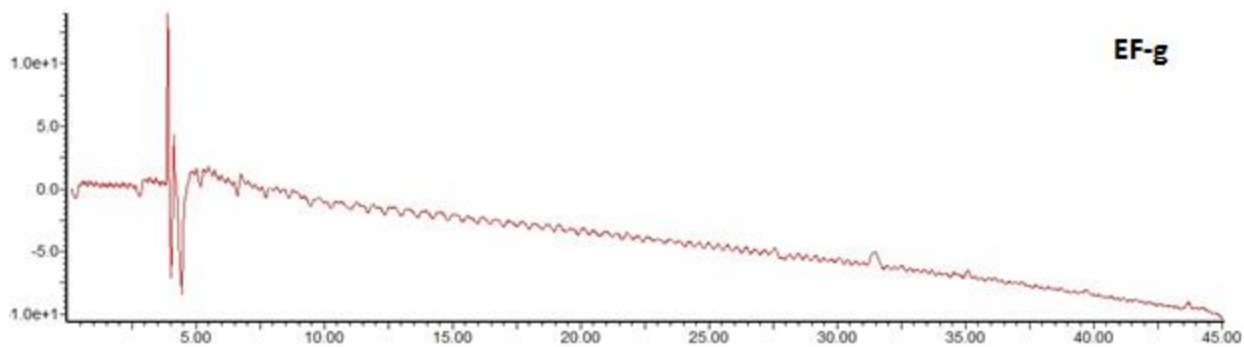
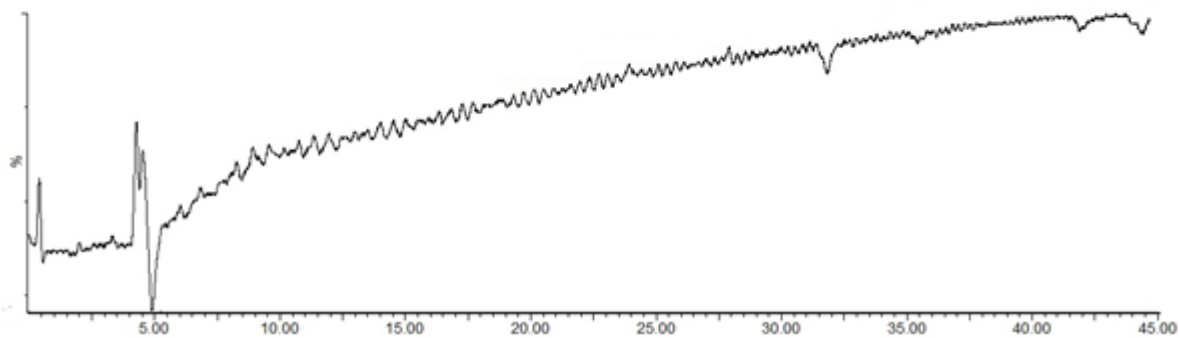
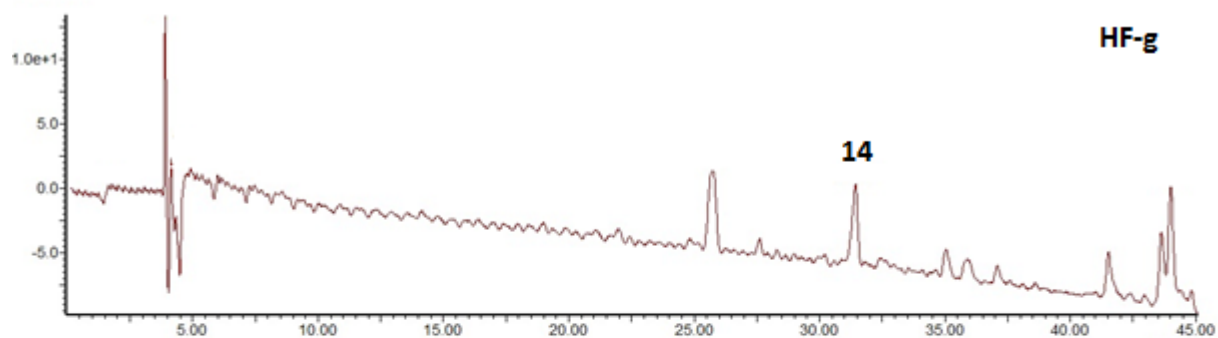
Ekstraktų ir frakcijų bei standartų chromatogramos



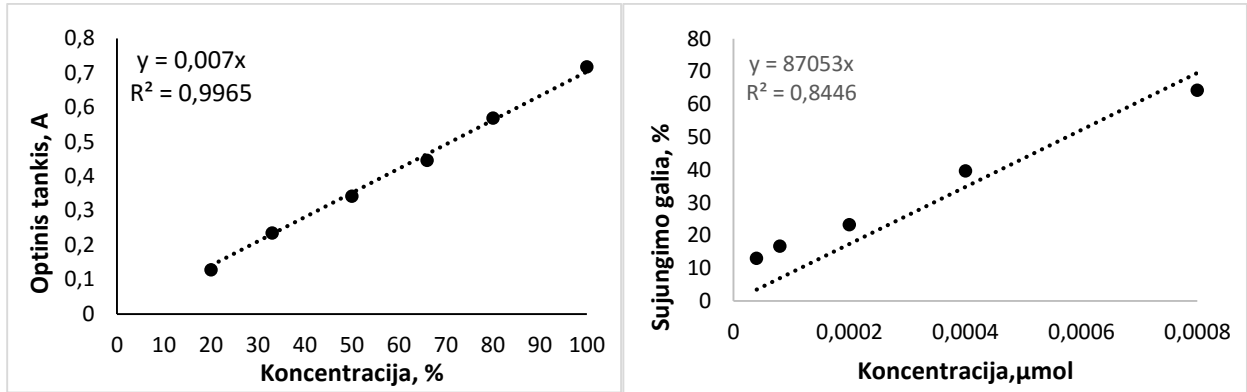


ECSH UV ir DPPH· realaus laiko ekstraktų ir frakcijų chromatogramos

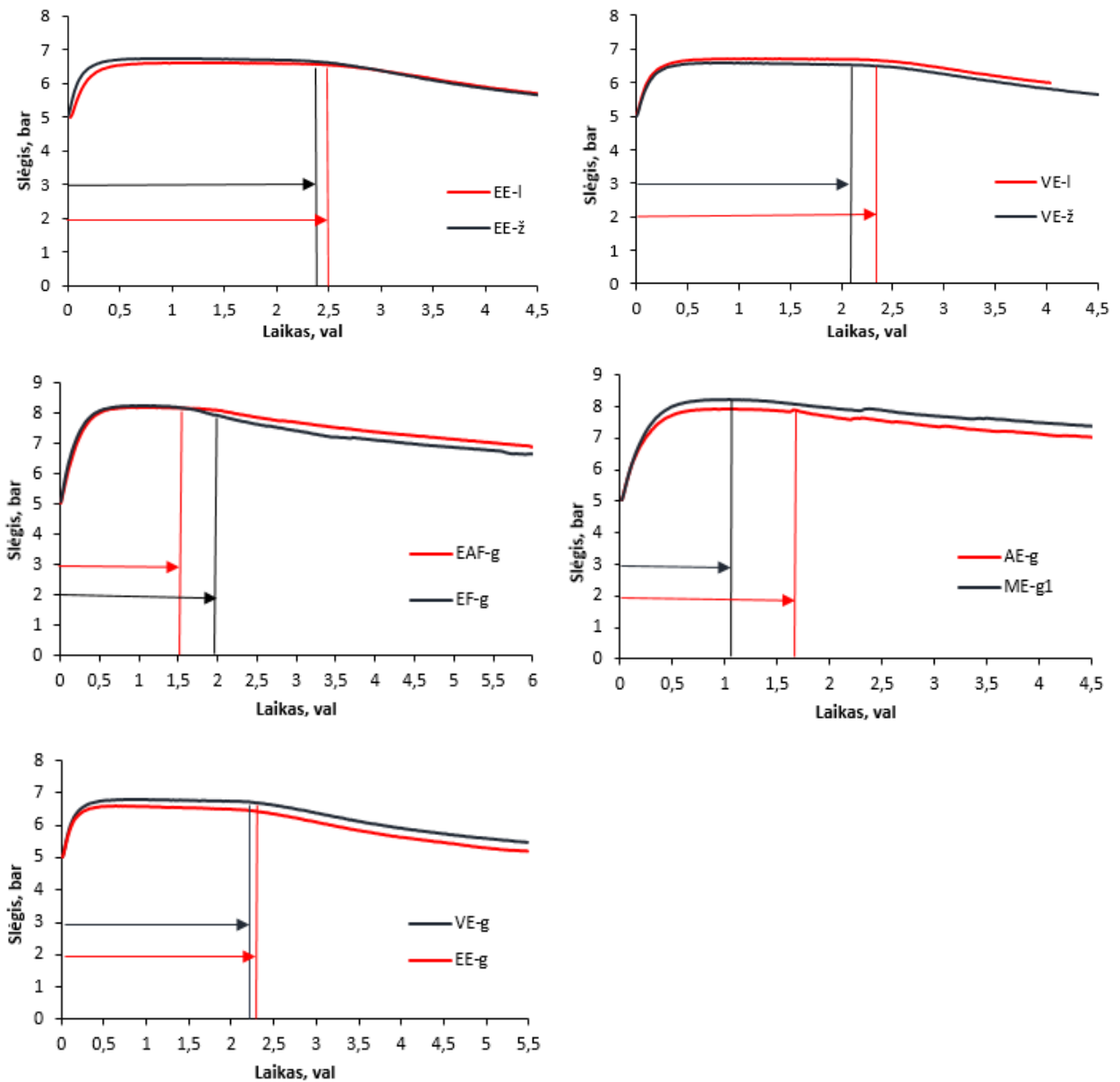




DPPH radikalo kalibracinė kreivė ir ABTS kalibracinė kreivės



Oksipresu užrašytos ekstraktų ir frakcijų oksidacijos kinetikos ir indukcinio periodo nustatymo kreivės.



		Slopinimo zona, mm																
Mikroorganizmas		<i>E. Coli</i> Cect 99 (1)	<i>E. Coli</i> Cect501 (2)	<i>St.Aureus</i> Cect 25923 (3)	<i>St.Aureus</i> Promise30 (4)	<i>B.Cereus</i> Cect147 (5)	<i>L.Mesenteroides</i> 119CN19 (6)	<i>L.Mesenteroides</i> Cect396 (7)	<i>W. Viridescens</i> Cect283 (8)	<i>W. Viridescens</i> Cect144 (9)	<i>P.Putida</i> Cect 324 (10)	<i>Listeria imocia</i> Cect 910 (11)	<i>B.Thermosphacta</i> Cect847 (12)	<i>Salmonella</i> 9B9 (13)	<i>Y.Enterocolica</i> Cect 354 (14)	<i>S.Sonnei</i> Cect 853 (15)	<i>C.Jenuni</i> Cect496 (16)	<i>C.Perfringers</i> Cect376 (17)
EE-1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
			4,5	3	2,8								0,5				8	
	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
			5	2,5	4								0,8				5	
	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
			5,8	2,5	3,2								1				6	
EE-ž	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
			5	4	3,3								1,2				7,5	
	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
			4	5	3,2								1,5				8,5	
	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
			5	4,4	4,2								1,2				6,5	
EE-g	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
			4	4,8	1,5		1,5						2				22	2
	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
			3,2	5	2,5		1,2						2,4				24	2,3
	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
			2,6	5,5	3,2		1						2,6				20	2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
VE-I	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
			2,5	2	4							0,8				6,5	
	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
		2	2,5	3,5								0,8				5	
		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
		2,5	2,2	3,2								1				4,5	
VE-ž	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
			4	2,4	4,4							1,2				3	
	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
		3,5	2,6	4,3								1				2	
		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
		4	2,5	4,2								1				3,5	
VE-g	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
			5,5	4	3		0,5					2				22	1,5
	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
		5	4,5	3,8		0,8						1,4				24	2
		+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
		6	4,7	4,5		0,5						1,6				28	1,5