

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

DARIUS POVILAITIS

**ŠALUTINIŲ AUGALINĖS ŽALIAVOS PERDIRBIMO  
PRODUKTŲ BIORAFINAVIMAS Į VERTINGUS  
FUNKCIONALIUOSIUS KOMPONENTUS TAIKANT ĮVAIRIUS  
EKSTRAKCIJOS METODUS**

Daktaro disertacijos santrauka  
Technologijos mokslai, chemijos inžinerija (05T)

2016, Kaunas

Disertacija parengta 2012–2016 metais Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakultete, Maisto mokslo ir technologijos katedroje. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

**Mokslinis vadovas:**

Prof. dr. Petras Rimantas VENSKUTONIS (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – 05T).

**Chemijos inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:**

Prof. habil. dr. Juozas Vidas GRAŽULEVIČIUS (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T) – **pirmininkas**;

Prof. habil. dr. Gražina JUODEIKIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T);

Dr. Paulius KRAUJALIS (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T);

Prof. habil. dr. Audrius Sigitas MARUŠKA (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, chemija, 03P);

Dr. Dalija SEGLINA (Latvijos vaisių auginimo institutas, fiziniai mokslai, chemija, 03P).

**Lietuvių kalbos redaktorė:** Rozita Znamenskaitė (Leidykla „Technologija“).

**Anglų kalbos redaktorė:** Dovilė Dumbraskaitė (Leidykla „Technologija“).

Disertacija bus ginama viešame chemijos inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2016 m. gruodžio 21 d., 11 val. 30 min. Kauno technologijos universiteto centrinių rūmų Disertacijų gynimo salėje.

Adresas: K. Donelaičio g. 73-403, 44249 Kaunas, Lietuva.

Tel. (370) 37 300 042; faks. (370) 37 324 144; el. paštas [doktorantura@ktu.lt](mailto:doktorantura@ktu.lt).

Disertacijos santrauka išsiųsta 2016 m. lapkričio 21 d.

Su disertacija galima susipažinti internetinėje svetainėje <http://ktu.edu> ir Kauno technologijos universiteto bibliotekoje (K. Donelaičio g. 20, 44239 Kaunas).

## Simboliai ir santrumpos

<b>ABTS<sup>•+</sup></b>	2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties katijono laisvasis radikalas
<b>AC</b>	Acetonas
<b>ANOVA</b>	Dispersijos analizė
<b>AOA</b>	Antioksidacinis aktyvumas
<b>APM</b>	Atsako paviršiaus metodologija
<b>BFJK</b>	Bendras fenolinių junginių kiekis
<b>BT</b>	Buferinis tirpalas
<b>CKP</b>	Centriškai kompozicinis planas
<b>CKRP</b>	Centriškai kompozicinis rototabilus planas
<b>DPPH<sup>•</sup></b>	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas
<b>EtOH</b>	Etanolis
<b>FE</b>	Fermentinė ekstrakcija
<b>FRAP</b>	Geležies redukavimo antioksidacinis aktyvumas
<b>GRE</b>	Galo rūgšties ekvivalentai
<b>HE</b>	Heksanas
<b>KS</b>	Kviečių selenos
<b>MeOH</b>	Metanolis
<b>ORAC</b>	Deguonies radikalo surišimo geba
<b>EOTPS</b>	Ekstrakcija organiniais tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje
<b>QUENCHER</b>	Antioksidacinio aktyvumo nustatymo sausoje medžiagoje metodika
<b>RR</b>	Riebalų rūgštis
<b>RS</b>	Rugių selenos
<b>RSG</b>	Radikalų surišimo geba
<b>SEM</b>	Sausas ekstraktas
<b>SKE</b>	Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu
<b>SM</b>	Sausa medžiaga
<b>SN</b>	Standartinis nuokrypis
<b>SSN</b>	Santykinis standartinis nuokrypis
<b>TE</b>	Trolokso ekvivalentas
<b>TEAA</b>	Trolokso ekvivalentų antioksidacinis aktyvumas
<b>TrE</b>	Tradicinė ekstrakcija

## 1. ĮVADAS

Šiuo metu stebima didėjanti įvairių sveikų ir sveikatai naudingų maisto produktų paklausa. Vis daugiau žmonių domisi sveika gyvensena ir mityba. Atliekama daugybė tyrimų ieškant naujų vertingų produktų ar šių junginių šaltinių. Ypatingas dėmesys skiriamas natūralioms antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčioms medžiagoms, kurias galime išgauti iš pačių įvairiausių augalinių šaltinių. Šie junginiai teigiamai veikia mūsų sveikatą, gali apsaugoti nuo įvairių susirgimų, kenksmingų junginių poveikio. Vis didesnę susirūpinimą kelia įvairios maisto gamybos ar apdorojimo metu susidarančios atliekos. Labai svarbu kaip įmanoma labiau sumažinti kiekį šių pramoninių maisto atliekų, kurios dažnai yra tiesiog išmetamos, kompostuojamos ar naudojamos pašarų gamybai. Taikant šiuolaikines augalinės žaliavos perdirbimo technologijas galima ne tik sumažinti šių atliekų kiekį, bet ir išgauti vertingus funkcinius junginius, kurie galėtų būti panaudojami įvairių maisto priedų ar funkcinio maisto gamyboje.

Vienos svarbiausių žmonių mityboje yra grūdinės kultūros. Kiekvienais metais užauginama apie 700 mln. tonų kviečių ir 15 mln. tonų rugių. Kvietiniai produktai paplitę visame pasaulyje, gaminiai iš rugių grūdų dominuoja Šiaurės Europos šalyse. Perdirbant šiuos grūdus gaunamas didelis kiekis šalutinių produktų – sėlenų. Kasmet susidaro apie 175 mln. tonų kviečių ir 3,75 mln. tonų rugių sėlenų. Šis šalutinis produktas dažnai yra išnaudojamas neefektyviai, nors jame gausu įvairių naudingų medžiagų. Tai lyg grūdų maistinių medžiagų sandėlis, kuriame itin daug maistinių skaidulų, vertingų riebalų rūgščių, antioksidantų, mineralų, vitaminų ir baltymų. Gaminant įvairių vaisių sultis lieka didelis kiekis išspaudų, kurios tiesiog kompostuojamos ar naudojamos pašarų gamybai. Tačiau tokiose išspaudose vis dar lieka didelis kiekis vertingų junginių, kurie galėtų būti panaudojami didinti mūsų maisto produktų vertei arba gaminti įvairiems funkciniams maisto priedams. Be to, augaluose esantys vertingi komponentai veikia tik tada, kai suvartojamas pakankamas jų kiekis. Tačiau vartojant šviežius vaisius ar kitus komercinius produktus labai sunku pasiekti reikiamą koncentraciją.

Sukoncentruoti vertingiems junginiams galima taikyti skirtingas ekstrakcijos technologijas. Populiarėja ekstrakcijos sistemos, veikiančios padidinto slėgio aplinkoje. Jos yra daug pranašesnės už sistemas, veikiančias atmosferinio slėgio aplinkoje. Šios sistemos lengvai valdomos, greitos, dažniausiai reikia tik nedidelio kiekio tirpiklio. Norint pasiekti geriausius rezultatus ir efektyviai išnaudoti įrenginius reikia pasitelkti įvairius matematinio modeliavimo metodus.

Šiame darbe tirtos rugių bei kviečių sėlenų ir juodųjų serbentų išspaudų panaudojimo bioaktyviųjų junginių gamybai perspektyvos. Šių žaliavų ekstrakcijai buvo pritaikyti didelio efektyvumo ekstrakcijos metodai: superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu, ekstrakcija organiniais tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje. Optimizuoti vykdomiems procesams buvo taikomas

centriškai kompozicinis planas ir pagal gautus duomenis sudaryti tiriamojo atsako paviršiai. Gautos įvairios bioaktyviųjų junginių frakcijos ir įvertintos jų savybės.

### **Darbo tikslas**

Sukurti efektyvias biorafinavimo schemas, skirtas grūdų sėlenoms ir uogų išspaudoms perdirbti į vertingus funkcinis junginius taikant efektyvius didelio slėgio ekstrakcijos/frakcionavimo ir fermentinio apdoravimo metodus.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Įvertinti, kaip rugių ir kviečių sėlenų ekstraktų išeiga priklauso nuo dalelių dydžio bei panaudoto tirpiklio.
2. Įvertinti, kaip rugių ir kviečių sėlenų ekstraktų antioksidacinės savybės priklauso nuo dalelių dydžio bei panaudoto tirpiklio.
3. Nustatyti optimalias rugių sėlenų superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginio parametrų vertes, kad būtų gauta didžiausią ekstrakto išeiga. Įvertinti gauto ekstrakto savybes.
4. Įvertinti rugių sėlenų frakcionavimo galimybes taikant pakopinės ekstrakcijos organiniais tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje metodiką ir šių ekstraktų savybes.
5. Sudaryti juodųjų serbentų išspaudų biorafinavimo schemą taikant didelio slėgio ir fermentinės ekstrakcijos metodus.
6. Įvertinti gautų juodųjų serbentų išspaudų ekstraktų savybes ir šių ekstraktų panaudojimo galimybes.

### **Mokslinis darbo naujumas**

1. Pirmą kartą ekstrakcija organiniais tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje buvo pritaikyta bioaktyviųjų junginių išskyrimui iš rugių bei kviečių sėlenų ir visapusiškam jų antioksidacinių savybių įvertinimui. Be to, buvo reikšmingai praplėstos mokslinės žinios apie rugių sėlenų ekstrakciją, frakcionavimą ir savybes, kadangi ši žaliava yra daug mažiau ištirta lyginant su kviečių sėlenomis.
2. Pirmą kartą atliktas rugių sėlenų lipofilinės frakcijos superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginio optimizavimas ir tolimesnis žaliavos apdorojimas skirtingais organiniais tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje.
3. Pirmą kartą atliktas juodųjų serbentų išspaudų lipofiliškos frakcijos ekstrakcijos optimizavimas superkritinės ekstrakcijos sistemoje. Naujai pritaikyta biorafinavimo koncepcija tolimesnėse žaliavos apdirbimo stadijose taikant ekstrakciją organiniais tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje ir fermentinę ekstrakciją.

## **Praktinė darbo vertė**

Taikant šiuolaikinius ekstrakcijos bei biotransformavimo metodus galima perdirbti šalutinius augalinės žaliavos perdirbimo produktus į itin vertingus komponentus. Kadangi kiekviena medžiaga turi tik jai savitą biologinę ir cheminę struktūrą, įvairūs biorafinavimo etapai turi būti pritaikomi individualiai kiekvienai atskirai medžiagai. Geriausias bioaktyviųjų junginių išskyrimo efektyvumas pasiekiamas taikant didelio slėgio ekstrakcijos sistemas kartu su matematinio modeliavimo metodais. Darbe pirmą kartą parodyta galimybė pagaminti rugių ir kvečių sėlenų ekstraktus taikant pakopinę ekstrakciją skirtingais tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje. Kruopščiai ištirtos šių ekstraktų antioksidacinės savybės, nustatytos sąlygos, kurioms esant galime išgauti didžiausią šių naudingų medžiagų kiekį. Pirmą kartą atliktas išsamus rugių sėlenų bei juodųjų serbentų išspaudų superkritinės ekstrakcijos optimizavimo eksperimentas. Nustatytos sąlygos, kurioms esant galime išgauti didžiausią lipofilinės frakcijos kiekį. Šiame tyrime pirmą kartą buvo pritaikytas tolimesnis žaliavos apdorojimas padidinto slėgio aplinkoje kartu su skirtingais organiniais tirpikliais bei papildoma fermentinė ekstrakcija. Buvo optimizuoti svarbiausi procesų parametrai, nuo kurių priklauso ekstrakcijos efektyvumas ir naudingųjų medžiagų išeiga. Taikydami pakopinę ekstrakciją, skirtingus metodus bei naudodami skirtingus tirpiklius galime išgauti didžiąją dalį augalo bioaktyviųjų junginių. Po medžiagos apdorojimo taikant biorafinavimo principą, joje lieka tik minimalus kiekis vertingų junginių, ir ši žaliava gali būti naudojama biokuro gamybai. Darbe parodyta galimybė padidinti šių perdirbimo procesų mastelį iki pramoninio naudojant didesnius žaliavos kiekius.

## **Disertacijos struktūra**

Disertacija parašyta anglų kalba. Ją sudaro simbolių ir santrumpų sąrašas, paveikslų ir lentelių sąrašas, įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų objektai ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados bei naudotos literatūros sąrašas (164 šaltiniai). Disertacijos apimtis – 104 p. aiškinamosios dalies, 16 lentelių ir 33 paveikslai.

## **Darbo rezultatų publikavimas**

Disertacijos tema paskelbti 2 straipsniai *Thomson Reuters* WOS pagrindinio sąrašo leidiniuose. Darbo rezultatai pristatyti 6 tarptautinėse konferencijose.

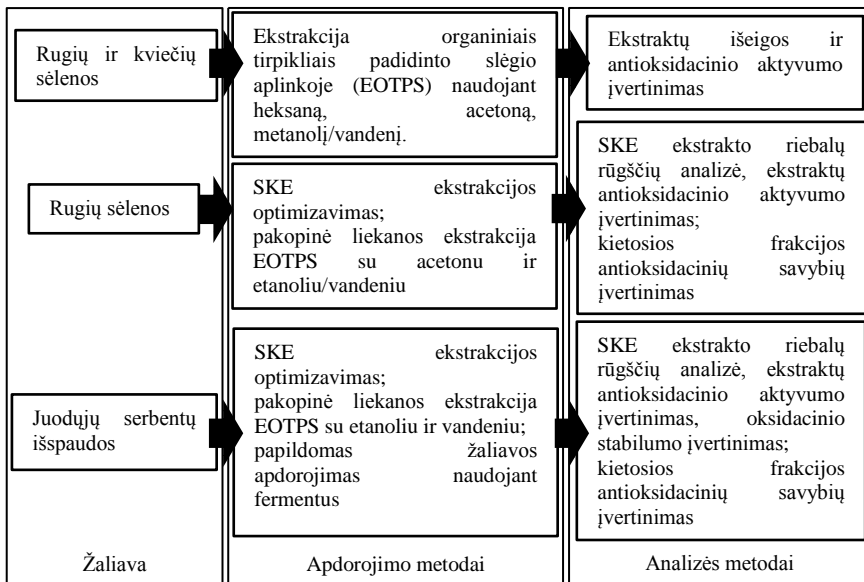
## **Ginamieji disertacijos teiginiai**

1. Didelio slėgio ekstrakcijos technologijos – ekstrakcija organiniais tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje ir superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu – gali būti taikomos vertingų medžiagų išgavimui iš rugių ir kvečių sėlenų.

Taikant centriškai kompozicinį planą gaunamas adekvatus atsako paviršius, kuris gali būti naudojamas rugių sėlenų ekstrakcijos proceso parametrams optimizuoti.

2. Taikant biorafinavimo principą ir tinkamai parinkus ekstrakciją, vykstančių didelio slėgio aplinkoje ar naudojant fermentus, metodus bei šių procesų parametrus galima efektyviai perdirbti juodųjų serbentų išspaudas išgaunant vertingas bioaktyviasias medžiagas.

### Darbo schema



1 pav. Bendroji tiriamojo darbo schema

## 2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

### 2.1. Tyrimų objektai

Tyrimams naudojome rugių (*Secale cereale*) ir kviečių (*Triticum aestivum*) sėlenas, kurias padovanojo AB „Kauno grūdai“. Šios sėlenos buvo laikomos sandariuose maišuose, gerai vėdinamame, tamsiame kambaryje (20 °C temperatūroje). Sėlenos buvo sumaltos rotoriniu smulkintuvu (8000 rpm) per 2 mm dydžio sietelį ir suskirstytos į skirtingas frakcijas naudojant skirtingo akučių skersmens sietelius: >1 mm, 1–0,5 mm, 0,5–0,23 mm, <0,23 mm. Šios skirtingo dydžio dalelės buvo naudojamos pakopinėje ekstrakcijoje padidinto slėgio aplinkoje kartu su organiniais tirpikliais.

Rugių sėlenos, naudotos optimizavimo eksperimentui su superkritiniu anglies dvideginiu, buvo sumaltos rotoriniu smulkintuvu (8000 rpm) naudojant

skirtingo skersmens sietelius. Taip gautos trys skirtingų dalelių dydžių frakcijos: <0,2 mm, <0,5 mm, ir <1,0 mm.

Tyrimams naudotas šviežias juodųjų serbentų (*Ribes nigrum*) išspaudas padovanojo vietinė įmonė „Obuolių namai“. Išspaudos buvo liofilizuotos ir sumaltos rotoriniu smulkintuvu (8000 rpm) naudojant 0,2 mm akučių dydžio sietelį. Paruošti išspaudų milteliai buvo laikomi sandariai uždaryti stikliniuose induose, tamsiame, vėsiame ir sausame kambaryje.

## 2.2. Tyrimų metodai

Buvo pritaikyti tradiciniai žaliavos ekstrakcijos metodai (soksleto ar purtyklėje su tirpikliu) pagal standartinius AOAC metodus. Šie metodai buvo skirti palyginti šių ekstrakcijos procesų efektyvumui su eksperimentais, atliktais padidinto slėgio aplinkoje.

Rugių ir kviečių sėlenos ekstrahuotos pakopinės ekstrakcijos būdu padidinto slėgio aplinkoje (EOTPS), naudojant didėjančio poliškumo tirpiklius. Pirmiausia buvo naudojamas heksanas, tada acetonas, o galiausiai metanolio ir vandens mišinys (MeOH/H<sub>2</sub>O; 80:20 t/t). Buvo įvertinta kiekvieno panaudoto tirpiklio įtaka ekstrakto išgavimui ir nustatyta, kokią įtaką turėjo tiriamosios medžiagos dalelių dydis. Kiekvieno ekstrakto savybės įvertintos taikant įvairius antioksidacinių aktyvumo (AOA) tyrimų metodus. Norint atlikti išsamų medžiagos antioksidacinių savybių įvertinimą, būtina remtis keliais metodais. Antioksidantų veikimas gali pasireikšti keliais mechanizmais: vandenilio atomo atidavimas (radikalų surišimo mechanizmas) arba elektrono perkėlimas (radikalo redukcija). Kelių AOA metodų taikymas padeda geriau įvertinti šiuos mechanizmus, ir taip galime tiksliau nustatyti, kokiomis specifinėmis savybėmis pasižymi tiriamasis mėginys. Darbe buvo taikomi trys metodai: deguonies radikalų surišimo gebos nustatymas (ORAC arba L-ORAC (lipofiliniams junginiams)), bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas (BFJK) ir vienas radikalų surišimo gebos nustatymo metodas (ABTS<sup>•+</sup> arba DPPH<sup>•</sup>).

Atlikus pirminį skirtingų grūdų sėlenų įvertinimą, buvo nuspręsta tolesnius tyrimus vykdyti su rugių sėlenomis. Šių grūdų produktai plačiausiai paplitę Rytų Europos, Skandinavijos šalyse, ir čia jų suvartojama didžiausias kiekis, todėl lieka dideli kiekiai rugių sėlenų. Eksperimento pradžioje buvo įvertinta, kokią įtaką ekstrakcijos išėigai turi dinaminės ekstrakcijos trukmė. Kadangi didžiausia išėiga pirmojo eksperimento metu buvo gauta iš smulkausių dalelių, tai smulkausios frakcijos (<0,2 mm) rugių sėlenos buvo panaudotos ekstrakcijai su superkritiniu anglies dvideginiu (SKE). Visi SKE optimizavimo eksperimentai atlikti naudojant 50 mL ekstrakcijos celę. Šis eksperimentas buvo optimizuotas norint išgauti didžiausią lipofiliškos frakcijos kiekį. Procesas optimizuotas taikant centriškai kompozicinį planą (CKP) kartu su atsako paviršiaus metodologija (APM). Optimizuoti trys didžiausią įtaką ekstrakcijos išėigai turintys kintamieji: ekstrakcijos slėgis, temperatūra ir dinaminės



ekstrakcijos trukmė. Visi kintamieji buvo optimizuoti penkiais lygiais, sudarytas planas buvo rotabilus – CKRP (įvesti žvaigždiniai taškai, esantys už plano erdvės). Buvo įvertinta kiekvieno nepriklausomojo kintamojo ir jų sąveikos įtaka tiriamajam atsakui. Nustatytos optimalios sąlygos, kurioms esant galime gauti didžiausią lipofiliškos frakcijos kiekį. Optimalios sąlygos buvo patikrintos bandomojoje įrangoje (10 L ekstrakcijos celė) su didesniu medžiagos kiekiu. Kad procesas būtų efektyvesnis, statinė ekstrakcija (vykdoma prieš dinaminę ekstrakciją) buvo prailginta nuo 10 iki 30 min. Ekstraktas, išgautas optimaliomis sąlygomis, buvo ištirtas nustatant jo antioksidacines savybes spektrofotometriniais metodais (L-ORAC, DPPH<sup>•</sup>, BFJK), taip pat nustatyta riebalų rūgščių sudėtis taikant dujų chromatografiją su liepsnos jonizacijos detektoriumi.

Atlikus SKE optimaliomis sąlygomis išekstrahuojama beveik visa lipofiliška rugių sėlenų dalis. Liekanoje, kuri gauta po ekstrakcijos, lieka įvairių naudingųjų medžiagų, kurias galime išgauti panaudodami kitus tirpiklius. Ši liekana toliau ekstrahuojama acetonu EOTPS sistemoje. Kadangi šioje sistemoje slėgis išlieka pastovus (10,3 MPa), svarbiausi parametrai šioje ekstrakcijoje yra ekstrakcijos temperatūra ir trukmė, kol tirpiklis liečiasi su ekstrahuojama medžiaga. Šie du parametrai buvo optimizuoti taikant CKP ir APM. Nustatytos optimalios sąlygos, kurioms esant galime pasiekti didžiausią išeigą. Šios sąlygos buvo taikomos tolimesnėje EOTPS ekstrakcijoje su kitu tirpikliu – etanolio ir vandens mišiniu (70:30, t/t). Visos EOTPS ekstrakcijos vykdytos trim pakopomis – tris kartus buvo tiekiamas šviežias tirpiklis. Optimizuojant EOTPS su acetonu, buvo papildomai įvertintas nepriklausomųjų kintamųjų atsakas – BFJK. Jis buvo išreikštas tiek grynam ekstraktui, tiek sausai žaliavai. Pritaikius QUENCHER procedūrą antioksidacinis aktyvumas nustatytas sausoje medžiagoje – liekanose po įvairių ekstrakcijos etapų. Šis metodas parodo, kaip keičiasi bioaktyviųjų junginių kiekis sausoje medžiagoje.

Optimizuotas biorafinavimo (pakopinės ekstrakcijos taikant skirtingus tirpiklius) procesas buvo pritaikytas juodųjų serbentų išspaudų ekstrakcijai. Liofilizuotos ir per smulkiausių sietelį (0,2 mm) sumaltos išspaudos buvo panaudotos optimizuoti SKE. Ekstrakcijos procesas buvo optimizuotas pasitelkiant APM kartu su CKRP. Optimizuoti trys pagrindiniai nepriklausomieji kintamieji: ekstrakcijos slėgis, temperatūra ir dinaminės ekstrakcijos trukmė. Pagal gautus rezultatus sudarytas matematinis modelis, patikrintas jo adekvatumas, nustatyti svarbiausi proceso parametrai ir jų sąveikos įtaka tiriamajam atsakui. Optimalios sąlygos (45 MPa, 60 °C, 120 min) patikrintos naudojant didesnę ekstrakcijos celę (500 mL) su didesniu tiriamosios medžiagos kiekiu (150 g). Statinė ekstrakcija, kaip ir naudojant bandomąją įrangą su rugių sėlenomis, buvo prailginta iki 30 min. Liekana, likusi po lipofiliškos frakcijos išgavimo, buvo ekstrahuojama taikant EOTPS technologiją. Pirmiausia buvo ekstrahuojama etanolio (70 °C), o vėliau ir subkritiniu vandeniu (130 °C).

Neapdorota žaliava ir mėginiai po įvairių ekstrakcijos etapų buvo papildomai apdoroti naudojant fermentus *Viscozyme L*, bei *CelluStar XL*. *Viscozyme L* – tai fermentų mišinys, sudarytas iš skirtingų karbohidrazių (arabinazės, celiulazės, β-gliukanazės, hemiceliulazės ir ksilanazės), o *CelluStar XL* – celiulazės ir hemiceliulazės mišinys. Apskaičiuota, kiek vandenyje tirpių medžiagų galime išgauti po įvairių technologinių etapų naudodami fermentus.

Juodųjų serbentų ekstrakte, gautame optimaliomis SKE sąlygomis, nustatyta riebalų rūgščių sudėtis taikant dujų chromatografiją su liepsnos jonizacijos detektoriumi, o tokoferolių sudėtis nustatyta taikant efektyviają skysčių chromatografiją su fluorescencijos detektoriumi. Papildomai buvo įvertintas šio aliejaus oksidacinis stabilumas taikant *Rancimat* ir *Oxipress* metodus. Taikant kelias skirtingas metodikas (ORAC, L-ORAC, DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, FRAP, BFJK, QUENCHER) ištirtos antioksidacinės savybės tiek gautuose ekstraktuose, tiek juodųjų serbentų liekanose po skirtingų technologinių procesų etapų.

Visi eksperimentiniai matavimai atlikti bent tris kartus ir prie rezultatų pateikiamas šių matavimų vidurkis kartu su standartiniu nuokrypiu (SN). Optimizavimo eksperimentai apdoroti statistine programa *Stat-Ease Design Expert 7.0*. Vidurkiai ir reikšmingi skirtumai tarp jų įvertinti statistine programa *Statgraphics*. Koreliacijos koeficientai nustatyti ir kiti papildomi skaičiavimai atlikti *MS Excel* programa.

### **3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS**

#### **3.1. Rugių ir kviečių sėlenų EOTPS ekstraktų išeiga ir antioksidacinės savybės**

Rugių ir kviečių sėlenų antioksidacinis aktyvumas iki šiol nebuvo nuodugnai ištirtas. Ekstrakcija organiniais tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje dar niekad nebuvo taikyta šių medžiagų ekstrakcijai ir analizei. Rugių sėlenos (RS), lyginant su kviečių (KS), yra daug mažiau paplitusios, todėl šios žaliavos tyrimų atlikta labai nedaug. Rugių ir kviečių sėlenos buvo suskirstytos į kelias skirtingas frakcijas pagal jų dalelių dydį ir ekstrahuotos taikant EOTPS bei naudojant skirtingus tirpiklius, jų poliškumo didėjimo tvarka. Naudotų procesų efektyvumas įvertintas nustatant gautų ekstraktų antioksidacines savybes ir taikant skirtingus antioksidacinių savybių tyrimų metodus.

##### **3.1.1. Rugių ir kviečių sėlenų ekstrakcijos išeiga**

Rugių ir kviečių sėlenos buvo ekstrahuotos naudojant skirtingus tirpiklius jų poliškumo didėjimo tvarka: heksaną (HE), acetoną (AC) ir metanolio/vandens mišinį (MeOH/H<sub>2</sub>O) (**1 lent.**). Didesnis ekstrakto kiekis buvo gautas iš RS naudojant polišką tirpiklį – MeOH/H<sub>2</sub>O. Daugeliu atvejų dalelių dydis buvo reikšmingas parametras. Naudojant MeOH/H<sub>2</sub>O ir mažinant dalelių dydį stebimas reikšmingas KS ekstrakto kiekio padidėjimas. Tokia pati tendencija

stebima rugių sėlenų ekstrakto, ekstrahuotame su heksanu. EOTPS technologija nėra tokia efektyvi, kad galėtų visiškai laisvai prasiskverbti per augalinės žaliavos matricą – reikia didinti paviršiaus plotą.

**1 lentelė.** Rugių ir kviečių sėlenų EOTPS išeišgos

Rugių sėlenos	Tirpiklis	Išeišga, %	Kviečių sėlenos	Tirpiklis	Išeišga, %
>1 mm	HE	2,25±0,02 <sup>a</sup>	>1 mm	HE	2,51±0,05 <sup>c</sup>
	AC	0,93±0,05 <sup>b</sup>		AC	1,19±0,02 <sup>c</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	9,89±0,01 <sup>c</sup>		MeOH/H <sub>2</sub> O	5,77±0,02 <sup>b</sup>
0,5–1 mm	HE	2,44±0,07 <sup>b</sup>	0,5–1 mm	HE	2,65±0,07 <sup>e</sup>
	AC	0,92±0,01 <sup>b</sup>		AC	1,24±0,01 <sup>d</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	9,83±0,04 <sup>b</sup>		MeOH/H <sub>2</sub> O	5,61±0,07 <sup>a</sup>
0,23–0,5 mm	HE	2,61±0,04 <sup>c</sup>	0,23–0,5 mm	HE	2,08±0,03 <sup>a</sup>
	AC	0,86±0,01 <sup>a</sup>		AC	0,94±0,01 <sup>b</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	9,96±0,04 <sup>d</sup>		MeOH/H <sub>2</sub> O	6,15±0,09 <sup>d</sup>
<0,23 mm	HE	2,91±0,02 <sup>d</sup>	<0,23 mm	HE	2,29±0,03 <sup>b</sup>
	AC	0,87±0,01 <sup>a</sup>		AC	0,96±0,02 <sup>b</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	10,56±0,06 <sup>e</sup>		MeOH/H <sub>2</sub> O	7,11±0,07 <sup>e</sup>
TrE (<0,23 mm)	HE	2,90±0,08 <sup>d</sup>	TrE (<0,23 mm)	HE	2,61±0,05 <sup>d</sup>
	AC	0,88±0,03 <sup>a</sup>		AC	0,88±0,03 <sup>a</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	9,53±0,61 <sup>a</sup>		MeOH/H <sub>2</sub> O	5,93±0,10 <sup>e</sup>

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN; raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp vieno tirpiklio ir skirtingo dalelių dydžio (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 3.1.2. Rugių ir kviečių sėlenų dalelių dydžio įtaka ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui

Visapusiškam tirtų sėlenų antioksidacinio aktyvumo įvertinimui taikėme skirtingus metodus antioksidaciniam aktyvumui nustatyti. Antioksidacinis aktyvumas buvo išreikštas tiek sauso ekstrakto masei, tiek sausos žaliavos medžiagos masei. Abu šie parametrai suteikia vertingos informacijos interpretuojant gautus duomenis. Vieni ekstraktai gali pasižymėti stipriomis AOA savybėmis, o jų išgaunamas kiekis gali būti labai nedidelis. Gali būti priešingai – kai ekstrakto aktyvumas yra mažas, o ekstrakto išeišga – pakankamai didelė. AOA matavimų rezultatai pateikti **2 lentelėje**.

BFJK reikšmės svyravo plačiame intervale tiek ruginėse (12,5±0,2–53,0±0,1 mg GRE/g), tiek kvietinėse sėlenose (13,2±0,1–40,2±0,1 mg GRE/g). Didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas acetono rugių (iki 53±0,11 mg GRE/g) ir kviečių (iki 40,2±0,1 mg GRE/g) ekstraktuose. Naudojant metanolį išeišga yra pastebimai didesnė, šio tirpiklio mišinys buvo itin efektyvus iš tiriamosios medžiagos ekstrahuojant fenolinius junginius. Fenolinių junginių kiekis, išgautas naudojant MeOH/H<sub>2</sub>O (0,83–1,42 mg GRE/g SM), buvo apie du kartus didesnis lyginant su heksanu (0,31–0,68 mg GRE/g SM) ir apie 3 kartus didesnis lyginant su acetonu (0,33–0,48 mg GRE/g SM).

**2 lentelė.** Rugių ir kviečių sėlenų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas: DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, ORAC išreikšti  $\mu\text{M TE/g}$  ekstrakto ir  $\mu\text{M TE/g SM}$  tirtoje žaliavoje; BFJK išreikštas  $\text{mg GRE/g}$  ekstrakto ir  $\text{mg GRE/g SM}$  tirtoje žaliavoje

Mėginys	Tirpiklis	BFJK		ABTS <sup>•+</sup>		DPPH <sup>•</sup>		ORAC	
		Ekstrakte	SM	Ekstrakte	SM	Ekstrakte	SM	Ekstrakte	SM
Rugių sėlenos (>1 mm)	HE	22,8±0,05 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	34,0±0,03 <sup>a</sup>	0,77 <sup>a</sup>	27,0±0,13 <sup>d</sup>	0,61 <sup>c</sup>	2166±0,21 <sup>a</sup>	48,74 <sup>a</sup>
	AC	46,8±0,16 <sup>a</sup>	0,43 <sup>a</sup>	113,7±0,12 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>	54,5±0,16 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	2826±0,23 <sup>a</sup>	26,28 <sup>c</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	14,4±0,11 <sup>b</sup>	1,42 <sup>c</sup>	198,4±0,13 <sup>d</sup>	19,62 <sup>d</sup>	21,2±0,18 <sup>b</sup>	2,09 <sup>d</sup>	2131±0,31 <sup>a</sup>	210,76 <sup>a</sup>
Rugių sėlenos (0,5–1 mm)	HE	23,8±0,15 <sup>c</sup>	0,58 <sup>b</sup>	32,2±0,16 <sup>a</sup>	0,79 <sup>b</sup>	20,7±0,18 <sup>c</sup>	0,50 <sup>a</sup>	2188±0,33 <sup>a</sup>	53,38 <sup>b</sup>
	AC	51,7±0,15 <sup>b</sup>	0,48 <sup>c</sup>	130,0±0,23 <sup>a</sup>	1,20 <sup>c</sup>	66,0±0,19 <sup>b</sup>	0,61 <sup>b</sup>	2861±0,31 <sup>ab</sup>	26,32 <sup>c</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	14,4±0,18 <sup>b</sup>	1,41 <sup>c</sup>	162,3±0,19 <sup>c</sup>	15,95 <sup>c</sup>	18,7±0,11 <sup>a</sup>	1,83 <sup>c</sup>	2146±0,37 <sup>a</sup>	210,93 <sup>a</sup>
Rugių sėlenos (0,23–0,5 mm)	HE	23,2±0,09 <sup>ab</sup>	0,60 <sup>c</sup>	32,2±0,07 <sup>a</sup>	0,84 <sup>c</sup>	19,3±0,12 <sup>b</sup>	0,50 <sup>a</sup>	2524±0,43 <sup>b</sup>	65,89 <sup>c</sup>
	AC	51,7±0,17 <sup>b</sup>	0,44 <sup>a</sup>	136,4±0,15 <sup>a</sup>	1,17 <sup>b</sup>	73,4±0,21 <sup>c</sup>	0,63 <sup>b</sup>	2881±0,33 <sup>ab</sup>	24,78 <sup>a</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	12,8±0,15 <sup>a</sup>	1,27 <sup>a</sup>	140,7±0,23 <sup>b</sup>	14,01 <sup>b</sup>	17,0±0,19 <sup>a</sup>	1,69 <sup>a</sup>	2155±0,40 <sup>a</sup>	214,62 <sup>a</sup>
Rugių sėlenos (<0,23 mm)	HE	23,5±0,16 <sup>bc</sup>	0,68 <sup>d</sup>	29,6±0,09 <sup>a</sup>	0,86 <sup>d</sup>	17,9±0,17 <sup>a</sup>	0,52 <sup>b</sup>	2647±0,43 <sup>c</sup>	77,02 <sup>d</sup>
	AC	53,0±0,10 <sup>c</sup>	0,46 <sup>b</sup>	218,4±0,19 <sup>b</sup>	1,90 <sup>d</sup>	85,5±0,21 <sup>d</sup>	0,74 <sup>c</sup>	2955±0,26 <sup>b</sup>	25,71 <sup>b</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	12,5±0,19 <sup>a</sup>	1,32 <sup>b</sup>	89,9±0,23 <sup>a</sup>	9,49 <sup>a</sup>	16,7±0,19 <sup>a</sup>	1,77 <sup>b</sup>	2210±0,33 <sup>b</sup>	233,38 <sup>b</sup>
Kviečių sėlenos (>1 mm)	HE	18,7±0,10 <sup>d</sup>	0,47 <sup>c</sup>	36,8±0,05 <sup>ab</sup>	1,28 <sup>c</sup>	27,0±0,11 <sup>d</sup>	0,51 <sup>d</sup>	2564±0,26 <sup>a</sup>	64,35 <sup>c</sup>
	AC	34,0±0,16 <sup>a</sup>	0,40 <sup>c</sup>	81,3±0,11 <sup>a</sup>	0,97 <sup>a</sup>	36,7±0,17 <sup>a</sup>	0,44 <sup>a</sup>	2173±0,28 <sup>a</sup>	25,86 <sup>b</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	14,4±0,09 <sup>b</sup>	0,83 <sup>a</sup>	89,9±0,13 <sup>a</sup>	7,47 <sup>a</sup>	24,9±0,10 <sup>a</sup>	1,44 <sup>a</sup>	2049±0,36 <sup>a</sup>	118,22 <sup>a</sup>
Kviečių sėlenos (0,5–1 mm)	HE	16,5±0,07 <sup>c</sup>	0,44 <sup>b</sup>	48,6±0,07 <sup>b</sup>	1,29 <sup>c</sup>	12,5±0,10 <sup>c</sup>	0,33 <sup>c</sup>	2635±0,32 <sup>b</sup>	69,83 <sup>d</sup>
	AC	37,1±0,17 <sup>b</sup>	0,46 <sup>d</sup>	127,5±0,17 <sup>b</sup>	1,58 <sup>c</sup>	51,9±0,22 <sup>b</sup>	0,64 <sup>c</sup>	2325±0,21 <sup>b</sup>	28,83 <sup>d</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	15,7±0,11 <sup>c</sup>	0,88 <sup>b</sup>	157,2±0,19 <sup>b</sup>	8,82 <sup>b</sup>	26,6±0,18 <sup>b</sup>	1,49 <sup>a</sup>	2074±0,38 <sup>a</sup>	116,34 <sup>a</sup>
Kviečių sėlenos (0,23–0,5 mm)	HE	14,8±0,13 <sup>b</sup>	0,31 <sup>a</sup>	36,5±0,09 <sup>ab</sup>	0,76 <sup>b</sup>	8,9±0,03 <sup>b</sup>	0,18 <sup>b</sup>	2673±0,31 <sup>c</sup>	55,59 <sup>a</sup>
	AC	40,2±0,06 <sup>c</sup>	0,38 <sup>b</sup>	160,7±0,19 <sup>c</sup>	1,51 <sup>b</sup>	61,7±0,24 <sup>c</sup>	0,58 <sup>b</sup>	2448±0,29 <sup>c</sup>	23,01 <sup>a</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	16,5±0,16 <sup>d</sup>	1,01 <sup>d</sup>	209,9±0,21 <sup>c</sup>	12,91 <sup>c</sup>	27,3±0,11 <sup>c</sup>	1,68 <sup>b</sup>	2128±0,29 <sup>b</sup>	130,88 <sup>b</sup>
Kviečių sėlenos (<0,23 mm)	HE	13,4±0,13 <sup>a</sup>	0,31 <sup>a</sup>	22,5±0,09 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a</sup>	4,4±0,01 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>	2673±0,40 <sup>c</sup>	61,22 <sup>b</sup>
	AC	34,2±0,06 <sup>a</sup>	0,33 <sup>a</sup>	190,8±0,19 <sup>d</sup>	1,83 <sup>d</sup>	71,2±0,22 <sup>d</sup>	0,68 <sup>d</sup>	2787±0,31 <sup>d</sup>	26,75 <sup>c</sup>
	MeOH/H <sub>2</sub> O	13,2±0,14 <sup>a</sup>	0,94 <sup>c</sup>	212,3±0,22 <sup>d</sup>	15,09 <sup>d</sup>	28,0±0,13 <sup>d</sup>	1,99 <sup>c</sup>	2259±0,38 <sup>c</sup>	160,63 <sup>c</sup>

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės  $\pm$  SN; raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp vieno tirpiklio ir skirtingo dalelių dydžio (ANOVA,  $p < 0,05$ ). SM: sausoje medžiagoje; HE: heksanas; AC: acetonas; MeOH/H<sub>2</sub>O: metanolis/vanduo (80:20 %).

Rugių sėlenų DPPH<sup>•</sup> radikalų surišimo geba kito nuo 16,77±0,19 iki 85,50±0,21 μM TE/g, o kviečių sėlenose nuo 4,4±0,0 iki 71,2±0,2 μM TE/g. Išreiškus šiuos dydžius sausajai medžiagai atitinkamai gauti šie rezultatai: 0,50–2,09 ir 0,10–1,99 μM TE/g SM. Naudojant metanolį buvo išgautas didžiausias DPPH<sup>•</sup> radikalą surišančių junginių kiekis iš rugių (1,69–2,09 μM TE/g SM) bei kviečių (1,44–1,99 μM TE/g SM) sėlenų. Kviečių sėlenų ekstraktai pasižymėjo mažesne RSG nei rugių sėlenos. ABTS<sup>•+</sup> radikalo surišimo geba kito dar didesniame intervale: RS – 29,6±0,1–218,4±0,2; KS – nuo 22,5±0,1 iki 212,3±0,2 μM TE/g. Šie rezultatai patvirtino, jog didžiausias radikalus surišančių junginių kiekis yra išgaunamas naudojant MeOH/H<sub>2</sub>O (RS iki 19,62 μM TE/g SM; KS iki 15,09 μM TE/g SM).

Matuojant ORAC vertes tarp ekstraktų, išgautų skirtingais tirpikliais, nebuvo užfiksuota tokių didelių skirtumų. ORAC reikšmės rugių sėlenose svyravo nuo 2131,4±0,3 iki 2955,7±0,3 ir nuo 2049,2±0,4–2787,1±0,3 μM TE/g kviečių sėlenose. Didesni verčių svyravimai užfiksuoti perskaiciavus AOA sausoms sėlenoms (RS: 25,71–233,38 μM TE/g SM; KS: 23,0–160,63 μM TE/g SM). Pastebėta ta pati tendencija – MeOH/H<sub>2</sub>O buvo efektyviausias tirpiklis išgaunant bioaktyviusius junginius.

### **3.1.3. Dalelių dydžio įtaka bioaktyviųjų junginių išgavimui iš rugių ir kviečių sėlenų**

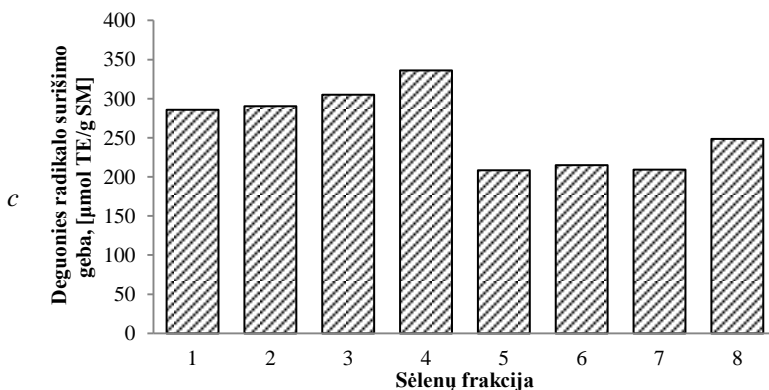
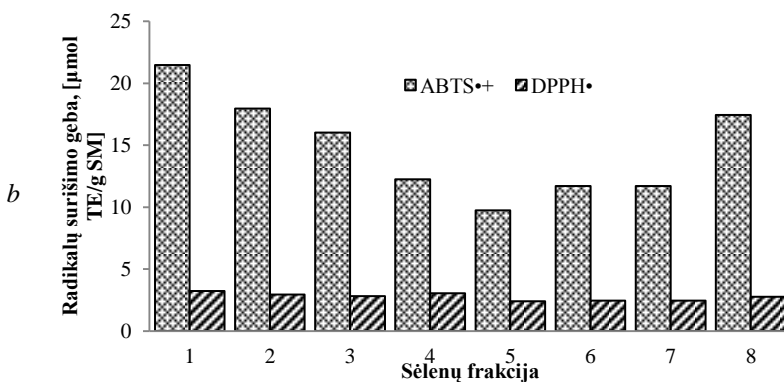
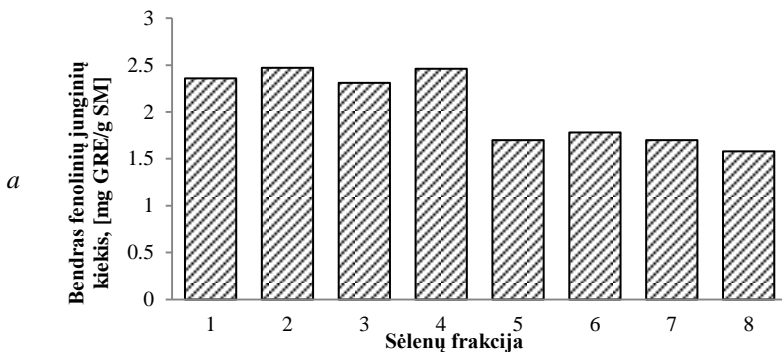
Atliekant ekstrakciją, medžiagos dalelių dydis yra vienas iš svarbiausių parametų. Kai dalelės smulkesnės, jų paviršiaus plotas yra didesnis, tirpiklis gali lengviau pasiekti ekstrahuojamas medžiagas, o šios gali lengviau pereiti iš vienos fazės į kitą. Ekstrakcijos proceso efektyvumas priklauso tiek nuo žaliavos savybių, tiek nuo parinkto tirpiklio. Dalelių dydis turi būti parenkamas individualiai kiekvienai skirtingai žaliavai. Šiame darbe buvo tirtos keturių skirtingų frakcijų medžiagos dalelės: >1 mm, 0,5–1,0 mm, 0,23–0,5 mm ir <0,23 mm.

Dalelių dydis daugeliu atvejų neturėjo pastebimos įtakos matuojant BFJK ekstrakto, tačiau iš **2 lentelės** nustatyti reikšmingi skirtumai tarp tam tikrų dydžių. Pateiktuose rezultatuose galime rasti labai įdomių priklausomybių: buvo nustatyti reikšmingi skirtumai tarp RS heksano ekstraktų BFJK, tačiau nėra jokios priklausomybės nuo dalelių dydžio. KS heksano ekstraktų BFJK kiekis mažėjo didėjant dalelių paviršiaus plotui (mažinant dalelių dydį). Tokius skirtumus tarp RS ir KS gali lemti jų skirtingos struktūros bei sudėties ypatybės. ABTS<sup>•+</sup> radikalų surišimo gebos rezultatai atskleidžia įdomias šių skirtingų tiriamųjų medžiagų savybes. Rugių sėlenų AC ekstraktų ABTS<sup>•+</sup> radikalų surišimo geba didėja nuo 113,7±0,1 iki 218,4±0,2 μM TE/g, kai dalelių dydis mažėja, tačiau MeOH/H<sub>2</sub>O ekstraktuose – aktyvumas mažėjo nuo 198,4±0,1 iki 89,9±0,2 μM TE/g. Kadangi visos ekstrakcijos buvo atliekamos pakopomis (naudojant

tą pačią žaliavą), o MeOH/H<sub>2</sub>O tirpiklis buvo panaudotas paskutinis, galime teigti, jog esant mažesniai dalelių dydžiui AC geba išekstrahuoti daugiau RSG pasižymintį junginių. Liekanoje po ekstrakcijos lieka mažiau junginių, kurie vėliau galėtų būti išskiriami panaudojus MeOH/H<sub>2</sub>O. Panaši tendencija gauta naudojant DPPH• radikalą, tačiau čia skirtumai yra mažesni. Kviečių sėlenų AC ekstrakto RSG didėjo mažėjant dalelių dydžiui matuojant keliais radikalų surišimo metodais (ABTS<sup>•+</sup>, DPPH•). Didesni skirtumai tarp RS ir KS matyti ekstrahuojant MeOH/H<sub>2</sub>O. Skirtingai nei RS, RSG metanolio–vandens ekstraktuose didėja mažėjant dalelių dydžiui. Tokie skirtumai gali atsirasti dėl skirtingų rugių bei kviečių sėlenų matricių ir juose esančių tirpiųjų antioksidantų sudėties. Mažiausio dalelių dydžio KS heksano ekstraktas pasižymėjo mažiausia radikalų surišimo geba, ir ji didėjo didėjant dalelių dydžiui. Tokia pati tendencija matoma ir RS mėginiuose, tik skirtumai čia kiek mažesni. Dalelių dydis bei tirpiklio tipas ORAC reikšmėms neturėjo labai didelės įtakos. Didžiausiu deguonies radikalo surišimo aktyvumu pasižymėjo ekstraktai, išgauti iš smulkiausios frakcijos.

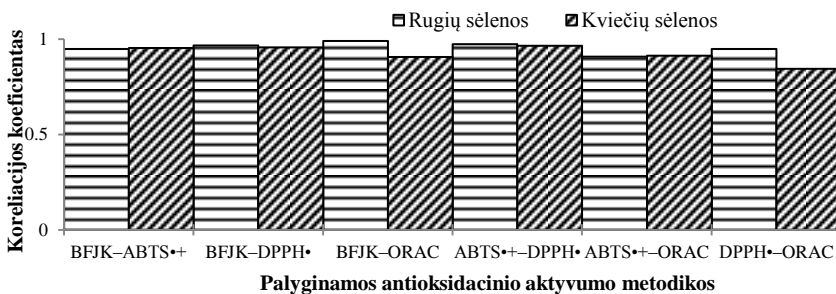
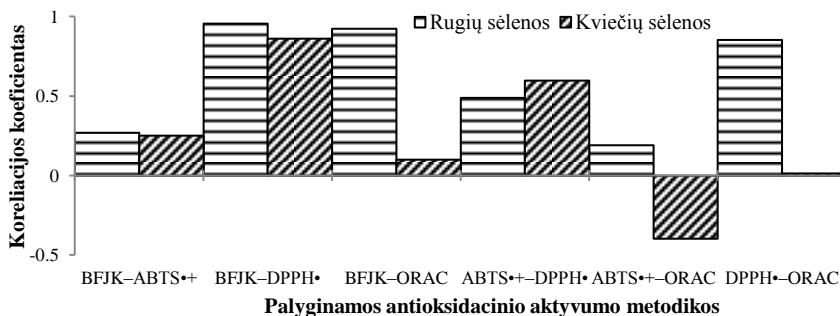
### 3.1.4. Bendras antioksidacinis aktyvumas ir gautų rezultatų koreliacija

Bendras visų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas yra pateiktas **2 paveiksle**. Šios reikšmės buvo gautos sudėjus visų ekstraktų (gautų skirtingais tirpikliais) AOA, nustatytą tam tikru metodu. Iš šio grafiko puikiai matyti, jog didžiausiu BFJK pasižymėjo rugių sėlenos (2,31–2,47 mg GAE/g SM), o kviečių sėlenose šis kiekis buvo pastebimai mažesnis (1,58–1,78 mg GAE/g SM). Tačiau dalelių dydis neturėjo reikšmingos įtakos BFJK (**2 pav., a**). Rugių sėlenose bendra RSG matuojant ABTS<sup>•+</sup> metodu sumažėjo nuo 21,45 iki 12,25 μM TE/g SM mažėjant dalelių dydžiui (**2 pav., b**). Visiškai priešinga priklausomybė nustatyta kviečių sėlenose – čia RSG didėjo nuo 9,72 iki 17,44 μM TE/g SM. Šie rezultatai parodo, kokios skirtingos yra rugių ir kviečių sėlenų antioksidacinės savybės, kurios daugiausiai priklauso nuo specifinių junginių ir nuo jų kiekio tiriamojoje mėginio matricioje. Gauti duomenys aiškiai parodo, kaip svarbu parinkti tinkamą medžiagos susmulkinimo laipsnį. RSG, matuojant DPPH•, buvo labai panašūs visuose tirtuose bandiniuose, nebuvo nustatyti jokie reikšmingi skirtumai. Rugių sėlenose šis dydis svyravo nuo 2,82 iki 3,21 μM TE/g SM, o kviečių sėlenose buvo kiek mažesnis – 2,39–2,77 μM TE/g SM. Šių tyrimų metu buvo naudojami skirtingo poliškumo tirpikliai, pradedant nuo heksano, kuriame tirpsta lipofiliški junginiai, ir baigiant MeOH/H<sub>2</sub>O, kuriame geriau tirpsta hidrofilinėmis savybėmis pasižymintys antioksidantai. Rugių sėlenų ekstraktuose, lyginant su KS, nustatytas didesnis ORAC aktyvumas (**2 pav., c**). Didžiausias deguonies radikalų surišimo efektyvumas nustatytas ekstraktuose, gautuose iš smulkiausios rugių ir kviečių sėlenų frakcijos. Anksčiau kitų autorių atlikti tyrimai tik patvirtina tokią priklausomybę.



**2 pav.** Bendras rugių ir kviečių sėlenų antioksidacinis aktyvumas, išreikštas kaip: BFJK suma (*a*); ABTS<sup>•+</sup> ir DPPH<sup>•</sup> radikalų surišimo gebos suma (*b*); deguonies radikalo surišimo gebos ORAC suma (*c*); 1 – RS > 1 mm; 2 – RS 0,5–1 mm; 3 – RS 0,23–0,5 mm; 4 – RS < 0,23 mm; 5 – KS > 1 mm; 6 – KS 0,5–1 mm; 7 – KS 0,23–0,5 mm; 8 – KS < 0,23 mm

Šio eksperimento metu buvo taikomos 4 skirtingos AOA nustatymo metodikos, naudojami 4 skirtingi dalelių dydžiai bei 3 skirtingo poliškumo tirpikliai. Gautas didelis kiekis duomenų, todėl norint maksimaliai išnaudoti AOA tyrimų rezultatus skirtingomis metodikomis gauti duomenys buvo palyginti tarpusavyje, ir nustatyti jų koreliacijos koeficientai (3 pav.). Antioksidacinį aktyvumą išreiškus sausos medžiagos masei skirtingi metodai gali labai gerai koreliuoti tarpusavyje (0,907–0,99 RS ekstraktams; 0,843–0,965 KS ekstraktams). Kai antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas sausai ekstrakto masei, koreliacijos tampa daug sudėtingesnės. Koreliacijos koeficientai tarp BFJK–ABTS<sup>•+</sup>, BFJK–DPPH<sup>•</sup> ir ABTS<sup>•+</sup>–DPPH<sup>•</sup> yra teigiami ir arti vieneto – šie metodai puikiai koreliuoja. Tačiau koreliacijos koeficientai su ORAC metodu nėra tokie pastovūs. BFJK–ORAC (0,924) ir DPPH<sup>•</sup>–ORAC (0,854) vertės rodo gerą koreliaciją tarp rugių sėlenų tyrimų, tačiau kviečių sėlenų tyrimuose ši koreliacija yra daug silpnesnė: atitinkamai 0,1 ir 0,15. Koreliacijos koeficientai tarp ABTS<sup>•+</sup>–ORAC rugių sėlenose buvo 0,191, o kviečių sėlenose net neigiama -0,396. Šie rezultai atskleidžia, kokia skirtinga AOA pasižyminčių junginių sudėtis yra rugių ir kviečių sėlenose.



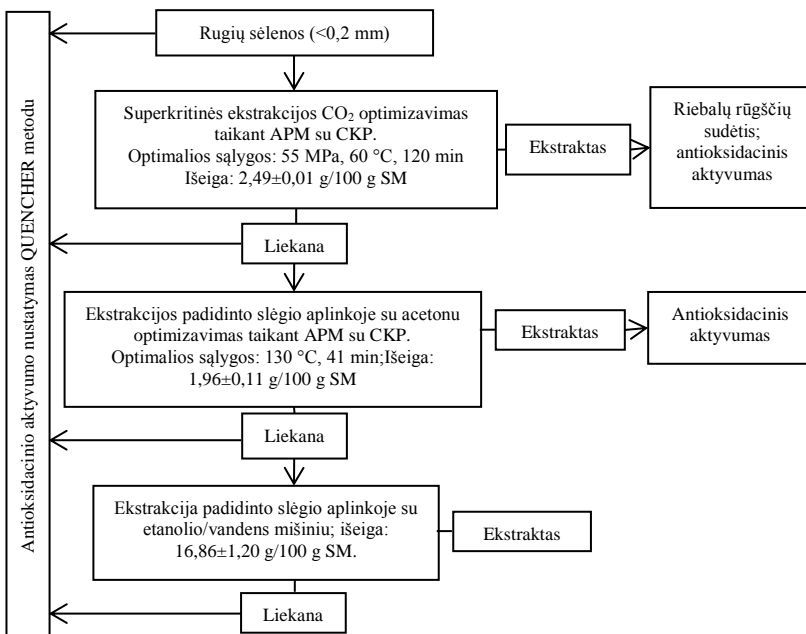
**3 pav.** Koreliacijos koeficientai tarp skirtingų antioksidacinio aktyvumo matavimo metodų, taikytų skirtingų rugių ir kviečių frakcijų savybėms įvertinti; viršuje – g ekstrakte; apačioje – g sausos medžiagos



### 3.2. Ruginių sėlenų SKE optimizavimas taikant APM su CKRP

Anksčiau atliktų eksperimentų metu nustatyta, jog naudodami EOTPS iš kviečių ir ruginių sėlenų galime išgauti vertingus ekstraktus, pasižyminčius sveikatai naudingomis antioksidacinėmis savybėmis. EOTPS ekstrakcija yra daug greitesnė ir efektyvesnė nei atmosferinio slėgio aplinkoje vykdomos ekstrakcijos. Tačiau taikant šį metodą ir norint gauti sausą ekstraktą reikia pašalinti tirpiklį, o tam reikia papildomų sanauđų (laiko, energijos, reikalinga papildoma įranga). Norint gauti grynesnius ekstraktus galima taikyti superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu.

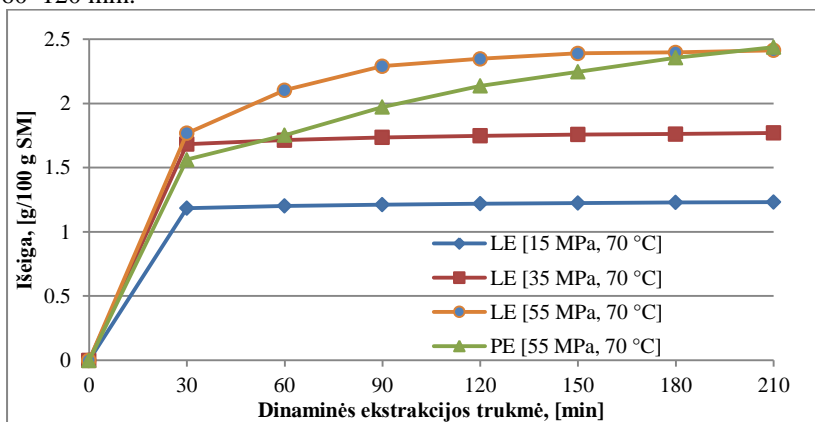
Atlikus literatūros apžvalgą nustatyta, jog su ruginių sėlenomis naudojant SKE sistemą atlikta nedaug tyrimų. Didžioji dalis tyrimų buvo orientuoti į siekį išgauti frakciją, kurioje būtų didelis kiekis alkilrezorcinolių, tačiau jokių optimizavimo eksperimentų iki šiol nebuvo atlikta. APM ir CKP pritaikymas leidžia efektyviai atlikti optimizavimo eksperimentą ir gali labai padidinti proceso efektyvumą. Mūsų grupėje anksčiau atlikti eksperimentai tik patvirtino šį teiginį, kadangi naudojant optimalius parametrus galima labai padidinti lipofiliškos frakcijos išėigą. Tinkamai parinkę parametrus galime pasiekti didžiausią ruginių sėlenų lipofiliškos ekstrakcijos išėigą, o žaliavą apdoroję kitais metodais galime padidinti tirpiųjų medžiagų išėigą (4 pav.).



4 pav. Ruginių sėlenų biorafinavimo schema

### 3.2.1. Rugių sėlenų SKE optimizavimas

Eksperto pradžioje buvo gauta ekstrakcijos kinetikos kreivė, kuri suteikia daug naudingos informacijos apie vykstančius termodinaminius procesus (5 pav.). Kinetinės kreivės buvo nubraižytos taikant tris skirtingus ekstrakcijos slėgius (15, 35, 55 MPa) ir pastovią ekstrakcijos temperatūrą (70 °C). Puikiai matyti, jog esant mažesniai slėgiui (15, 35 MPa) didžioji dalis ekstrakto yra išgaunama per pirmąsias 30 min. Taikant didžiausią bandytą slėgį (55 MPa) ekstrakto kiekis laipsniškai didėja ir beveik pasiekia termodinaminę pusiausvyrą 90–120 min nuo dinaminės ekstrakcijos pradžios. Nuspręsta, jog dinaminės ekstrakcijos trukmės optimizavimo intervalas bus 60–120 min.



5 pav. Ekstrakcijos išeigos priklausomybė nuo dinaminės ekstrakcijos trukmės (LE – laboratorinio dydžio ekstraktoriai su 50 mL cele, PE – pusiau pramoninis ekstraktoriai su 10 L cele). Santykinis standartinis nuokrypis (SSN) neviršijo 10 %

Ankstesnių eksperimentų su EOTPS metu nustatyta, jog rugių ir kveičių sėlenų dalelių dydis turėjo reikšmingą įtaką ekstrakcijos išeigai. Prieš CKP optimizavimą buvo patikrinta, kokią įtaką rugių sėlenų dalelių dydis turi ekstrakcijos išeigai taikant SKE. Ekstrakcija buvo atliekama tokiomis sąlygomis, kurios buvo anksčiau taikytos ekstrahuoti rugių sėlenoms kituose tyrimuose (35 MPa ir 70 °C). Šitomis sąlygomis buvo gauta maksimali išeiga – 3,26 g/100 g SM, tačiau šiame eksperimente buvo naudojamas papildomas tirpiklis – etanolis. Ekstrahuodami skirtingo dydžio frakcijas be modifikatoriaus nustatėme, jog didžiausią išeigą ( $2,44 \pm 0,01$  g/100 g SM) galime pasiekti naudodami smulkiausias daleles (<0,2 mm). Išeiga ekstrahuojant kitas frakcijas buvo:  $2,03 \pm 0,01$  g/100 g SM naudojant <0,5 mm frakciją ir  $1,95 \pm 0,01$  g/100 g naudojant <1 mm frakciją. Smulkiausia frakcija buvo naudojama tolesniuose eksperimentuose.

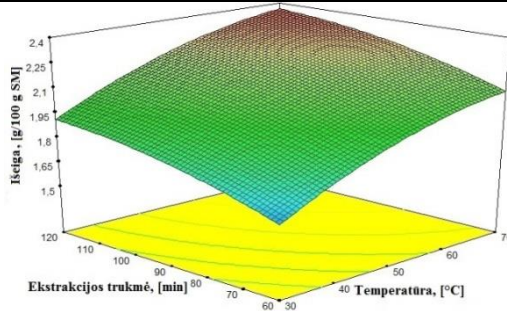
**3 lentelė.** CKP parametrų vertės ir rugių selenų SKE ekstrakcijos rezultatas: 1–8 eksperimentiniai bandymai, 9–14 bandymai žvaigždiniuose taškuose ir 14–20 bandymai plano centre

Eil. nr.	Ekstrakcijos slėgis, MPa	Ekstrakcijos temperatūra, °C	Dinaminės ekstrakcijos trukmė,	Išėiga, g/100 g DW
1	25	30	60	1,43±0,05
2	55	30	60	1,67±0,09
3	25	70	60	1,85±0,04
4	55	70	60	2,16±0,05
5	25	30	120	1,68±0,04
6	55	30	120	1,92±0,09
7	25	70	120	2,03±0,02
8	55	70	120	2,49±0,01
9	14,77	50	90	1,49±0,09
10	65,23	50	90	2,16±0,06
11	40	16,36	90	1,53±0,07
12	40	83,64	90	2,27±0,09
13	40	50	39,55	1,70±0,07
14	40	50	140,45	2,23±0,05
15	40	50	90	2,06±0,05
16	40	50	90	2,13±0,04
17	40	50	90	2,18±0,02
18	40	50	90	2,08±0,03
19	40	50	90	2,20±0,08
20	40	50	90	2,08±0,08

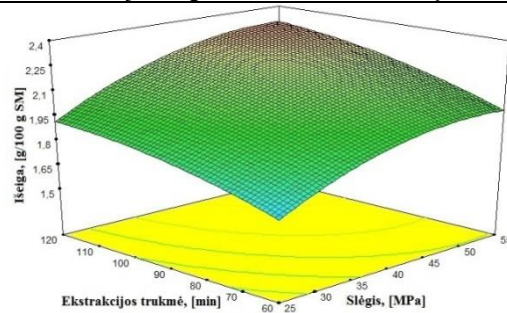
Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN.

SKE optimizavimo rezultatai pateikti **3 lentelėje**. Buvo pritaikyta APM su CKRP optimizuojant tris svarbiausius nepriklausomuosius kintamuosius: ekstrakcijos slėgį, temperatūrą ir dinaminės ekstrakcijos trukmę. Visi eksperimento kintamieji buvo optimizuojami penkiais lygiais, ir buvo gautos atsako paviršiaus kreivės (**6 pav.**). Šios kreivės parodo, kaip atskiri kintamieji ir tam tikra jų sąranka veikia mūsų tiriamąjį atsaką – lipofiliškos frakcijos išėigą. Šie grafikai gauti vieną kintamąjį fiksuojant eksperimentinio plano centre, o kitus du kintamuosius keičiant plano erdvėje ir taip numatant galimą išėigą. Trimačiai grafikai (3D) leidžia aiškiai stebėti, kaip kinta mūsų tiriamasis atsakas varijuojant nepriklausomuosius reakcijos kintamuosius.

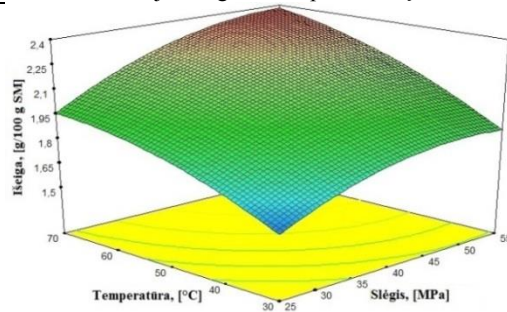
a) Pastovus ekstrakcijos slėgis, [40 MPa]  
Ekstrakcijos temperatūros ir dinaminės trukmės įtaka



b) Pastovi ekstrakcijos temperatūra, [50 °C]  
Ekstrakcijos slėgio ir dinaminės trukmės įtaka



c) Pastovus dinaminės ekstrakcijos laikas, [90 min]  
Ekstrakcijos slėgio ir temperatūros įtaka

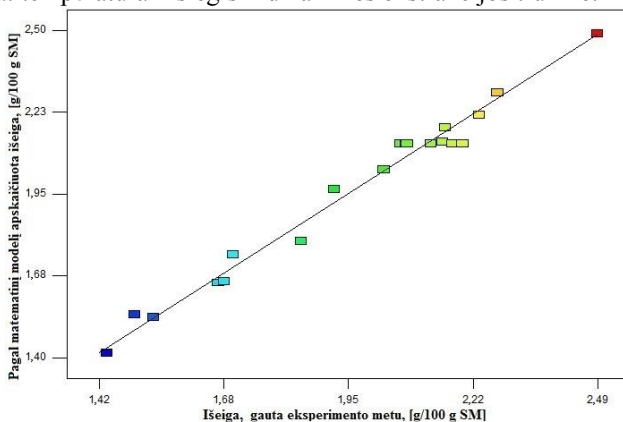


**6 pav.** Rugių sėlenų SKE atsako paviršiaus kreivės, parodančios ekstrakto išieigos priklausomybę nuo optimizuojamų parametų

Pirmame grafike (**6 pav., a**) galime matyti, kaip keičiasi ekstrakto išieiga, kai ekstrakcijos slėgis yra pastovus (40 MPa), o kiti parametrai

(temperatūra ir trukmė) keičiasi. Temperatūros pokytis turi daug didesnę įtaką nei dinaminės ekstrakcijos trukmė. Ekstrakcijos laiko prailginimas nuo 60 iki 120 min leidžia padidinti ekstrakto kiekį tik apie 10 %, o temperatūros padidėjimas nuo 30 iki 70 °C padidina ekstrakto išėigą ~30 %. Panaši tendencija matoma ir antrame grafike, kai fiksuotas parametras yra temperatūra (50 °C) (**6 pav., b**). Ekstrakcijos trukmės prailginimas nuo 60 iki 120 min sukėlė tik nežymų išėigos padidėjimą (0,3 %), o padidinus reakcijos slėgį nuo 25 iki 45–55 MPa ekstrakto kiekis padidėjo tik apie 0,4 %. Iš šio grafiko matyti, kad reakcijos slėgio didinimas 45–55 MPa ribose turi labai nedidelę reikšmę lipofiliškos frakcijos išėigai. Nustatyta, jog reakcijos slėgis bei temperatūra yra du svarbiausi ekstrakcijos proceso parametrai, o šių parametru tarpusavio sąveikos efektus galime pamatyti paskutiniame grafike (**6 pav., c**). Abiejų nepriklausomųjų parametru verčių padidėjimas lemia ekstrakto išėigos padidėjimą. Esant aukštai temperatūrai (70 °C), ekstrakcijos slėgio padidėjimas nuo 25 iki 55 MPa sukelia apie 0,5 % ekstrakto prieaugį. Panašią priklausomybę galime pamatyti, kai yra taikomas maksimalus slėgis (55 MPa) ir didinama temperatūra. Didėjant reakcijos slėgiui ir temperatūrai didėja tirpiklio tankis, o kartu ir difuzija į tiriamosios medžiagos matricą. Be to, taikant didesnę temperatūrą padidėja rugių sėlenų aliejaus garų slėgis, o tai palengvina šios frakcijos išėigimą. Esant mažesniam slėgiui (<35 MPa), temperatūros padidėjimas gali sukelti tirpiklio tankio sumažėjimą, o tai gali sumažinti taikomo proceso veiksmingumą. Rugių sėlenų ekstrakto išėiga taikant skirtingas ekstrakcijos sąlygas kito nuo 1,43 iki 2,49 g/100 g SM (14,32–24,89 mg/g SM). Kitų autoriu tyrimuose naudojant gryną CO<sub>2</sub> tirpiklį šis kiekis buvo gerokai mažesnis (4 mg/g SM). Panašus aliejaus kiekis buvo išėigautas tik panaudojus papildomą tirpiklį – etanolį (8–20 mg/g SM). Palyginimui taikant tradicinę ekstrakcijos metodą gautas kiek didesnis ekstrakto kiekis 27,89±0,63 mg/g SM. Tačiau organinio tirpiklio panaudojimas sukelia papildomu problemu, kadangi vėliau ekstraktus gryninant reikia ši tirpiklį visiškai pašalinti. Šitas tyrimas parodė, jog pritaikę APM su CKRP galime efektyviai padidinti lipofiliškos frakcijos išėigą iš rugių sėlenų naudodami gryną CO<sub>2</sub>. Nustatytos optimalios sąlygos, kurias taikydami galime gauti didžiausią ekstrakto išėigą: 55 MPa, 70 °C ir 120 min. Šios ekstrakcijos sąlygos buvo patikrintos ekstrahuojant didesnę medžiagos kiekį pusiau pramoniniu SKE ekstrakcijos įrenginiu su 10 L ekstrakcijos cele. **5 paveiksle** matyti, jog reakcijos kinetika šiame įrenginyje kiek skiriasi nuo optimizavimo metu naudoto laboratorinio įrenginio. Praėjus 120 min nuo ekstrakcijos pradžios ekstrakto kiekis buvo 10 % mažesnis, tačiau proceso pabaigoje (180–210 min) buvo pasiekta tokia pati išėiga abiejuose ekstraktoriuose. Abiejuose ekstraktoriuose buvo panašus žaliavos ir per ją pratekėjusio tirpiklio santykis.

Šio eksperimento metu buvo taikomas APM su CKRP ir ištirti trys nepriklausomieji parametrai: slėgis ( $P$ ), temperatūra ( $T$ ) ir laikas ( $t$ ). Atlikus dispersinę analizę (ANOVA) nustatyta, jog pagal Stjudento kriterijų ( $p < 0,05$ ) modelis yra adekvatus, o determinacijos koeficientas yra lygus  $-0,98$ . Eksperimentiniu būdu gautos ir apskaičiuotos pritaikius matematinį modelį išeigos yra pateiktos **7 paveiksle**. Pagal gautus duomenis sudarytas matematinis modelis gali būti naudojamas tirti mūšų sudaryto eksperimentinio plano erdvei. Nustatyti šeši parametrai, kurie turi reikšmingos įtakos mūšų sudarytam modeliui:  $P$ ,  $T$ ,  $t$ ,  $P^2$ ,  $T^2$ ,  $t^2$ . Pagrindiniai nepriklausomieji kintamieji pagal jų įtaką ekstrakto išeigai gali būti surikiuoti šia tvarka: temperatūra > slėgis > dinaminės ekstrakcijos trukmė.



**7 pav.** Ekstrakto išeigos, gautos eksperimento metu ir apskaičiuotos sudarytu matematiniumi modeliu (SSN neviršijo 10 %)

### 3.2.2. Rugių sėlenų aliejaus riebalų rūgščių sudėtis ir antioksidacinis aktyvumas

Vienas iš svarbiausių veiksnių, nusakančių aliejaus maistinę vertę, yra jo riebalų rūgščių sudėtis. Tirtame aliejuje daugiausiai nustatyta polinesočiosios linolo rūgšties (61,09 %), taip pat aptikta palmito (13,74 %), oleino (13,65 %) ir linoleno (6,37 %) riebalų rūgščių. Bendras nesočiųjų RR kiekis buvo apie 82 %, kitų rūgščių kiekiai buvo daug mažesni (0,07–1 %). Mūšų turimomis žiniomis, niekas nebuvo atlikęs RR sudėties nustatymo rugių sėlenose. Dar vienas svarbus aliejaus maistinės vertės nustatymo matas yra sočiųjų ir nesočiųjų RR santykis, kuris šiuo atveju buvo nustatytas 0,18. Optimaliomis sąlygomis išgautame RS aliejuje yra didelis kiekis nesočiųjų RR, kurios gali būti panaudotos mūšų mitybai praturtinti ar gaminti funkciniais produktams.

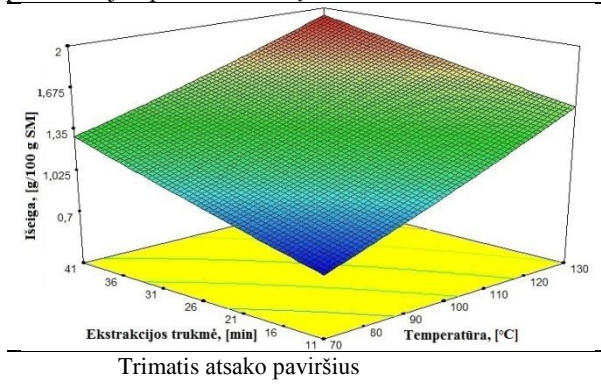
Grūdų sėlenose galime rasti vertingų bioaktyviųjų junginių, tarp kurių svarbią vietą užima įvairūs antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys komponentai. Buvo įvertintos RS ekstrakto antioksidacinės savybės taikant kelis AOA matavimo metodus. Nustatyta L-ORAC, kuri buvo lygi  $683 \pm 45$   $\mu\text{M TE/g}$  ekstrakto. Taip pat nustatytas BFJK –  $14,62 \pm 0,61$  mg GRE/g ekstrakto ir DPPH<sup>•</sup> –  $62,3 \pm 1,2$   $\mu\text{M TE/g}$  ekstrakto. Rugių sėlenų SKE ekstraktas ne tik pasižymi puikia RR sudėtimi, bet ir yra puikus antioksidacinių junginių, turinčių teigiamą poveikį sveikatai, šaltinis.

### 3.2.3. Rugių sėlenų liekanos ekstrakcijos optimizavimas taikant EOTPS

Rugių sėlenų liekana, gauta po ekstrakcijos naudojant superkritinį CO<sub>2</sub>, buvo toliau apdorota taikant EOTPS sistemą su skirtingais tirpikliais. Pradiniame etape buvo išekstrahuojama lipofilinė frakcija, tačiau tiriamojoje žaliavoje dar liko gana didelis kiekis kitų vertingų junginių, kurie gali būti išskiriami naudojant poliškesnius tirpiklius. Šiam procesui vykdyti pasitelkta EOTPS sistema taikant pakopinę ekstrakciją organiniais tirpikliais. Pradžioje buvo ekstrahuojama acetonu, vėliau ta pati liekana paveikta etanolio–vandens mišiniu. Kadangi EOTPS ekstrakcijos efektyvumas daugiausiai priklauso nuo ekstrakcijos temperatūros ir jos trukmės, nuspręsta šiuos du parametrus optimizuoti taikant APM ir CKOP. Šiame eksperimente papildomai išmatuotas dar vienas matematinio modelio atsakas – BFJK. Optimizuota ne tik išeiga, bet ir bendras fenolinių junginių kiekis. Tokiu būdu galime įvertinti, kaip nuo skirtingų nepriklausomųjų parametrų sąrankos priklauso ekstrakcijos išeiga bei antioksidacinis aktyvumas.

Taikant EOTPS sistemą acetoninių ekstraktų išeiga svyravo nuo  $0,74 \pm 0,02$  iki  $1,96 \pm 0,11$  g/100 g SM. Didžiausia išeiga ( $1,96 \pm 0,11$  g/100 g SM) buvo pasiekta taikant maksimalias tirtų parametrų vertes: 130 °C temperatūrą ir 41 min ekstrakcijos trukmę. Pagal sudarytą CKP nubraižyta atsako paviršius kreivė (**8 pav.**). Iš šio grafiko matyti, kad abu tirtieji parametrai turi didelę įtaką ekstrakcijos išeigai. Didindami tiek temperatūrą, tiek ekstrakcijos trukmę galime pasiekti didesnę išeigą. Esant mažiausiai tirtai temperatūrai (70 °C) ilgindami ekstrakcijos trukmę nuo 11 iki 41 min galime beveik dvigubai padidinti išgaunamo ekstrakto kiekį (nuo 0,7 iki 1,35 g/100 g SM). Kiek mažesnis ekstrakto prieaugis pastebimas ir taikant aukštesnę temperatūrą (>100 °C). Esant ilgiausiai ekstrakcijos trukmei, padidinti ekstrakto kiekį nuo 1,35 iki 1,9 g/100 g SM galima padidinus ekstrakcijos temperatūrą nuo 70 iki 130 °C. Naudodami atsako paviršiaus grafikus galime nuspręsti, kokia linkme norime vykdyti savo eksperimentus. Panaši ekstrakcijos išeiga gali būti pasiekta žemoje temperatūroje esant ilgai ekstrakcijos trukmei, arba galime sutrumpinti ekstrakcijai reikalingą laiką ją atlikdami aukštesnėje temperatūroje. Pavyzdžiui, taikant 70 °C temperatūrą po 41 minutės yra išgaunama 1,35 g/100 g SM ekstrakto, tačiau jei

ekstrakcijos temperatūra bus aukštesnė – 110 °C, tada toks pat ekstrakto kiekis bus pasiektas jau po 11 minučių.



**8 pav.** Rugių sėlenų EOTPS ekstrakcijos su acetonu atsako paviršiaus kreivė

Abu pasirinkti nepriklausomieji kintamieji buvo reikšmingi parametrai tirtame modelyje. Ekstrakcijos temperatūra buvo svarbesnis parametras nei ekstrakcijos trukmė. Dispersinė analizė parodė, jog sudarytas modelis reikšmingas, o determinacijos koeficientas taip pat tenkina reikalavimus ( $R^2=0,96$ ). Apskaičiuotas adekvatumo preciziškumas, kuris išmatuoja signalo santykį su triukšmu (pašaliniais trikdžiais, kurie iškreipia rezultatus), yra pakankamas ir lygus 20,33 (turi būti didesnis nei 4). Tai reiškia, jog signalas yra adekvatus ir modelis gali būti naudojamas visoje sudaryto modelio erdvėje.

Buvo atlikti papildomi bandymai, norint pasiekti tokią pačią išeigą (130 °C, 41 min) taikant žemesnę (70 °C) temperatūrą, tačiau prailginus ekstrakcijos trukmę. Pastebėta, kad ekstrakcijos kiekis tolygiai didėja iki 80 min ( $2,03\pm 0,13$  g/100 g SM), o tada pasiekiamą termodinaminę pusiausvyrą. Galiausiai likutis po ekstrakcijos su acetonu optimaliomis ir prieš tai paminėtomis sąlygomis buvo ekstrahuojamas EOTPS su EtOH/H<sub>2</sub>O. Šiuo poliniu tirpikliu buvo išekstrahuojamos rugių sėlenose likusios tirpiosios medžiagos. Ekstrakcijos išeigos naudojant EtOH/H<sub>2</sub>O buvo  $16,93\pm 0,48$  g/100 g SM (70 °C, 81 min) ir  $16,86\pm 1,20$  g/100 g SM (130 °C, 41 min).

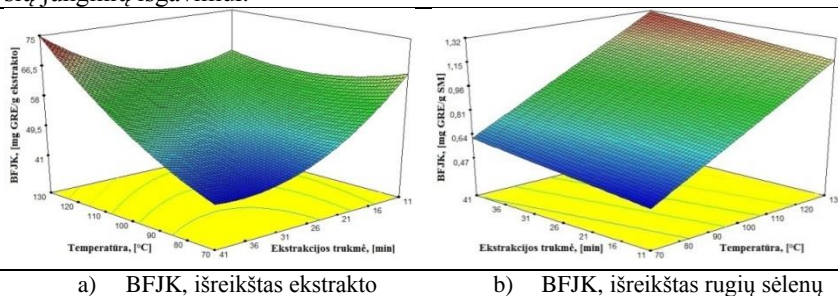
### 3.2.4. Rugių sėlenų ekstraktų, gautų skirtingais metodais, antioksidacinis aktyvumas

Vykdam RS EOTPS optimizavimą su acetonu papildomai buvo išmatuotas BFJK atsakas, preliminariai nustatyta optimizuojamų parametru įtaka bendram fenolinių junginių kiekiui. Pagal eksperimento rezultatus sudaryti atsako paviršiai pateikti **9 paveiksle**. Šiuose grafikuose BFJK rezultatai pateikti g ekstrakto bei g SM. Pagal diferencialinės analizės



rezultatus abu sudaryti modeliai yra reikšmingi, jų adekvatumas yra pakankamas, kad juos būtų galima naudoti visoje sudaryto modelio erdvėje. Abiejuose modeliuose temperatūra išliko svarbiausiu parametru, be to, abu nepriklausomieji parametrai ( $T$ ,  $t$ ) apskaičiuoti kaip reikšmingi tiriamajam atsakai. Modelio determinacijos koeficientai buvo atitinkamai  $R^2=0,85$  išreiškiant BFJK ekstrakto ir  $R^2=0,95$  išreiškiant sausoje medžiagoje. Norint atlikti detalesnę ir išsamesnę šio modelio analizę rekomenduojama jį patikslinti sumažinant modelio erdvę.

Iš atsako paviršiaus kreivių (**9 pav.**) galime aiškiai matyti, kaip keičiasi antioksidacinis aktyvumas kintant ekstrakcijos parametrams. Esant pastoviai temperatūrai (70 °C) didinant ekstrakcijos trukmę sumažėja ekstrakto antioksidacinis aktyvumas. Toks efektas gali atsirasti dėl šio ekstrakto praskiedimo kitomis medžiagomis, kurios nepasižymi AOA savybėmis. Visiškai priešingas rezultatas pastebimas analizuojant ekstrakcijos trukmės įtaką esant aukštai temperatūrai – 130 °C. Taikydami aukštą temperatūrą ir ilgą ekstrakcijos trukmę (41 min) galime išgauti ekstraktus, pasižyminčius didžiausiu fenolinių junginių kiekiu. Išreikškus BFJK sausai medžiagai mūsų modelis įgauna beveik tiesinę priklausomybę. Šiuo atveju ekstrakcijos trukmės ilginimas nebetenka prasmės, kadangi tai tik nedaug padidina fenolinių junginių kiekį, o temperatūros pakėlimas gali turėti didelės įtakos šių junginių išgavimui.



**9 pav.** Rugių sėlenų EOTPS acetoninių ekstraktų BFJK atsako paviršiaus kreivės

Papildomai buvo atliktas kietosios rugių sėlenų frakcijos antioksidacinių savybių įvertinimas taikant QUENCHER procedūrą (**4 lent.**). Iš šių rezultatų galime sužinoti, kurie ekstrakcijos procesai yra efektyviausi ekstrahuojant antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčius junginius, kaip skiriasi šių junginių kiekis po kiekvieno taikyto ekstrakcijos etapo. Atlikus SKE ekstrakciją antioksidacinis aktyvumas RS kietojoje frakcijoje nedaug padidėjo lyginant su neapdorota žaliava. Tokį pokytį galėjo lemti lipofiliškos frakcijos išgavimas – liekanoje padidėjo hidrofilios frakcijos kiekis. EOTPS ekstrakcija aukštoje temperatūroje (130 °C) efektyviau išekstrahavo bioaktyviuosius junginius lyginant su ilga ekstrakcija žemesnėje

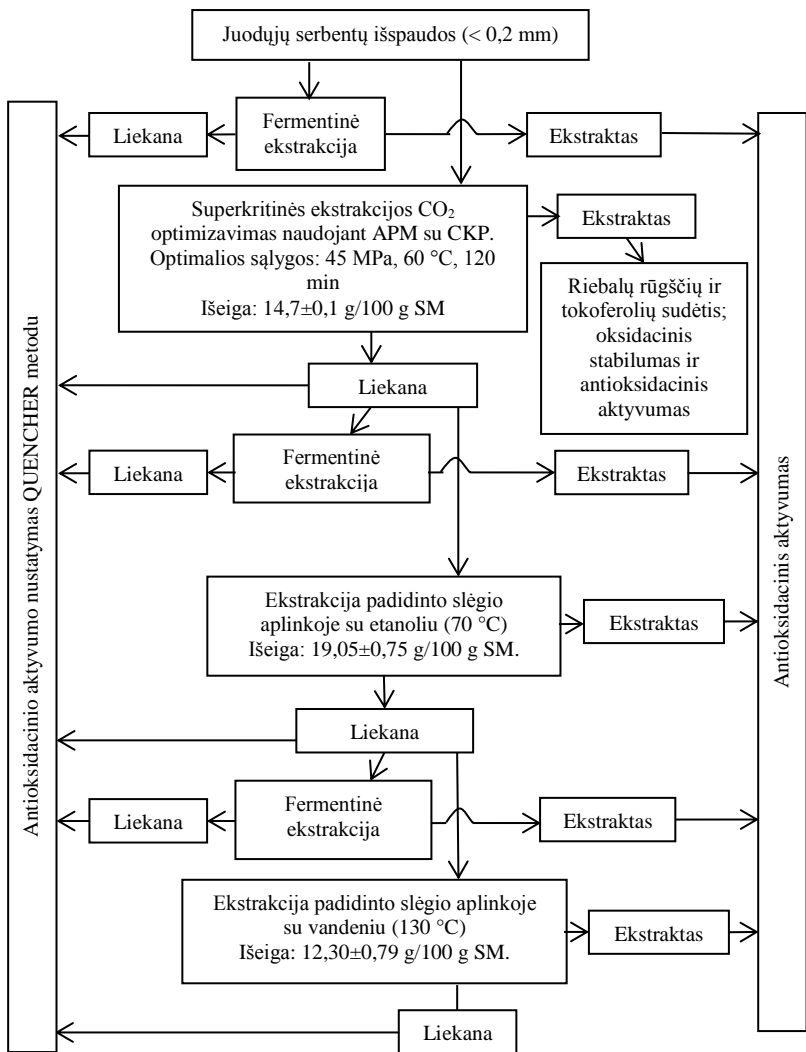
temperatūroje (70 °C) su acetonu. Be to, liekanoje po EOTPS–AC žemoje temperatūroje buvo nustatytas didesnis antioksidacinis aktyvumas beveik visais taikytais metodais. Didelis kietosios frakcijos AOA kritimas (du kartus) pastebėtas po EOTPS ekstrakcijos su poliniu tirpikliu EtOH/H<sub>2</sub>O taikant ABTS<sup>•+</sup> metodą. Panašus kritimas užfiksuotas ir kitais metodais tačiau tik tada, kai buvo taikoma ilgesnės trukmės ekstrakcija padidinto slėgio aplinkoje. Jei EOTPS ekstrakciją vykdome aukštoje temperatūroje, tada didelis AOA kritimas kietojoje frakcijoje pastebimas jau po pirmosios ekstrakcijos. Tačiau jei taikome žemesnę temperatūrą, galbūt galime pasiekti geresnį šių aktyviųjų junginių frakcionavimą.

**4 lentelė.** Kietosios rugių sėlenų frakcijos antioksidacinių savybių įvertinimas

Mėginys	BFJK, mg GRE/g	DPPH <sup>•</sup> , mg TE/g	ABTS <sup>•+</sup> , mg TE/g	FRAP, mg TE/g
Prieš SKE	6,310±0,182 <sup>d</sup>	12,393±0,656 <sup>d</sup>	46,769±5,624 <sup>bc</sup>	15,280±0,848 <sup>b</sup>
Po SKE	7,413±0,128 <sup>e</sup>	13,395±0,286 <sup>e</sup>	47,486±2,165 <sup>c</sup>	14,550±0,246 <sup>b</sup>
Po EOTPS su acetonu (130 °C, 40 min)	3,921±0,258 <sup>c</sup>	6,837±0,758 <sup>b</sup>	40,892±0,657 <sup>b</sup>	12,209±0,390 <sup>a</sup>
Po EOTPS su acetonu (70 °C, 80 min)	3,882±0,069 <sup>c</sup>	10,543±0,812 <sup>c</sup>	41,589±4,259 <sup>b</sup>	16,467±0,598 <sup>c</sup>
Po EOTPS su EtOH/H <sub>2</sub> O (130 °C, 40 min)	3,000±0,097 <sup>b</sup>	6,158±0,106 <sup>ab</sup>	22,317±2,268 <sup>a</sup>	–
Po EOTPS su EtOH/H <sub>2</sub> O (70 °C, 80 min)	1,643±0,248 <sup>a</sup>	5,471±0,196 <sup>a</sup>	23,870±0,234 <sup>a</sup>	–

### 3.3. Juodųjų serbentų išspaudų biorafinavimas į funkcionaliuosius junginius

Juodųjų serbentų išspaudoms biorafinuoti pritaikę modernius ekstrakcijos ir frakcionavimo metodus galime gauti daug įvairių specifinės sudėties ir savybių produktų. Šitie produktai gali labai padidinti šių šalutinių žaliavų perdirbimo efektyvumą. Uogų išspaudos yra puikus pridėtinės vertės maisto produktų šaltinis, daugelis jame esančių komponentų galėtų praturtinti mūsų mitybą vertingomis medžiagomis. Buvo sukurta daugiapakopė juodųjų serbentų biorafinavimo proceso schema norint išgauti kuo daugiau vertingų junginių. Pirmiausiai išgauta lipofiliška frakcija optimizuojant SKE procesą. Norint išgauti likusias tirpiąsias medžiagas tolimesnis žaliavos apdirbimas buvo vykdomas taikant EOTPS ir fermentinės ekstrakcijos sistemas su skirtingais tirpikliais (**10 pav.**).



10 pav. Juodųjų serbentų išspaudų biorafinavimo schema

### 3.3.1. Juodųjų serbentų išspaudų SKE optimizavimas

APM kartu su CKRP buvo pritaikyta optimizuoti ekstrakcijos parametrus taip, kad gautume didžiausią lipofiliškos frakcijos išėgą. Buvo optimizuoti tokie patys parametrai kaip ir eksperimente su rugių sėlenomis (slėgis, temperatūra, dinaminės ekstrakcijos trukmė), skyrėsi tik sudaryto

plano erdvė (parinktos kitos parametrų vertės). Ekstrakcijos rezultatai pateikti **5 lentelėje**.

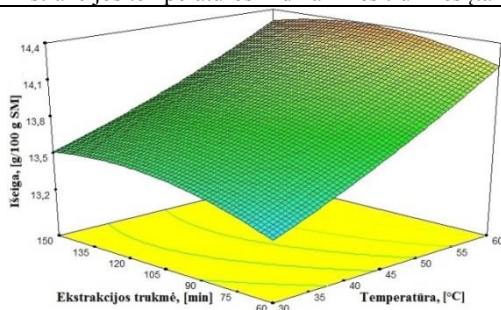
**5 lentelė.** CKRP parametrų vertės ir juodųjų serbentų išspaudų SKE ekstrakcijos rezultatas: 1–8 eksperimentiniai bandymai, 9–14 bandymai žvaigždiniuose taškuose ir 14–20 bandymai plano centre

Eil. nr.	Ekstrakcijos slėgis, MPa	Ekstrakcijos temperatūra, °C	Dinaminės ekstrakcijos trukmė,	Išeiga, g/100 g SM
1	30	30	60	12,90±0,01
2	55	30	60	13,26±0,37
3	30	60	60	14,17±0,32
4	55	60	60	13,85±0,47
5	30	30	150	12,92±0,26
6	55	30	150	13,62±0,27
7	30	60	150	13,85±0,63
8	55	60	150	14,25±0,66
9	21,48	45	105	12,84±0,47
10	63,52	45	105	13,42±1,20
11	42,5	19,77	105	13,28±0,09
12	42,5	70,23	105	14,71±0,03
13	42,5	45	29,32	13,32±1,20
14	42,5	45	180,68	13,69±1,03
15	42,5	45	105	13,78±0,36
16	42,5	45	105	13,60±0,67
17	42,5	45	105	14,03±0,27
18	42,5	45	105	13,90±0,20
19	42,5	45	105	14,04±0,09
20	42,5	45	105	14,14±0,56

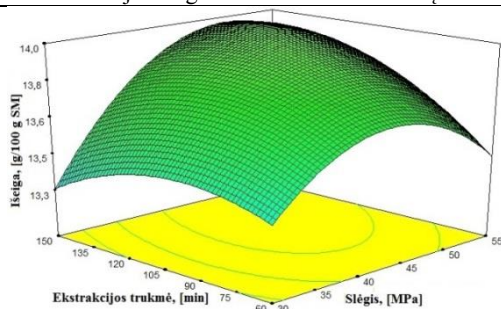
Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN.

Ekstrakcijos išeigos taikant skirtingus nepriklausomųjų kintamųjų sąrankos variantus skirtumai nebuvo labai dideli (12,84–14,71 g/100 g SM). Tačiau atlikus dispersinę duomenų analizę nustatyta, jog ekstrakcijos slėgis ir temperatūra yra reikšmingi ekstrakcijos išeigos optimizavimo parametrai. Sudaryto matematinio modelio atsako paviršiai pateikti **11 paveiksle**.

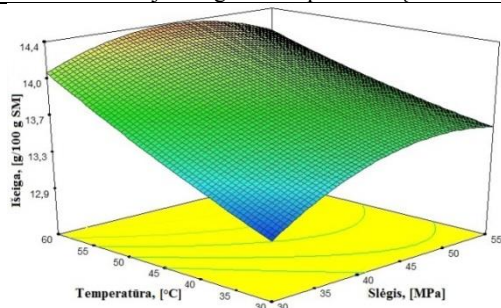
a) Pastovus ekstrakcijos slėgis, [42,5 MPa]  
Ekstrakcijos temperatūros ir dinaminės trukmės įtaka



b) Pastovi ekstrakcijos temperatūra, [45 °C]  
Ekstrakcijos slėgio ir dinaminės trukmės įtaka



c) Pastovus dinaminės ekstrakcijos laikas, [90 min]  
Ekstrakcijos slėgio ir temperatūros įtaka



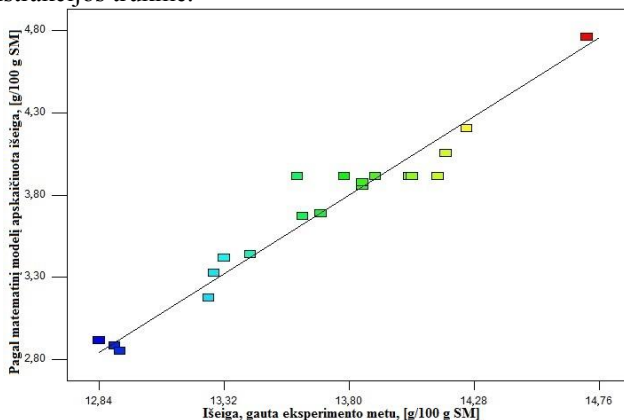
**11 pav.** Juodųjų serbentų išspaudų SKE atsako paviršiaus kreivės, parodančios ekstrakto išeigos priklausomybę nuo optimizuojamų parametru

Esant pastoviam ekstrakcijos slėgiui (42,5 MPa) (**11 pav., a**) ekstrakto išeiga didėja didinant temperatūrą. Ekstrakcijos trukmės prailginimas neturi

didelės reikšmės, ypač kai pasiekiamė 120 min nuo ekstrakcijos pradžios. Esant fiksuotai temperatūrai (**11 pav., b**), aiškiai matome, kokiomis sąlygomis galime pasiekti didžiausią išėigą (šiamė grafike matomas ekstremumas). 0,7 % ekstrakcijos išėigos prieaugis pastebimas proceso slėgį padidinus nuo 30 iki 45 MPa. Tolimesnis ekstrakcijos slėgio didinimas buvo neefektyvus, kaip ir ekstrakcijos laiko pratėsimas nuo 120 iki 150 min. Svarbiausių parametų saveikos efektai pavaizduoti paskutiniame grafike (**11 pav., c**). Abiejų parametų verčių kilimas padidina ekstrakcijos išėigą. Visame taikytame slėgio diapazone temperatūros padidėjimas nuo 30 iki 60 °C sukelia 1 % išėigos padidėjimą. Šiamė grafike pastebime, kad ekstrakcijos slėgio didinimas per 45 MPa nebeturi reikšmės.

Pasinaudojus sudarytu matematiniumi modeliu nustatytos sąlygos, kurias pritaikę galime gauti didžiausią išėigą (14,7 g/100 g SM): 45 MPa, 60 °C ir 120 min ekstrakcijos trukmė. Optimalios sąlygos patikrintos su didesniu ekstraktoriumi (500 mL ekstrakcijos celė), papildomai nustatyta reakcijos kinetika. Didžioji dalis ekstrakto išgaunama per pirmąsias 60 min, o pusiausvyra nusistovi po 100 minučių nuo reakcijos pradžios.




Trys nepriklausomieji kintamieji (slėgis, temperatūra ir laikas) 5 lygiais buvo optimizuoti taikant APM su CKRP. Dispersijos analizės rezultatai parodė, jog sudarytas modelis yra reikšmingas, nustatytas determinacijos koeficientas  $R^2=0,95$ . Eksperimento metu gautos ir naudojant matematinį modelį apskaičiuotos išėigos pateiktos **12 paveiksle**. Nustatyta, jog modelio signalas yra adekvatus ir jis gali būti naudojamas visoje sudaryto modelio erdvėje. Modelio analizė parodė, jog yra 5 išspaudų išėigai reikšmingi veiksniai:  $P$ ,  $T$ ,  $Pt$ ,  $P^2$ ,  $t^2$ . Visi optimizuoti kintamieji pagal jų įtaką ekstrakcijos efektyvumui gali būti surikiuoti šia tvarka: temperatūra, slėgis, ekstrakcijos trukmė.



**12 pav.** Juodųjų serbentų išspaudų ekstrakto išėigos, gautos eksperimento metu ir apskaičiuotos pagal sudarytą matematinį modelį (SSN neviršijo 10 %)

### 3.3.2. Išspaudų ekstraktija taikant tradicinius, pagreitintus ir fermentinius metodus

Juodųjų serbentų išspaudų SKE proceso optimizavimas leidžia mums išgauti iki 15 % lipofiliško ekstrakto. Gautas ekstraktas buvo geltonai žalsvos spalvos, o liekana po ekstrakcijos vis dar pasižymėjo tamsia sodria spalva. Galime daryti išvadą, jog šioje liekanoje yra likę natūralūs augalų pigmentai, kurie nepasišalina kartu su nepoliniu CO<sub>2</sub> (**13 pav.**). Tolimesniuose etapuose buvo taikomi kiti biorafinavimo būdai: tradiciniai ekstrakcijos metodai naudojant skirtingus tirpiklius jų poliškumo didėjimo tvarka; EOTPS kartu su etanolium ir papildomas ekstrakcijos likučio apdorojimas fermentiniais metodais. Tradicinių ekstrakcijos metodų išeiga priklausė nuo naudojamų tirpiklių poliškumo: naudojant AC – 17,5±0,8 g/100 g SM, o su EtOH/H<sub>2</sub>O – 18,53±0,88 g/100 g SM. EOTPS sistema buvo taikoma ekstrahuojant likutį po SKE optimaliomis sąlygomis. Nustatyta, jog naudodami EtOH galime išgauti 19,05±0,75 g/100 g SM, o vėliau panaudoję subkritinį vandenį – 12,30±0,79 g/100 g SM ekstrakto. Panašūs kiekiai ekstrakto išgaunami taikant tradicinius ir EOTPS metodus, tačiau padidinto slėgio aplinkoje ekstrakcija vyksta 16 kartų greičiau.

SKE ekstraktas	Juodųjų serbentų išspaudos			
	Neapdorotos	Po SKE optimizavimo	Po EOTPS su EtOH 70 °C	Po EOTPS su H <sub>2</sub> O 130 °C
				

**13 pav.** Juodųjų serbentų ekstraktas ir liekanos po įvairių ekstrakcijos etapų

Taikydami tradicinius ir didelio slėgio ekstrakcijos metodus iš juodųjų serbentų išspaudų galime išgauti iki 50 % tirpiųjų junginių. Norint padidinti išekstrahuojamos masės dydį taikyti fermentiniai ekstrakcijos metodai. Buvo naudojamas *Viscozyme L* fermentas ir palaikomos specifinės ekstrakcijos sąlygos: fermento substrato santykis – 6 %, temperatūra – 40 °C, ekstrakcijos laikas – 7 h, pH – 3,5. Palyginti fermentinės reakcijos efektyvumui buvo naudojamas papildomas fermentas *CelluStar XL*. Fermentai buvo naudojami uogų išspaudoms prieš SKE bei EOTPS–EtOH ekstrakciją ir po jos. Liekanos, ekstrahuotos subkritiniu vandeniu, nebuvo naudojamos fermentinei analizei. Manome, jog šios žaliavos apdorojimas fermentais yra netikslingas, kadangi visi ekstrahuojami junginiai turėtų būti išgaunami taikant EOTPS ir naudojant subkritinį vandenį. Fermentinės ekstrakcijos rezultatai pateikti **6**

**lentelėje.** Didžiausias tirpiųjų medžiagų kiekis išgautas iš žaliavos prieš ir po SKE, tačiau efektyviausiai FE veikė liekaną po EOTPS–EtOH. Lyginant su kontroliniu mėginiu tirpiųjų medžiagų kiekis šioje liekanoje padidėjo net du kartus. Kitas naudotas fermentas buvo ne toks aktyvus.

**6 lentelė.** Tirpiųjų medžiagų išeiga iš juodųjų serbentų išspaudų naudojant FE; fermento/substrato santykis 6 %, 40 °C, pH 3,5, 7 h

Juodųjų serbentų išspaudų frakcija	Išeiga*, g/100 g SM	Tirpiosios frakcijos padidėjimas**	
		g/100 g	%
Prieš SKE ( <i>Viscozyme L</i> )	39,92±0,26 <sup>c</sup>	17,97	94,89
Po SKE ( <i>Viscozyme L</i> )	39,47±0,11 <sup>c</sup>	18,28	86,27
Po EOTPS–EtOH ( <i>Viscozyme L</i> )	31,55± 0,07 <sup>b</sup>	21,32	208,52
Po EOTPS–EtOH ( <i>CelluStar XL</i> )	16,98 ± 0,14 <sup>a</sup>	6,76	66,06

\* Išeiga buvo apskaičiuota iš liofilizuoto filtrato atėmus kontrolinio mėginio masę (fermentas su buferiu); \*\* padidėjimas buvo apskaičiuotas iš liofilizuoto filtrato (liekana su fermentu ir buferiu) atėmus kontrolinio mėginio masę (liekana ir buferis) bei liofilizuoto buferinio tirpalo masę. Skirtingos raidės po vidutinių verčių pažymi reikšmingus skirtumus tame stulpelyje.

Taikydami trijų pakopų ekstrakciją (SKE, EOTPS–EtOH ir FE) galime išskirti apie 67 % visų tirpiųjų junginių. Papildomas fermentų panaudojimas gali reikšmingai padidinti tirpiųjų medžiagų išeigą. Augalo ląstelių sienelės yra suardomos, ir šie tirpūs junginiai tampa lengviau pasiekiami skirtingiems tirpikliams.

### 3.3.3. Lipofiliško ekstrakto RR bei tokoferolių sudėtis ir jo stabilumas

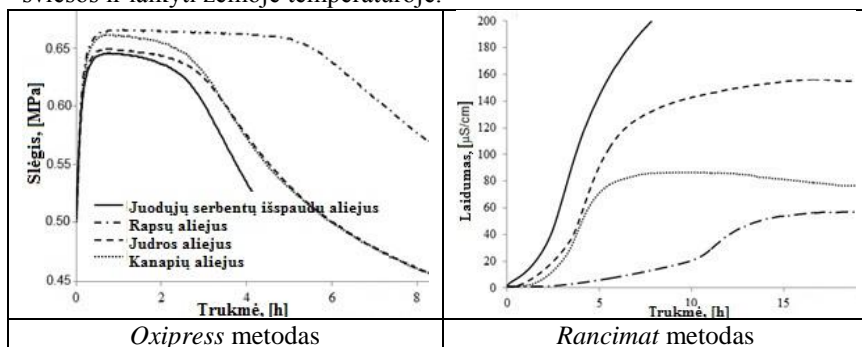
Kadangi CO<sub>2</sub> yra nepolinis tirpiklis, jis puikiai tinka lipofilinių junginių ekstrakcijai. Jei ekstrahuojamoje medžiagoje yra nemažas kiekis sėklų ar jų dalelių, tada gaunami aliejingi ekstraktai, o šių vertė priklauso nuo jų sudėties. Pagrindiniai tokių ekstraktų komponentai paprastai būna triacilgliceroliai, kurių maistinė vertė labiausiai priklauso nuo jų sudėties. Riebalų rūgščių sudėtis buvo nustatyta juodųjų serbentų ekstrakto, gautame optimaliomis sąlygomis SKE sistemoje ir soksetu su HE. RR sudėtis buvo panaši abiejuose analizuotuose ekstraktuose. Didžiausias kiekis aptiktas linolo rūgšties (46,89–47,21 %),  $\gamma$ -linoleno (14,02–14,08 %), linoleno (13,80–13,88 %) ir oleino (11,84–11,79 %). Kitų RR buvo nustatyti daug mažesni kiekiai, o bendras nesočiųjų riebalų rūgščių kiekis buvo apie 86 %. Nesočiosios riebalų rūgštys ( $\alpha$ -linoleno ir linolo) padeda palaikyti normalų kraujospūdį bei cholesterolio kiekį. Juodųjų serbentų išspaudų ekstraktai galėtų būti naudojami kaip vertingi funkciniai priedai įvairiuose maisto papilduose ar kituose panašiuose produktuose.

Tokoferoliai yra vieni iš svarbiausių lipofiliškų antioksidantų, kurie veikia įvairiose biologinėse sistemose. Nustatyta jų koncentracija tirtame



juodųjų serbentų išspaudų ekstrakto ( $\mu\text{g/g}$  ekstrakto):  $\alpha$ -tokoferolis –  $789\pm 33$ ;  $\gamma$ -tokoferolis –  $1511\pm 27$ ;  $\delta$ -tokoferolis –  $168\pm 4$ ; iš viso – 2468. Tirtame ekstrakto yra gan nemažas vitamino E kiekis, o šis vitaminas gali veiksmingai apsaugoti nuo oksidacinio streso.

Papildomai įvertintas išgauto aliejaus oksidacinis stabilumas. Šviežiai spaustame aliejuje nustatytas peroksidų skaičius –  $2,43\pm 0,09$  meq/kg. Tiriant oksidacinį stabilumą *Oxipress* ir *Rancimat* (14 pav.) metodais šis aliejus gana greitai oksidavosi palyginus su kitais tirtais aliejais. Indukcijos periodas buvo 2,39 h *Oxipress* teste ir 2,46 h *Rancimat* teste. Kitiems aliejams šis laikas buvo kiek ilgesnis. Juodųjų serbentų išspaudų aliejuje aptiktas didelis kiekis nesočiųjų RR, kurios greitai oksiduojasi, todėl jis turi būti atitinkamai tvarkomas. Reikia vengti tiesioginio kontakto su deguonimi, apsaugoti nuo šviesos ir laikyti žemoje temperatūroje.



14 pav. Juodųjų serbentų išspaudų SKE ekstrakto oksidacinio stabilumo kreivės palyginimas su kitais aliejais

### 3.3.5. Ekstraktų ir kietosios frakcijos antioksidacinis aktyvumas

AOA tyrimų rezultatai pateikti 7 lentelėje. Čia matyti, jog BFJK junginių kiekis nelabai keitėsi naudojant nepolinius bei mažo poliškumo tirpiklius. Keturis kartus didesnis aktyvumas ( $119,5\pm 6,5$  mg GRE/g ekstrakto) nustatytas ekstraktuose, išgautuose naudojant polinio tirpiklio mišinį (EtOH/H<sub>2</sub>O) esant atmosferiniam slėgiui. Kiek mažesnis aktyvumas nustatytas EOTPS–EtOH ir EOTPS–H<sub>2</sub>O ekstraktuose, bet čia ekstrakcija buvo vykdoma pakopomis. Didžiausias fenolinių junginių kiekis yra sukonzentruotas polinėje juodųjų serbentų išspaudų frakcijoje. Gauti ekstraktai buvo įvertinti ir kitais AOA nustatymo metodais. Ekstraktai, kurie buvo gauti nepoliniais tirpikliais (heksanu, CO<sub>2</sub>) pasižymėjo nedideliu aktyvumu (ORAC – 11,35–13,24 mg TE/g), o AC ir EtOH/H<sub>2</sub>O ekstraktuose nustatytas kelis kartus didesnis aktyvumas (ORAC – 261,40–661,90 mg TE/g).

**7 lentelė.** BFJK kiekis bei antioksidacinis aktyvumas juodųjų serbentų išspaudų ekstrakte ir kietojoje frakcijoje

Mėginys	BFJK, mg GRE/g	DPPH*, mg TE/g	ORAC, mg TE/g	FRAP, mg TE/g
<b>Ekstraktai, išgauti naudojant skirtingus tirpiklius ir taikant skirtingus metodus</b>				
Heksanas	27,02±1,57 <sup>a</sup>	2,31±0,20 <sup>a</sup>	13,24±0,92 <sup>a</sup>	25,23±2,21 <sup>a</sup>
Acetonas	27,49±1,43 <sup>a</sup>	40,69±3,43 <sup>b</sup>	261,40±21,60 <sup>b</sup>	70,80±2,62 <sup>b</sup>
Etanolis:vanduo	119,50±6,50 <sup>d</sup>	172,10±10,60 <sup>c</sup>	661,90±48,90 <sup>d</sup>	348,60±23,00 <sup>c</sup>
SKE	24,34±1,45 <sup>a</sup>	1,59±0,08 <sup>a</sup>	11,35±1,15 <sup>a</sup>	25,00±0,97 <sup>a</sup>
EOTPS–EtOH	64,75±0,94 <sup>b</sup>	–	330,60±18,60 <sup>c</sup>	–
EOTPS–H <sub>2</sub> O	79,84±0,70 <sup>c</sup>	–	329,30±16,40 <sup>c</sup>	–
<b>Uogų išspaudos ir liekanos po ekstrakcijos</b>				
Neapdorotos išspaudos	23,60±1,56 <sup>d</sup>	54,80±4,76 <sup>b</sup>	51,81±4,60 <sup>c</sup>	106,40±7,20 <sup>b</sup>
Po heksano	27,12±1,66 <sup>e</sup>	72,69±8,06 <sup>c</sup>	91,29±7,19 <sup>e</sup>	121,30±5,80 <sup>bc</sup>
Po acetono	22,05±1,46 <sup>d</sup>	78,46±5,76 <sup>c</sup>	56,80±3,62 <sup>c</sup>	135,90±10,60 <sup>c</sup>
Po EtOH/H <sub>2</sub> O	10,07±0,41 <sup>b</sup>	14,45±0,18 <sup>a</sup>	5,67±0,36 <sup>a</sup>	57,00±3,40 <sup>a</sup>
Po SKE	27,83±1,62 <sup>e</sup>	77,34±6,61 <sup>c</sup>	79,19±3,58 <sup>d</sup>	114,40±9,80 <sup>b</sup>
Po EOTPS–EtOH	16,71±0,53 <sup>c</sup>	–	39,71±2,12 <sup>b</sup>	–
Po EOTPS–H <sub>2</sub> O	3,80±0,17 <sup>a</sup>	–	5,51±0,73 <sup>e</sup>	–

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN; raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp apskaičiuotų vidurkių

AOA liekanose (kietojoje frakcijoje) nustatytas taikant QUENCHER procedūrą (**7 lent.**). Šis metodas įvertina ne tik laisvas (tirpias) aktyviasias medžiagas, bet ir surištas (netirpias). Taikydami šį metodą galime nustatyti, kurie biorafinavimo metodai yra efektyviausi ir tinkamiausi išskirti tam tikriems junginiams. Žaliavą apdorojus SKE, BFJK beveik nepakito, panaši tendencija buvo apdorojant atmosferinio slėgio aplinkoje su acetonu. Didžiausias šių junginių kiekio sumažėjimas nustatytas liekanose po apdoravimo su EtOH/H<sub>2</sub>O mišiniu. Šių junginių kiekis itin sumažėjo ir EOTPS sistemoje naudojant poliškesnius tirpiklius EtOH ir H<sub>2</sub>O. BFJK kiekis apdorojus EtOH/H<sub>2</sub>O liekanoje buvo mažesnis nei EOTPS–EtOH, vanduo yra svarbus papildomas tirpiklis išskirti uogų išspaudose esantiems fenoliniams junginiams. Pagal šiuos duomenis galime matyti, jog mažiausias kiekis vertingų fenolinių junginių lieka po visų etapų padidinto slėgio aplinkoje (3,80±0,17 g GRE/g liekanos), atmosferinio slėgio aplinkoje šis kiekis didesnis (10,07±0,41 g GRE/g liekanos). Išmatavus AOA kitais metodais nustatyta, kad liekanoje jis padidėjo po SKE ir ekstrakcijos su

heksanu, kaip ir BFJK atveju. Po ekstrakcijos su acetonu nustatytas ORAC vertės sumažėjimas, nedaug pakito DPPH• ir FRAP kiekis. Pats didžiausias AOA kritimas liekanose pastebėtas po ekstrakcijos su EtOH/H<sub>2</sub>O bei EOTPS. Likutinis ORAC kiekis liekanose po visų ekstrakcijų buvo panašus atmosferinio ir padidinto slėgio aplinkoje. Kaip ir BFJK atveju, didesniu efektyvumu pasižymėjo EOTPS metodika.

AOA nustatytas ekstraktuose (**8 lent.**) ir liekanose, gautose po fermentinės ekstrakcijos (**9 lent.**). Didesnis fenolinių junginių kiekis nustatytas ekstraktuose su buferiniu tirpalu. Perskaičius AOA vertes sausoms išspaudoms nustatyta, jog kiek didesniu aktyvumu pasižymėjo ekstraktai, išgauti naudojant fermentus. Ši tendencija užfiksuota atliekant beveik visus matavimus. Fermentų panaudojimas didina tirpiųjų medžiagų kiekį (**6 lent.**) ir gerina antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių išgavimą iš juodųjų serbentų išspaudų. FE ekstraktų aktyvumas beveik nepakinta apdorojus SKE, o didesnis sumažėjimas pastebimas tik po žaliavos apdorojimo su EOTPS–EtOH. *CelluStar XL* fermentu išgauti ekstraktai pasižymėjo kiek didesniu aktyvumu, tačiau šių ekstraktų išeiga buvo beveik 2 kartus mažesnė.

**8 lentelė.** Juodųjų serbentų išspaudų FE ekstraktų, gautų po įvairių biorafinavimo etapų, antioksidacinės savybės

Mėginys	BFJK, mg GRE/g		ABTS <sup>•+</sup> , mg GRE/g		ORAC, mg GRE/g	
	ekstrakto	SM*	ekstrakto	SM*	ekstrakto	SM*
<b>Prieš SKE:</b>						
Išspaudos ir <i>Viscozyme L</i>	21,11±0,49 <sup>b</sup>	8,43±0,20 <sup>e</sup>	107,9±2,40 <sup>b</sup>	43,09±0,98 <sup>e</sup>	60,90±1,90 <sup>b</sup>	24,31±0,76 <sup>d</sup>
Išspaudos ir buferinis tirpalas	36,32±0,60 <sup>e</sup>	7,97±0,13 <sup>d</sup>	183,0±2,90 <sup>e</sup>	40,16±0,65 <sup>d</sup>	117,7±6,00 <sup>e</sup>	25,84±1,31 <sup>d</sup>
<b>Po SKE:</b>						
Išspaudos ir <i>Viscozyme L</i>	21,14±0,76 <sup>b</sup>	8,34±0,30 <sup>e</sup>	109,9±3,10 <sup>b</sup>	43,38±1,22 <sup>e</sup>	79,74±8,35 <sup>c</sup>	31,47±3,30 <sup>e</sup>
Išspaudos ir buferinis tirpalas	33,23±0,75 <sup>d</sup>	7,04±0,16 <sup>c</sup>	162,7±3,00 <sup>d</sup>	34,47±0,64 <sup>c</sup>	95,21±3,88 <sup>d</sup>	20,17±0,82 <sup>c</sup>
<b>Po EOTPS–EtOH:</b>						
Išspaudos ir <i>Viscozyme L</i>	9,29±0,60 <sup>a</sup>	2,93±0,19 <sup>a</sup>	54,78±3,18 <sup>a</sup>	17,28±1,00 <sup>b</sup>	18,86±1,33 <sup>a</sup>	5,95±0,42 <sup>a</sup>
Išspaudos ir <i>CelluStar XL</i>	20,86±0,31 <sup>b</sup>	3,54±0,05 <sup>b</sup>	109,5±6,10 <sup>b</sup>	18,60±1,04 <sup>b</sup>	64,31±5,78 <sup>b</sup>	10,92±0,98 <sup>b</sup>
Išspaudos ir buferinis tirpalas	26,43±0,58 <sup>c</sup>	2,70±0,06 <sup>a</sup>	132,2±2,80 <sup>c</sup>	13,52±0,29 <sup>a</sup>	91,32±7,14 <sup>d</sup>	9,34±0,73 <sup>b</sup>

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN; raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp apskaičiuotų vidurkių

FE liekanoje (**9 lent.**) BFJK (naudojant tik buferinį tirpalą) nedaug keitėsi po ekstrakcijos su superkritiniu CO<sub>2</sub> ir sumažėjo po ekstrakcijos su etanoliumi. Naudojant fermentus BFJK po pirmo ekstrakcijos etapo (CO<sub>2</sub>) padidėjo, tačiau po antrojo (EOTPS– EtOH) išliko nepakitęs. Po fermentinės EOTPS–ET liekanos ekstrakcijos gavome 3 kartus didesnę tirpiųjų medžiagų išeigą lyginant su žaliavos apdorojimu buferiniu tirpalu. Tačiau BFJK kiekis 1 g liekanos tik šiek tiek padidėjo, o išspaudų kiekis po fermentacijos buvo daug mažesnis. Todėl BFJK yra panašus kietojoje frakcijoje po SKE ir

EOTPS–EtOH. Matuojant ABTS<sup>•+</sup> radikalų surišimo efektyvumą nustatyta, kad jis padidėja po SKE – šie junginiai sukonzentruojami. Tokia pati tendencija pastebėta kietojoje frakcijoje po FE naudojant EOTPS–ET liekaną. Deguonies radikalus surišančių junginių (ORAC) koncentracija mažėjo laipsniškai visuose etapuose. Iš gautų duomenų matyti, jog liekanoje po FE ir EOTPS likę nemažai aktyviųjų medžiagų, nors tirpiųjų medžiagų išėiga yra pakankamai didelė. Papildomas tokios žaliavos apdorojimas EOTPS–H<sub>2</sub>O galėtų sumažinti šių junginių kiekį iki minimumo.

**9 lentelė.** Juodųjų serbentų išspaudų FE liekanų, gautų po įvairių biorafinavimo etapų, antioksidacinės savybės

Mėginys	BFJK, mg GRE/g SM	ABTS <sup>•+</sup> , mg TE/g SM	ORAC, mg TE/g SM
<b>Prieš SKE:</b>			
Neapdorotos išspaudos	23,52±1,56 <sup>bc</sup>	261,20±20,90 <sup>c</sup>	65,35 ±1,96 <sup>f</sup>
Išspaudos ir <i>Viscozyme L</i>	21,20±1,98 <sup>b</sup>	205,80±8,00 <sup>b</sup>	46,87 ±1,68 <sup>de</sup>
Išspaudos ir buferinis tirpalas	25,24±1,64 <sup>bc</sup>	202,60±15,60 <sup>b</sup>	41,39 ±2,77 <sup>d</sup>
<b>Po SKE:</b>			
Neapdorotos išspaudos	26,87±1,01 <sup>c</sup>	234,90 ±4,60 <sup>bc</sup>	77,87 ±5,86 <sup>g</sup>
Išspaudos ir <i>Viscozyme L</i>	25,97±2,23 <sup>c</sup>	219,50 ±21,30 <sup>bc</sup>	41,00 ±3,18 <sup>d</sup>
Išspaudos ir buferinis tirpalas	25,76±1,83 <sup>c</sup>	263,30 ±25,40 <sup>c</sup>	53,48 ±3,22 <sup>e</sup>
<b>Po EOTPS–EtOH:</b>			
Neapdorotos išspaudos	16,71±0,53 <sup>a</sup>	152,40 ±15,80 <sup>a</sup>	39,71 ±2,12 <sup>cd</sup>
Išspaudos ir <i>Viscozyme L</i>	26,25±2,57 <sup>c</sup>	336,20 ±26,00 <sup>d</sup>	27,71 ±2,27 <sup>ab</sup>
Išspaudos ir <i>CeluStar XL</i>	22,86±1,10 <sup>bc</sup>	254,20 ±19,40 <sup>bc</sup>	22,98 ±0,85 <sup>a</sup>
Išspaudos ir buferinis tirpalas	21,20±1,55 <sup>b</sup>	262,80 ±24,90 <sup>c</sup>	33,14 ±3,12 <sup>bc</sup>

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN; raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp apskaičiuotų vidurkių

## IŠVADOS

1. Naudojant metanolio–vandens mišinį (polinių junginių ekstrakcija) ekstrakcijos organiniais tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje sistemoje rugių ir kviečių sėlenų ekstraktų išeiga buvo kur kas didesnė nei naudojant kitus tirpiklius (heksaną ar acetoną). Didesnė ekstraktų išeiga buvo gauta iš rugių sėlenų lyginant su kvietinėmis. Mažinant kviečių ir rugių sėlenų dalelių dydį – didėja ekstrakto išeiga naudojant metanolio–vandens mišinį.
2. Rugių sėlenų ekstraktai pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei kviečių sėlenų ekstraktai. Bendras fenolinių junginių kiekis rugių sėlenų ekstraktuose, išgautuose metanolio–vandens mišiniu (0,83–1,42 mg GRE/g SM), buvo apie 2 kartus didesnis lyginant su ekstraktais, išgautais heksanu (0,31–0,68 mg GRE/g SM) ir apie 2 kartus didesnis už ekstraktus, išgautus acetonu (0,33–0,48 mg GRE/g SM). Bendras ABTS<sup>•+</sup> radikalo surišimo efektyvumas rugių sėlenose mažėjo nuo 21,45 iki 12,25  $\mu\text{M TE/g SM}$  mažėjant dalelių dydžiui, priešinga priklausomybė nustatyta kviečių sėlenose – efektyvumas didėjo nuo 9,72 iki 17,44  $\mu\text{M TE/g SM}$ .
3. Taikant optimalias rugių sėlenų superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginio sąlygas didžiausia išeiga ( $2,49 \pm 0,01$  g/100 g SM) gaunama esant 55 MPa slėgiui, 70 °C temperatūrai, 120 min ekstrakcijos trukmei. Nustatyti reikšmingi proceso parametrai, kurie pagal svarbumą gali būti surikiuoti šia tvarka: temperatūra > slėgis > dinaminės ekstrakcijos trukmė. Gautame aliejuje didžiąją dalį riebalų rūgščių sudarė polinesočiosios riebalų rūgštys (iki 82 g/100 g aliejaus).
4. Apdorojant rugių sėlenų liekaną (po superkritinės ekstrakcijos) padidinto slėgio aplinkoje su acetonu didžiausia išeiga buvo pasiekta taikant 130 °C temperatūrą ir 41 min ekstrakcijos trukmę ( $1,96 \pm 0,11$  g/100 g SM). Apdorojus etanolio–vandens mišiniu pasiektos tokios išeigos:  $16,93 \pm 0,48$  g/100 g SM (70 °C ir 81 min);  $16,86 \pm 1,2$  g/100 g SM (130 °C ir 41 min). Rugių sėlenose esantys bioaktyvieji junginiai efektyviausiai yra išskiriami taikant ekstrakcijos sistemą su EtOH/H<sub>2</sub>O mišiniu, kadangi po visų ekstrakcijos etapų liekanoje lieka tik nedidelis kiekis fenolinių junginių ( $1,64 \pm 0,25$  mg GRE/g SM).
5. Apdorodami juodųjų serbentų išspaudas pagal sukurtą biorafinavimo schemą kartu su skirtingomis biorafinavimo technologijomis galime gauti 3 skirtingas frakcijas: optimizuotas superkritinės ekstrakcijos procesas (45 MPa, 60 °C, 120 min) leidžia išgauti didžiausią lipofilinės frakcijos kiekį ( $14,7 \pm 0,1$  g/100 g SM); apdorojė juodųjų serbentų liekaną po superkritinės ekstrakcijos padidinto slėgio aplinkoje su etanolio ( $19,05 \pm 0,75$  g/100 g SM) ir vandeniu ( $12,30 \pm 0,79$  g/100 g SM) gavome dar 2 frakcijas. Papildomas liekanos apdorojimas fermentais padidino bendrą tirpiųjų medžiagų išeigą nuo 50 iki 67 g/100 g SM.

6. Biorafinavimo proceso metu, taikydami ekstrakcijas padidinto slėgio aplinkoje ir fermentinius apdorojimo metodus, galime gauti vertingus juodųjų serbentų išspaudų ekstraktus. Superkritinis ekstraktas galėtų būti panaudojamas polinesočiųjų riebalų (kurių yra iki 86 g/100 g aliejaus) ir vitamino E (iki 2,47 mg/g ekstrakto) maisto papildų gamybai. Liekaną po šios ekstrakcijos apdoroję padidinto slėgio aplinkoje kartu su poliniais tirpikliais – etanoliu ( $64,75 \pm 0,94$  mg GRE/g ekstrakto) ir vandeniu ( $79,84 \pm 0,70$  mg GRE/g ekstrakto) – išgauname vertingus fenolinius junginius. Papildomas žaliavos apdorojimas fermentais padidina fenolinių ir kitų radikalus surišančių bioaktyviųjų junginių išėigą iš juodųjų serbentų išspaudų.

## MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

### **Straipsniai mokslinės informacijos instituto (ISI) pagrindinio sąrašo leidiniuose**

1. Darius Povilaitis, Petras Rimantas Venskutonis. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of rye bran using response surface methodology and evaluation of extract properties // The Journal of Supercritical Fluids. ISSN 0896-8446. 2015, vol. 100, p. 194–200 (ISI web of science, I.F. 2,371)
2. Darius Povilaitis, Vaida Šulniūtė, Petras Rimantas Venskutonis, Vaida Kraujalienė. Antioxidant properties of wheat and rye bran extracts obtained by pressurized liquid extraction with different solvents // Journal of Cereal Science. ISSN 0733-5210. 2015, vol. 62, p. 117–123 (ISI web of science, I.F. 2,094)

### **Konferencijų pranešimų medžiagoje**

1. Kitrytė, Vaida; Povilaitis, Darius; Kraujalienė, Vaida; Šulniūtė, Vaida; Pukalskas Audrius; Venskutonis, Petras Rimantas. Biorefining of sea buckthorn pomace and seeds into valuable components by using high pressure and enzyme-assisted extraction methods // Fruit and vegetable processing: 2nd Euro-mediterranean symposium on fruit and vegetable processing, April 4–6, 2016. Avignon, France: book of abstracts / INRA – National Institute for Agricultural Research, University of Avignon, France, p. 148.
2. Povilaitis, Darius; Kitrytė, Vaida; Venskutonis, Petras Rimantas; Dursun, Derya; Schulte, Johanna. Biorefining of rye bran by high pressure extraction technologies // FOODBALT – 2015: 10th Baltic conference on food science and technology „Future food: innovations, science and technology“, May 21–22, 2015, Kaunas, Lithuania: abstract book / Kaunas University of Technology, Kaunas: KTU, 2015, p. 25. ISBN 9786090211380.
3. Basegemez, Hatice Imge Oktay; Alasalvar, Cesarettin; Povilaitis, Darius; Venskutonis, Petras Rimantas. Optimization of supercritical SC-CO<sub>2</sub> extraction of *Ribes nigrum* L. berry pomace using response surface methodology // FOODBALT – 2015: 10th Baltic conference on food science and technology „Future food: innovations, science and technology“, May 21–22, 2015, Kaunas, Lithuania: book of abstracts / Kaunas University of Technology, Kaunas: KTU, 2015, p. 16. ISBN 9786090211380.
4. Povilaitis, Darius; Venskutonis, Petras Rimantas. Optimization of rye bran supercritical CO<sub>2</sub> extraction by response surface methodology // ISEKI Food 2014: 3<sup>rd</sup> international conference “Food science and technology excellence for sustainable bioeconomy, May 21–23, 2014. Athens, Greece: book of abstracts / ISEKI Food Association, Athens: National Technical University of Athens, 2015, p. 87. ISBN 9789608978980.
5. Povilaitis, Darius; Venskutonis, Petras Rimantas. Extraction of bioactive compounds from rye bran using different extraction techniques //



FOODBALT – 2014: 9th Baltic conference on food science and technology „Food for consumer well-being“, May 8–9, 2014, Jelgava, Latvia: book of abstracts / Latvia University of Agriculture, Jelgava, 2014, p. 133. ISSN 2255-9809.

6. Venskutonis, Petras Rimantas; Šulniūtė, Vaida; Povilaitis, Darius; Jaime, Isabel; Rovira, Jordi. Rye and wheat bran extracts – a source of functional ingredients // Functional foods, nutraceuticals, natural health products, and dietary supplements: 2014 Annual conference and exhibition. October 14–17, 2014, Istanbul, Turkey: book of abstracts / International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF), p. 357.

### **Kiti renginiai**

1. Povilaitis, Darius; Venskutonis, Petras Rimantas. Uogų išspaudų biorafinavimas į vertingas funkcines medžiagas. // „Technorama‘2016“ jaunųjų mokslininkų paroda-konkursas, Kauno technologijos universitetas, Kaunas. Darbų katalogas, p. 149–150.

### **Trumpa informacija apie autorių**

Darius Povilaitis gimė 1988 m. vasario 09 d. Kaune.

#### **Išsilavinimas:**

1998–2006	Kauno „Saulės“ gimnazija. Brandos atestatas.
2006–2010	Kauno technologijos universitetas. Cheminės technologijos fakultetas. Chemijos inžinerijos bakalauro kvalifikacinis laipsnis.
2010–2012	Kauno technologijos universitetas. Cheminės technologijos fakultetas. Chemijos inžinerijos magistro kvalifikacinis laipsnis. Baigta su pagyrimu.
2012–2016	Kauno technologijos universitetas. Cheminės technologijos fakultetas. Doktorantūros studijos.

#### **Stażuotės:**

2011.02–2011.07	Erasmus stažuotė Tulūzos nacionaliniame politechnikos institute INP-ENSIACET. Tulūza, Prancūzija.
2011.07.04–16	Erasmus intensyvieji kursai „Sustainable Utilization of Renewable Resources“ Karl-Franzens universitetas (KFUG), Gracas, Austrija.
2013.06.09–22	Erasmus intensyvieji kursai „Modelling in systems biology and synthetic biology“, Jelgava, Latvija.

#### **Mokslinių interesų sritis:**

Bioaktyviųjų junginių iš augalinės žaliavos ekstrakcija/frakcionavimas taikant įvairius padidinto slėgio ir kitus ekstrakcijos metodus.

el. paštas: dareuspo@yahoo.com

# **BIOREFINING THE BY-PRODUCTS OF PLANT MATERIAL PROCESSING INTO VALUABLE FUNCTIONAL INGREDIENTS BY APPLYING VARIOUS EXTRACTION TECHNIQUES**

## **SUMMARY**

### **INTRODUCTION**

There is a growing demand for healthy food products, since more and more people are concerned about their health. Consequently, many researchers are searching for new, natural and valuable bioactive compounds. Finding new, safe and effective antioxidants from natural sources is an important task, since their beneficial effect on human health is well known. Furthermore, it is crucial to reduce the growing production of industrial waste. Combining novel plant biomass conversion technologies allows to decrease by-product production and develop new promising value-added products and chemicals (Ravindran & Jaiswal, 2015).

Cereal bran is an often inefficiently used by-product from flour milling, although it can be a great source for the extraction of valuable compounds. It is the nutritional storehouse of grains and its resources can be used to enrich our diet with various bioactive compounds, such as dietary fibers, essential fatty acids, phytosterols, various antioxidants, minerals, vitamins and proteins (Patel, 2012). Even though it is assumed that the entire wheat grain is used for flour production, about 175 million tons of bran is produced every year. Since rye grain is mainly used in the Nordic countries, the amount of rye bran is lower and comprises about 3.75 million tons. Fruit pomaces can also be a great stock of various bioactive compounds. The production of different juices from berries results in high amounts of valuable residue. This by-product is a rich source of food ingredients and functional constituents which can be applied to enhance the functionality of food products. Usually, positive effects on health are visible when sufficient amounts of required components are consumed. However, it is difficult to obtain this quantity through consumption of fresh fruit or common commercial products, thus food additives that contain sufficient amount of the compounds which have a positive effect on health can be prepared by using different by-product processing techniques (Galanakis, 2012a).

In order to successfully obtain valuable compounds, it is best to consecutively employ different extraction technologies. One of the possibilities is to use high pressure extraction technologies which are very efficient, fairly easy to handle and usually require less harmful solvents. The best results can be achieved by applying these technologies accompanied by various mathematical optimization techniques.

This study investigates the valorization of rye and wheat bran and blackcurrant pomace using multistep processes for biorefining the biomass into high value food-grade functional ingredients. Firstly, rye and wheat bran antioxidant activity was evaluated by using pressurized solvent extraction with organic solvents. Then, environmentally friendly supercritical carbon dioxide extraction was optimized using response surface methodology with central composite design for effective isolation of lipophilic fraction. Finally, pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extractions were applied to isolate higher polarity substances. Different antioxidant activity assays were applied to determine the best fractions for the value-added ingredient production.

### **Aim of the thesis**

The aim of the thesis is to develop effective schemes for biorefining cereal bran and blackcurrant pomace into valuable functional ingredients by using effective high pressure extraction/fractionation and enzymatic treatment techniques.

### **Objectives of the thesis are:**

1. To evaluate the influence of extraction solvent and particle size on the recovery of rye and wheat bran extract.
2. To evaluate the influence of extraction solvent and particle size on the antioxidant properties of rye and wheat bran extracts.
3. To optimize the process of supercritical carbon dioxide extraction for isolating lipophilic fraction from rye bran and to evaluate the properties of the obtained extracts.
4. To evaluate the possibilities of rye bran fractionation using pressurized liquid extraction technologies and extract characterization. To optimize the process of pressurized liquid extraction with acetone.
5. To develop a scheme for biorefining blackcurrant pomace by optimizing high pressure and enzyme-assisted extraction parameters.
6. To evaluate the properties of blackcurrant pomace extract and to explore the possibility to use it as food supplement or additive.

### **Scientific novelty**

1. Pressurized liquid extraction has been applied and comprehensively evaluated for the isolation of bioactive substances from rye and wheat bran for the first time. Moreover, the scientific knowledge on rye bran extraction, fractionation and characterization of the products obtained has been substantially expanded in general, since so far the processing of rye bran has been remarkably less studied than that of wheat bran.

2. The optimization of supercritical carbon dioxide extraction parameters for isolating the highest yields of lipophilic fraction from rye bran has not been performed before this research.

3. This research pioneers in optimizing the supercritical carbon dioxide extraction parameters for isolating lipidic fraction from blackcurrant pomace and developing a scheme combining pressurized liquid and enzyme-assisted extraction for biorefining blackcurrant pomace into valuable functional ingredients.

### **The practical value of the work**

During flour milling or various fruit juice production large amounts of agro product waste, such as cereal bran and berry pomaces are accumulated from different production lines. These materials are usually discarded (mainly berry pomace) or used rather inefficiently, although they can be a rich source of valuable components. By applying novel extraction technologies and biorefining, these unexploited materials can be transformed into very beneficial products. Since every material has a unique biological and chemical structure, it is very important to evaluate possible applications and extraction methods individually. By applying high pressure extraction technologies alongside with mathematical modeling tools, it is possible to achieve high efficiency in fractionation and recover valuable compounds. To the best of our knowledge, no existent experiments have analyzed the composition of rye and wheat bran antioxidants by pressurized liquid extraction applying different solvents. Furthermore, there have not been any experiments optimizing supercritical carbon dioxide extraction of rye bran or blackcurrant pomace. Furthermore, this is the first time that a combination of supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction is used on these materials. The most important variables have been optimized in order to achieve the highest efficiency of the applied process. By consecutively applying these methods almost all valuable components can be extracted from the analyzed material. After extraction, the residue can be used for biofuel production. The results obtained on laboratory equipment may be applied for upscaling the processes to pilot plant and finally industrial levels. Consequently, the results of the study may be considered as the first and important step for the commercialization of the developed biorefining schemes.

### **Structure and outline of the dissertation**

This dissertation is divided into the following parts: the list of abbreviations, the introduction, the literature review, materials and methods, results and discussion, conclusions, a list of 164 references and a list of publications on the topic of the dissertation. The literature overview and results of the research are presented in 104 pages, including 33 figures and 16 tables.

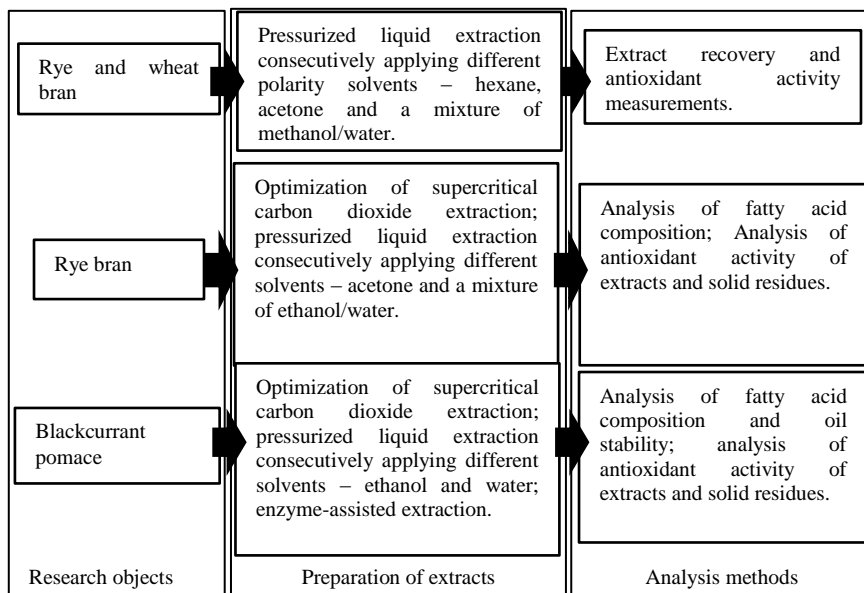
## Publication of the research results

The results of this research are presented in two publications, corresponding to the list of the Thompson Reuters Web of Science database, and reported at 6 international conferences.

## Statements presented for defense of the dissertation

1. High performance extraction techniques, such as pressurized liquid extraction and supercritical carbon dioxide extraction, may be efficiently applied for isolating valuable substances from rye and wheat bran; whereas response surface methodology using central composite design may provide reliable mathematic models for the optimization of extraction parameters.
2. Selecting combined high pressure and enzyme-assisted extraction methods and schemes as well as optimization of their parameters may provide efficient blackcurrant pomace biorefining technology for obtaining high value bioactive substances.

## Thesis research scheme



**Figure 1.** Thesis research scheme

## CONCLUSIONS

1. The yields obtained with pressurized liquid extraction and methanol/water (extracting polar compounds) from rye and wheat brans are considerably higher in comparison to the extract yields isolated with hexane and acetone. In general, the accumulative yields of extracts isolated from rye bran are higher in comparison to wheat bran. The yield of methanol extract of wheat and rye bran can be increased by decreasing the particle size.
2. Rye bran extracts, in general, are stronger antioxidants than wheat bran extracts. The amounts of total phenolic content in rye bran extract isolated with methanol (0.83–1.42 mg GAE/g DW) are about 2 times higher than in hexane extract (0.31–0.68 mg GAE/g DW) and 3 times higher than in extract isolated using acetone (0.33–0.48 mg GAE/g DW). Radical scavenging capacity of ABTS<sup>•+</sup> assay reveals notable differences between rye and wheat brans with regards to decreasing the particle size: in rye bran it decreases (from 21.45 to 12.25  $\mu$ M TE/g DW) and in wheat bran it increases (from 9.72 to 17.44  $\mu$ M TE/g DW).
3. Supercritical fluid extraction conditions have been optimized and the highest rye bran oil yield (2.49 $\pm$ 0.01 g oil/100 g DW) is obtained at 55 MPa pressure and 70 °C temperature in 120 min of extraction. It is established that in terms of significance these parameters can be arranged in the following order: temperature > pressure > dynamic extraction time. The extract of rye bran oil appears to be rich in unsaturated fatty acids (up to 82 g/100 g oil).
4. The highest yield for rye bran residue (after supercritical fluid extraction) using pressurized liquid extraction with acetone can be obtained using 130 °C temperature for 41 min of extraction – 1.96 $\pm$ 0.11 g/100 g DW. The extract yield using pressurized liquid extraction system with ethanol/water mixture is 16.93 $\pm$ 0.48 g/100 g DW (at 70°C and 81 min) and 16.86 $\pm$ 1.21 g/100 g DW (at 130 °C and 41 min). Pressurized liquid extraction using ethanol/water mixture appears to be the most efficient for extracting phenolic antioxidant compounds from the rye bran residue and the amount of total phenolic compounds in the final residue is small (1.643 $\pm$ 0.248 mg GAE/g).
5. Applying the scheme developed for biorefining blackcurrant pomace using high pressure and enzyme-assisted extraction 3 valuable fractions can be obtained: supercritical carbon dioxide extraction at optimized conditions (45 MPa pressure, 60 °C temperature, 120 min extraction time) gives 14.7 $\pm$ 0.1 g/100 g DW extract yield; pressurized liquid extraction of the residue (after supercritical fluid extraction) with ethanol (19.05 $\pm$ 0.75 g/100g DW) and water (12.30 $\pm$ 0.79 g/100 g DW) provide 2 more fractions. Additional enzyme-assisted extraction step can considerably increase the extraction yield of soluble substances (from 50 up to 67 g/100 g DW).
6. The products obtained by biorefining of blackcurrant pomace using high pressure and enzyme-assisted extractions may be considered as valuable

ingredients for producing food supplements and functional foods. Lipophilic extracts may be used for polyunsaturated fatty acids (up to 86 g/100 g oil) or for vitamin E (up to 2.47 mg/g EDW) supplement production. Ethanol (64.75±0.94 mg GAE/g EDW) and water (79.84±0.70 mg GAE/g EDW), as polar solvents, seem to be effective in extracting polyphenolics present in blackcurrant pomace. Further enzymatic treatment may assist in releasing phenolic and radical scavenging compounds.

## **Padėka**

Nuoširdžiai dėkoju savo moksliniam vadovui prof. dr. Petrui Rimantui Venskutoniui už visokeriopą pagalbą vykdant mokslinius tyrimus, rašant straipsnius bei rengiant šią disertaciją. Taip pat dėkoju KTU Maisto mokslo ir technologijų katedros kolegoms už pagalbą vykdant mokslinius tyrimus bei gerą darbinę atmosferą. Labai ačiū mano žmonai ir šeimai už kantrybę, rūpestį ir pasitikėjimą.

UDK 542.61+634.723+633.1](043.3)

SL344. 2016-11-14, 2,75 leidyb. apsk. I. Tiražas 50 egz. Užsakymas 416.  
Išleido Kauno technologijos universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44249 Kaunas  
Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas