



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Laurynas Lukošius

**LIPIDŲ IR BALTYMŲ IŠSKYRIMO IŠ PLUOŠTINIŲ KANAPIŲ
SĖKLŲ PROCESŲ ĮVERTINIMAS IR GAUTO ALIEJAUS
OKSIDACINIO PATVARUMO PAGERINIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Prof. dr. Rimantas Petras Venskutonis

KAUNAS, 2017

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**LIPIDŲ IR BALTYMŲ IŠSKYRIMO IŠ PLUOŠTINIŲ KANAPIŲ
SĖKLŲ PROCESŲ ĮVERTINIMAS IR GAUTO ALIEJAUS
OKSIDACINIO PATVARUMO PAGERINIMAS**

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

Vadovas

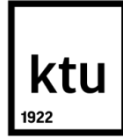
(parašas) Prof. dr. Rimantas Petras Venskutonis
(data)

Recenzentas

(parašas) Dr. Paulius Kraujalis
(data)

Projektą atliko

(parašas) Laurynas Lukošius
(data)



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

(Fakultetas)

(Studento vardas, pavardė)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Lipidų ir baltymų išskyrimo iš pluoštinių kanapių sėklų procesų įvertinimas ir gauto aliejaus oksidacinio patvarumo pagerinimas“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 ____ m. _____ d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Lauryno Lukošiaus**, baigiamasis projektas tema „Lipidų ir baltymų išskyrimo iš pluoštinių kanapių sėklų procesų įvertinimas ir gauto aliejaus oksidacinio patvarumo pagerinimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Lukošius, Laurynas. Lipidų ir baltymų išskyrimo iš pluoštinių kanapių sėklų procesų įvertinimas ir gauto aliejaus oksidacinio patvarumo pagerinimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovas prof. dr. Rimantas Petras Venskutonis; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: *Kanapių sėklos, aliejus, oksidacinis stabilumas, antioksidantai, ekstraktai, antioksidacinis aktyvumas, baltymai.*

Kaunas, 2017. 68 p.

SANTRAUKA

Kanapių sėklos yra vienos maistingiausių pasaulyje. Jos yra puikus ir natūralus mišinys lengvai virškinamų baltymų, nepakeičiamų riebalų rūgščių (Omega 3 ir 6), gama linolo rūgšties, antioksidantų, amino rūgščių, skaidulų, geležies, cinko, karotino, fosfolipidų, fitosterolių, vitaminų B1, B2, B6, D, E, chlorofilo, kalcio, magnio, sieros, vario, fosforo ir fermentų šaltinis [13].

Šio darbo tikslas – riebalų, baltymų ir antioksidantų išskyrimas iš pluoštinių kanapių sėklų, gauto aliejaus oksidacinio patvarumo įvertinimas ir pagerinimas. Antioksidacinių savybių nustatymas. Baltymų sudėties ir funkcinių savybių analizavimas, bei amino rūgščių nustatymas.

Skirtingų ekstraktų metu, parenkant tinkamus parametrus ir tirpiklius, buvo gauti tyrimams reikalingi ekstraktai. Buvo naudojama superkritinė CO₂ ekstrakcija, Soksleto ekstrakcija bei šaltas kanapių sėklų presavimas lipofilinio ekstrakto išgavimui. Pagreitintai skysčių ekstrakcija skirtingais tirpikliais (vandeniui, acetonu, etanoliu, bei vandens ir etanolio mišiniu) buvo naudojama iš po superkritinės CO₂ ekstrakcijos likusios žaliavos išgauti ekstraktus antioksidacinėms savybėms tirti. Baltymų ekstrakcijai buvo naudojama metodika pagal Osborną, kai skirtingoms baltymų frakcijoms išgauti buvo naudojami skirtingi tirpikliai: albuminams – vanduo, globulinams – druskos tirpalas, prolaminams – vandens ir etanolio mišinys, gliuteinams – natrio šarmo tirpalas.

Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas nustatytas 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties) radikalų-katijonų (ABTS^{•+}) sujungimo, deguonies radikalų absorbcijos galios (ORAC) nustatymo bei DPPH radikalo blukinimo metodais. Bendrasis fenolinių junginių kiekis (BFJK) ekstraktuose nustatytas naudojant *Folin-Ciocalteu* metodą. Nustatytas tokoferolių kiekis.

Kanapių sėklų aliejaus ir jo mišinių su antioksidantais stabilumas pagal oksidacijos indukcijos periodą (IP) nustatytas naudojant Oksipreso ir Rancimato metodus. Nustatyta, kad geriausiai veikė natūralus antioksidantas DURALOX BLEND AN-110 XT, kurio į aliejų buvo pridėta 0,4 % nuo aliejaus masės. Buvo nustatyta, kad laikant aliejų ir jo mišinius su antioksidantais skirtingomis sąlygomis (kambario temperatūroje ir šaldytuve), mažiausiai peroksidų susidarė aliejuje su DURALOX OXIDATION MANAGEMENT (DOM) antioksidanto priedu, laikant jį šaldytuve. Aliejus visą eksperimento laiką – 18 mėnesių, nepasiekė kritinės peroksidų skaičiaus vertės šiomis sąlygomis.

Atlikus elektroforezę, nustatyta, kad ekstraktuose daugiausiai baltymų, kurių molekulinė masė yra tarp 20000 ir 45000 Da. Palyginus šiuos rezultatus su literatūros šaltiniuose nurodytais, nustatyta, kad tokiose ribose yra baltymo Edestino molekulinė masė.

Lukošius, Laurynas. Evaluation Of The Processes Of Isolation Of Lipids And Proteins From Hemp Seeds And Improvement Of The Obtained Oil Stability: Master's thesis / supervisor prof. dr. Rimantas Petras Venskutonis. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Technological Sciences, Food Technology

Key words: Hemp seeds, oil, oxidative stability, antioxidants antioxidants, extracts, antioxidation activity, proteins.

Kaunas, 2017. 68 p.

SUMMARY

Hemp Seeds are a perfect and natural blend of easily digested proteins, essential fats (Omega 3 and 6), Gamma Linolenic Acid (GLA), antioxidants, amino acids, fiber, iron, zinc, carotene, phospholipids, phytosterols, vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, vitamin D, vitamin E, chlorophyll, calcium, magnesium, sulfur, copper, potassium, phosphorus, and enzymes [13].

The aim of this work is extraction of lipids, proteins and antioxidants from hemp seeds, evaluation and improvement of oxidative stability of obtained oil. Evaluation of antioxidant activity of extracts. Analyzation of protein composition and their functional properties. Determination of amino acids.

Extracts from hemp seeds were obtained by choosing needed parameters and different solvents in different type of extractions. It was used supercritical CO₂, Soxhlet extractions and cold pressing of hemp seeds to obtain lipids. Accelerated solvent extraction with different solvents (water, acetone, ethanol, water and ethanol solution) were used to obtain extracts from residue after supercritical CO₂ extraction to evaluate their antioxidant activity. Protein extraction was done by Osborn. To obtain different protein fractions it was used different type of solvents: albumins – water, globulins – NaCl solution, prolamins – solution of water and ethanol, glutenins – NaOH solution.

Antioxidant activity of extracts was evaluated by 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical cation (ABTS^{•+}) scavenging, oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays, and DPPH radical scavenging assay. The total content of phenolic compounds in the extracts was determined using the Folin-Ciocalteu method. It was also measured tocopherol content.

The stability of hemp seed oil and its solutions with antioxidants, expressed by induction period (IP) of their oxidation was determined using Oxipress and Rancimat methods. Induction period (IP) showed that that hemp oil with antioxidant DURALOX BLEND AN-110 XT (0,4 % concentration) has the best oxidative stability. It was evaluated, that the lowest peroxide concentration was in oil with antioxidant DURALOX OXIDATION MANAGEMENT (DOM), which was kept in fridge (4-5°C). The entire time of experiment (18 months), oil have not reached the critical value of peroxides at this conditions.

The electrophoresis showed that the extracts contains proteins, whose molecular weight is between 20000 and 45000 Da. Comparing these results with the literature referred to, it was found that in these limits is protein Edestin molecular weight.

SANTRUMPOS

THC	tetrahidrokanabinolis
AAPh	2,2'-azobio (2-amidinpropano) dihidrochloridas
ABTS•+	2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties katijono laisvasis radikalas
DPPH•	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas
ORAC	deguonies radikalų absorbcijos geba
BFJK	bendras fenolinių junginių kiekis
SKE –	CO ₂ Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu
PSE	pagreitinta ekstrakcija tirpikliais
TE	Trolokso ekvivalentai
AUC	po kalibracinė kreivė esantis plotas
BHA	butilhidroksianizolas
TBHQ	tert-butilhidroksichinonas
GAE	galo rūgšties ekvivalentas
IP	indukcinis periodas
PS	peroksidų skaičius
SKE–CO ₂	superkrizinė ekstrakcija su CO ₂
TROLOX	6–hidroksil–2,5,7,8–tetrametilchroman–2–karboksirūgštis
DOM	DURALOX OXIDATION MANAGEMENT
GLA	gama linoleno rūgštis
ROO [•]	peroksilo radikalas
OH [•]	hidroksilo radikalas
PI	izoeletrinis taškas
AR	amino rūgštis

TURINYS

IVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Kanapės apibūdinimas ir taksonomija.....	11
1.2. Istorija ir paplitimas	11
1.3. Kanapių sėklų cheminė sudėtis bei kanapių sėklų maistinė vertė.....	13
1.4. Kanapių aliejaus fizikiniai rodikliai	19
1.5. Kanapių ir jų sėklų panaudojimas	20
1.6. Antioksidantai ir jų poveikis	21
1.7. Ekstrakcijų metodai.....	22
1.7.1. Superkritinė CO ₂ ekstrakcija	22
1.7.2. Pagreitinta skysčių ekstrakcija (PSE)	23
1.7.3. Soksleto ekstrakcija	24
1.8. Baltymų elektroforezė.....	25
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	26
2.1. Chemikalai ir reagentai	26
2.2. Kanapių sėklų žaliava	27
2.3. Kanapių sėklų ir aliejaus cheminė sudėtis	27
2.3.1. Drėgmės kiekio nustatymas	27
2.3.2. Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas.....	28
2.3.3. Riebalų kiekio nustatymas	28
2.3.4. Baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu.....	28
2.3.5. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas dujų chromatografijos metodu.....	29
2.4. Aliejaus oksidacinis stabilumas	30
2.4.1. Peroksidų skaičiaus nustatymas jodometriniu metodu	30
2.4.2. Rūgštingumo (LRR) nustatymo metodas	31
2.4.3. Aliejaus oksidacinis stabilumas Oksipres metodu.....	31
2.4.4. Aliejaus oksidacinis stabilumas Rancimat metodu.....	32
2.5. Superkritinė CO ₂ ekstrakcija (SKE-CO ₂)	32
2.6. Pagreitinta skysčių ekstrakcija (PSE)	32
2.7. Antioksidacinės savybės	33
2.7.1. Bendrasis fenolinių junginių kiekis (Folin ir Ciocalteu metodu).....	33
2.7.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH• radikalų sujungimo metodu.....	33
2.7.3. TEAG nustatymas ABTS• ⁺ radikalo katijono sujungimo metodu.....	34
2.7.4. Deguonies radikalo absorbcijos pajėgumo (ORAC) tyrimas.....	35
2.8. Skvaleno ir tokoferolių nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (HPLC).....	35
2.9. Baltymų išskyrimas ir savybės.....	36
2.9.1. Osborno frakcionavimas	36
2.9.2. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje ir jo dažymas	37
2.9.3. Putų sudarymo pajėgumas ir stabilumas.....	38
2.9.4. Emulsijos sudarymo pajėgumas.....	38
2.9.5. Emulsijos stabilumo.....	38
2.9.6. Amino rūgščių nustatymas.....	39
3. Rezultatai ir jų aptarimas.....	40
3.1. Kanapių sėklų sudėtis	40

3.2. Kanapių sėklų ekstrakcijos ir išėigos.....	40
3.2.1 . SKE-CO ₂ ekstrakcija	41
3.2.2. Pagreitinta skysčių ekstrakcija (PSE)	43
3.3. Kanapių sėklų aliejinių ekstraktų sudėtis	44
3.3.1. Riebalų rūgščių sudėtis.....	44
3.3.2. Tokoferoliai	45
3.3.3. Skvalenas	46
3.4. Kanapių aliejaus oksidacinis stabilumas	47
3.4.1. Pradinis aliejaus peroksidų skaičius (PS) ir rūgštingumas (R)	47
3.4.2. Aliejaus atsparumas oksidacijai.....	47
3.4.3. Kanapių aliejaus ir jo mišinių su antioksidantais PS kitimas, esant skirtingoms laikymo sąlygoms	50
3.4.4. Kanapių aliejaus, gauto CO ₂ ekstrakcijos metu ir jo mišinių su ORH antioksidantu PS kitimas	53
3.5. Ekstraktų, gautų po pagreitinotos skysčių ekstrakcijos, antioksidacinės savybės.....	55
3.6. Kanapių sėklų baltymų išskyrimas ir savybės	56
3.6.1. Kanapių baltymų elektroforezė.....	56
3.6.2. Kanapių sėklų ir jų skirtingų baltymų frakcijų amino rūgščių sudėtis	58
3.6.3. Kanapių sėklų baltymų putų sudarymo pajėgumas ir stabilumas	59
3.6.4. Kanapių sėklų baltymų emulsijų sudarymo pajėgumas ir stabilumas	60
IŠVADOS.....	62
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	64
PADĖKA.....	68

IVADAS

Sveika ir suderinta dieta padeda palaikyti gerą savijautą ir sveikatą, aprūpindama kūną nepakeičiamomis amino rūgštimis iš baltymų, nepakeičiamomis riebalų rūgštimis, vitaminais, mineralais. Sveika mityba teikia reikiamą energijos kiekį bei padeda mesti svorį. Gerai subalansuota mityba mažina tikimybę sirgti įvairiomis ligomis, tokiomis, kaip nutukimas, širdies ligos, diabetas, hipertenzija ir vėžys. Vienas tokių produktų, kuris pasižymi gera maistine verte yra kanapių sėklos.

Pagrindinis produktas, gaunamas iš kanapių sėklų yra aliejus. Likusi dalis yra vadinama išspaudomis, kurios dažnai naudojamos kaip pašaras. Bet jose gausu ir kitų maistinių bei bioaktyvių komponentų, todėl tinkamai panaudojus šiuolaikinius įrengimus galima iš jų išgauti įvairius produktus, tokius, kaip baltymai, vitaminai, mineralinės medžiagos, antioksidantai bei kiti junginiai, kurie gali būti panaudojami medicinoje bei kosmetikoje.

Kanapių sėklose yra apie 30-35 % riebalų. Kanapių sėklų aliejus yra sudarytas iš 75-80 % polinesočiųjų riebalų rūgščių (gerieji riebalai). Yra teigiama, kad šis aliejus yra vienas nesočiausių aliejų, gautų iš augalinės žaliavos. Omega 3 ir omega 6 nepakeičiamos riebalų rūgštys gali sumažinti cholesterolio kiekį, kraujo spaudimą ir insulto riziką. Omega 6 ir omega 3 riebalų rūgščių santykis 3:1 kanapių sėklų aliejuje yra laikomas geriausiu, palaikant sveiką ląstelės būklę.

Išpresavus aliejų iš kanapių sėklų, lieka antrinė žaliava – išspaudos. Jose gausu baltymų (25-35 %). Kanapių sėklų baltymai yra visų 20 žinomų amino rūgščių šaltinis, įskaitant ir visas 9 nepakeičiamas, kurių mūsų organizmas pats negali pasigaminti. Pagrindinis sėklose esantis baltymas yra globulinis baltymas edestinas. Jis sudaro apie 65 % visų kanapių sėklų baltymų kiekio ir randamas tik jose. Jis padeda virškinimui, jame mažai fosforo. Kanapių sėklų baltymai yra geriau virškinami nei mėsos, kiaušinių, sūrio ar pieno.

Kanapių sėklų lukštuose yra didelis kiekis tirpios ir netirpios ląstelienos, kuri yra naudinga virškinimui, nes išvalo gaubtinę žarną. Ląsteliena taip pat padidina sotumo jausmą.

Darbo tikslas – įvairių ekstraktų išskyrimas iš kanapių sėklų, taikant skirtingus ekstrakcijų metodus, įvertinant aliejaus oksidacinį stabilumą, baltymų pasiskirstymą bei funkcines savybes ir nustatant amino rūgštis.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti kanapių sėklų cheminę sudėtį.
2. Palyginti skirtingų ekstrakcijų įtaka aliejaus išeigai.
3. Nustatyti kanapių sėklų aliejinių ekstraktų sudėtį (riebalų rūgštys, skvalenas, tokoferoliai).
4. Įvertinti kanapių sėklų aliejaus ir jo mišinių su antioksidantais oksidacinį stabilumą Oksipres ir Rancimat metodais.

5. Nustatyti aliejaus ir jo mišinių su antioksidantais oksidacijos stabilumą, laikant jį skirtingomis temperatūros sąlygomis, įvertinant peroksidų skaičiaus kitimą laike.
6. Palyginti skirtingų ekstraktų, gautų po pagreitintos skysčių ekstrakcijos iš kanapių sėklų išspaudų, antioksidacinį aktyvumą, taikant skirtingus metodus.
7. Nustatyti baltymų molekulinę masę skirtingose kanapių sėklų išspaudų baltymų frakcijose elektroforezės metodu bei nustatyti amino rūgščių sudėtį. Įvertinti baltymų funkcines savybes.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kanapės apibūdinimas ir taksonomija

Kanapė yra vienas seniausių kultūrinių augalų. Ji priklauso kanapinių šeimai, magnolijūnų genčiai. Kanapinių šeimai priklauso 170 rūšių, sugrupuotų į 11 genčių. Buvo skiriamos trys pagrindinės kanapių



1 pav. *Cannabis sativa*

rūšys: sėjamoji kanapė (*Cannabis sativa*), indinė kanapė (*Cannabis indica*) ir šiukšlyninė kanapė (*Cannabis ruderalis*). Gentis pirmasis suskirstė Karlas Linėjus [1]. Anksčiau, kanapių gentis buvo įtraukta į dilgelinių (*Urticaceae*) ar šilkmedinių (*Moraceae*) šeimą ir tik vėliau atskirta į Kanapinių (*Cannabaceae*) šeimą [2].

Įvairūs kanapių tipai buvo aprašyti ir suskirstyti į rūšis, porūšius ar veisles:

- augalai, kurie daugiausiai kultivuojami dėl pluošto ir sėklų, apibūdinami kaip ne toksiški;
- augalai, kurie auginami dėl narkotikų gamybos, apibūdinami kaip labai toksiški;

- hibridizuotos arba laukinės aukščiau minėtų tipų formos [3].

Kanapė buvo ir yra auginama industriniams tikslams dėl pluošto, aliejaus, maisto, kaip narkotinė medžiaga atsipalaidavimui ir religinėms bei ritualinėms apeigoms, medicinoje. Kiekviena augalo dalis yra nuimama skirtingai, priklausomai nuo to kur bus naudojama [4].

Kanapė yra greitai augantis dvinamis (vyriški ir moteriški reprodukciniai organai yra atskiruose augaluose), kasmet žydintis augalas, kuris gali užaugti iki 6 metrų aukščio. Augalų apdulkinimas vyksta vėjo pagalba. Stiebas tvirtas, tuščiaviduris ir smarkiai šakotas, su ilgomis ataugomis. Lapkočiai trumpi, dažniausiai su 5-9 lapeliais. Sėklos yra apvalios, beveik lęšio formos, žalios arba rudos spalvos, nuo 1,5 iki 4 mm dydžio. Sėklos sudygsta per savaitę, sudaigindamos du daigelius [5].

1.2. Istorija ir paplitimas

Kanapė yra vienas anksčiausiai pradėtų kultivuoti augalų. Japonų archeologai nustatė, kad kanapės buvo naudojamos net maždaug 8000 metų prieš Kristų [6]. Iš jos gamino įvairius pluoštus, virves, rūbus ir popierių. Taip pat buvo naudojami dūmai, kuriais svaigindavosi per apeigas arba savo malonumui. Dėl savo pluošto Neolito laikotarpiu, kanapė buvo auginama visame šiauriniame kontinente, nuo Europos (Vokietija, Šveicarija, Austrija, Rumunija, Ukraina) iki Rytų Azijos (Tibetas, Kinija).

1 lentelė. Pagrindiniai kanapių sėklų augintojai pasaulyje 1961-2008 (tonomis) [18]

Šalis	1961	1970	1980	1990	2000	2008
Čilė	3000	2500	1100	1100	1100	1300
Kinija	27000	48000	42000	25000	26000	45000
Prancūzija	900	523	2680	1100	5500	5500
Vengrija	1309	524	1664	1191	50	450
Italija	855	40	3	0	0	0
Lenkija	4000	2000	280	98	15	20
Rumunija	400	1200	1800	3000	25	100
Rusija	-	-	-	-	250	331
Ispanija	2171	45	146	17	8	8
Ukraina	-	-	-	-	1500	600
SSRS	30000	20000	10000	196	-	-
Europa	11648	5817	6855	5445	5598	6078
Pasaulis	79478	80448	64741	35291	34591	53354

Geriausiai kanapės auga derlinguose, vandeniui laidžiuose dirvožemiuose, kurio pH 7,1-7,6. Paprastai kanapės sodinamos 200-300 vnt. kvadratiname metre. Auginant kanapes pluoštui ar sėklai reikia naudoti mažiau azoto, auginant biomasei – azoto normą reikia padidinti. Norint gauti geresnius derlius, reikėtų taikyti sėjomainą. Gerai kanapės auga po javų, cukrinių runkelių, daugiamečių žolių. Paprastai kanapių vegetacija tęsiasi apie 120 dienų. Jei kanapės auginamos tik sėklai – derlius imamas, kai sėklos pribrešta šluotelės viduryje; jei kanapės auginamos tik pluoštui – jos nuimamos visiško žydėjimo tarpsniu arba žydėjimo pabaigoje; jei kanapės auginamos ir sėklai, ir pluoštui – derlius imamas praėjus 1 mėn. po visiško žydėjimo. Tokias kanapes siūloma džiovinti sustatytas pėdais [8]. Kanapės dažniausiai sodinamos tarp kovo ir gegužės mėnesio šiauriniame pusrutulyje arba tarp rugsėjo ir lapkričio mėnesio – pietiniame pusrutulyje.

Kanapių veislę, lauko auginimui, pasirinkti lengviausia pagal geografinę padėtį [9]. *Cannabis sativa*, kitaip sėjamoji kanapė, paplitusi visame pasaulyje. Auginama dėl sėklų, pluošto ir tetrahidroksikanabinolio (THC). Nuo pagrindinio stiebo simetriškos šakos auga aukštyn, lapkočių lapeliai siauri. Aukštis – 3-3,5 m, bet gali užaugti iki 6 metrų aukščio. Kilusi iš Centrinės Azijos.

Cannabis indica paplitusi daugiausia Indijoje, Pakistane. Auginama dėl sėklų, THC. Nuo pagrindinio stiebo simetriškos šakos auga beveik horizontaliai į šonus. Lapkočių lapeliai platūs.

Cannabis ruderalis daugiausia paplitusi Šiaurės Europoje ir Rusijoje, auga kaip piktžolė. Kadangi jos žydėjimas, skirtingai nei anų dviejų, nepriklauso nuo paros tamsaus ir šviesaus periodo santykio,

naudojama išvedinėti atšiauriame klimato augančias marihuanines kanapių veisles. Panašios į *Cannabis sativa* tik daug mažesnės. Užauga iki ~0,6 m.

2016 metais buvo paskelbtas kanapių veislių sąrašas, kurias galima auginti legaliai, nes jose THC kiekis neviršija leistinos normos: Alyssa, Anka, Canda, CanMa, Carmagnola, Carmen, CFX-1, CFX-2, Crag, CRS-1, CS, Delores, Deni, ESTA-1, Fasamo, Fedrina 74, Felina 34, Ferimon, Fibranova, Fibriko, Fibrimon 24, Fibrimon 56, Finola, Georgina, GranMa, Grandi, Joey, Jutta, Katani, Kompolti, Kompolti, Hibrid TC, Kompolti, Sargaszarū, Lovrin 110, Petera, Picolo, Silesia, UC-RGM, Uniko B, USO 14, USO 31, VictoriaX-59, Yvonne, Zolotonosha 11, Zolotonosha 15 [10].

1.3. Kanapių sėklų cheminė sudėtis bei kanapių sėklų maistinė vertė

Kanapės biosintetina terpeno-fenolinius junginius, seskviterpenus. Jose yra identifikuota 483 cheminiai junginiai. Vienas pagrindinių junginių kanapėse yra THC. THC veikia nervų sistemą. Augaluose gali būti maždaug 113 skirtingų kanabinoidų [11]. Apie 120 junginių yra suteikia būdingą kvapą. Pagrindiniai kanapių lakieji terpenai ir seskviterpenai: α -pinenas, mircenas, linalolis, limonenas, trans- β -ocimenas, α -terpinolenas, α -humulenas (vienas pagrindinių *Canabis sativa* aromato komponentų), trans-kariofilenas (šunys apmokomi aptikti šį junginį, ieškant hašišo) [12].

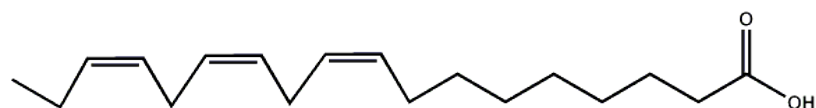
Kanapių sėklose baltymų gali būti iki 36 %. Baltymai sėklose yra be tripsino inhibitorių, kurie apsunkina baltymų įsisavinimą žmogaus organizme. Riebalai sudaro iki 35 % sėklos masės. Iš jų 80 % yra polinesočiosios rūgštys. Omega-3 ir omega-6 santykis 3:1 [13]. Kanapių sėklų sudėtis pavaizduota 2 lentelėje.

2 lentelė. Kanapių sėklų sudėtis [13]

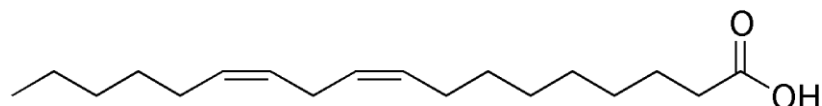
Komponentas	Vertė 100 g	Vienetas
Energijos kiekis	553	Kcal
Baltymai	22,72	g
Riebalai	32,12	g
Pelenai	6,06	g
Angliavandeniai	8,67	g
Lašteliena	4,0	g
Bendras cukrų kiekis	0,85	g
Gliukozė	0,2	g
Fruktozė	0,31	g
Laktozė	0,07	g
Maltozė	0,07	g
Kalcis	70	mg
Geležis	7,95	mg

2 lentelės tęsinys. Kanapių sėklų sudėtis [13]		
Varis	1,60	mg
Magnis	700	mg
Fosforas	1650	mg
Kalis	1200	mg
Natris	5,0	mg
Cinkas	9,90	mg
Magnis	7,60	mg
Vitaminas C	0,5	mg
Tiaminas	1,28	mg
Riboflavin	0,29	mg
Niacinas	9,20	mg
Vitaminas B-6	0,60	mg
Foliatai	110	μg
Vitaminas A	1	μg
Beta karotinas	7	μg
Vitaminas E	0,80	mg

Kanapių sėklose yra nemažai kalcio, kalio ir geležies. Sėklų aliejuje yra virš 80 % polinesočiųjų riebalų rūgščių. Aliejuje yra gausu nepakeičiamų omega-3 (linoleno) ir omega-6 (linolo) riebalų rūgščių. Jos turi būti gaunamos su maistu, nes žmogaus organizmas jų nesintetina. Nepakeičiamos rūgštys atlieka svarbų vaidmenį žmogaus organizme. Jos įeina į ląstelių membranų sudėtį ir yra nepakeičiamos kai kurių reguliavimo mechanizmų procesuose [57].



Linoleno rūgštis



Linolo rūgštis

2pav. Linolo ir linoleno riebalų rūgštys

Riebalų rūgščių sudėtis priklauso nuo kanapių veislės prigimties, augimvietės, klimatinių, auginimo sąlygų. Nuo riebalų rūgščių sudėties priklauso aliejaus konsistencija, lydymosi temperatūra, biologinė vertė ir atsparumas oksidacijai. Kanapių aliejaus riebalų rūgščių sudėtis pateikta 3 lentelėje.

3 lentelė. Kanapių sėklų aliejaus riebalų rūgščių sudėtis % [13].

Riebalų rūgštis	Kiekis, %
Palmitino (16:0)	3,44
Stearino (18:0)	1,46
Arachido (20:0)	0,28
Beheno (22:0)	0,12
Lignocero (24:0)	0,06
Oleino (18:1)	9,92
Eikozeno (20:1)	0,12
Linolo (18:2)	54,32
Linoleno (18:3)	17,09
Gama-linoleno (18:3)	1,70

Maistinės vertės atžvilgiu, kanapių aliejus iš sėklų turi būti presuojamas šalto spaudimo būdu. Aliejus spalva būna nuo tamsiai geltonos iki tamsiai žalios. Skonis primena riešutų, su nedideliu kartumo skoniu. Kanapių aliejų daugiausiai sudaro nesočiosios rūgštys, kurios gali lengvai oksiduotis, todėl jis nėra tinkamas kepimui. Antioksidantų pridėjimas prailgina galiojimo trukmę.

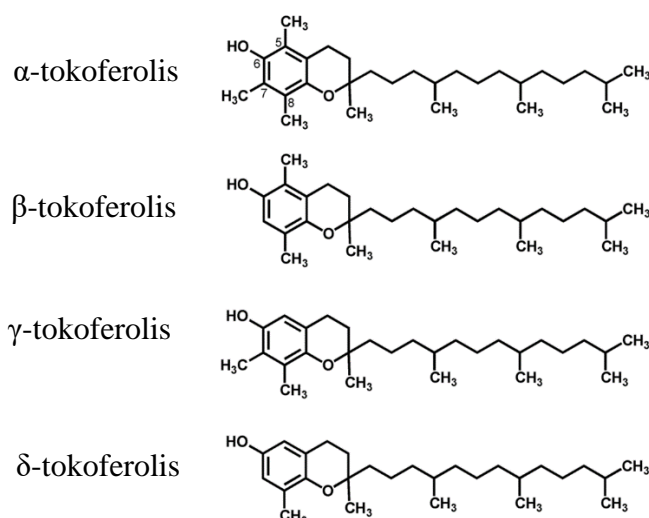
Kanapių aliejus turi apie 1,7 % gama-linoleno rūgšties. Ji skatina plaukų ir nagų augimą, gerina odos būklę. Ji taip pat veikia gyvybiškai svarbius metabolinius procesus, tokius kaip uždegimų reguliavimus, kraujagyslių tonusą. Ji taip pat mažina psoriazę, atopinę egzemą, mastalgiją. Omega 3 ir omega 6 polinesočiosios riebalų rūgštis turi priešvėžinių savybių, gali užkirsti kelią širdies ir kraujagyslių ligoms, apsaugo nuo insulto, užkerta kelia diabetui, taip pat skatina nervų veiklą bei palaiko sveiką imuninę sistemą. [14].

Kitas svarbus kanapių aliejaus komponentas yra β -sitosterolis. Jis turi antivirusinių, priešgrybelinių ir priešuždegiminių savybių [15]. Jis veikia blokuodamas cholesterolio absorbciją.

4 lentelė. Kanapių aliejaus svarbesni junginiai [15]

Komponentas	Kiekis
Kanabidiolis	10 mg/kg
Mircenas	160 mg/l
β -sitosterolis	740 mg/l
β -kariofilenas	100-148 mg/l
α -tokoferolis	Pėdsakai
γ -tokoferolis	468 mg/l
Metilsalicilatas	Pėdsakai

Antioksidacinėmis savybėmis pasižymi tokoferoliai. Tokoferoliai yra organinių junginių klasė, kurie turi vitamino E aktyvumą. Yra 8 skirtingos vitamino E formos: 4 tokoferolių ir 4 tokotrienolių. Dar yra jų enantiomerai. Abi grupės gali būti α (alfa), β (beta), γ (gama) ir δ (delta) formų pavidalu, nusakant metilo grupių skaičių ir poziciją chromanolio žiede. Kanapių sėklų aliejuje nustatytas bendras tokoferolių kiekis yra nuo 700 iki 800 mg/kg aliejaus. Vyraujantis yra γ -tokoferolis, kuris sudaro apie 85 % visų tokoferolių esančių kanapių sėklų aliejuje. Apie 5 % sudaro δ -tokoferolis ir α -tokoferolis ir tik mažiau nei 1 % kanapių aliejuje randama β -tokoferolio ir γ -tokotrienolio. Buvo nustatytas santykis tarp α -: β -: γ -: δ -tokoferolių izomerų, atitinkami, 5:2:90:3. Kai kuriuose šaltiniuose nurodyta ženkliai mažesnis γ -tokoferolio kiekis – 216,8 mg/kg, kai bendras jų kiekis siekė tik 240,4 mg/kg [57]. α -tokoferolis yra vitamino E forma, kuri yra labiau priimtina ir įsisavinama žmogaus organizme. Tokoferoliai veikia kaip priešvėžiniai agentai, slopina riebalų peroksidaciją bei mutageninių peroksidacijos produktų formavimąsi žarnyne. Išskirti į gaubtinę žarną, γ -tokoferoliai gali sumažinti azoto oksido junginių daromą žalą DNR molekulėms [15].



3 pav. Tokoferolių molekulinės formulės

Tokoferoliai taip pat naudojami kaip antioksidantai maiste, pavyzdžiui, aliejuje, kad apsaugoti nuo apkartimo (peroksidų susidarymo).

Kanapėse gausu fenolinių junginių, tokių kaip: fenolinės rūgštys, fenoliniai metilesteriai ir fenoliniai glikozidai. Jie svarbūs pluoštinių kanapių aktyvieji junginiai ir pasižymi antioksidacinėmis savybėmis ir ląstelių apsauga nuo įvairių pažeidimų [57].

5 Lentelė. Bioaktyvūs pluoštinių kanapių junginiai [23]

Junginys	Kiekis, % (sausos medžiagos)
Fenoliai ir flavanoidai	
Ferulinė rūgštis	0,01
Apigeninas	0,1
Luteolinas	0,049
Kvercetas	0,01
Kampferolis	0,026
Terpenoidai	
β -mircenas	0,47
β -karofilenas	0,05
d-limonenas	0,14
α -pinenas	0,04

Atlikus įvairius tyrimus, buvo nustatyta, kad flavanoidai veikia kaip antimikrobiniai agentai, kaip antioksidantai, prieš virusiniai, antiuždegiminiai, antialerginiai, estrogeniniai, antimutageniniai agentai [58]. Terpenoidai yra atsakingi už daugumą skoninių ir kvapo savybių, taip pat pasižymi priešuždeginėmis, antibiotikinėmis, prieš mutageninėmis, prieš maliarinėmis, prieš depresinėmis, atmintį gerinančiomis savybėmis. Terpenoidų ir flavanoidų sudėtis priklauso nuo veislės ir derliaus nuėmimo datos.

Kanapių sėklų aliejus dažniausiai yra presuojamas šalto spaudimo presais, o liekana yra vadinama išspaudomis. Jos turi didelį kiekį baltymų, kuris gali siekti iki 40 % baltymų sausoje medžiagoje [20]. Buvo nustatyta, kad kanapių sėklose vienas pagrindinių baltymų yra edestinas. Jis turtingas naudingomis amino rūgštimis. Didžiausi jo kiekiai randami kanapėse. Jis panašus savo sudėtimi į žmogaus kūno globulinius baltymus, randamus kraujo plazmoje. Edestino gaminami antikūniai, padeda palaikyti gerą imuninę sistemą.

Kitas svarbus globulininis baltymas yra Albuminas. Jis yra gerai virškinamas ir yra vienas pagrindinių laisvųjų radikalų šaltinis.

Virškinimas hidrolizina kanapių baltymus į amino rūgštis, reikalingas augimui ir kūno audinių priežiūrai. Kanapių baltymai susideda iš visų 20 amino rūgščių, įskaitant ir 9 nepakeičiamas. Lyginant kanapes su soja, jos pasižymi privalumu, kad jų sudėtyje nėra tripsino inhibitorių. Taip pat kanapių sėklų sudėtyje nėra oligosacharidų. Jie sukelia virškinimo sutrikimus [20].

Amino rūgščių sudėtis priklauso nuo kanapių genotipo, taip pat nuo agronominių faktorių. Kanapių sėklų amino rūgščių sudėtis yra panaši į kitų baltymingų produktų sudėtį, tokių kaip: mėsa, pienas, kiaušiniai, soja [16]. Kanapių sėklų amino rūgščių sudėtis pavaizduota 6 lentelėje.

6 lentelė. Amino rūgščių sudėtis kanapių sėklose [20]

Amino rūgštis	Kiekis, %
Alaninas	5,06
Asparto rūgštis	11,20
Argininas	10,53
Cisteinas	1,86
Glutamo rūgštis	22,10
Glicinas	6,83
Histidinas	2,58
Izoleucinas	4,90
Leucinas	6,76
Lizinas	4,72
Metioninas	2,03
Fenilalaninas	5,24
Prolinas	4,41
Treoninas	4,19
Tirozinas	2,70
Triptofanas	1,63
Serinas	5,31
Valinas	5,87

Tarp įvairių kanapių veislių, dominuojančios amino rūgštys yra argininas ir glutamo rūgštis [16]. Glutamo rūgštis yra neurotransmitorius, kuris padeda žmonėms kovoti su psichologiniu stresu. Arginino kiekis kanapių sėklose yra didesnis nei sojų sėklose ir beveik dvigubai didesnis nei rapsų sėklose. Ši amino rūgštis svarbi kaip azoto nešėja bei žarnyno ir skrandžio augimui bei vystymuisi [16].

Atlikus tyrimus su žiurkėmis, buvo nustatyta, kad baltymų virškinamumas siekia 86,7 % [17]. Virškinamumas priklauso nuo baltymų struktūros, nevirškinamų junginių bei apdoravimo temperatūros. Kanapių sėklų baltymai padeda reguliuoti kraujo spaudimą ir mažinti cholesterolio kiekį [57].

Kanapių sėklos, kaip ir dauguma kitų, turi tam tikrą kiekį fenolinių rūgščių, flavanoidų ir mineralų. Jos taip pat linkusios kaupti sunkiuosius metalus [57].

Kanapių sėklos turi ir antimonybinių komponentų. Vienas pagrindinių yra fito rūgštis [20]. Fito rūgštis yra svarbiausias organinio fosforo šaltinis augalų sėklose. Jos buvimas mažina baltymų virškinamumą ir skatina endogeninio azoto, amino rūgščių ir bivalentinių katijoninių mineralų išskyrimą. Kondensuoti taninai taip pat turi antimonybinių savybių. Jie trukdo azotinių junginių įsisavinimui, mineralinių medžiagų įsiurbimui.

1.4. Kanapių aliejaus fizikiniai rodikliai

Kanapių aliejų sudaro polinesočios riebalų rūgštys, kurios yra neatsparios oksidaciniam gedimui, todėl tai smarkiai paveikia kanapių aliejaus kvapą, jei aliejus yra laikomas netinkamomis sąlygomis. Pasenusiame aliejuje atsiradęs nemalonus kvapas primena tepalų/dažų, amoniako ir žuvies aromatų puokštę. Dėl savo polinesočių riebalų kompozicijos kanapių aliejus yra skystas kambario temperatūroje, stingti pradeda esant 20°C temperatūrai, lydymosi temperatūra yra 8°C. Aliejus netinkamas kepimui, nes atlaiko tik žemesnę nei 150 °C temperatūrą, prie 141°C temperatūros aliejus pradeda rūkti, o prie 165°C užsiliepsnoja. Esant 20°C temperatūrai kanapių aliejaus tankis yra 0,9295 g/ml [57].

Aliejaus apmuilinimo skaičius apibūdina vidutinę riebalų rūgščių molekulinę masę. Kanapių aliejuje apmuilinimo skaičius yra 192,5 – 193,0, o nesumuilintų medžiagų kanapių aliejuje yra 0,28 %, o netirpių priemaišų yra 0,01 %. Jodo skaičius aliejuje parodo nesočiųjų riebalų rūgščių kiekį, kanapių aliejuje šis rodiklis yra 160 g J₂/100g riebalų. Peroksidų skaičius (PS) aliejuje parodo riebalų oksidacijos laipsnį, iš jo sprendžiama apie aliejaus sugedimo laipsnį. Šaltai spaustame kanapių aliejuje PS yra <5 mekv/kg. Kanapių aliejaus stabilumas prie 100°C temperatūros aktyvaus deguonies metodu yra 4,5 valandos [58].

7 lentelė. Fiziniai ir cheminiai aliejaus rodikliai [58]

Stingimo temperatūra	-20°C
Užsiliepsnojimo temperatūra	165°C
Degimo temperatūra	141°C
Lydymosi temperatūra	-8°C
Tankis	0,9295 g/ml
Apmuilinimo skaičius	192,5 – 193

7 lentelės tęsinys. Fiziniai ir cheminiai aliejaus rodikliai [58]

Nesumuilnamos medžiagos	0,28%
Jodo skaičius	160 g J/100 g
Hidrolizės skaičius	165 mg KOH/g
Peroksidų skaičius	<5 mekv/kg
p-anisidinas (<i>p</i> -An)	0,62
Riebalų stabilumas (aktyvaus deguonies metodu prie 100°C temperatūros)	4,5 h.
Netirpios medžiagos	0,01%
Cholesterolis	nėra
<i>trans</i> -riebalų rūgštys	nėra
Laisvos riebalų rūgštys (LRR)	<0,1%

1.5. Kanapių ir jų sėklų panaudojimas

Kiekviena kanapės dalis turi skirtingas charakteristikas ir gali būti panaudojama skirtingai. Pagal tai jos naudojamos: popieriui gaminti, tekstilei, plastikui, kūno priežiūros priemonėms, kaip statybinių medžiagų komponentas, kaip pašaras, kraikas, maisto papildas, eterinių aliejų gamybai, medicinoje ir kaip maistas [21].

Viena pagrindinių priežasčių, kodėl kanapių pluoštas yra vertinamas, tai dėl jo ilgio. Jų ilgis gali siekti net iki 5 metrų. Kanapių stiebo medinė dalis nėra labai stora, bet ji gali būti panaudojama popieriui gaminti. Dėl pluošto tvirtumo ir ilgaamžiškumo, kanapės gali būti panaudojamos virvių, tinklų, burių ir pakulų gamybai.

Popierius pagamintas iš kanapių yra naudojamas popierinių valiutų ir cigarečių popieriaus gamybai, kur reikia tvirtumo.

Plastiko mišiniai automobiliams yra antras svarbiausias kanapių pramonės Europoje komponentas. Plastikuose, skaidulos sustiprina fizikines savybes, tokias kaip: standumas, atsparumas smūgiams, lankstumas ir atsparumas tempimui. Europos mašinų pramonėje, kanapių pluoštas naudojamas sustiprinti durų plokštes, bagažinės pamušalą ir atramas.

Trečia pagal svarbą kanapių panaudojimo sritis yra statybos pramonė. Jos naudojamos kompozitinėms plokštėms, taip pat kaip priedas cemente, kad padidinti atsparumą tempimui, sumažinti skilinėjimą.

Kanapių sėklos naudojamos kaip maistas. Tai yra puikus dietinis produktas, nes kanapių sėklose yra apie 30 % riebalų, apie 20 % gerai virškinamų baltymų, be to, šios sėklos turi daug kalcio ir geležies. Sveikos kanapių sėklos taip pat yra puikus šaltinis papildyti organizmo atsargas mikroelementais: fosforu, magniu, cinku, variu ir manganu. Kanapių sėklas galima panaudoti salotoms, padažams,

gaminti, galima naudoti vietoj prieskonių pagardinti patiekalams, nes kanapių sėklų skonis yra panašus į riešutų. 3 šaukšteliai kanapių sėklų atstoja 10 g baltymų (2 kartus didesnis nei kiaušiniuose), 7,5 g omega-6 ir 3 g omega-3 riebalų rūgščių [21].

Taip pat yra gaminami kanapių baltymai. Tai produktas, kuris pagamintas iš 100% natūralių kanapių sėklų. Produkte yra gausu edestino – biologiškai aktyvaus globulino baltymo, kuris yra lengvai virškinamas, jo yra 66 %. Naudojamas įvairiems kokteiliams, desertams, sportininkų mitybai.

Kanapių aliejuje gausu linolo riebalų rūgšties, α -linoleno rūgšties, omega-9 riebalų rūgšties, γ -linoleno ir stearidono rieblų rūgščių. Aliejus puikia tinka salotoms, padažams, makaronams gaminti. Patiekalams aliejus suteikia malonų riešutų skonį ir aromatą.

Kanapių sėklos turi riešutų skonį ir yra įtraukiamos į daugelio maisto produktų paruošimą, dažnai pamėgdžiodant kitus panašius produktus. Jos naudojamos sveikuose ar užkandžių batonėliuose, riešutų sviestuose, duonoje, sausainiuose, jogurtuose, blynuose, desertuose, salotose, majonezuose, gėrimuose ir kituose produktuose. Sėklos būna parduodamos ir vakuumuotos arba skardinėse [58].

Kanapių sėklų aliejus gali būti naudojamas dažams ir lakui gaminti bei muilui. Maisto pramonėje jis tinkamas naudoti įvairių produktų ir papildų gamybai. Taip pat gali būti naudojamas kosmetinių priemonių gamybai. Iš jo gaminami kremai, losjonai, drėkikliai, lūpų balzamai.

1.6. Antioksidantai ir jų poveikis

Antioksidantai yra priedai, dedami į maistą, kad prailginti produktų vartojimo trukmę. Jie apsaugo nuo oksidacijos. Taip pat natūralūs antioksidantai maiste didina atsparumą prieš įvairius oksidacinius procesus mūsų organizme. Oksidacija vyksta keliomis stadijomis, todėl dažnai yra vadinama laisvųjų radikalų oksidacija. Laisvasis radikalas yra labai reaktingas ir reaguodamas su deguonimi sudaro peroksidus bei hidroksiperoksidus. Šie laisvieji radikalai taip pat skatina tolesnę oksidaciją ir kitų laisvųjų radikalų susidarymą. Galiausiai hidroperoksidai skyla į mažesnės molekulinės masės junginius, tokius kaip aldehidai, ketonai, alkoholiai ir rūgštys [60].

Antioksidantai būna sintetiniai bei natūralūs, randami įvairiuose augaluose. Sintetiniai: butilhidroksianizolis, butilhidroksitoluenas, butilintas hidrokvinonas bei galo rūgšties esteris; natūralūs: tokoferoliai, citrinų rūgštis, lecitinai, fenoliniai junginiai ir kiti junginiai.

Laisvieji radikalai sukelia ląstelių pažeidimus bei polinesočiųjų riebalų rūgščių peroksidaciją ląstelių membranose. Reaktyvusis deguonis bei aktyvios azoto formos gali sukelti deoksiribonukleorūgščių (DNR), ribonukleorūgščių (RNR), angliavandenių, lipidų, fermentų ar baltymų oksidacines modifikacijas, kas turi įtakos tokioms ligoms kaip kraujagyslių ir širdies ligos, virškinamojo trakto sutrikimai, diabetas, piktybiniai navikai, katarakta, Parkinsono liga, Alzheimerio liga, sąnarių uždegiminiai procesai, atsiradimą [24].

Laisvieji radikalai – tai atomai ar atomų grupės, turinčios neparinį elektronų skaičių. Laisvieji deguonies radikalai - tai superoksido radikalas, peroksilo radikalas (ROO^\cdot), hidroksilo radikalas (OH^\cdot), ne radikalinės kilmės junginiai, tokie kaip vandenilio peroksidas (H_2O_2), hipochlorito rūgštis (HOCl); aktyviosios azoto formos – azoto oksido radikalas ($\cdot\text{NO}$) ir azoto dioksido radikalas ($\cdot\text{NO}_2$) [24].

Nuo oksidacinio streso pažeidimų žmogaus organizmo ląstelės apsisaugo naudodamos fermentines ir su fermentais nesusijusias antioksidantines sistemas. Tačiau kartais šie apsaugos mechanizmai būna nepakankami, todėl žmogus turi gauti papildomus antioksidantų kiekius.

Antioksidanto gebėjimą surišti laisvuosius radikalus lemia šie faktoriai :

- ✓ antioksidanto bei laisvojo radikalo molekulių struktūrinis suderinamumas;
- ✓ sąveika su kitais antioksidantais;
- ✓ antioksidanto ir laisvųjų radikalų koncentracija;
- ✓ absorbcija, metabolizmas bei pasiskirstymas [25].

1.7. Ekstrakcijų metodai

Natūralių bioaktyvių ir kitų vertingų medžiagų išskyrimas ir jų frakcionavimas yra vieni svarbiausių uždavinių siekiant racionaliai panaudoti augalinę žaliavą. Matematiniai tiriamų ekstrakcijos ir frakcionavimo procesų modeliai galėtų būti pritaikyti gamybinėmis sąlygomis. Tokie tyrimai turi tiek teorinę, tiek ir praktinę vertę, nes prisideda prie įvairios cheminės sudėties ir savybių medžiagų išskyrimo iš sudėtingos biologinės matricos procesų išaiškinimo bei gali būti pritaikomi pramoniniam augalų perdirbimui. Parinkus tinkamus pirminio apdirbimo bei ekstrakcijos parametrus, galima selektyviai išskirti naudingų augaluose esančių medžiagų frakcijas bei jas sukonzentruoti.

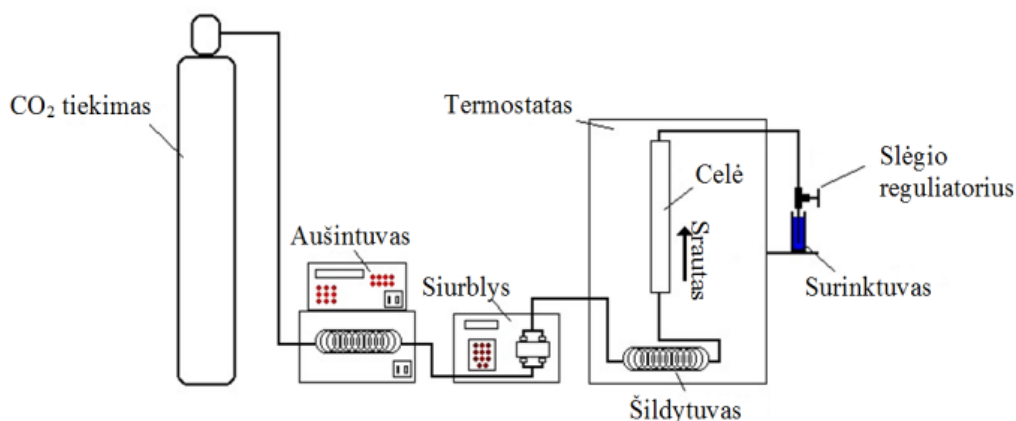
1.7.1. Superkritinė CO_2 ekstrakcija

CO_2 ekstrakcijos metodas paremtas anglies dvideginio dujų savybe transformuotis į specifinę būklę, kuri vadinama superkritiniu skysčiu. Šioje būklėje anglies dvideginis gali būti naudojamas perkoliacijos ir maceracijos procesuose kaip bet kuris kitas tirpiklis. Vienintelė būtina sąlyga yra ta, kad darbo metu dujos turi būti suslėgtos, o tai reikalauja specialios ir vis dar gan brangios aparatūros. Tai pats didžiausias šio metodo trūkumas, ypač smulkiems augalinių aliejų spaudėjams ir aromatinių junginių distiliuotojams [26].

CO_2 – tai stabilios ir inertiškos dujos, nepaliekančios išgautame ekstrakto tirpiklio nuosėdų ar likučių, nedegios, tinkamos maisto gamybai. Jos nekenkia aplinkai ir nesukuria jokių pašalinių produktų [27].

Suslėgtos anglies dvideginio dujos ekstraktoriuje cirkuliuoja uždaru ratu, kuris padalijama į dvi dalis: aukštesnio slėgio zoną ir žemesnio slėgio zoną. Aukšto slėgio kolonoje CO_2 dujos, suslėgtos iki superkritinio skysčio būklės, teka per ekstraktorių, kuriame sukrauta augalinė žaliava. Perėjęs specialų vožtuvą superkritinis CO_2 skystis praranda slėgį ir savybes, o ekstraktas kondensuojamas ir surenkamas

specialiame inde. Anglies dvideginis regeneruojamas, kondensuojamas ir sugražinamas atgal į darbinį ciklą. Temperatūros reguliatoriai yra atsakingi už tikslų temperatūros režimą ekstraktoriuje.



4 pav. Superkritinės CO₂ ekstrakcijos schema

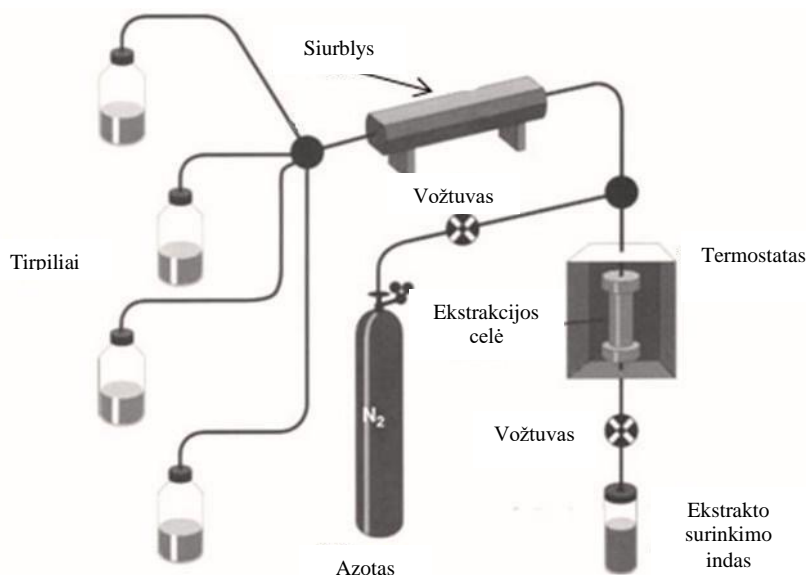
Anglies dvideginio dujos pasižymi reguliuojamu selektyvumu (atrankumu), kitaip sakant, keičiant slėgį ir temperatūrą galima keisti tarpiklio gebėjimą tirpinti skirtingus augalo junginius.

Visų frakcijų, arba pilnieji, CO₂ ekstraktai, susidedantys iš bioaktyvių lipofilinių augalo junginių: riebiųjų aliejų (sočiųjų ir nesočiųjų riebalų rūgščių), vašku, pigmentų, vitaminų, aromatinių ir kt. junginių, gaunami naudojant aukšto tankio dujas ir slėgimą nuo 20 MPa iki 50 MPa. CO₂ ekstraktai turi daugybę gydomųjų ir kosmetinių komponentų – antioksidantų, polifenolinių junginių, karotenu, fitosterolių, tokių kaip skvalenas, antocianų ir t. t.

1.7.2. Pagreitinta skysčių ekstrakcija (PSE)

Tai visiškai automatizuota greita skysčių ekstrakcija, skirta organiniams junginiams išskirti iš skystų ir pusiau skystų matricų. Schematinė PSE diagrama pavaizduota 5 pav. [28].

Ekstrakcija susideda iš kombinuoto dinaminio ir statinio skysčio tekėjimo per įkaitintą ekstrahavimo celę, kurioje yra mėginys. Šios celės turi būti atsparios aukštam slėgiui. Dažniausiai jos pagamintos iš nerūdijančio plieno. Mėginio celė yra užpildoma tirpikliu. Labai svarbu, kad visa tuščia ertmė celėje būtų užpildyta tirpikliu, kad būtų geras sąlytis su mėginiu ir kad nevyktų analizuojamos medžiagos oksidacija, kuri gali vykti dėl likusio deguonies ir aukštos temperatūros. Tada mėginio celė yra kaitinama kaitinimo šaltiniu. Kad tirpiklis išliktų skystoje fazėje, turi būti parinktas tam tikras slėgis. Sistemos slėgis turi būti didesnis nei slenkstinis, kad išlaikyti tirpiklį skystoje fazėje nustatytoje temperatūroje ir kad jis galėtų judėti per mėginį reikiamą laiko tarpą. Tam naudojamas HPLC tipo siurblys, kuris gali sudaryti 6,9 20,7 MPa slėgį [28].



5 pav. Pagreitinotos skysčių ekstrakcijos schema

Kai pasiekama šilumos pusiausvyra, mėginio celė yra laikoma nustatytoje temperatūroje maždaug 5-10 minutes. Šios statinės fazės metu, junginiai skverbiasi iš mėginio į tirpiklį. Po to, yra atidaromas išleidimo vožtuvas ir pamatuotas skysčio tūris yra leidžiamas per mėginį, išleidžiant anksčiau sukauptą ekstrakto tūrį į surinkimo indą. Galiausiai, suspaustomis azoto dujomis, išstumiamas likęs tirpiklio kiekis iš celės. Labai svarbu, kad visas tirpiklis, naudotas ekstrakcijos metu būtų surinktas analizei.

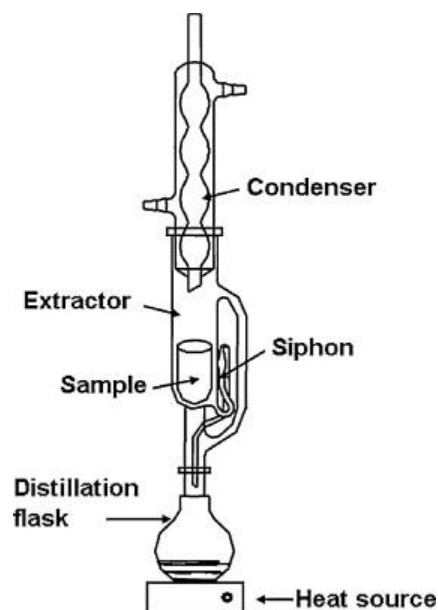
Norint ištirti naują medžiagą, reik parinkti ir nustatyti optimalius parametrus. Pirmiausia reikia parinkti ekstrakcijos celės dydį, kuris atitiktų turimo mėginio kiekį. Celės neturi būti pilnai užpildomos, bet kuo pilnesnė celė, tuo mažiau bus sunaudota tirpiklio ekstrakcijos metu. Po to reikia pasirinkti koks bus naudojamas tirpiklis. Reikia pakartoti ekstrakciją kelis kartus, tada nustatyti išeigą. Jei analizuojamo mišinio yra antrame ir trečiame ekstrakto, reikia keisti proceso parametrus ir kartoti patį procesą: kelti temperatūrą, pridėti antrą ar net trečią statinį ciklą, padidinti statinį laiką. Jei šie žingsniai nepadeda užbaigti ekstrakcijos, reikia dar kartą išanalizuoti mėginio paruošimą ir gal net keisti tirpiklį.

1.7.3. Soksleto ekstrakcija

Soksleto ekstrakcija yra naudinga norint sukcentruoti analizuojamą medžiagą pilnai atskiriant nuo pagrindinės matricos ar padalinant į atskiras medžiagas. Tradicinė Soksleto ekstrakcija išlieka vienas iš aktualiausių metodų naudojamų šiandien.

Soksleto ekstrakcijoje plačiausiai naudojamas tirpiklis yra heksanas, kuris gerai pasižymi nepolinių junginių ekstrahavimu, pavyzdžiui, augalinio aliejaus. Be to, Soksleto aparatu išskiriami junginiai turi pasižymėti dideliu patvarumu parinkto ekstrakcijos tirpiklio virimo temperatūroje, nes ekstrahuojama frakcija kaupiasi apvaliadugnėje kolboje su pačiu tirpikliu. Išties heksanas nėra aplinką tausojantis tirpiklis, todėl mokslininkai bandė ieškoti sprendimų ir panaudoti kitus tirpiklius, kurie būtų

netoksiški. Soksleto ekstrakciją labai sąlygoja ekstrahuojamos medžiagos savybės ir dalelių dydis, nes lėtas tirpiklio prasiskverbimas į kietąją medžiagą riboja ekstrahavimo efektyvumą [29].



6 pav. Soksleto aparatas

Pagrindiniai Soksleto ekstrakcijos privalumai yra, kad palaikoma gana aukšta ekstrakcijos temperatūra (~70°C) distiliavimo kolboje, nėra reikalingas frakcijos perfiltravimo procesas, metodo galima neprižiūrėti, kadangi trunka ilgai, bei šis metodas yra paprastas ir nereikalaujantis brangios aparatūros. Soksleto ekstrakcijos trūkumai: per ilgas ekstrahavimo laikas, naudojami tirpikliai yra toksiški, brangūs, sunaudojami jų dideli kiekiai, taip pat frakcijoje susidaro didelis tirpiklio kiekis, kurį nugarinti sunaudojami papildomi išteklių ir, žinoma, laikas. Be to, vienas iš svarbių šios ekstrakcijos trūkumų yra tam tikrų junginių skilimas aukštoje tirpiklio virimo temperatūroje.

1.8. Baltymų elektroforezė

Elektroforezė yra vienas plačiausiai naudojamų analizinių metodų. Tai metodas, kurį naudojant dviejų ar daugiau skirtingus krūvius turinčių molekulių ar dalelių atskyrimas laidžioje terpėje veikiant elektros srovės elektriniam laukui vyksta dėl skirtingų judrumų. Molekulės, turinčios skirtingus arba skirtingo dydžio krūvius, judės skirtingomis kryptimis arba skirtingu greičiu link priešingą krūvį turinčių elektrodų.

Baltymai yra amfoterinės molekulės, turi teigiamą ir neigiamą krūvį turinčių grupių. Bendrą baltymo molekulės krūvį nulemia į baltymo sudėtį įeinančių teigiamai ir neigiamai įkrautų aminorūgščių krūvių suma ir jis priklauso nuo terpės pH. Kiekvienas baltymas tam tikrame pH krūvio neturi ir tame pH, veikiant elektros laukui baltymas nemigruos. Ši pH reikšmė vadinama baltymo izoelektriniu tašku, arba pI. Neigiamą krūvį turintys baltymai, kai terpės pH > pI judės elektriniame lauke link anodo. Pažeminus pH iki mažesnio, nei yra baltymo pI, baltymas įgaus teigiamą krūvį ir judės link katodo [25].

Elektroforezė yra labai paprastas, greitas ir jautrus metodas baltymų savybių tyrimui. Elektroforezės pagalba galima frakcionuoti ir palyginti baltymų mišinius, pvz.: skirtingose ląstelių fiziologinėse būsenose, tirti baltymų grynumą skirtingose gryninimo stadijose ir nustatyti baltymų fizikines savybes, kaip antai izoelektrinis taškas, dydis, krūvis ar subdalelinė sudėtis. Elektroforezė dažniausiai naudojama kaip analizinis metodas, rečiau kaip preparatyvinis metodas [25].

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1. Chemikalai ir reagentai

2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfo rūgštis) (ABTS•+, Sigma-Aldrich, Steinheimas, Vokietija), anglies dioksido dujos (99,9 %) gautos iš Gaschema (Jonavos r., Lietuva), Folin–Ciocalteu fenolinis reagentas gautas iš Merck (Darmstadt, Vokietija), galo rūgštis (>99 %) ir natrio karbonatas (98 %, bevandenis) gauti iš Sigma-Aldrich (Mousa, Sent Luisas, JAV), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis (Troloksas, ≥ 97 %), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH•, radikalas, 99 %), kalio persulfatas, kalio dihidrofosfatas, vandeninis natrio hidrofosfatas gauti iš Sigma-Aldrich (Mousa, Sent Luisas, JAV), acetonitrilas gautas iš VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Prancūzija), analitinio grynumo heksanas iš Chempur (Lenkija), metanolis ($\geq 99,9$ %) gautas iš Sigma-Aldrich (Vokietija), azoto dujos gautos iš Gaschema (Jonavos r., Lietuva), 2,2'-azobis-2-metilpropanimidamid dihidrochloridas (AAPH), NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Lach-Ner, Brno, Čekija), Na_2HPO_4 (Merck KGaA, Darmstadas, Vokietija), Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich), H_2SO_4 , NaOH, H_3PO_4 , (Sigma-Aldrich), HCl (35-38%, Chempur, Piekary Slaskie, Lenkija), skvalenas (99%, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, JAV), boro trifluoridas (24% metanolinis tirpalas, Acros organics, Geel, Belgija), etanolis (96.3%, maistinis, Stumbras, Kaunas, Lietuva), heksanas (PENTA Chemikalien, Mainaschaff, Vokietija), skystas azotas (AGA SIA, Ryga, Latvija), ASE filtrai (Glass Fiber_(X)_Cellulose, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, JAV), diatomitinė žemė (100 % SiO_2 , Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, JAV), buferis (MES SDS Running Buffer (20X), Van Allen Way Carlsbad, CA, JAV), buferis (LDS Sample Buffer (4X), Van Allen Way Carlsbad, CA, JAV), kristalinis tripsinas (VWR International Ltd., Hunter Boulevard, JAV), α -chimotripsinas (Sigma-Aldrich, Steinheimas, Vokietija), 30 % akrilamido tirpalas, 4xTRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas (pH 8,8), ·HCl/NDS buferinis tirpalas (pH 6,8), elektroforezės TRIS – glicino buferinis tirpalas, 10 % amonio persulfato tirpalas, tetrametiledilendiaminas (TEMED), 2 x baltymo denatūravimo buferinis tirpalas, standartinis baltymų mišinys, 10 % acto rūgštis, dažo Coomassie mėlio tirpalas, baltymams dažyti Coomassie mėliu baltymo tvirtinimo tirpalas.

2.2. Kanapių sėklų žaliava

Buvo gautos ekologiškos kanapių sėklos (*Canabis sativa*, veislė Finola) iš UAB „Agropro“ 2015 metų derliaus. Sėklos buvo laikomos sandariai uždarytos kambario temperatūroje tamsioje, gerai vėdinamoje patalpoje.

Dalis sėklų buvo panaudota išgauti aliejui, todėl jos buvo presuotos šalto spaudimo presu (Ankarsum Assitent, Švedija). Aliejus buvo naudojamas oksidacinio stabilumo tyrimams. Į jį buvo pridėta sintetinių ir natūralių antioksidantų. Kita dalis sėklų ir taip pat po presavimo likusi sėklų masė buvo smulkinama ultra centrifuginiu rotoriniu malūnu (Retsch ZM200, Retsch GmbH, Vokietija) (10000 rpm). Sėklos buvo susmulkintos į 3 frakcijas: 1mm, 0,5mm ir 0,2mm dalelių dydžio naudojant skirtingus malimo sietus. Susmulkinta žaliava buvo laikoma sandariuose stiklainiuose. Soksleto ekstrakcijai buvo naudotos sėklos smulkintos kavamale, kad nustatyti aliejaus kiekį jose. Kitų ekstrakcijų metu (superkritinės CO₂ ir pagreitinotos skysčių ekstrakcijos) buvo naudotos visos trys frakcijos. Skirtingų ekstrakcijų metu buvo gauti įvairūs ekstraktai, kurie buvo naudojami antioksidacinių savybių nustatymui. Taip pat buvo atlikta nuriebintų sėklų Osbornio ekstrakcija skirtingais tirpikliais: vandeniu, 0,1 N druskos tirpalu, etanolio ir vandens mišiniu (7:3), 0,1 N NaOH tirpalu. Vandenyje tirpsta – albuminai, druskos tirpale – globulinai, prolaminai – etanolyje, baziniuose tirpaluose – gliuteinai. Atlikus ekstrakciją, tirpalai liofilizuoti, o etanolis nugarintas rotaciniu garintuvu. Apskaičiuotos baltymų išeigos pagal kanapių masę. Po to nustatytas baltymų kiekis Kjeldalio metodu kiekviename ekstrakto ir apskaičiuotas baltymų išeiga pagal bendrą baltymų kiekį. Buvo gauta: albuminų – 18,38 %, globulinų – 14,23 %, prolaminų – 0,89 %, gliuteinų – 32,15 %, netirpi frakcija – 34,35 %.

2.3. Kanapių sėklų ir aliejaus cheminė sudėtis

2.3.1. Drėgmės kiekio nustatymas

Iškaitintame sausame pasvertame biukse, pasveriamas 3-5 g gramai susmulkintų kanapių sėklų. Mėginys pasvertas ir sumaišytas su iškaitintu smėliu ir kaitinamas termostate 110°C temperatūroje. Pirmą kartą mėginys buvo pasvertas po 1,5 valandos ir vėl gražintas kaitinimui. Po to svėrimas buvo kartojamas kas pusvalandį tol, kol nebekito svoris (0,001-0,005 g kitimas). Prieš svėrimą, biuksai būdavo aušinami eksikatoriuje. Eksperimentas buvo pakartotas tris kartus. Drėgmės kiekis (%) apskaičiuotas pagal formulę (1):

$$x = \frac{(m_1 - m_2) * 100}{m_1 - m}; \% \quad (1)$$

m – biukso ir dangtelio svoris g; m₁ – biukso ir mėginio svoris prieš kaitinimą g; m₂ – biukso ir mėginio svoris po kaitinimo g.

2.3.2. Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas

Porcelianinis tiglio kaitinamas mufelyje iki pastovaus svorio. Į tigli 0,0002 g tikslumu pasveriami 3 g smulkintų ir nuriebintų tiriamųjų kanapių sėklų. Tigli su bandiniu padedamas ant elektrinės plytelės ir apanglinamas, kol iš tiglio nustoja rūkti dūmai. Po to tigli perkeliama į mufelinę krosnį, kurio vidaus temperatūra – 600–650 °C. Deginimas trunka 1–2 h.

Po apanglinimo bandinys perkeliama į mufelį ir deginamas tol kol dviejų nuoseklių svėrimų rezultatai skirsis 0,0001–0,0005 g. Deginimas trunka apie 15–16 h. Eksperimentas kartojamas tris kartus.

Pelenų kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal formulę (2):

$$x = \frac{(m_2 - m) \cdot 100}{m_1 - m}, \% \quad (2)$$

Čia: m – tiglio svoris, g; m_1 – tiglio svoris su bandiniu, g; m_2 – tiglio svoris su pelenais, g.

2.3.3. Riebalų kiekio nustatymas

20 g susmulkintų (kavamale) kanapių sėklų buvo įdedama į celiuliozinę tūbelę ir užkemšama vata. Po to, tūbelė patalpinama į Soksleto aparatą ir per šaldytuvo viršų užpildoma 200 ml heksano tirpikliu. Ekstrakcija vykdoma 3 val. nustatant 80 % kaitinimą. Pasibaigus ekstrakcijai heksanu, tūbelė su medžiaga džiovinama 50°C temperatūroje džiovinimo spintoje iki pastovios masės ir pasveriamos 0,0002 g tikslumu. Frakcijos buvo surinktos apvaliadugnėse kolbose ir iš jų tirpikliai pašalinti vakuuminiu rotaciniu garintuvu (Biuchi Labortechnik AG, Konzanz, Šveicarija) esant 40 °C temperatūrai. Frakcijos baigiamos džiovinti azoto dujų sraute, pasveriamos iki pastovios masės ir laikomos sandariai uždarytos tamsaus stiklo buteliukuose –18 °C temperatūroje iki tolimesnių tyrimų. Išeiga buvo apskaičiuota pagal formulę (3):

$$x = \frac{(a-b) \cdot 100}{m}; \% \quad (3)$$

a – kolbos svoris su mėginiu po ekstrakcijos (arba tūbelės svoris su mėginiu prieš ekstrakciją), g; b – tuščios kolbos svoris (arba tūbelės svoris su mėginiu po ekstrakcijos), g; m – mėgnio svoris, paimtais ekstrakcijai, g.

2.3.4. Baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu

1 g susmulkintų ir nuriebintų kanapių sėklų pasveriami į Kjeldalio kolbą 0,0002 g tikslumu. Ant mėginio Kjeldalio kolboje įpilama 20 ml koncentruotos, įdedama katalizatoriaus tabletė (sudėtis: K_2SO_4 ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; TiO_2). Tuomet kolba statoma ant elektrinio kaitintuvo ir kaitinama (programa: 90 min. 60% temp.). Pasibaigus programai aparatas išjungiamas ir kolbos atvėsinaimos.

Atvėsinta kolba dedama į distiliavimo aparatą ir įjungiamas programa. Šalia paruošiama kūginė 250 ml kolba distiliatui surinkti. Pagal programą buvo pasirinkti tokie parametrai: 3 s NaOH ir 3 s H_3BO_4

užpildymas ir distiliavimo laikas 300 min, garavimo intensyvumas 80 %. Distiliatas nutitruojamas 0,01 N arba 0,1 N HCl tirpalu, naudojant Taširo indikatoriumi (indikatorius titravimo metu žalią spalvą keičia į violetinę). Lygiagrečiai tomis pačiomis sąlygomis nudistiliuojamas ir nutitruojamas toks pat kiekis distiliuoto vandens (tuščiasis mėginys).

Iš tiriamo produkto mėginio išsiskyręs azoto (N) kiekis apskaičiuojamas taip (4):

$$N = [1,4 \times n \times K (VI - V_0)] / m (\%), \quad (4)$$

kur 1,4 – azoto kiekis, kurį sujungia 1 ml 0,1 N HCl; 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas iš distiliuojamo mineralizato išsiskyrusiam amoniakui sujungti, ml; V_0 – 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas tuščiajam mėginiui nutitruoti, ml; m – pasvertas analizei medžiagos kiekis, g; n – druskos rūgštis, naudotos titravimui, normalingumas (0,01N arba 0,1 N HCl); K – druskos rūgštis tirpalo pataisos koeficientas (1, jei nėra atliekamas atskiras įvertinimas).

Baltymų kiekis apskaičiuojamas: $B_{pr} = N \cdot k$, kur N - azoto (N) kiekis, k - koeficientas perskaičiuoti azoto kiekį į baltymų kiekį (6,25).

2.3.5. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas dujų chromatografijos metodu

Šiuo metodu nustatomi riebalų rūgščių metilo esteriai turintys nuo 8 iki 24 anglies atomų grandinę. Trigliceridų esterinimui ir laisvų rūgščių apmuilinimui 0,5 g aliejaus ir 4 ml metanolinis NaOH (0,5 N) supilama į 50 ml apvaliadugnę kolbą ir kaitinama su grįžtamuju šaldytuvu, kol išnyksta riebalų fazė (apie 5-10 min). Virimui sulygtinti įdėtas pemzos gabaliukas.

Esterifikavus riebalus per šaldytuvo viršų įpilama 5 ml 24 % Boro trifluorido/metanolio komplekso ir verdama dar 2 min., atšaldoma iki kambario temperatūros. Bandinys praskiedžiamas 5 ml n-heksanu ir tiek pat NaCl, gerai suplakama. Palikti, kol nusistos sluoksniai. Viršutine heksano fazė atskiriama pastero pipete ir laikoma 4°C temperatūroje iki analizės. Analizei imama 100 μl heksano fazės ir praskiedžiama 900 μl heksanu.

Analizė atlikta dujiniu chromatografu HRGC 5300 (Mega Series, Carlo Erba, Milan, Italy) naudojant liepsnos jonizacinį detektorių su poline SPTM-2560 kolonėle (100 m ilgio, 0,25 mm vidinio skersmens, adsorbento sluoksnis 0,20 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)). Krosnies temperatūra buvo užprogramuota nuo 80°C ir didėjant iki 240°C kas 4°C/min. Inžektoriaus (bandinio įleidimo kameros) temperatūra 220°C, o detektoriaus – 240°C. Įleisto bandinio kiekis – 1 μl. Junginiams identifikuoti naudotas etaloninis 37 riebalų rūgščių mišinys (Supelco™). Rūgščių metilo esteriai identifikuojami pagal išlaikymo laikus, o procentinė riebalų rūgščių sudėtis apskaičiuojama smailių plotus lyginant su etaloniniais smailių plotais.

2.4. Aliejaus oksidacinis stabilumas

Šalto spaudimo kanapių aliejaus oksidaciniam stabilumui įvertinti buvo naudojami skirtingi metodai, stebimas oksidacijos produktų kitimas. Taip pat į aliejų buvo pridėta skirtingų antioksidantų – natūralių ir sintetinių skirtingomis koncentracijomis:

natūralūs:

- Rozmarinų ekstraktas „Oleoresin rosemary, Herbalox“ (ORH) 0,1 %, 0,2 %, 0,4 % koncentracijų;
- „DURALOX BLEND AN-110 XT“ 0,1 %, 0,2 %, 0,4 % koncentracijų;
- „DURALOX OXIDATION MANAGEMENT“ (DOM) 0,1 %, 0,2 %, 0,4 % koncentracijų;

sintetiniai:

- Butilhidroksianizolis (BHA) 0,02 % koncentracijos;
- Tertbutilhidroksikinas (TBHQ) 0,02 % koncentracijos.

Šie natūralūs antioksidantai stabilizuoja tiek riebalus tiek patį iškeptą produktą, apsaugant nuo oksidacijos [61]. Koncentracijos buvo parinktos pagal gamintojo nurodymus. Sintetinių antioksidantų leidžiamos vertės pagal EB Nr. 1333/2008 [47] yra iki 0,02 %.

Buvo nustatomas kanapių aliejaus oksidacinis stabilumas su šiais antioksidantų priedais naudojant Oksipres ir Rancimat metodus. Taip pat buvo sudarytas eksperimentas, kai paskirstytas aliejaus kiekis buvo sumaišytas su nurodytais antioksidantų priedais. Kiekvieną mėnesį buvo matuojamas peroksidų skaičius šių aliejaus bandinių. Tai buvo atliekama pusantrų metų, kol baigėsi aliejus. Be to, vėliau buvo atliktas panašus eksperimentas su ekstraktu, gautu po superkritinės CO₂ ekstrakcijos. Tik į šį ekstraktą buvo pridėta vieno antioksidanto – rozmarino ekstrakto „Oleoresin rosemary, Herbalox“, skirtingomis koncentracijomis: 1 %, 0,7 %, 0,4 %, 0,2 %. Peroksidų skaičius taip pat buvo matuojamas kas mėnesį, kol baigėsi ekstraktas.

2.4.1. Peroksidų skaičiaus nustatymas jodometriniu metodu

Peroksidų skaičius parodo, kiek tiriamuose riebaluose yra junginių (peroksidų ar į juos panašių riebalų oksidacijos produktų), kuriuos atliekant analizę oksiduoja jodidas. Tai svarbus riebalų kokybės rodiklis, iš jo sprendžiama apie riebalų sugedimo laipsnį. Matavimo vienetas – mekv/1000g.

Riebalų bandinys, veikiamas rūgščioje aplinkoje kalio jodidu, iš kurio išsiskiria laisvas jodas ir yra nutitruojamas natrio tiosulfatu (Na₂S₂O₃). Titravimo metu sunaudoto natrio tiosulfato tirpalo kiekio pagalba paskaičiuojama aliejaus peroksidų skaičius (PS).

Aliejus (5±0,05 g) ištirpintas 30 ml izooktano – ledinės acto rūgšties (2:3) tirpale ir pridėdama 0,5 ml sotaus KJ. Tirpalas plakamas lygiai 1 min, praskiestas 30 ml distiliuotu vandeniu ir titruotas 0,01 N natrio tiosulfato tirpalu įlašinus kelis lašus 1 % krakmolo kleisterio kaip indikatorius, kol pranyks

mėlyna spalva. Lygiagrečiai atliekama kontrolinė analizė (be riebalų). Peroksidų kiekis (PS), išreikštas mekv aktyvaus deguonies/kg aliejaus apskaičiuojamas taip (5):

$$PS = ((V - V_1) * N * 1000) / m; \quad (5)$$

V ir V₁ - natrio tiosulfato tirpalo, sunaudoto atitinkamai tiriamajam ir kontroliniam bandiniams nutitruoti, kiekis, ml; N - natrio tiosulfato tirpalo koncentracija; m - bandinio masė, g.

2.4.2. Rūgštingumo (LRR) nustatymo metodas

Rūgščių skaičius, tai kalio šarmo kiekis miligramais, reikalingas neutralizuoti riebalų rūgštis, esančias viename grame riebalų ar aliejaus.

Aliejus ištirpintas 50 ml neutralizuotame dietilo ir etanolio mišinyje (1:1), 250 ml talpos kūginėje kolboje. Tirpalas maišant titruojamas 0,1 N koncentracijos KOH tirpalu iki indikatoriaus ekvivalentinio taško (rožinė spalva, neišnyksta 10 sekundžių – fenolftaleinui).

Rūgštingumas apskaičiuojamas pagal formulę (6):

$$R = V * c * M / 10 * m, \% \quad (6)$$

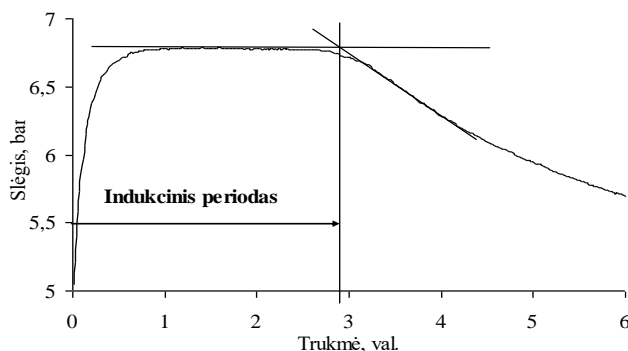
V – titravimui sunaudoto KOH tirpalo tūris, ml; c – tiksli KOH tirpalo koncentracija, mol/l; m – bandinio masė, g; M – molinė pasirinktos rezultatų skaičiavimams rūgšties masė, g/mol.

2.4.3. Aliejaus oksidacinis stabilumas Oksipres metodu

Šiuo metodu buvo nustatomas oksidacinis kanapių aliejaus stabilumas, naudojant įvairius antioksidantų priedus.

Instrumentiniu oksipreso metodu nustatant aliejaus indukcinį periodą valandomis (toliau IP, val), tiriamas aliejaus stabilumas oksidacijai aukštoje temperatūroje (110°C), esant deguonies slėgiui.

Reikalingas bandinio kiekis 5 g (pasveriamą 0,0002 g tikslumu) patalpintas į reakcijos celę. Oksidacija tirta 110°C temperatūroje, deguonies slėgis 0,5 MPa (5 bar). Prietaisas automatiškai nubrėžia deguonies slėgio kitimo kreivę ir apskaičiuoja IP. Gautų tyrimų rezultatų standartinis nuokrypis neviršija 0,05 (t.y. 5 %).



7 pav. Oksipresu užrašyta oksidacijos kinetinė kreivė ir indukcinio periodo nustatymo liestinės

2.4.4. Aliejaus oksidacinis stabilumas Rancimat metodu

Šis metodas skirtas nustatyti aliejaus oksidacinį stabilumą, pagreitinant jo oksidacijos procesą. Buvo naudojami įvairūs antioksidantų priedai.

5 g (0,0002 g tikslumu) kanapių aliejaus pasveriamas tiesiai į reakcijos indą. Tada indai uždaromi dangteliais, kurie sujungti su oro padavimo žarnelėmis ir įstatomi į Rancimat įrangą. Naudoti reakcijos parametrai buvo tokie: temperatūra – 110°C, dujų srautas – 20 l/h, slėgis – 0,5 MPa. Prietaisas automatiškai nubrėžia deguonies slėgio kitimo kreivę ir apskaičiuoja indukcinį laiką.

2.5. Superkritinė CO₂ ekstrakcija (SKE-CO₂)

SFE-CO₂ buvo atlikta „Helix“ ekstrakcijos sistema (Applied Separation, Allen–town, PA, JAV). Kiekvienai ekstrakcija buvo naudota 20 g smulkintų kanapių: 1mm, 0,5 mm ir 0,2 mm dydžio, kurių viena rūšis buvo naudojama iš po šalto aliejaus presavimo galutiniam nuriebinimui, o kita dalis nepresuotų, nustatyti išėigą. Mėginys buvo patalpintas į 30 cm³ celę. Abiejuose celės galuose buvo įstatyti filtro popierėliai, kad nepatektų mėginio į ekstrakcijos sistemą. CO₂ dujų srautas, tekantis sistemoje, buvo išmatuotas elektroniniu srauto matuokliu standartiniais litrais per minutę (SL/min) standartinėmis sąlygomis (P_{CO2}= 100 kPa, T_{CO2}= 20°C, ρ_{CO2}=0.0018 g/ml). Procesas susidėjo iš statinės ir dinaminės fazės. Statinė fazė vyko 20 min, o dinaminė – 4 val. Ekstrakcija buvo vykdoma šiomis sąlygomis: temperatūra – 40°C ir 60°C, slėgis – 40 MPa, laikas – 4 val. Išėigai nustatyti prieš ekstrakcija buvo pasveriamas stiklinis indelis, po to po ekstrakcijos pasveriamas su mėginiu. Ekstraktai buvo laikomi tamsiuose buteliukuose, -18°C temperatūroje. Ekstrakcijos liekna buvo laikoma stiklainiuose.

2.6. Pagreitinta skysčių ekstrakcija (PSE)

PSE buvo atlikta naudojant ASE-350 (Thermo Scientific Dionex, Sunnyvale, CA, JAV) įrangą. Ekstrakcijai buvo naudojama etanolis, distiliuotas vanduo bei acetonas. Kaip mėginys buvo naudojamas likutis po SFE-CO₂ ir Soksleto ekstrakcijos.

10 g bandinio buvo patalpinta į nerūdijančio plieno celę, o kad nepatektų dalelės į ekstraktą, buvo naudojami celiulioziniai filtrai, kurie dedami celės viršuje ir apačioje. Užpildyta celė, patalpinta į ekstraktoriaus karuselę. Celė siurbliu užpildoma tirpikliu ir kaitinama iki 70 ar 130°C temperatūros. Tada vykdomas statinė ekstrakcija – 3 ciklai po 5 minutes, 1500 psi (10,3 MPa) slėgyje. Po statinės ekstrakcijos ekstraktas išstumiamas su 60 % celės tūrio šviežiu tirpikliu ar tirpiklių mišiniu ir prapučiamas 60 s azoto dujų srautu į 40 ml surinkimo indą. Ekstrakcijos sąlygos tirpikliams: acetono darbinė temperatūra - 40°C, etanolio 70°C, o vandens 70 ir 130 °C.

Etanolis ir acetonas iš ekstraktų pašalinamas naudojant vakuuminį rotacinį garintuvą *Büchi R-210, Flawil*, (Šveicarija), o vanduo – liofilizatorių *Telstar, LyoQuest* (JAV). Ekstraktai baigiami džiovinti

azoto dujų sraute, pasveriami iki pastovios masės ir laikomi sandariai uždaryti tamsaus stiklo buteliukuose –18 °C temperatūroje iki tolimesnių tyrimų.

2.7. Antioksidacinės savybės

Antioksidacinio aktyvumo matavimams paruošti koncentruoti ekstraktų tirpalai, tirpinti metanolyje, kurie vėliau buvo skiedžiami metanoliu iki reikiamos koncentracijos, tyrimams atlikti.

2.7.1. Bendrasis fenolinių junginių kiekis (Folin ir Ciocalteu metodu)

Šis metodas paremtas fenolinių junginių ir Folin – Ciocalteu reagento spalvine reakcija, bei susidariusios spalvos intensyvumo matavimu spektrofotometru nustatant fenolinių junginių kiekį [30]. Nustatant fenolinių junginių kiekį tiriamuose ekstraktuose, 0,1 % koncentracijos ekstraktų tirpalai buvo tirpinti metanolyje.

Nustatant fenolinių junginių kiekį ekstraktuose sudaroma kalibravimo kreivė galo rūgščiai. Tuo tikslu paruošti standartiniai etanoliniai galo rūgšties tirpalai šių koncentracijų: 0,025; 0,075; 0,10; 0,175; 0,35 mg/ml. Tada imta 30 µl kiekvienos koncentracijos galo rūgšties tirpalo, supilama į mikrolėkštelės šulinėlius ir sumaišoma su 150 µl paruošto Folin – Ciocalteu reagentu ir 120 µl 7,5 % Na₂CO₃ tirpalu. Po 30 min. išmatuota tirpalų absorbcija spektrofotometru FLUOstar Omega esant 765 nm bangos ilgiui. Absorbcijos nulinis taškas nustatytas naudojant etanolį. Pagal gautas absorbcijos reikšmes toliau yra braižoma kalibravimo kreivė galo rūgščiai. Kreivės lygtis: $y = 7,5584x + 0,0189$; $R^2 = 0,9979$.

Nustatant skirtingų ekstraktų absorbcijos reikšmes imta 30 µl šviežiai pagaminto ekstrakto (10 mg/ml) buvo sumaišyta su 150 µl paruošto Folin – Ciocalteu reagentu ir 120 µl 7,5 % Na₂CO₃ tirpalu. Po 30 min. išmatuota tirpalų absorbcija spektrofotometru FLUOstar Omega esant 765 nm bangos ilgiui. Bendras fenolinių junginių kiekis apskaičiuojamas pagal formulę (8):

$$C = \frac{c \times V}{M} \quad (8)$$

C – polifenolių kiekis, išreikštas GRE, mg/g; c – pagal kalibracinę kreivę nustatyta GR koncentracija, mg/ml; V – tiriamojo ekstrakto tūris, ml; M – ekstrakto masė, g.

2.7.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH• radikalų sujungimo metodu

Antioksidacinio aktyvumo DPPH (EC₅₀) vertės ekstraktuose buvo nustatytos pagal Brand–Williams ir kt. (1995) DPPH• radikalų sujungimo metodo aprašymą su nedideliais pakeitimais [32].

Pirmiausia pagaminamas DPPH• tirpalas, kurį ruošiant 0,0235 g DPPH• radikalo ištirpinama metanolyje 100 ml matavimo kolboje, kuris toliau skiedžiamas metanoliu 1:10 santykiu, kad gauti

darbinį DPPH• tirpalą. Abu šie tirpalai laikomi tamsioje vietoje 4 °C temperatūroje iki tolimesnio naudojimo.

Šviežiai paruoštas ekstrakto tirpalas skiedžiamas metanoliu, kad gauti 5 skirtingas koncentracijas, po to, imama po 10 µl ir 96 šulinėlių mikroplokštelėje sumaišoma su 290 µl darbinio DPPH• tirpalu, kad gauti 300 µl reakcijos tūrį. Analogiškai paruošiami tuštieji bandiniai, tik maišoma su 290 µl metanoliu.

Spektrofotometru (Bio Tek Instruments, Winooski, VT, JAV) išmatuojama mėginių absorbcijos pokyčiai, esant 515 nm bangos ilgiui kas 60 sekundžių. Matavimas truko 40 minučių. Rezultatams suskaičiuoti kalibracinės kreivės lygtis buvo sudaryta naudojant Trolokso etaloninius įvairių koncentracijų ($0,75 \times 10^{-5}$ – 9×10^{-5} M) tirpalus. Kreivės kygtis: $y = 320,52x + 1,3739$; $R^2 = 0,9992$.

2.7.3. TEAG nustatymas ABTS•⁺ radikalo katijono sujungimo metodu

Trolokso ekvivalento antioksidacinė galia (TEAG) ekstraktuose buvo įvertinta pagal Re ir kt. (1999) ABTS•⁺ katijono radikalo sujungimo metodo aprašymą su nedideliais pakeitimais [32].

Pirmiausia ruošiamas 50 mM (pH=7,4) PBS, kurį ruošiant 1,2928 g KH₂PO₄ ir 5,7502 g Na₂HPO₄ ištirpinama ultragryname vandenyje 1 l matavimo kolboje ir pridedama fosforo rūgšties tirpalo iki pH 7,4. Pagamintas tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje ir naudojamas visų TEAG ekstraktuose įvertinimui.

Darbinis 5 mM (pH=7,4) PBS paruošiamas skiedžiant 50 ml 50 mM (pH=7,4) PBS distiliuotu vandeniu 500 ml matavimo kolboje ir, jei reikia, pridedama fosforo rūgšties tirpalo iki pH 7,4. Pagamintas tirpalas laikomas 4°C temperatūroje iki tolimesnio naudojimo.

Pradžioje pradinis 7 mM ABTS•⁺ tirpalas paruošiamas 0,0096 g ABTS•⁺ reagento ištirpinant 2,5 ml distiliuoto vandens ir sumaišant su 44 µl 139,8 mM kalio persulfato tirpalu, kuris buvo pagamintas 0,0378 g K₂S₂O₈ druskos ištirpinant 1 ml distiliuoto vandens. Po 16 valandų tirpalo laikymo tamsioje kambario temperatūroje gaminamas darbinis ABTS•⁺ tirpalas, kurį ruošiant imamas 1 ml šio tirpalo ir praskiedžiamas su 70 ml darbinio 5 mM (pH=7,4) PBS, kad išmatavus absorbciją gautųsi $0,7 \pm 0,02$ optinio tankio vienetų, kai bangos ilgis 734 nm.

Šviežiai paruoštas ekstrakto tirpalas skiedžiamas darbinio 5 mM (pH=7,4) PBS tirpalu, kad gauti 5 skirtingas koncentracijas (varijavo nuo 0,0938 iki 1,5 mg/ml ir nuo 0,0436 iki 0,7 mg/ml), po to, imama po 3 µl ir sumaišoma su 300 µl darbinio ABTS•⁺ tirpalo. Analogiškai paruošiami tuštieji bandiniai, tik maišoma su 300 µl darbinio 5 mM (pH=7,4). Spektrofotometru (FLUOstar Omega reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany) išmatuojama mėginių absorbcijos pokyčiai, esant 734 nm bangos ilgiui kas 60 sekundžių. Matavimas truko 40 minučių. Rezultatai išreiškiami standartinio antioksidanto TEAG (mmol TE/g ekstrakto) pagal išraiškos (10) formulę iš kalibracinės kreivės, kuri sudaryta naudojant Trolokso etaloninius įvairių koncentracijų (0,25–1 mM) tirpalus. Šie TEAG rezultatai buvo gauti iš 5

skirtingų koncentracijų tiriamojo ekstrakto laisvųjų radikalų sujungimo 20 – 80 % ribinių verčių linijinio grafiko. Kalibravimo kreivės lygtis: $y = 94,509x + 5,9978$; $R^2 = 0,9969$.

TEAG rezultatai pateikti kaip trijų pakartojimų vidurkis \pm standartinis nuokrypis (SN).

$$TEAG = \frac{\frac{1 \text{ mmol Trolokso}}{1000 \text{ ml}}}{\frac{\text{mg ekstrakto}}{\text{ml}}} \times \frac{\text{g}}{1000 \text{ mg}} = \frac{\frac{\text{mmol}}{1000 \text{ ml}}}{\frac{\text{g}}{1000 \text{ ml}}} = \text{mmol} / \text{g ekstrakto} \quad (10)$$

2.7.4. Deguonies radikalo absorbcijos pajėgumo (ORAC) tyrimas

ORAC ekstraktuose buvo įvertinta pagal Prior ir kt. (2003), naudojant fluoresceiną kaip fluorescentini agentą [33]. 96 šulinėlių juodoje nepermatomoje lėkštelėje, 25 μl mėginio ar metanolio (tuščias bandinys) buvo sumaišyta su 150 μl fluoresceino tirpalo (14 $\mu\text{mol/l}$), inkubuojama 15 min 37°C temperatūroje. Po to greitai pridedama 25 μl AAPH tirpalo (240 mmol/l). Tada lėkštelė įdėta į spektrofotometrą (FLUOstar Omega reader BMG Labtech, Offenburg, Vokietija), automatiškai supurtoma prieš nuskaitymą ir fluorescencija matuojama kas 66 sekundes. Matavimai atlikti esant sužadanimui 485 nm ir emisijai 510 nm. Viso ciklą 85 (94 minutės). Duomenys buvo eksportuoti iš programos Mars į Excel 2003 tolesniems skaičiavimams. Pirmiausia buvo sutvarkytos antioksidacinės kreivės ir po to buvo suskaičiuotas fluorescencijos nykimo kreivės plotas (AUC) (11):

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=150} \frac{f_i}{f_0}, \quad (11)$$

f_0 – fluorescencijos reikšmė, kai laikas 0 min, f_i – fluorescencijos reikšmė laiku i .

Kalibracinės kreivės sudarymui buvo naudota įvairių trolokso (150 μl) koncentracijų tirpalai (0-500 $\mu\text{mol/l}$ PBS). Ekstraktų TEAC_{ORAC} buvo suskaičiuoti išvedant vidurkius iš trolokso kreivių pagal formulę (12):

$$y = 0.2025x - 4,1475, R^2 = 0.9732 \quad (12)$$

2.8. Skvaleno ir tokoferolių nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (HPLC)

Skvaleno ir tokoferolių nustatymui buvo naudotas HPLC metodas pagal Gruszka and Kruk [34] su nedideliais pakeitimais. Buvo naudojama Perkin Elmer Series 200 HPLC sistema su C₃₀ reversinės fazės kolonėle (porų dydis 5 μm , 250 mm ilgio ir 4,6 mm vidinio skersmens), taikant izokratinį praplovimą acetonitrile/metanolio/dichlormetanu (72/22/6, v/v/v). Buvo naudojama 20 μl superkrizinės ekstrakcijos ekstrakto kiekio ir tekėjimo greitis buvo 1 ml/min. Skvalenui aptikti buvo naudojamas 214 nm bangos ilgio UV detektorius. Mėginiai buvo praskiesti iki 0,1 % koncentracijos. Skvalenas buvo identifikuotas lyginant jo sulaikymo trukmę su standarto tirpalo sulaikymo trukmėmis, kuris buvo paruoštas skirtingomis koncentracijomis (0-1 mg/ml). Buvo sudaryta kalibravimo kreivė, pagal kurią, buvo nustatytas skvaleno kiekis mėginiuose. Buvo atlikti trys pakartojimai. Tokoferoliai aptinkami

naudojant fluorescencijos detektorius, esant 290 nm sužadimui ir 330 nm emisijai. Tyrimo trukmė – 20 min. Analitės iš kolonėlės išplaunamos: α -T – 13,5 min, β -T – 11,5 min, γ -T – 11,0 min ir δ -T – 9,5 min. Kiekybinam nustatymui buvo sudarytos kalibracinės kreivės tokoferoliams 0–10 $\mu\text{g/ml}$.

Tokoferolių kalibracinių kreivių lygtys:

$$\alpha\text{-T } y=1092165,6x-431040,34; R^2 = 0,99;$$

$$\beta\text{-T } y=1568587,94x-12570,52; R^2 = 1,00;$$

$$\delta\text{-T } y=2041727,95x-112339,60; R^2 = 1,00$$

$$\gamma\text{-T } y=3042993,35x-116169,75; R^2 = 1,00$$

2.9. Baltymų išskyrimas ir savybės

2.9.1. Osbornio frakcionavimas

Ekstrakcija atlikta pagal Osbornio procedurą [35], su nedideliais pakeitimais.

Albuminų ekstrakcija. 100 g nuriebtų ir smulkintų kanapių sėklų buvo užpilta 2 litrais distiliuoto vandens (santykis 1:20) ir maišoma magnetu, naudojant magnetinę maišyklę 1 val. Po to mišinys centrifuguojamas 10 min 4800 aps/min greičiu naudojant 4 vietų rotorių. Indelių tūris 200 ml. Pasibaigus centrifugavimui, tirpalas nupilamas (albuminų ekstraktas) ir toliau išsaugomas. Centrifugatas užpilamas 500 ml vandens, maišomas 30 min magnetine maišykle, po to centrifuguojamas tais pačiais parametrais. Tirpalas nupilamas ir saugomas, centrifugatas užpilamas 500 ml vandens ir maišomas 15 min tais pačiais parametrais. Tada atskiriamas tirpalas ir taip pat saugomas, o centrifugatas naudojamas tolesniems baltymų išskyrimams.

Globulinų ekstrakcija. Centrifugatas likęs po albuminų ekstrakcijos, užpilamas 1 litru 0,5 N NaCl tirpalu ir maišomas magnetine maišykle 30 min. Po to mišinys centrifuguojamas 10 min 4800 aps/min greičiu naudojant 4 vietų rotorių. Indelių tūris 200 ml. Pasibaigus centrifugavimui, tirpalas nupilamas (globulinų ekstraktas) ir toliau išsaugomas. Centrifugatas užpilamas 500 ml 0,5 N NaCl tirpalu, maišomas 15 min magnetine maišykle, po to centrifuguojamas tais pačiais parametrais. Tirpalas nupilamas ir saugomas, centrifugatas užpilamas 500 ml 0,5 N NaCl tirpalu ir maišomas 15 min tais pačiais parametrais. Tada atskiriamas tirpalas ir taip pat saugomas, o centrifugatas naudojamas tolesniems baltymų išskyrimams.

Prolaminų ekstrakcija. Centrifugatas likęs po globulinų ekstrakcijos, užpilamas 1 litru 70 % etanoliniu tirpalu ir maišomas magnetine maišykle 30 min. Po to mišinys centrifuguojamas 10 min 4800 aps/min greičiu naudojant 4 vietų rotorių. Indelių tūris 200 ml. Pasibaigus centrifugavimui, tirpalas nupilamas (prolaminų ekstraktas) ir toliau išsaugomas. Centrifugatas užpilamas 500 ml 70 % etanoliniu tirpalu, maišomas 15 min magnetine maišykle, po to centrifuguojamas tais pačiais parametrais. Tirpalas nupilamas ir saugomas, centrifugatas užpilamas 500 ml 70 % etanoliniu tirpalu ir maišomas 15 min tais

pačiais parametrais. Tada atskiriamas tirpalas ir taip pat saugomas, o centrifugatas naudojamas tolesniems baltymų išskyrimams.

Gliadinų ekstrakcija. Centrifugatas likęs po prolaminų ekstrakcijos, užpilamas 1 litru NaOH tirpalu (pH=11) ir maišomas magnetine maišykle 30 min. Po to mišinys centrifuguojamas 10 min 4800 aps/min greičiu naudojant 4 vietų rotorių. Indelių tūris 200 ml. Pasibaigus centrifugavimui, tirpalas nupilamas (gliadinų ekstraktas) ir toliau išsaugomas. Centrifugatas užpilamas 500 ml NaOH tirpalu (pH=11) tirpalu, maišomas 15 min magnetine maišykle, po to centrifuguojamas tais pačiais parametrais. Tirpalas nupilamas ir saugomas, centrifugatas užpilamas 500 ml NaOH tirpalu (pH=11) tirpalu ir maišomas 15 min tais pačiais parametrais. Tada atskiriamas tirpalas ir taip pat saugomas, o centrifugatas naudojamas tolesniems baltymų išskyrimams.

Po ekstrakcijų, skirtingų frakcijų pakartojimai buvo sumaišyti tarpusavyje, nufiltruoti Biuchnerio piltuvu per vatmano filtrą, vandens srove sudarant vakuumą. Po to liofilizuoti ir apskaičiuota skirtingų frakcijų išeiga. Liofilizuoti ekstraktai laikyti sandariuose induose, tamsioje vėsioje vietoje iki sekančių tyrimų.

2.9.2. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje ir jo dažymas

Baltymų elektroforezė atlikta pagal Sanchez (1999.) [36], su nedideliais pakeitimais. Elektroforezės metu įkrautos molekulės juda elektriniame lauke. Įkrautųjų molekulių judrumas elektriniame lauke priklauso nuo jų dydžio, formos krūvio ir cheminės prigimties. Elektroforezės metu naudojami 2 geliai: skiriamasis ir koncentruojamasis, šie geliai turi ir skirtingą įtampos gradientą.

Osbornio ekstrakcijos metu gauti baltymų mišiniai tirpinami distiliuotame vandenyje ir paruošiama 1 mg/ml koncentracijos tirpalai. Prieš analizę, tirpalai atskiriami nuo druskų filtruojant per „Ultra- 15, MWCO 10 kDa“ filtrus.

Skiriamasis gelis sudarytas: 4 ml akrilamido tirpalo, 2,5 ml 4xTRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas (pH 8,8), 3,4 ml distiliuoto vandens, 100 µl 10 % amonio persulfato tirpalas, 4 µl TEMED. Skiriamasis gelis pilamas tarp elektroforezės aparato stiklo plokštelių ir paliekamas kol sustings.

Koncentruojamasis gelis sudarytas: 0,83 ml akrilamido tirpalo, 2,5 ml 4xTRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas (pH 6,8), 2,9 ml distiliuoto vandens, 50 µl 10 % amonio persulfato tirpalas, 5 µl TEMED.

Tiriamasis baltymų tirpalas praskiedžiamas su 2 x baltymo denatūravimo buferiu 1:2. Mišinys 3-5 min kaitinamas verdančio vandens vonioje. Analizei naudojama 10 – 40 µl paruošto baltymo preparato.

Į gelyje esančius tarpus įpilami mėginiai. Elektroforezės aparatas prijungiamas prie elektros srovės šaltinio. Nustatoma 40 Ma stiprumo srovė ir 220 V įtampa. Kai judantis gelyje mėlynasis bromfenolis pasiekia skiriamąjį gelio apačią, elektros srovė išjungžiama.

Po elektroforezės poliakrilamido gelis atsargiai atskiriamas nuo stiklo plokštelių, įdedamas į plastikinę vonelę ir užpilamas baltymų tvirtinimo tirpalu tiek, kad apsemtų. Vonelė lėtai purtoma „KS 130 basic (IKA)“ kambario temperatūroje 60 min. Po 60 min nupilamas baltymo tvirtinimo tirpalas ir užpilamas Coomassie mėlio dažo tirpalas. Dažoma, kol baltymo juostelės nusidažo norimo ryškumo spalva. Baigus dažyti, dažai nupilami ir užpilama 10 % acto rūgšties. Vonelė purtoma kambario temperatūroje, kol iš gelio išsiplauna nesusirišę su baltymų dažai (1 val).

2.9.3. Putų sudarymo pajėgumas ir stabilumas

1 g kanapių baltymų ekstrakto sumaišyta su 50 ml vandens matavimo cilindre ir plakama (homogenizuojama) 5 min su plakikliu „IKA T25 digital“ (Vokietija). Išskirtų baltymų putų sudarymo pajėgumas nustatomas esant pH 8. Reikalingas pH sureguliuojamas į suspensiją lašinant 0,1 N NaOH arba 0,1 N HCl tirpalą. Susidariusių putų kiekis matuojamas po 0 min, 30 min, 60min 90 min, 120 min. Putų kiekis apskaičiuojamas pagal formulę (13) [53]:

$$\text{Putų kiekis}(\%) = \frac{\text{putų tūris,ml}}{\text{Bendras suspensijos tūris,ml}} \times 100 \quad (13)$$

2.9.4. Emulsijos sudarymo pajėgumas

0,5 g kanapių baltymų ekstrakto sumaišoma su 3 ml vandens ir 3 ml aliejaus. Turinys maišomas 5 min su vorteks „Vibrofix VF1 (IKA)“, poto centrifuguojama su „Microcen 23 (Orto alresa)“ 5000 rpm 30 min. Baltymų emulsijos sudarymo pajėgumas nustatomas esant terpės pH 8. Terpės pH koreguojamas su 0,1 N NaOH ir 0,1N HCl. Emulsijos sudarymo pajėgumas apskaičiuojamas pagal formulę (14) [53]:

$$\text{Emulsijos sluoksnis} (\%) = \frac{\text{emulsijos sluoksnio tūris (ml)}}{\text{bendras suspensijos tūris (ml)}} \times 100 \quad (14)$$

2.9.5. Emulsijos stabilumo

Tyrimui mėginiai ruošti taip pat, kaip ir emulsijos susidarymo pajėgumui nustatyti. Prieš centrifugavimą mėginiai išlaikomi 80 °C temperatūroje 30 min, poto atvėsunami iki kambario temperatūros (20±2°C). Atvėsinti mėginiai centrifuguojami „Microcen 23 (Orto alresa)“ centrifuga 30 min 5000 rpm greičiu. Emulsijos stabilumas apskaičiuojamas pagal formulę (15) [53]:

$$\text{Emulsijos stabilumas} (\%) = \frac{\text{emulsijos sluoksnio tūris (ml)}}{\text{bendras suspensijos tūris (ml)}} \times 100 \quad (15)$$

2.9.6. *Amino rūgščių nustatymas*

Amino rūgščių kiekis buvo nustatytas skirtinguose kanapių sėklų baltymų ekstraktuose, kurių išskyrimas buvo aprašytas 2.9.1 skyrelyje.

50 μ l baltymo ekstrakto buvo sumaišyta su 6 N HCl rūgšties tirpalu hidrolizei ir kaitinama 16 val 110°C temperatūroje. Po to centrifuguojama 10000 aps/min 5 minutes. Bandinys santykiu 1:3 sumaišoma su ACN. Centrifuguojama 10000 aps/min, 2 min. Tirpalas filtruojamas per 0,22 μ m filtrą. Paruoštas mėginys analizuojamas amino rūgščių analizatoriumi UF-Amino station, Shimadzu, Japonija.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Kanapių sėklų sudėtis

Eksperimento metu buvo nustatyti pagrindiniai kanapių sėklų sudėtiniai komponentai: drėgmės kiekis, riebalų, baltymų ir pelenų kiekiai bei riebalų rūgščių sudėtis. Nustatyta, kad tyrime naudojamų sėklų vidutinė drėgmė yra 6,99 %, riebalų kiekis – 33,23 g/100 g, baltymų kiekis – 35,53 g/100g, o pelenų kiekis – 6,11 g/100 g. Gauti rezultatai sutampa su lieteratūroje nurodytomis vertėmis (baltymai – 28,71-36 g/100 g, riebalai – 26,22-40 g/100 g, pelenai – 5,5-6,99 g/100 g) [41]. Palyginamieji rezultatai pateikti 8 lentelėje.

8 lentelė. Kanapių sėklų cheminė sudėtis

Komponentas	Nustatyta, g/100 g	Literatūroje nurodyti, g/100 g [41]
Drėgmės kiekis	6,99±0,11	–
Baltymai	35,53±0,49	28,71-36
Riebalai	33,23±0,15	26,22-40
Pelenai	6,11±0,22	5,5-6,99

Kanapių sėklų sudėtis ir maistinė vertė priklauso nuo veislės bei auginimo sąlygų, pvz., regiono, kuriame buvo užaugintos, klimato. Kanapės, kurios yra auginamos vėsesniame klimate, pasižymi didesniu riebalų kiekiu, nei augintos šiltame klimate [37].

3.2. Kanapių sėklų ekstrakcijos ir išėigos

Tyrimo metu, aliejaus išgavimui, kanapių sėklos buvo presuojamos šalto spaudimo presu. Po presavimo ir filtravimo, buvo gauta aliejaus išėiga 14,22 %, nuo bendro sėklų kiekio. Išspaudos toliau buvo naudojamos kitoms ekstrakcijoms.

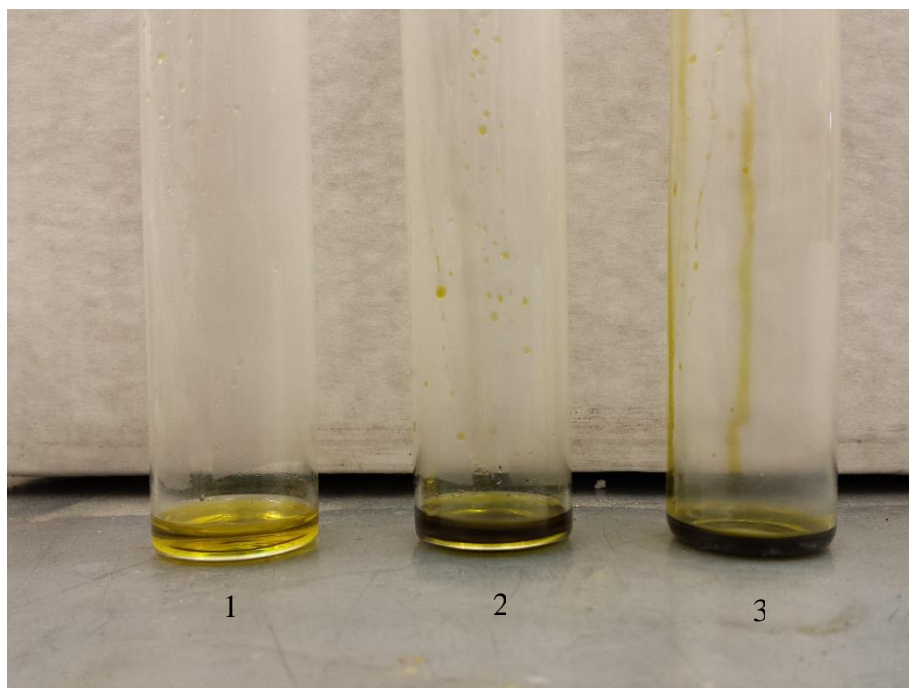
Su presuotomis išspaudomis toliau buvo atlikta Soksleto ekstrakcija ir palyginta su nepresuotų sėklų ekstrakcija. Vykiant Soksleto ekstrakciją, prieš tai išspaudos buvo smulkintos į skirtingas frakcijas: 1 mm, 0,5 mm ir 0,2 mm. Atlikus ekstrakciją nustatyta, kad iš 1 mm dydžio aliejaus išekstrahuota 18,98±0,15 %, iš 0,5 mm – 18,89±0,11 %, o iš 0,2 mm – 19,03±0,20 %. Iš gautų rezultatų matyti, kad dalelių dydis ekstrakcijai įtakos neturi. Alikus sėklų Soksleto ekstrakciją, nustatytas aliejaus kiekis jose yra 35,23 %. Bendra aliejaus išėiga, gauta presavimo metu ir po Soksleto ekstrakcijos iš išspaudų, yra beveik tokia pati – 33,11-33,25 % kaip ir po Soksleto ekstrakcijos iš nepresuotų kanapių – 33,23 %.

3.2.1. SKE-CO₂ ekstrakcija

CO₂ ekstrakcijai, buvo naudojami bandiniai: presuotos smulkintos 1 mm, 0,5 mm, 0,2 mm dyžio frakcijų kanapių išspaudos ir nepresuotos smulkintos per 1 mm sietą sėklos.

Atlikus 1 mm frakcijos ekstrakcijas skirtingomis sąlygomis (esant 40 ir 60 °C temperatūrai bei 40 MPa slėgiui), buvo nustatyta, kad ekstrakcija geriau vyksta esant 40°C temperatūrai ir 40 MPa slėgiui (ekstrakcijos laikas 4 val), todėl sekančios ekstrakcijos buvo vykdomos esant šiai temperatūrai.

Renkant aliejų skirtingais laiko momentais, ekstrakcijos metu, buvo stebima, kad surenkamo aliejaus spalva buvo skirtinga. Po pusvalandžio aliejus buvo šviesiausias (gelsvas), po 1 valandos – žalias, po 1,5 valandos – tamsiai žalias. Manoma, kad pirma ekstrahuosi triacilglicerolių frakcija, po to sekė chlorofilo ir kitų pigmentų frakcijos, kurios ir nulėmė aliejaus spalvą (8 pav.)



8 pav. Skirtingu SKE-CO₂ ekstrakcijos metu paimti ekstraktai: 1 – po 30 min, 2 – 60 min, 3 – po 90 min

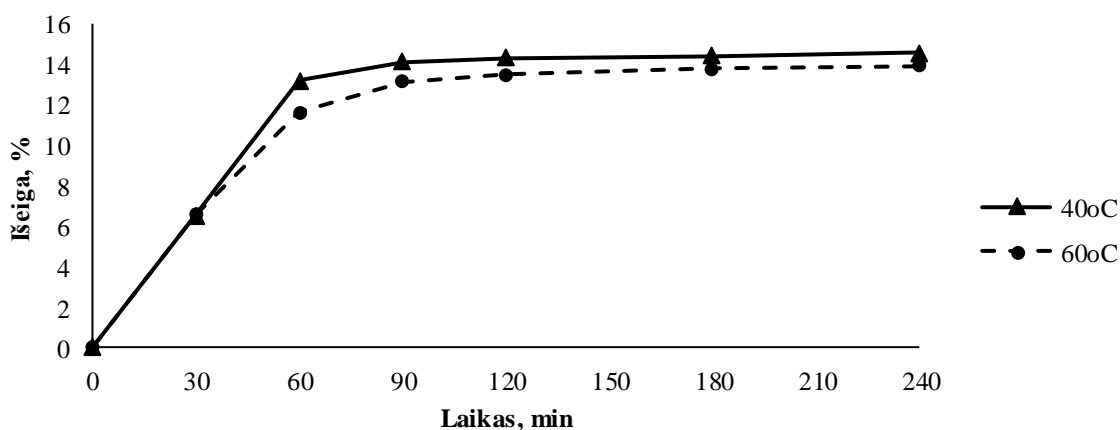
Atliekant ekstrakciją skirtingais parametrais buvo gautos skirtingos išeigos (9 lentelė). Nustatyta, kad didžiausia išeiga gauta nepresuotų sėklų, esant 40°C temperatūrai ir 40 MPa slėgiui (20,27 g/100 g), o vykdant ekstrakciją esant 60 °C temperatūrai ir 40 MPa slėgiui, gauta išeiga yra 18,48 g/100 g. Bet palyginus šios ekstrakcijos išeigą (20,27 g/100 g), su Soksleto ekstrakcija (33,23 g/100 g), išeiga gauta mažesnė.

9 lentelė. Aliejaus išėigos iš skirtingų kanapių sėklų frakcijų SKE-CO₂ ekstrakcijos metu

Parametrai	Išėiga, g/100 g sėklų			
	Nepresuotos 1 mm	1 mm	0,5 mm	0,2 mm
40°C, 40 MPa	20,27±0,29	14,67±0,62	14,92±0,42	15,60±0,13
60°C, 40 MPa	18,48±0,37	14,04±0,72	14,52±0,25	14,77±0,31

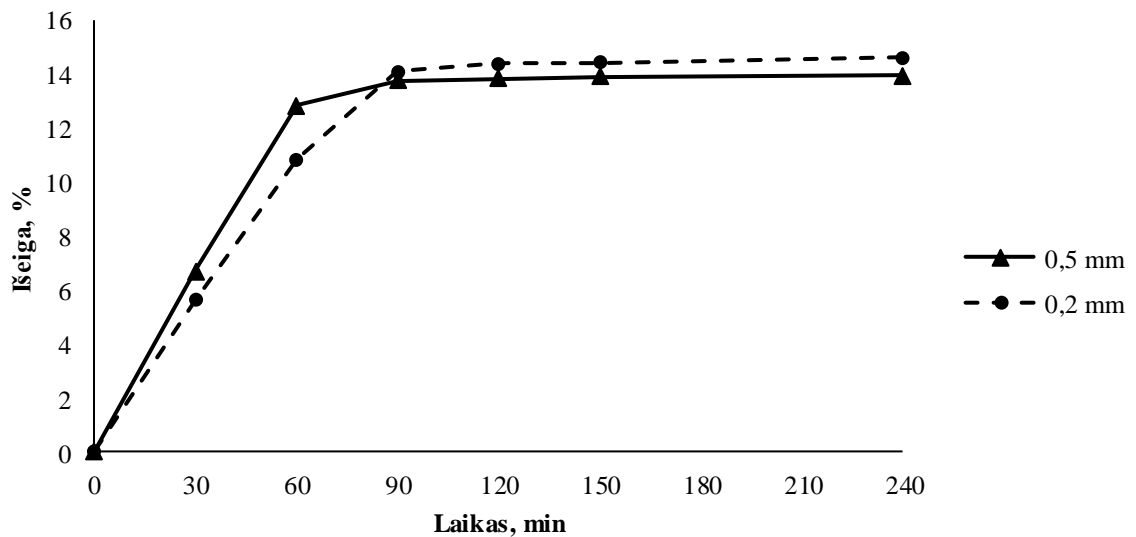
Lyginant išėigas pagal dalelių dydį, didžiausia išėiga buvo nustatyta esant 40°C temperatūrai ir 40 MPa slėgiui bei dalelių dydžiui 0,2 mm (15,60 g/100 g). Su 1 mm dydžio frakcija, išėiga gauta 1 % mažesnė, bet tai nėra labai didelis skirtumas.

Buvo stebima aliejaus išėigos kitimas laike 1 mm dydžio dalelių frakcijose, imant ekstrakto bandinius pakopomis. Tam buvo renkamas ekstraktas kas 30 min. Buvo lyginama išėigų kinetika esant skirtingoms ekstrakcijos temperatūroms: 40 ir 60°C (9 pav.) bei esant skirtingam dalelių dydžiui (10 pav.).



9 pav. 1 mm kanapių sėklų frakcijos ekstrakto išėigų priklausomybė nuo laiko (40°C ir 60°C, 40 MPa)

Buvo nustatyta, kad išėiga nusistovi laike tarp 180 ir 240 minutės. 9 pav. matyti, kad išėigos kinetikos panašios, esant skirtingoms temperatūroms. Taip pat, buvo palygintos išėigos, kurios buvo gautos ekstrakciją vykdant tais pačiais proceso parametrais (40°C ir 40 MPa), bet ekstrakcijai naudojant skirtingų dydžių kanapių išspaudų frakcijas. 10 Pav. matyti, kad 0,5 mm frakcijos ekstrakto išėiga greičiau pradėjo didėti pradžioje, bet po to greitai nusistovėjo.



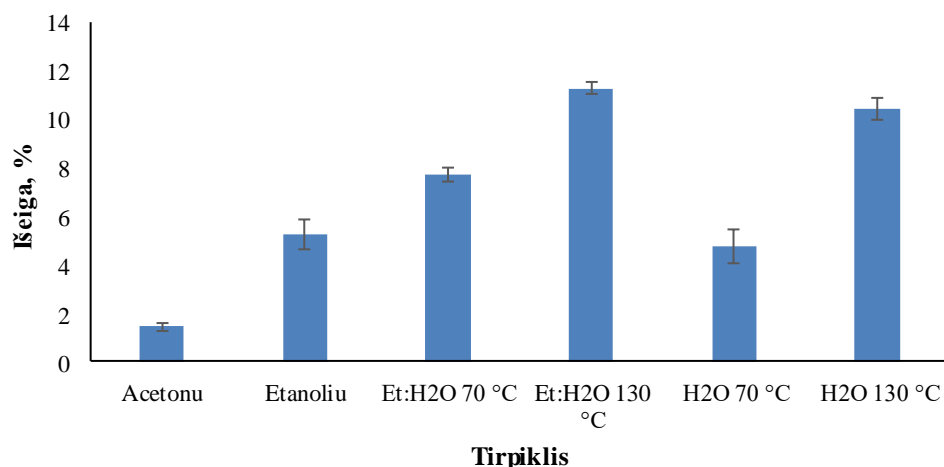
10 pav. 0,5 mm ir 0,2 mm kanapių sėklų frakcijų ekstrakto išėigų priklausomybė nuo laiko (40°C, 40 MPa)

0,2 mm frakcijos išėiga tolygiai kilo, po to pradėjo nusistovėti ties 120 minute. Didelių skirtumų, esant skirtingiems ekstrakcijos parametrams bei frakcijų dydžiui, nepastebėta. Todėl, galima teigti, kad esant skirtingiems parametrams ir frakcijų dydžiams, skirsis tik išėigos dydis, bet kinetika bus panaši. Išėigos kitimas nusistovi ties 120 min.

Lyginant gautus rezultatus su literatūros šaltiniuose nurodytais [64], geriausia išėiga buvo taip pat gauta esant 40 MPa slėgiui ir 40°C temperatūrai. Ekstrakcijos išėiga taip pat nusistovi per 4 valandas.

3.2.2. Pagreitinta skysčių ekstrakcija (PSE)

Buvo atlikta pagreitinta skysčių ekstrakcija skirtingais tirpikliais, esant skirtingai temperatūrai iš kanapių sėklų išspaudų, gautų po aliejaus presavimo ir SKE-CO₂ ekstrakcijos, kaip nurodyta metodinėje dalyje (skyrus 2.6.). Buvo naudojami tirpikliai: acetonas, etanolis, vandens ir etanolio mišinys (santykis 70:30), distiliuotas vanduo. Gauti rezultatai pateikti 11 pav.



11 pav. PSE ekstraktų išeigos skirtingais tirpikliais, esant skirtingiems temperūros režimams

Didžiausia išeiga ($11,29 \pm 0,22$ %) gauta naudojant etanolio ir vandens mišinį esant 130°C . Panaši išeiga (10,43 %) buvo gauta ir ekstrakciją vykdant vandeniu esant tokiai pat temperatūrai. Atliekant ekstrakciją kitais tirpikliais, gautos išeigos mažesnės, atitinkamai: acetonu – $1,44 \pm 0,18$ %, etanolium – $5,24 \pm 0,62$ %, etanolio ir vandens mišiniu 70°C temperatūroje – $7,74 \pm 0,29$ %, vandeniu 70°C temperatūroje – $4,78 \pm 0,69$ %. Atliekant ekstrakciją acetonu, buvo gautas lipofilinis ekstraktas, kuris liko po aliejaus šalto presavimo bei SKE- CO_2 ekstrakcijos. Ekstrakcijų kitais tirpikliais metu buvo išskirti kiti bioaktyvių junginių mišiniai. Ekstraktai toliau buvo naudojami antioksidacinių savybių tyrimuose.

3.3. Kanapių sėklų aliejinių ekstraktų sudėtis

3.3.1. Riebalų rūgščių sudėtis

Kanapių sėklose gausu omega-3 riebalų rūgščių bei jose yra optimalus omega-3 (linolo) bei omega-6 (linoleno) RR santykis [38]. Linolo rūgšties kiekis gali svyruoti nuo 53 iki 60 % nuo bendro RR kiekio, linoleno rūgšties kiekis svyruoja nuo 15 iki 20 % [37,39,40,41]. Tirtose kanapių sėklose, šių riebalų rūgščių kiekis patenka į intervalus, nurodytus literatūroje (9 lentelė). Be to, reikšmingi kiekiai jų apykaitos produktų yra taip pat randami: gama linoleno rūgšties ($18:3n6$) svyruoja tarp 2-5 %, tirtose sėklose nustatytas kiekis, priklausomai nuo ekstrakto, yra maždaug apie 4 %.

Tyrimo metu, buvo nustatyta kad, skirtingais būdais išgauto aliejaus riebalų rūgščių kompozicija tarpusavyje skiriasi nedaug. Didžiausias linolo RR kiekis buvo nustatytas SKE – CO_2 ekstrakto – $54,92 \pm 0,05$ %, o mažiausiai kanapėse yra lignocero, tyrimo metu buvo nustatyta, kad šios RR Soksleto ekstrakto yra $0,07 \pm 0,01$ %. Visuose ekstraktuose RR kiekis skiriasi nežymiai, todėl galima teigti, kad skirtingi metodai, išgaunant aliejų, didelės įtakos RR sudėčiai neturi.

10 lentelė. Kanapių aliejaus po presavimo ir soklseto ekstrakcijos bei kanapių ekstrakto po superkryzinės ekstrakcijos riebalų rūgščių kompozicija, nustayta dujų chromatografijos metodu

	Po presavimo	Po Soksleto ekstrakcijos	Po SK E-CO ₂ ekstrakcijos	Literatūroje nurodoma [37, 39, 40, 41]
Riebalų rūgštis	Kiekis, %			
Palmitino (C16:0)	6,27±0,07	7,11±0,11	6,55±0,07	5,05-7,82
Margarino (C17:0)	0,18±0,02	0,12±0,05	0,11±0,02	0,01-0,19
Stearino (C18:0)	2,35±0,05	2,45±0,05	2,39±0,09	1,45-2,76
Oleino (C18:1n9c)	9,51±0,01	9,99±0,15	9,97±0,12	9,01-15,60
Linolo (C18:2n6c)	53,54±0,09	54,85±0,12	54,92±0,05	53,4-59,77
Arachidino (C20:0)	0,76±0,02	0,80±0,04	0,82±0,04	0,711-1,05
γ-Linoleno (C18:3n6)	4,11±0,02	4,08±0,06	4,05±0,08	2,01-4,51
Cis-11-Eikozano (C20:1)	0,42±0,08	0,46±0,04	0,41±0,02	0,31-0,71
Linoleno (C18:3n3)	18,00±0,04	18,07±0,18	18,49±0,15	15,10-19,40
Cis-11,14-Eikozantrieno (C20:2)	1,45±0,01	1,36±0,05	1,45±0,04	0,93-1,52
Beheno (C22:0)	0,28±0,09	0,29±0,03	0,27±0,09	0,13-0,45
Eruko (C22:1n9)	0,14±0,05	–	–	0,0-0,2
Lignocero (C24:0)	0,10±0,06	0,07±0,01	0,09±0,02	0,03-0,12

Nesočiosios riebalų rūgštys sudaro maždaug 80 % kanapių sėklų aliejaus kiekio, dėl to aliejus yra skystas ir nestingsta kambario temperatūroje. Tai taip pat turi įtakos aliejaus oksidaciniui stabilumui – jis lengviau oksiduoja, nes dėl dvigubų jungčių šios RR yra mažiau atsparios deguonies, temperatūros, šviesos ir slėgio poveikiui.

Šiais laikais yra suvartojami dideli kiekiai trans riebalų rūgščių. Tyrimai parodė, kad trans riebalų rūgštys didina cholesterolio kiekį ir mažina didelio tankio lipoproteinų kiekį kraujyje [42]. Papildant dietą nesočiosiomis cis riebalų rūgštimis, kurių yra kanapių aliejuje, šios problemos gali būti sumažinamos. Omega-3 riebalų rūgštys gali padeda išvengti susirgimų širdies ligomis. Vartojant jas vietoj sočiųjų, yra mažinamas kraujo spaudimas, didinamas aukšto tankio lipidų kiekis. Taip pat yra atlikti tyrimai, kurie rodo, jog omega-3 rūgštys mažina demencijos sutrikimus [63].

3.3.2. Tokoferoliai

Tokoferoliai yra svarbiausi natūralūs antioksidantai, randami augalinėje žaliavoje (pvz., aliejinių augalų sėklose ir vaisiuose). Jie priklauso vitamino E šeimai. Jie svarbūs žmogaus organizmui bei dėl savo sugebėjimo apsaugoti riebalus nuo oksidacijos. Tokoferolių koncentracijos bei jų izomerų sandara skiriasi.

Tokoferolių kiekis tirtas kanapių ekstraktuose, kurie gauti po SKE-CO₂ ekstrakcijos, imant bandinius skirtingu metu: po 30, 60 ir 120 min. Taip pat buvo nustatytas tokoferolių kiekis Soksleto ekstrakto. Rezultatai pateikti 12 lentelėje.

Nustatytas bendras tokoferolių kiekis ekstrakto, gauto superkritinės CO₂ ekstrakcijos metu, lygus 590,12 mg/kg, Soksleto ekstrakto – 782,44 mg/kg. Didžiausias kiekis nustatytas γ -tokoferolio: suminis CO₂ ekstrakcijos – 515,87 mg/kg, Soksleto – 692,42 mg/kg. Mažiausias kiekis buvo β -tokoferolio: CO₂ ekstrakto – 3,57 mg/kg, Soksleto – 2,72 mg/kg ekstrakto. Iš gautų rezultatų taip pat matyti, kad pakopinės superkritinės CO₂ ekstrakcijos metu, tokoferoliai taip pat skyrėsi laipsniškai. α -tokoferolio visas kiekis išsiskyrė su pirma frakcija. β -tokoferolis išsiskyrė per pirmą valandą kaip ir δ -tokoferolis. γ -tokoferolis skyrėsi laipsniškai visos ekstrakcijos metu. Bet kaip matoma iš gautų rezultatų, kad didžioji dalis tokoferolių išsiskiria ekstrakcijos pradžioje.

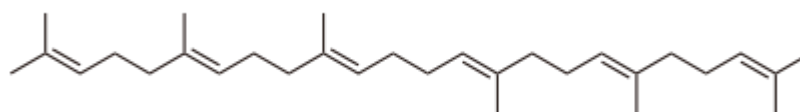
11 lentelė. Tokoferolių kiekis kanapių sėklų ekstraktuose

Bandiniai	α-tokoferolis, mg/kg ekstrakto	β-tokoferolis, mg/kg ekstrakto	γ-tokoferolis, mg/kg ekstrakto	δ-tokoferolis, mg/kg ekstrakto
1 frak. po 30 min	36,36±1,72	2,27±0,17	470,81±3,98	29,44±1,21
2 frak. po 60 min	-	1,30±0,03	35,39±1,69	4,88±0,09
3 frak. po 120 min	-	-	9,67±0,31	-
Po soksleto ekstrakcijos	41,15±3,65	2,72±0,02	692,42±5,21	46,15±1,25

Uluata ir kiti 2011 [45] metais nustatė, kad bendras kanapių sėklų tokoferolių kiekis yra 668,86 mg/kg aliejaus. Didžiausias kiekis buvo nustatytas γ -tokoferolio – 597,91 mg/kg aliejaus. α -tokoferolio nustatyta 25,58 mg/kg, δ -tokoferolio – 39,71 mg/kg ir mažiausiai buvo nustatyta β -tokoferolio – 5,96 mg/kg aliejaus. Palyginus literatūros šaltinyje nurodytus rezultatus su šiame darbe gautais, matoma, kad kiekiai panašūs. Skirtumui įtakos galėjo turėti metodų ir įrangos skirtumai, kanapių auginimo sąlygos ir vieta.

3.3.3. Skvalenas

Skvalenas yra triterpenas, natūrali ir gyvybiškai svarbi sterolių sintezės dalis, įskaitant cholesterolio, steroidinių hormonų ir vitamino D gamybą žmogaus organizme.



12 pav. Skvaleno struktūrinė formulė

Skvalenas buvo nustatytas kanapių sėklų ekstraktuose po superkritinės CO₂ ir Soksleto ekstrakcijos. CO₂ ekstrakto buvo nustatyta 25,09±1,01 µg/g ekstrakto, o Soksleto ekstrakto 18,37±0,94 µg/g ekstrakto. Kiekiai labai nesiskiria, todėl galima teigti, kad šie ekstrakcijų metodai didelės reikšmės išėigai neturi. MANSOURI ir kiti (2012) [48] nustatė, kad skvaleno kanapių sėklų aliejuje yra 23,47 µg/g aliejaus. Kiekis panašus į šiame darbe nutatytą skvaleno kiekį. Skirtumui įtakos galėjo tūrėti įrangos būklė, metodų ir reagentų skirtumai, kanapių auginimo sąlygos.

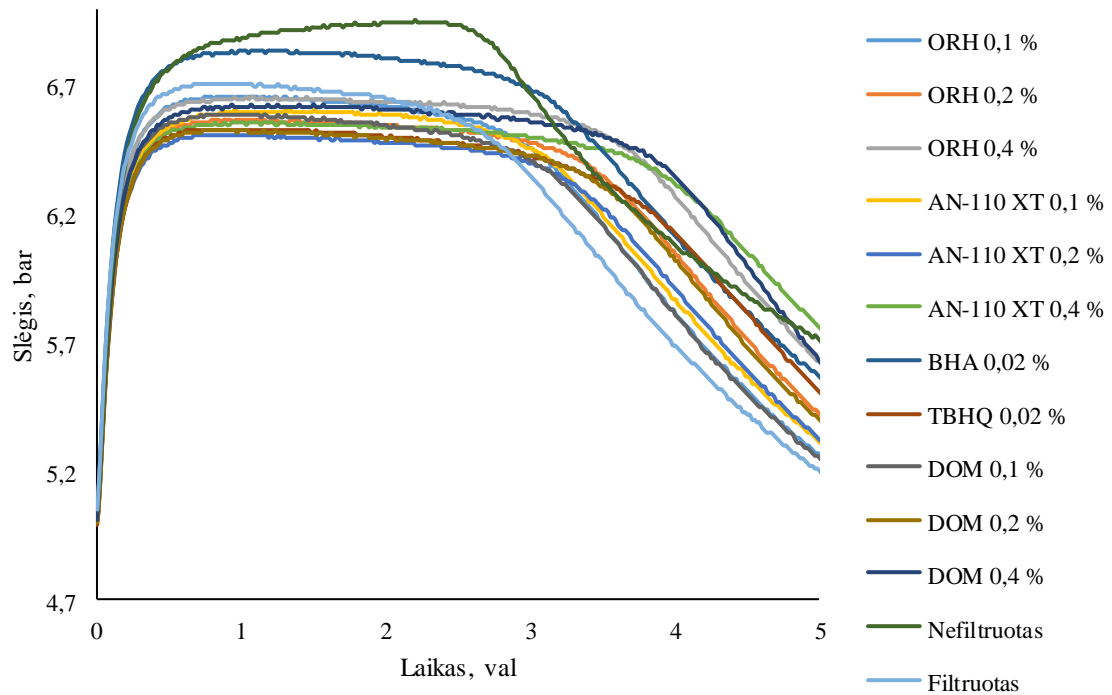
3.4. Kanapių aliejaus oksidacinis stabilumas

3.4.1. Pradinis aliejaus peroksidų skaičius (PS) ir rūgštingumas (R)

Peroksidų skaičiaus nustatymas naudojamas pirminių riebalų oksidacijos produktų nustatymui. Rūgštingumas parodo laisvų riebalų rūgščių kiekį. Rūgštingumo vertė ir peroksidų skaičius aliejuje priklauso nuo aliejingos žaliavos. Jei žaliava blogai išvalyta ir išdžiovinta, tai sėklose greičiau vyksta hidrolizė ir oksidacija. Buvo nustatytas filtruoto ir nefiltruoto aliejaus rūgštingumas bei peroksidų skaičius. Nefiltruoto aliejaus rūgštingumas (R) buvo lygus 4,27 %, o peroksidų skaičius (PS) lygus 0,79 mekv/kg. Filtruoto aliejaus R – 2,66 %, o PS – 0,45 mekv O₂/kg. Pagal CODEX STAN 210 [46] reikalavimus, aliejaus PS ir R vertės patenka į standarte nurodytas šalto spaudimo aliejams nurodytas vertes: PS<15 mekv O₂/kg ir R<4 %.

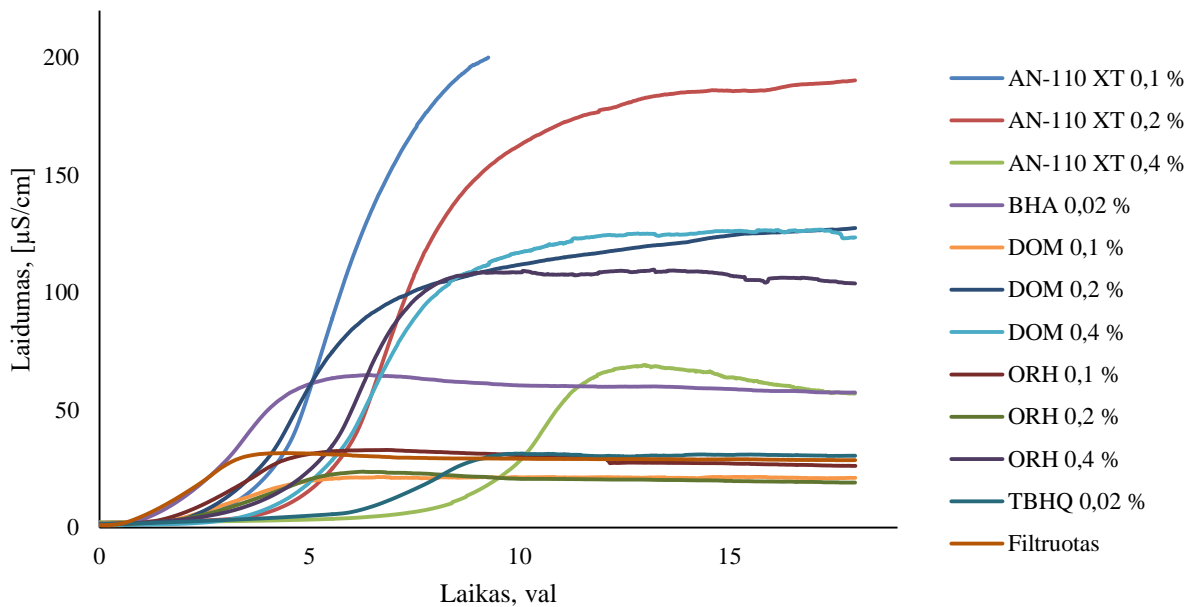
3.4.2. Aliejaus atsparumas oksidacijai

Kanapių aliejaus ir jo mišinių su antioksidantais oksidacinis stabilumas buvo nustatytas oskipreso bei Rancimato metodais. Gautos kinetinės bandinių kreivės pateiktos 13 pav. Kreivių pobūdis leidžia teigti, kad aliejaus oksidacija pradžioje vyksta lėtai, nes reakcijos greitis yra tiesiai proporcingas hidroperoksidų susidarymo greičiui. Indukcinio periodo (IP, val) pabaigoje oksidacijos kinetikos kreivėse įvyksta lūžis.



13 pav. Kanapių aliejaus oksidacinis stabilumas Oksipres metodu

Pagal kreivių liestines, nustatyti indukciniai periodai valandomis, kurie parodo oksidacinį stabilumą. Jie pavaizduoti 12 lentelėje.



14 pav. Kanapių aliejaus oksidacinis stabilumas Rancimat metodu

Tiriant atsparumą oksidacijai Oksipres metodu, kanapių aliejus be priedų pasižymėjo mažiausiu stabilumu. Filtruoto aliejaus IP siekė tik 2,68 val, nefiltruoto – 2,54 val. Rancimat metodas taip pat parodė, kad aliejus be priedo turi mažiausią stabilumą – 0,5 val. Antioksidantų priedai padidino aliejaus

stabilumą. Geriausiomis savybėmis pasižymėjo natūralūs antioksidantai. Rancimat metodu nustatyta, kad didžiausią IP ($8,26 \pm 0,09$) turi aliejus su antioksidantu DURALOX BLEND AN-110 XT 0,4 % koncentracija. Oksipres metodu didžiausią stabilumą (IP-3,90 val) turi aliejus su DURALOX OXIDATION MANAGEMENT (DOM) 0,4 % koncentracijos antioksidanto priedu. Su 0,4 % AN-110 XT priedu aliejaus stabilumas panašus – 3,8 val. Todėl lyginant šių antioksidantų įtaką aliejaus oksidaciniui stabilumui abiem metodais, galima teigti, kad geresnėmis savybėmis pasižymėjo antioksidantas AN-110 XT.

Iš sintetinių antioksidantų, geriausiomis savybėmis pasižymėjo tertbutilhidroksikinonas (TBHQ). Jo indukcinis periodas Oksipres metodu buvo 3,66 val., o Rancimat metodu – 6,04 val. Silpniausiai iš visų veikė butilhidroksianizolis (IP 3,11 ir 3,12 val). Literatūros šaltiniuose rašoma, kad jis labiau tinkamas naudoti aliejaus galiojimo trukmei prailginti, o ne temperatūros pokyčių sukeltiems oksidaciniams pokyčiams stabilizuoti [43]. TBHQ veikia atvirkščiai. Jis skirtas oksidacijai stabdyti aukštoje temperatūroje [44]. Gauti rezultatai tai ir parodo.

Pagal gautus rezultatus matyti, kad Rancimat ir Oksipres metodu nustatyti IP tarpusavyje koreliuoja, todėl galima teigti, kad antioksidantų priedai pagerina kanapių aliejaus stabilumą oksidacijai.

12 lentelė. Kanapių aliejaus ir jo mišinių su antioksidantais indukciniai periodai

Aliejus su priedu	IP Oksipres metodu, val	IP Rancimat metodu, val
Filtruotas (be priedo)	$2,68 \pm 0,10$	$0,50 \pm 0,11$
Nefiltruotas (be priedo)	$2,54 \pm 0,14$	–
DOM 0,4 %	$3,90 \pm 0,21$	$5,97 \pm 0,05$
DOM 0,2 %	$3,41 \pm 0,15$	$4,18 \pm 0,08$
DOM 0,1 %	$3,14 \pm 0,16$	$1,42 \pm 0,04$
TBHQ 0,02 %	$3,66 \pm 0,09$	$6,04 \pm 0,10$
BHA 0,02 %	$3,12 \pm 0,13$	$3,11 \pm 0,15$
AN-110 XT 0,4 %	$3,80 \pm 0,15$	$8,26 \pm 0,09$
AN-110 XT 0,2 %	$3,15 \pm 0,22$	$6,15 \pm 0,21$
AN-110 XT 0,1 %	$2,90 \pm 0,08$	$4,61 \pm 0,02$
ORH 0,4 %	$3,54 \pm 0,21$	$5,71 \pm 0,07$
ORH 0,2 %	$3,35 \pm 0,14$	$2,11 \pm 0,11$
ORH 0,1 %	$2,72 \pm 0,11$	$1,39 \pm 0,07$

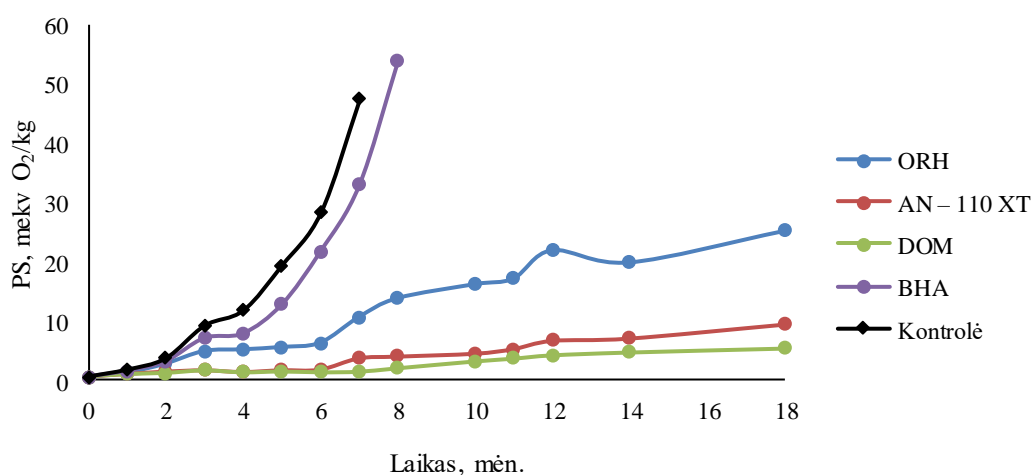
Uluata (2012) nurodė, kad kanapių aliejaus IP Rancimat metodu yra 1,31 val. Atliktų tyrimų metu buvo gauta beveik trigubai mažesnis aliejaus stabilumas oksidacijai (0,5 val). Dėl savo mažo oksidacinio stabilumo, kanapių aliejus nėra tinkamas naudoti kepiniai. Kepimui yra naudojami aliejai, kurių indukcinis periodas pagal Oksipres metodą prasideda nuo 8 val. [49]. Gauti kanapių aliejaus rezultatai ir su antioksidantais nedavė teigiamo rezultato. Jame labai gausu nesočiųjų riebalų rūgščių (apie 80 %), kurios linkusios greit oksiduotis. Taip pat, kepiniai yra naudojami rafinuoti aliejai. Kanapių aliejus nėra rafinuojamas, nes jame gausu įvairių aromatinių junginių, tokoferolių ir kitų junginių, kurie jam suteikia

savitumą. Todėl jis labiau tinka vartoti salotoms, pagardams. Antioksidantų priedai prailgina jo galiojimo terminą. Apie tai toliau kalbama 3.4.3. skyriuje.

3.4.3. Kanapių aliejaus ir jo mišinių su antioksidantais PS kitimas, esant skirtingoms laikymo sąlygoms

Daugelis riebalų, laikomi šviesoje ir ore, apkarsta; atsiranda nemalonūs jų skonis ir kvapas. Viena jų gedimo priežasčių – oksidavimasis oro deguonimi, kuris suskaido anglies atomų grandinę, dėl to susidaro mažamolekuliniai aldehidai, ketonai arba karboksirūgštys, suteikiantys riebalams nemalonų kvapą bei skonį. Biologiniai riebalų oksidacijos sužadintojai – tai kai kurios augalinės ir gyvūninės kilmės medžiagos, pvz. chlorofilas ir lipoksidazė. Tokių oksidacijos sužadintojų aktyvumas priklauso nuo daugelio veiksnių. Chlorofilas, esantis augaliniuose aliejuose, šviesoje pasižymi prooksidacinėmis savybėmis (suintensyvėja oksidacija). Tamsioje jis neturi įtakos oksidacijos procesui, tačiau, esant fenolinių antioksidantų, jis veikia kaip sinergistas, o šviesoje kaip antagonistas [50]. Aliejaus stabilumui ir oksidacijos procesui laikymo metu prailginti yra naudojami antioksidantai. Jie įsiterpia į autooksidacines reakcijas, sudaro patvarius junginius su maisto medžiagomis ir neleidžia toliau oksiduotis.

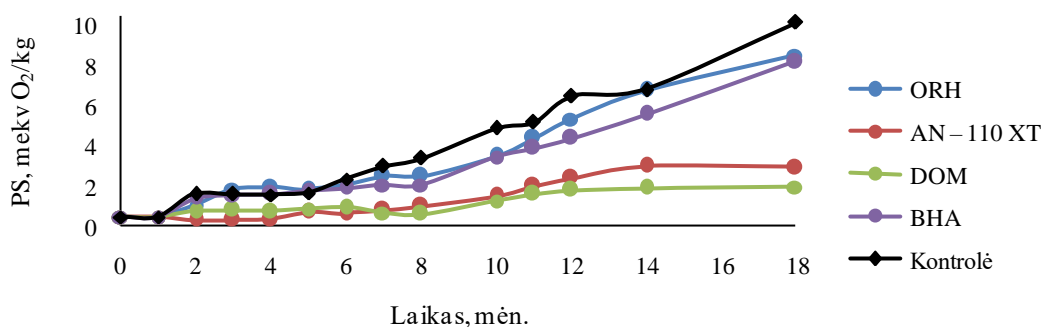
Šalto spaudimo kanapių aliejus buvo sumaišytas su skirtingais antioksidantais. Natūralių antioksidantų buvo dedama maksimali leistina koncentracija – 0,2 %, remiantis EB Nr. 1333/2008 [47], o sintetinio antioksidanto butilhidroksianizolio leistina norma 0,02 %. Tyrime tokia koncentracija ir buvo naudota. Paruošti bandiniai buvo laikomi skirtingomis sąlygomis. Vieni mėginiai buvo laikomi tamsioje spintoje, esant kambario temperatūrai, kiti – šaldytuve, esant maždaug 4-6°C temperatūrai. PS skaičiaus kitimas esant skirtingai laikymo temperatūrai pavaizduotas 15 ir 16 paveikslėliuose.



15 pav. Kanapių aliejaus bandiniai laikomi spintoje, kambario temperatūroje

Laikant bandinius spintoje, geriausiu stabilumu pasižymėjo aliejus su DOM antioksidanto priedu. Jame peroksidų skaičius per visą bandymo laikotarpį (18 mėnesių) pakilo tik iki $5,35 \pm 0,09$ mekv O_2/kg .

Leistina norma nerafinuotiems aliejams yra iki 15 mekv O₂/kg [46]. Remiantis šiuo rodikliu, galima teigti, kad aliejus per visą šį laikotarpį nesugedo. Panašiai veikė ir antioksidantas AN-110 XT. Per 18 mėnesių PS pakilo iki 9,42±0,15 mekv O₂/kg. Jų PS kitimo kinetika taip pat panaši. 6 mėnesius abu mišiniai beveik nesioksidavo. 7 mėnesį aliejuje su AN-110 XT priedu įvyko lūžis, aliejus pradėjo truputėlį greičiau oksiduotis, kinetinė kreivė pradėjo kilti į viršų, peroksidų susidarymo kryptimi. Aliejuje su DOM priedu, tai įvyko 8 mėnesį ir po to taip pat stabiliai pradėjo kilti. Aliejuje su kitais antioksidantais, lūžis įvyko po antro mėnesio. Kontrolinis bandinys (aliejus be antioksidantų), oksidavosi greičiausiai. 15 mekv O₂/kg PS kiekį pasiekė tarp 4-5 mėnesio ir po to oksidacija vyko labai greit. Panašiai oksidacijos procesas vyko ir aliejuje su BHA priedu. Tik jis oksidavosi mėnesiu vėliau. ORH priedas veikė prasčiau nei AN-110 XT ir DOM, bet geriau nei sintetinis antioksidantas BHA. Prasidėjus oksidacijai po trečio mėnesio, ji po to sulėtėjo (4-6 mėnesis), bet vėliau pradėjo eksponentiškai kilti. Leistiną PS normą viršijo 8-10 mėnesio intervale.



16 pav. Kanapių aliejaus bandiniai laikomi šaldytuve, 4-6°C temperatūroje

Aliejaus oksidacinis stabilumas šaldytuve buvo didesnis nei laikant jį spintoje (16 pav.). Antioksidantų veikimo tendencija panaši. Stebint PS kiekio kitimo kinetiką, matome, kad iki 7 mėnesio geriau veikė antioksidantas AN-110 XT. Po to, kinetinės kreivės persipynė ir geresniu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo DOM ir šis poveikis išliko iki pat tyrimo pabaigos. Su šiais antioksidantais aliejus išliko ganėtinai stabilus iki pat eksperimento galo. Aliejus nepasiekė kritinės PS skaičiaus vertės (DOM – 1,95±0,08 mekv O₂/kg ir AN-110 XT – 2,92±0,11). Aliejus su ORH ir BHA priedais taip pat veikė prasčiau, laikant aliejų ir šiomis sąlygomis. Abu antioksidantai veikė panašiai iki 10 mėnesio, bet po to geresniu veikimu pasižymėjo ORH, tik paskutinio mėnesio PS vertės beveik sutapo. Kontrolinis aliejaus bandinys oksidavosi greičiausiai, bet net ir jis šaldytuve nepasiekė kritinės PS vertės. Visi peroksidų skaičiaus kitimo rezultatai pateikti 13 lentelėje.

13 lentelė. Peroksidų skaičiaus kitimas kanapių aliejuje ir jo mišiniuose su antioksidantais

Aliejaus bandiniai	Peroksidų skaičius												
	Po mėnesio, mekv O ₂ /kg	Po 2 mėnesių, mekv O ₂ /kg	Po 3 mėnesių, mekv O ₂ /kg	Po 4 mėnesių, mekv O ₂ /kg	Po 5 mėnesių, mekv O ₂ /kg	Po 6 mėnesių, mekv O ₂ /kg	Po 7 mėnesių, mekv O ₂ /kg	Po 8 mėnesių, mekv O ₂ /kg	Po 10 mėnesių, mekv O ₂ /kg	Po 11 mėnesių, mekv O ₂ /kg	Po 12 mėnesių, mekv O ₂ /kg	Po 14 mėnesių, mekv O ₂ /kg	Po 18 mėnesių, mekv O ₂ /kg
Spinta													
ORH	1,12±0,03	2,66±0,08	4,81±0,08	5,09±0,09	5,49±0,10	6,22±0,05	10,57±0,09	13,79±0,04	16,17±0,08	17,14±0,09	21,94±0,25	19,87±0,06	25,21±0,07
AN – 110 XT	0,89±0,05	1,29±0,15	1,52±0,09	1,23±0,04	1,53±0,08	1,63±0,07	3,59±0,05	3,89±0,08	4,39±0,04	5,18±0,09	6,61±0,12	7,01±0,04	9,42±0,15
DOM	0,89±0,07	1,09±0,05	1,52±0,07	1,19±0,02	1,33±0,06	1,19±0,11	1,29±0,03	1,89±0,04	3,09±0,08	3,58±0,04	4,16±0,08	4,66±0,08	5,35±0,09
BHA	1,46±0,05	3,08±0,09	7,01±0,21	7,79±0,07	12,71±0,11	21,72±0,06	32,93±0,21	53,97±0,21	93,97±0,35	-	-	-	-
Kontrolė	1,62±0,11	3,54±0,04	9,07±0,12	11,65±0,05	19,32±0,22	28,24±0,08	47,41±0,16	-	-	-	-	-	-
Šaldytuvas													
ORH	-	1,06±0,07	1,85±0,04	1,93±0,08	1,82±0,09	2,09±0,08	2,49±0,13	2,51±0,04	3,49±0,17	4,37±0,05	5,34±0,22	6,79±0,21	8,54±0,05
AN – 110 XT	-	0,29±0,02	0,29±0,04	0,33±0,04	0,67±0,07	0,62±0,04	0,79±0,02	0,99±0,05	1,49±0,04	1,98±0,07	2,38±0,11	2,99±0,08	2,92±0,11
DOM	-	0,72±0,04	0,78±0,08	0,73±0,02	0,86±0,08	0,93±0,05	0,66±0,08	0,59±0,03	1,24±0,09	1,59±0,05	1,77±0,09	1,90±0,05	1,95±0,08
BHA	-	1,39±0,05	1,55±0,06	1,59±0,05	1,73±0,04	1,89±0,09	2,06±0,10	2,05±0,07	3,45±0,04	3,90±0,12	4,41±0,26	5,61±0,14	8,23±0,21
Kontrolė	-	1,62±0,09	1,59±0,04	1,56±0,04	1,66±0,09	2,35±0,11	2,99±0,04	3,39±0,19	4,89±0,06	5,20±0,15	6,49±0,25	6,83±0,33	10,17±0,35

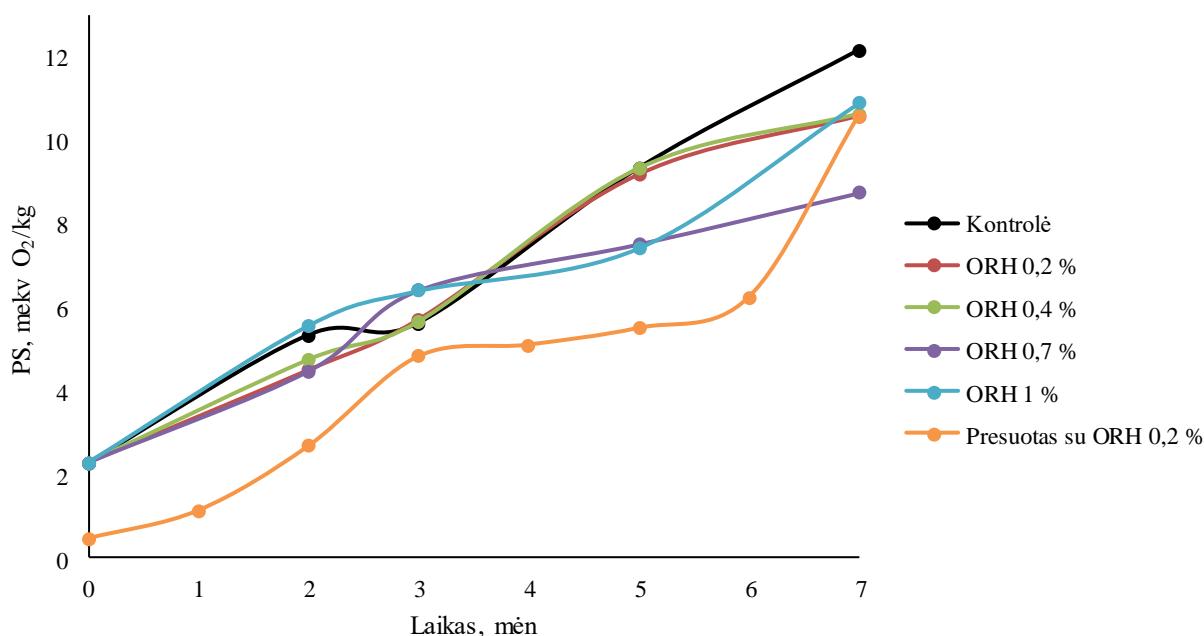
Iš gautų rezultatų matyti, kad aliejaus laikymo temperatūra turi didelės įtakos peroksidų susidarymo greičiui. Lėčiausiai oksidacija veikė šaldytuve. Nė vienas aliejaus bandinys šaldytuve nesusioksidavo viso bandymo metu. Taip pat matome, kad antioksidantai tikrai pagerino aliejaus oksidacinį stabilumą. Net ir laikant kambario temperatūroje aliejus su DOM ir AN-110 XT priedais nesioksidavo iki galo. Kadangi baigėsi aliejaus bandiniai, nebuvo galima toliau pratęsti tyrimų ir stebėti, kiek dar laiko tas oksidacinis stabilumas būtų išlikęs. Rezultatai parodė, kad laikant aliejų tinkamomis sąlygomis (tamsioje ir vėsioje vietoje, taip pat šaldytuve), galima užtikrinti, kad oksidacijos procesas vyks lėčiau.

Aliejaus stabilumui taip pat įtakos turi natūralūs antioksidantai, esantys aliejuje (tokoferoliai, karotinai, fenoliniai junginiai). Jie stabdo aliejaus oksidaciją. Chlorofilai, kurių yra ganėtinai daug kanapių aliejuje (138,3 mg/kg) [51], veikia atvirkščiai. Jie skatina aliejaus autooksidacijos bei fotooksidacijos procesus. Antioksidantų priedai lėtina ar net visiškai stabdo šiuos procesus, todėl norint, kad aliejus išsilaikytų ilgiau nesugedęs, yra verta naudoti juos net ir mažais kiekiais.

3.4.4. Kanapių aliejaus, gauto CO₂ ekstrakcijos metu ir jo mišinių su ORH antioksidantu PS kitimas

Šis tyrimas buvo atliktas tam, kad patikrinti ar kanapių aliejus, gautas po SKE-CO₂ ekstrakcijos, yra stabilesnis oksidacijai nei presuotas aliejaus. Į jį taip pat buvo pridėtas ORH antioksidantas skirtingomis koncentracijomis: 0,2 %; 0,4 %; 0,7 %; 1 %. Šio bandymo metu lyginti SKE-CO₂ ekstrakcijos bandiniai tarpusavyje bei su 3.5.3. skyrelyje aprašytu presuotu kanapių aliejumi su ORH 0,2 % priedu. Bandymas atlikinėtas tol, kol buvo sunaudotas aliejus PS nustatymui (7 mėnesius).

Visų pirma, buvo nutatyta šviežio kanapių aliejaus, gauto superkrizinės ekstrakcijos metu, peroksidų skaičius PS – 2,06 mekv O₂/kg ir rūgšties skaičius R – 3,02 %. Tai ganėtinai aukštos vertės šviežiam aliejui. Tam įtakos galėjo turėti temperatūra ir slėgis (30°C ir 40 MPa) ekstrakcijos metu. CO₂ ekstrakcijos metu gauto ekstrakto ir presuoto aliejaus su ORH antioksidanto priedais PS kitimo kinetinės kreivės pavaizduotos 17 pav.



17 pav. Kanapių aliejaus PS kitimo kinetinės kreivės

Lyginant SKE-CO₂ ekstrakcijos metu gauto aliejaus su skirtingomis ORH koncentracijomis bandinius tarpusavyje, buvo nustatyta, kad geriausiu antioksidaciniu veikimu pasižymėjo 0,7 %

koncentracijos ORH priedas. Per 7 mėnesių laikymo laikotarpį PS vertė pakilo iki $8,73 \pm 0,29$ mekv O_2/kg . Šio bandinio PS augimas pirmus 3 mėnesius buvo didesnis, nei mažesnių koncentracijų bandinių. Bet po to jis kilo stabiliai, lėčiau nei kitų koncentracijų bandinių iki pat tyrimo galo. Panašiai veikė ir 1 % ORH priedas. Tik paskutinį tyrimo mėnesį PS smarkiai pakilo, net iki $10,90 \pm 0,24$ mekv O_2/kg . Tai didžiausia tirtų bandinių su ORH vertė. Tai rodo, kad aliejuje ši ORH koncentracija per didelė ir jis pradėjo veikti kaip prooksidantas, skatindamas aliejaus oksidaciją. Kitų koncentracijų bandinių oksidacijos produktų kiekis pirmus 3 mėnesius didėjo lėčiau, bet po to įvyko lūžis ir penktą mėnesį matyti, kad peroksidų kiekis pradėjo smarkiai didėti. Kontrolinio aliejaus bandinio (be antioksidanto) PS augo tolygiai didėdamas ir pasiekė didžiausią reikšmę iš visų bandinių – $12,15 \pm 0,07$ mekv O_2/kg . Susidarę peroksidų kiekiai pavaizduoti 14 lentelėje.

Lyginant presuoto kanapių aliejaus ir SKE- CO_2 kanapių sėklų ekstrakto PS kinetines kreives, matoma, kad presuotame aliejuje ORH 0,2 % koncentracijos priedas veikė geriau nei CO_2 ekstrakcijos metu gautame aliejuje. Bet po 7 mėnesių nustatyta, kad smarkiai padidėjo oksidacijos produktų – PS vertė išaugo dvigubai (nuo 5,49 iki 10,57 mekv O_2/kg) ir tapo artima CO_2 ekstraktų vertėms, iškyrus bandinį su 0,7 % koncentracijos ORH priedu, kuri tarp visų bandinių veikė geriausiai.

14 lentelė. Peroksidų skaičiaus kitimo kanapių aliejuje, gautame superkryzinės CO_2 ekstrakcijos ir presavimo metu, su ORH priedais, palyginimas

Aliejaus bandiniai	Peroksidų skaičius			
	Po 2 mėnesių, mekv O_2/kg	Po 3 mėnesių, mekv O_2/kg	Po 5 mėnesių, mekv O_2/kg	Po 7 mėnesių, mekv O_2/kg
Kontrolė	$5,32 \pm 0,05$	$5,61 \pm 0,21$	$9,32 \pm 0,23$	$12,15 \pm 0,07$
Aliejus + 0,2 % ORH	$4,48 \pm 0,09$	$5,69 \pm 0,09$	$9,17 \pm 0,30$	$10,58 \pm 0,25$
Aliejus + 0,4 % ORH	$4,73 \pm 0,11$	$5,64 \pm 0,14$	$9,32 \pm 0,24$	$10,63 \pm 0,14$
Aliejus + 0,7 % ORH	$4,45 \pm 0,15$	$6,39 \pm 0,05$	$7,50 \pm 0,09$	$8,73 \pm 0,29$
Aliejus + 1 % ORH	$5,55 \pm 0,06$	$6,39 \pm 0,08$	$7,41 \pm 0,12$	$10,90 \pm 0,24$
Aliejus po presavimo + 0,2 % ORH	$2,66 \pm 0,08$	$4,81 \pm 0,08$	$5,49 \pm 0,09$	$10,57 \pm 0,09$

Iš gautų rezultatų, galima teigti, kad geriausia antioksidanto ORH koncentracija tirtuose bandiniuose yra 0,7 %. Bet sunku vertinti, kaip kitų koncentracijų ORH priedai būtų veikę tiriant oksidaciją toliau, jei nebūtų sunaudotas visas aliejus. Taip pat reiktų atlikti bandymą su šalto presavimo aliejumi ir nustatyti, ar 0,7 % ORH priedo koncentracija veiks geriau nei 0,2 %.

3.5. Ekstraktų, gautų po pagreitintos skysčių ekstrakcijos, antioksidacinės savybės

Ekstraktų, gautų po pagreitintos skysčių ekstrakcijos iš kanapių sėklų išspaudų antioksidacinis aktyvumas įvertintas naudojant DPPH radikalo ir ABTS katijono radikalo blukinimo metodus, o deguonies radikalų absorbcijos pajėgumas nustatytas ORAC metodu. Bendras fenolinių junginių kiekis įvertintas Folin - Ciocalteu metodu. Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo skirtingose modelinėse sistemose įvertinimo rezultatai pateikiami 15 lentelėje. Ekstrakcijos vandeniu metu, atliekant ekstrakciją tomis pačiomis sąlygomis ir šiuos ekstraktus liofilizavus, buvo gauti skirtingos spalvos bandiniai, todėl jų antioksidacinis aktyvumas įvertintas atskirai.



18 pav. ASE vandeniu (kairėje-70°C, dešinėje-130°C) gauti skirtingos spalvos ekstraktai

Tiriamųjų ekstraktų antioksidacinė galia labai priklauso nuo jų fitocheminės sudėties – kiekio bei struktūros, ypač polifenolinių junginių iš kurių svarbiausi flavonoidai ir fenolinės rūgštys. BFJK ekstraktuose buvo nuo 14,08±0,09 iki 60,16±1,43 mg GRE/g ekstrakto. Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas taikant ekstrakciją etanolio ir vandens mišiniu (130°C temperatūra). Mažiausios vertės gautos ekstrakcijai naudojant vandenį (70°C temperatūroje). Kitų ekstraktų fenolinių junginių kiekis labai nesiskyrė.

15 lentelė. Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Tirpiklis	BFJK, mg GRE/g ekstrakto	DPPH, mg TE/g ektrakto	ABTS, mg TE /g ekstrakto	ORAC, mg TE/g ektrakto
Et:H ₂ O 70°C	38,58±2,20	26,17±2,21	73,55±2,29	107,01±1,44
Et:H ₂ O 130°C	60,16±1,43	28,59±1,36	73,05±5,38	100,29±1,54
H ₂ O 70°C (šviesesnis)	14,08±0,09	3,74±1,18	41,56±1,03	119,28±1,14
H ₂ O 70°C 2 (tamsesnis)	27,06±1,88	8,34±1,28	58,93±1,33	124,76±1,47
H ₂ O 130°C 1 (šviesesnis)	31,16±1,43	15,05±2,41	55,41±4,79	140,69±0,29
H ₂ O 130°C 2 (tamsesnis)	31,40±1,75	17,60±1,13	64,48±3,53	173,48±1,33
Acetoninis	40,74±0,18	18,70±1,65	67,40±5,56	75,96±0,87
Etanolinis	30,65±1,52	19,62±1,63	73,22±3,61	90,59±0,69

Ekstraktų DPPH radikalų surišimo geba kito nuo $3,74 \pm 1,18$ iki $28,59 \pm 1,36$ mg TE/g ekstrakto. Didžiausia surišimo geba pasižymėjo ekstraktai, kurie buvo gauti naudojant etanolio ir vandens mišinį. Nors ir buvo naudojama skirtinga proceso temperatūra, nustatyta surišimo geba kito paklaidų ribose: 70°C – $26,17 \pm 2,21$ mg TE/g ekstrakto, 130°C – $28,59 \pm 1,36$ mg TE/g ekstrakto. Ekstraktai, gauti naudojant vandenį 70°C temperatūroje, pasižymėjo mažiausia surišimo geba. Kitų ekstraktų surišimo gebos panašios, skyrėsi nežymiai.

ABTS blukinimo metodas parodė panašius rezultatus. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymi ekstraktai, gauti naudojant vandens ir etanolio mišinį. Vertės taip pat panašios, naudojant skirtingą temperatūrą (70°C ir 130°C), atitinkamai $73,55 \pm 2,29$ ir $73,05 \pm 5,38$ mg TE /g ekstrakto. Taip pat mažiausiu aktyvumu pasižymėjo ekstraktai gauti vandeniui 70°C ($41,56 \pm 1,03$ ir $58,93 \pm 1,33$ mg TE/g ekstrakto).

Nustatant deguonies surišimo gebą (ORAC), buvo pastebėta skirtinga tendencija. Naudojant šį metodą, stipresniu poveikiu pasižymėjo ekstraktai, gauti vandeniui. Gautos vertės svyravo intervale nuo $119,28 \pm 1,14$ iki $173,48 \pm 1,33$ mgTE/g ekstrakto. Mažesne geba pasižymėjo acetoninis ir etanolinis ekstraktai, atitinkamai $75,96 \pm 0,87$ ir $90,59 \pm 0,69$ mg TE/g ekstrakto.

Palyginus visus ekstraktus ir antioksidacinių savybių metodus, nustatyta, kad geriausiomis savybėmis pasižymėjo ekstraktai, gauti naudojant vandens ir etanolio mišinį.

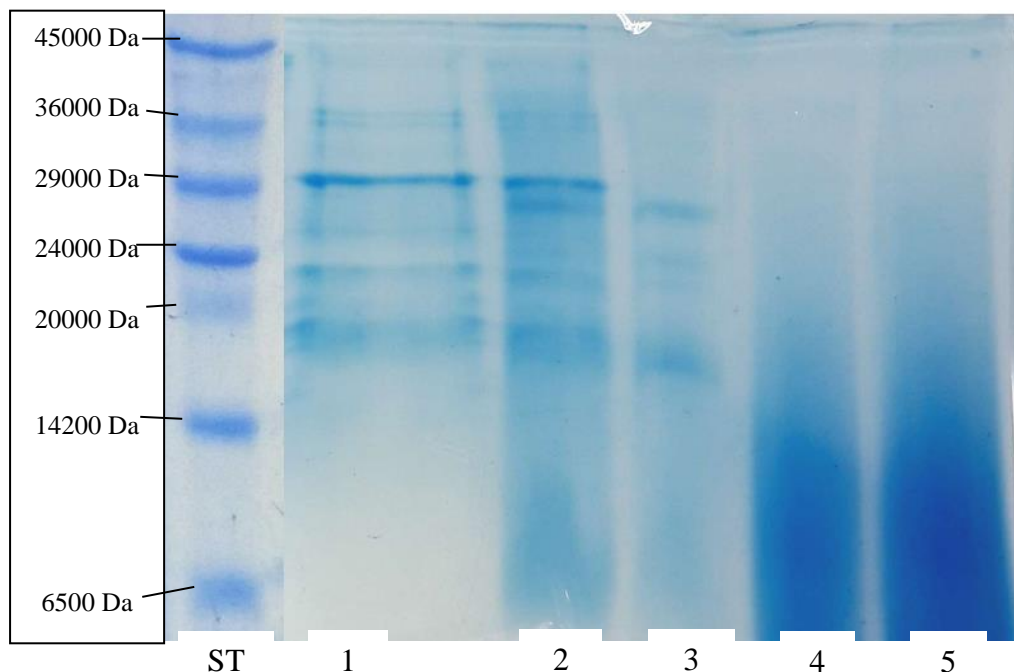
3.6. Kanapių sėklų baltymų išskyrimas ir savybės

Kanapių sėklų presavimo arba ekstrakcijos tirpikliais metu yra atskiriamas aliejus. Likutis po ekstrakcijos yra vadinamas išspaudomis. Jose yra daug baltymų – maždaug 30-40 % pagal sausą medžiagą, priklausomai nuo kanapių veislės ar auginimo sąlygų [52]. Šios išspaudos gali būti naudojamos baltymingų miltų gamybai.

Tyrimo metu buvo išskyrinėjami baltymai į 4 frakcijas (albuminų, globulinų, prolaminų gluteinų) skirtingais tirpikliais iš kanapių sėklų išspaudų. Nustatoma baltymų molekulinė masė, aminorūgščių sudėtis ir funkcinės savybės.

3.6.1. Kanapių baltymų elektroforezė

Elektroforezės metodu, buvo nustatyta kanapių sėklų baltymų pasiskirstymas pagal molekulinę masę skirtinguose baltymų ekstraktuose, gautuose Osbornio ekstrakcijos metu. Rezultatai pateikti 19 paveikslėlyje.



19 pav. Kanapių sėklų baltymų frakcijų baltymų išskirstymas ir jų molekulinės masės: ST–standartas, 1 – albuminai, 2 – globulinai, 3 – prolaminai, 4-5 – gliuteinai

Atlikus elektroforezę nustatyta, kad albuminų frakcijoje daugiausiai išsiskirstė baltymų, kurių molekulinė masė yra tarp 20000 Da ir 45000 Da. 19 paveikslėlyje matyti, kad daugiausiai šioje frakcijoje yra baltymų, kurių molekulinė masė yra apie 29000 Da. Globulinų frakcijoje nustatytas baltymų išskirstymas buvo panašus į albuminų. Prolaminų frakcijoje vyrauja baltymai, kurių molekulinė masė yra tarp 20000 Da ir 29000 Da. Gliuteinų frakcijos baltymų nepavyko išskirstyti, bandiniai tiesiog nusidažė per visą kanalėlio ilgį.

Sunday ir kiti (2015) nustatinėjo baltymų išskirstymą kanapių sėklų albuminų ir globulinų frakcijose [53]. Pagal jų rezultatus, albuminų frakcijoje vyravo baltymai, kurių molekulinė masė tarp 10000 ir 42000 Da, globulinų tarp 6000 ir 35000 Da.

Docimo ir Caruso (2014) atliko bendro kanapių sėklų baltymų ekstrakto elektroforezę [54]. Remiantis jų rezultatais, baltymai pasiskirstė tarp 10 kDa ir 54 kDa. Buvo nustatyta 3 pagrindinės polipeptidų grupės, kurių molekulinė masė yra apytiksliai lygi 48, 33 ir 20 kDa. Pagal Tang ir kitus (2006) [55] ir Wang ir kitus (2008) [56], polipeptidai, kurių molekulinė masė yra apie 33 ir 20 kDa, atitinka rūgštinius ir bazinius baltymo edestino subvienetus, o 48 kDa polipeptidas atitinka kanapių sėklų baltymų izoliatą 7S. Šiame darbe nustatytas baltymų pasiskirstymas yra panašus į literatūroje nurodytus.

Kanapių sėklose vyrauja globuliniai baltymai (edestinas ir albuminas). Edestinas sudaro apie 60-80 % visų baltymų kiekio. Šie baltymai yra atsakingi už fermentines funkcijas kraujo plazmoje antikūnių gamybai. Edestinas yra vienas geriausiai virškinamų baltymų. Jis randamas tik kanapėse [52].

3.6.2. Kanapių sėklų ir jų skirtingų baltymų frakcijų amino rūgščių sudėtis

Buvo nustatyta kanapių sėklų ir jų skirtingų baltymų frakcijų amino r. sudėtis (16 lentelė). Iš gautų rezultatų matyti, kad sėklose bei baltymų frakcijose, amino r. kiekiai pasiskirstę skirtingai. Nustatyta, kad visose frakcijose didžiausias kiekis yra amino r. glutamino. Albuminų frakcijoje jos yra 84,35 $\mu\text{mol/l}$. Ši amino rūgštis svarbi sveikai inkstų veiklai palaikyti, dalyvauja reguliuojant organizmo šarmų ir rūgščių pusiausvyrą, dalyvauja anaboliniuose procesuose, naudojamas imuniteto stiprinimui [62]. Nustatyta, kad izoleucino kiekis frakcijose labai skirtingas. Kanapių sėklų ir albuminų frakcijoje jo kiekis ganėtinai didelis ir panašus, atitinkamai, 60,44 $\mu\text{mol/l}$ ir 66,76 $\mu\text{mol/l}$, o kitose mažas: globulinų – 18,06 $\mu\text{mol/l}$, prolaminų – 2,45 $\mu\text{mol/l}$, gliuteinų – 3,04 $\mu\text{mol/l}$. taip pat albuminų frakcijoje gausu amino r. leucino – 82,21 $\mu\text{mol/l}$. Kitose frakcijose amino r. pasiskirtymas nevienodas.

16 lentelė. Kanapių sėklų ir jų skirtingų baltymų frakcijų baltymų amino r. sudėtis

	Albuminų frakcija	Globulinų frakcija	Prolaminų frakcija	Gliuteinų frakcija	Kanapių sėklos
Amino r. pavadinimas	Kiekis, $\mu\text{mol/l}$				
Asparto	8,57	4,63	3,08	20,86	2,67
Glutamo	15,60	16,53	12,69	10,68	11,31
Asparaginas	2,69	2,75	2,57	1,45	2,37
Serinas	3,02	5,62	4,33	8,27	6,24
Glicinas	2,71	1,02	0,79	0,77	0,87
Glutaminas	84,35	36,25	50,36	65,26	71,27
Histidinas	33,84	11,82	10,95	10,56	15,63
Treoninas	24,79	14,23	6,63	10,57	15,90
Alaninas	10,88	5,36	5,43	3,97	4,05
Karnozinas	3,66	2,16	8,20	8,42	2,16
Argininas	16,39	5,57	4,68	9,91	6,00
γ-Aminobutiro	5,11	3,97	2,49	3,31	2,40
Prolinas	43,66	21,83	30,28	20,57	12,23
Teaninas	4,52	6,57	3,11	4,28	5,65
Tirozinas	9,65	6,59	7,32	8,37	6,09
Valinas	36,73	12,45	10,70	20,73	8,13
Hidroksilizinas	12,92	12,89	9,18	11,67	13,30
Metioninas	12,86	8,60	5,48	10,37	10,81
Ornitas	2,67	7,15	2,98	2,46	3,49
Lizinas	4,78	5,47	5,47	3,36	4,09
Izoleucinas	66,76	18,06	2,45	3,04	60,44
Leucinas	82,21	10,65	40,36	30,45	45,21
Fenilalaninas	73,59	10,73	20,36	42,36	30,43
Triptofanas	7,38	1,56	5,12	8,28	5,69

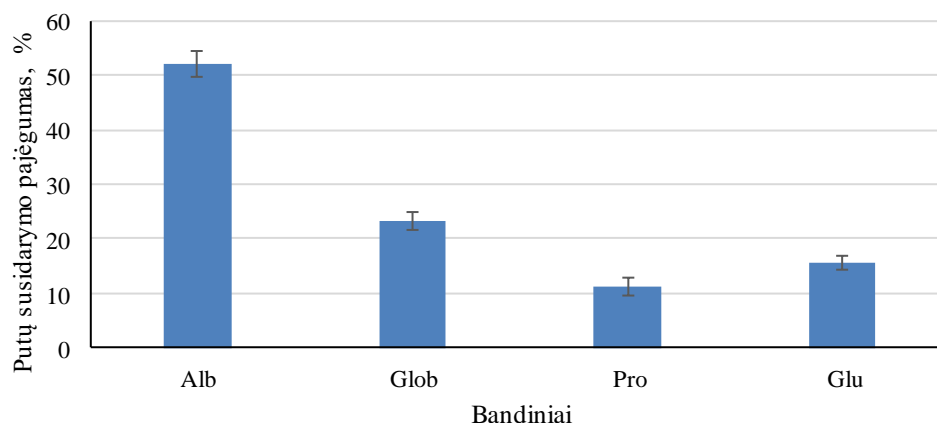
Mažiausias kiekis baltymų frakcijose yra amino r. glicino. Jo kiekis yra nuo 0,77 iki 2,71 $\mu\text{mol/l}$. Taip pat nustatyta, kad kanapėse yra maži kiekiai sierą turinčių amino rūgščių. Metionino kiekis bandiniuose yra nuo 5,48 iki 12,86 $\mu\text{mol/l}$, o cisteino visai neaptikta.

Nepakeičiamų amino rūgščių kiekis tirtose kanapių sėklose sudarė 56,67 % viso amino r. kiekio. Tai yra ganėtinai didelis skaičius, todėl šios kanapės yra geras amino r. šaltinis žmogaus organizmui.

Ruso (2014) taip pat nustatė, kad skirtingose kanapių sėklų veislėse didžiausias kiekis yra amino rūgšties glutamino [52]. Bet kaip antrą dominuojančią amino r. nurodė argininą. Šiame darbe tirtuose bandiniuose, arginino kiekis buvo nedidelis. Antra didžiausiu kiekiu amino r. yra leucinas. Wang (2007) nustatė, kad glutamino kiekis kanapių sėklose taip pat didžiausias, bet antrą dominuojančią nurodė asparto rūgštį. Tokius skirtumus galėjo lemti auginimo sąlygos, klimatas, kanapių veislė.

3.6.3. Kanapių sėklų baltymų putų sudarymo pajėgumas ir stabilumas

Kanapių sėklų baltymų frakcijų: albuminų (Alb), globulinų (Glob), prolaminų (Pro) ir gliuteinų (Glu) putų susidarymo pajėgumo ir stabilumo rezultatai pateikti 20 ir 21 paveikslėliuose.



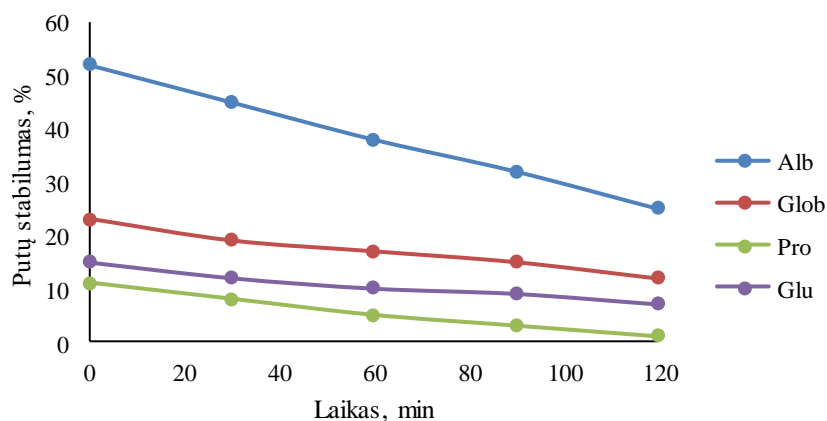
20 pav. Kanapių sėklų baltymų frakcijų putų sudarymo pajėgumas

Iš gautų rezultatų matyti, kad putų susidarymo pajėgumas (PSP) svyravo nuo 15 iki 50 %. Geriausiu putų susidarymo pajėgumu pasižymėjo albuminų frakcija. Jos susidarymo pajėgumas siekė $52,11 \pm 2,31$ %. Kitų frakcijų putų susidarymo pajėgumai žymiai mažesni, atitinkamai: Glo – $23,37 \pm 1,55$ %, Pro – $11,24 \pm 1,62$ % ir Glu – $15,73 \pm 1,31$ %.

Sunday ir kiti (2015) [53] tyrė kanapių sėklų baltymų albuminų ir globulinų frakcijų putų susidarymo pajėgumą. Buvo nustatyta, kad putų PSP, esant terpės pH 7, buvo atitinkamai: Alb 98,51 % ir Glo 31,25 %. Lyginant rezultatus, gautus šiame darbe su literatūroje nurodytais, pastebima ta pati tendencija, kad geresniu pajėgumu pasižymėjo albuminų frakcija, nors rezultatai yra ganėtinai skirtingi.

Tam įtakos galėjo turėti baltymų frakcijų išskyrimo metodikų skirtumai, reagentai, kanapių sėklų auginimo sąlygos.

Geriausiu putų stabilumu pasižymėjo globulinų frakcija (21 pav.). Putų kiekis kito nesmarkiai, lyginant su kitomis frakcijomis. Šios frakcijos bendras stabilumas 52,17 %. Prasčiausiu stabilumu pasižymėjo prolaminų frakcija (9,09 %).



21 pav. Kanapių baltymų frakcijų putų stabilumas

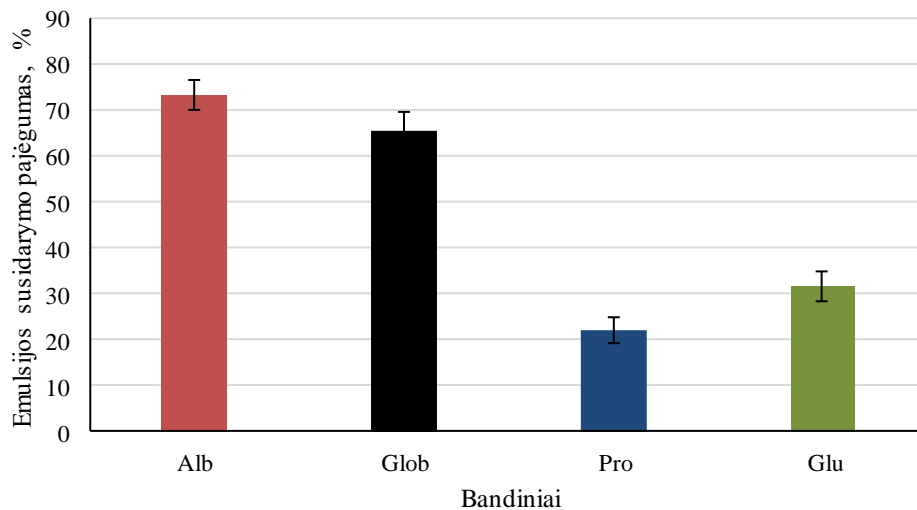
Sunday ir kiti (2015) [53] nustatė, kad esant pH terpei 7 geresniu putų stabilumu pasižymi taip pat globulinai (83,25 %). Albuminų frakcija pasižymėjo prastesniu stabilumu (62,17 %).

Lyginant rezultatus, gautus šiame darbe, su literatūroje nurodytais, matyti, kad tendencija ta pati. Geriausiu stabilumu pasižymėjo albuminų frakcija, prastesniu globulinai.

3.6.4. Kanapių sėklų baltymų emulsijų sudarymo pajėgumas ir stabilumas

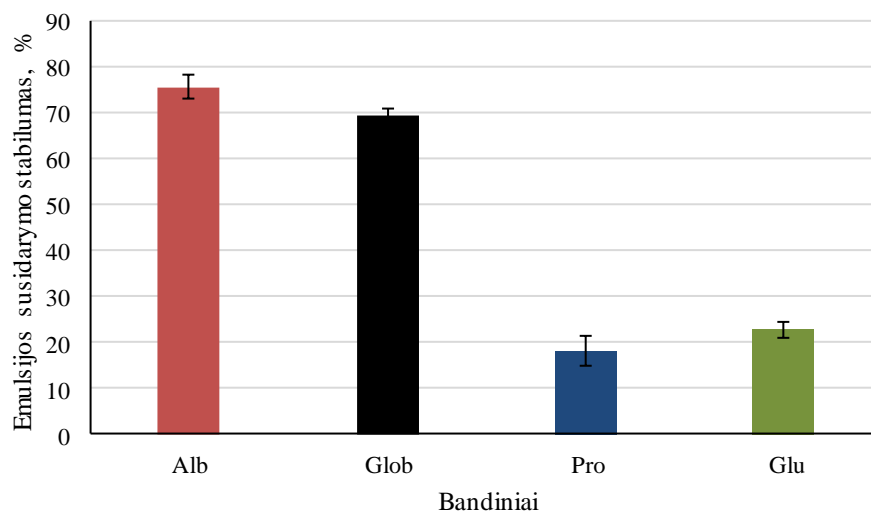
Kanapių sėklų baltymų frakcijų: albuminų (Alb), globulinų (Glob), prolaminų (Pro) ir gliuteinų (Glu) emulsijų susidarymo pajėgumo ir stabilumo rezultatai pateikti 22 ir 23 paveikslėliuose.

Iš gautų rezultatų matyti (22 pav.), kad emulsijos susidarymo pajėgumas (ESP) svyravo nuo $31,50 \pm 3,12$ iki $73,32 \pm 3,24$ %. Geriausiu emulsijos susidarymo pajėgumu pasižymėjo albuminų frakcija. Jos susidarymo pajėgumas siekė $73,32 \pm 3,24$ %. Ne daug skyrėsi ir Glob frakcija. Jos ESP $65,48 \pm 4,21$ %. Blogiausią ESP parodė Pro frakcija – $21,96 \pm 2,71$ %.



22 pav. Kanapių sėklų baltymų frakcijų emulsijų susidarymo pajėgumas

Geriausiu emulsijos stabilumu pasižymėjo albuminų frakcija (23 pav.). Šios frakcijos stabilumas $75,69 \pm 2,71$ %. Prasčiausiu stabilumu pasižymėjo prolaminų frakcija ($18,13 \pm 3,17$ %).



23 pav. Kanapių sėklų baltymų frakcijų emulsijų stabilumas

Sunday ir kiti (2015) [53] nustatė, kad esant pH terpei 7 geresniu emulsijos stabilumu pasižymi taip pat albuminai (94,57 %). Globulinų frakcija pasižymėjo prastesniu stabilumu (56,82 %). Palyginus šio darbus rezultatus su literatūroje nurodytais, matome, kad rezultatai skiriasi. Šiame darbe gauta, kad Alb ir Glo frakcijų stabilumas skiriasi nežymiai, o Sunday ir kiti nustatė, kad jų stabilumas skiriasi dvigubai, bet tendencija ta pati – albuminai pasižymi geresniu emulsijos stabilumu. Įtakos tokiems skirtumams tarp šio darbo rezultato ir literatūroje nurodytų galėjo turėti kanapių sėklų žaliavos skirtumai, metodų atlikimo skirtumai bei baltymų išgryninimo skirtumai.

IŠVADOS

1. Nustatyta tirtų kanapių sėklų (*Cannabis sativa*) chemminė sudėtis: riebalų kiekis – 33,23 g/100 g, baltymų kiekis – 35,53 g/100g, pelenų kiekis – 6,11 g/100 g.
2. Nustatyta, kad Soksleto ekstrakcijos metu gauname didžiausią aliejinio ekstrakto išėigą. Iš nepresuosuotų sėklų Soksleto ekstrakcijos metu buvo gauta išėiga – 35,53 %, SKE-CO₂ – 20,27 %. Iš išspaudų Soksleto ekstrakcijos metu gauta išėiga – 18,98 %, SKE-CO₂ – 14,67 %. Presavimo metu buvo gauta 14,22 % aliejaus.
3. Nustatyta, kad kanapių sėklų aliejuje daugiausiai yra nesočiųjų RR (87,17-89,22 %), iš kurių daugiausiai yra linolo rūgštis – 53,54-54,92 %. Jos greičiausiai oksiduojasi, susidaro aldehidai, hidroksi peroksidai ir kiti junginiai, kurie suteikia aliejui apkartimą, bet sėklose yra natūralių antioksidantų, tokiu kaip tokoferoliai, kurie stabilizuoja antioksidacinį stabilumą. Tirtose kanapėse nustatyta, kad didžiausias kiekis yra γ -tokoferolio (692,42±5,21 mg/kg). Bendras tokoferolių kiekis 782,44 mg/kg.
4. Nustatytas kanapių sėklų aliejaus oksidacinis stabilumas deguonies, slėgio ir temperatūros poveikyje Oksipres metodu siekia 2,68 val, o Rancimat metodu – 0,5 val. Norint padidinti aliejaus oksidacinį stabilumą, patartina naudoti antioksidantus. Pridėjus antioksidantų, aliejaus stabilumas padidėjo. Geriausiai veikė DURALOX BLEND AN-110 XT 0,4 % koncentracijos antioksidantas. Oksidacinis stabilumas padidėjo: Oksipres metodu 29,5 % (iki 3,8 val), Rancimat metodu 93,9 % (iki 8,26 val).
5. Nustatyta, kad kanapių aliejaus galiojimo trukmei turi įtakos laikymo temperatūra: kanapių aliejus, laikomas kambario temperatūroje, sugedo per 5 mėn (PS vertė pasiekė 19,32 mekv O₂/kg), o laikant aliejų šaldytuve 4 – 6 °C temperatūroje per 18 mėn. PS nepasiekė kritinės vertės (8,54 mekv O₂/kg). Taip pat, galiojimo trukmės prailginimui galima naudoti antioksidantus, pvz. naudojant DURALOX OXIDATION MANAGEMENT antioksidantą (0,2 % koncentracijos), laikant 4 °C temperatūroje aliejaus PS vertė pakilo tik iki 5,35 mekv O₂/kg. Taip pat, nustatyta, kad ekstrakcijos metodas turi įtakos aliejaus galiojimo trukmei: SKE-CO₂ ekstrakcijos metu gautas aliejus nesugedo laikant jį 7 mėnesius kambario temperatūroje (12,15 mekv O₂/kg), tuo tarpu laikant aliejų, gautą po presavimo, tokiomis pačiomis sąlygomis jis sugedo po 5 mėn. laikymo.
6. Pagreitintos skysčių ekstrakcijos metu iš kanapių išspaudų etanolio ir vandens mišiniu 130°C temperatūroje išgautas ekstraktas parodė geriausias antioksidacines savybes. Skirtingais metodais buvo nustatyta, kad BFJK – 60,16±1,43 mg GRE/g, DPPH – 28,59±1,36 mg TE/g, ABTS – 73,03±5,38 mg TE/g, ORAC – 100,29±1,54 mg TE/g ekstrakto.
7. Elektroforezės metu nustatyta, kad daugiausia baltymų yra, kurių molekulinė masė tarp 20 ir 49 kDa, kas atitinka edestino molekulinę masę. Nustatytas didžiausias kiekis amino r. yra

glutamino – 84,35 $\mu\text{mol/l}$ albuminų frakcijoje. Kitose frakcijose jo kiekis taip pat didžiausias. Mažiausias kiekis buvo nustatytas glicino gliuteinų frakcijoje – 0,77 $\mu\text{mol/l}$. nustatyta, kad kanapių sėklose, nepakeičiamos amino rūgštys sudaro 56,67 % visų amino r. kiekio. Geriausių putų (52,11 \pm 2,31 %) ir emulsijos (73,32 \pm 3,24 %) susidarymo pajėgumu bei emulsijos stabilumu (75,69 \pm 2,71 %) pasižymi albuminų frakcija – o geriausių putų stabilumu – globulinų (52,17 %). Prasčiausiomis savybėmis tiek putų ir emulsijų susidarymo ir stabilumo savybėmis pasižymi prolaminų frakcija.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Guy, G. W., et al. The Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids. *Pharmaceutical Press*, 2004, pp. 74–76. ISBN 978-0-85369-517-2;
2. Song, B. H., et al. Further evidence for paraphyly of the Celtidaceae from the chloroplast gene mat K. *Plant Systematics and Evolution*, 2001, 107–15. doi:10.1007/s006060170041;
3. Small, E. American law and the species problem in Cannabis: Science and semantics. *Bulletin on narcotics*, 1975, pp. 1–20. PMID 1041693;
4. Green, G., The Cannabis Breeder's Bible. *Green Candy Press*, 2005, pp. 15-16. ISBN 9781931160278;
5. Moliterni, V. M., et al. The sexual differentiation of Cannabis sativa L.: A morphological and molecular study. *Euphytica*, 2004, pp. 95–106. doi:10.1007/s10681-004-4758-7;
6. Russo, E. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry & Biodiversity*, 2007. doi:10.1002/cbdv.200790144
7. Johnson, R. Hemp as an Agricultural Commodity, 2015. RL32725;
8. Bócsa, I., et al. The cultivation of hemp. Botany, varieties, cultivation and harvesting, markets and product lines, 2000, GmbH, Münster;
9. U.S. National Plant Germplasm System, [žiūrėta 2017-03-29]. Prieiga per internetą: <https://npgsweb.arsgrin.gov/gringlobal/taxonomylist.aspx?category=species&type=genus&value=Cannabis&id=2034>;
10. List of Approved Cultivars for the 2016 Growing Season - Cannabis sativa L., [žiūrėta 2017-03-29]. Prieiga per internetą: <http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/substancontrol/hemp-chanvre/comm-licen/list-cultivars-liste-2016/index-eng.php>;
11. What Chemicals Are in Marijuana and Its Byproducts, žiūrėta [2017-04-01]. Prieiga per internetą: <http://medicalmarijuana.procon.org/view.answers.php?questionID=000636>;
12. Novak, J., et al. Essential oils of different cultivars of Cannabis sativa L. and their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 2001, 16(4), pp. 259–262. doi:10.1002/ffj.993;
13. House, J. D., et al. Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa L.*) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, pp.11801-11807;
14. Erasmus, U. Fats and Oils. *Alive*, 1996, Kanada;
15. Leizer, C., et al. The Composition of Hemp Seed Oil and Its Potential as an Important Source of Nutrition. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, 2000, P. 46;
16. Callaway, J. C. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 2004, pp. 65–72. doi:10.1007/s10681-004-4811-6;

17. House, J. D. Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa L.*) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *J Agric Food Chem.*, 2010;
18. Kozłowski, R. M. Handbook of natural fibres. Processing and applications. *Woodhead Publishing limited*, 2012, p.329-360;
19. Bolton, J. The potential of plant fibres as crops for industrial use. *Outlook Agr.*, 1995, pp. 85–89;
20. Russo, R., et al. Evaluation of Protein Concentration, Amino Acid Profile and Antinutritional Compounds in Hempseed Meal from Dioecious and Monoecious Varieties, 2014, Milano, Italy.
21. Chris Conrad. Hemp for health. *The medicinal and nutritional uses of cannabis sativa*.
22. Small, E., D. Marcus. Hemp: A New Crop with New Uses for North America.
23. Plant Physiology and Biochemistry. Volume 84, 2014, pp. 142–148;
24. Rodrigues, E., et al. Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chem*, 2012, 134(2), pp. 704–11;
25. Niki, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med.*, 2010, 49(4), P. 503–1;
26. HERRERO, M., et al. Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *Chromatography A.*, 2010, pp. 2495–2511;
27. HERRERO, M., et al. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 2015, pp. 26–38;
28. Luthriaa, D., et al. Accelerated Solvent Extraction, [žiūrēta 2017-04-05]. Prieiga per: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac9508199>;
29. Luque, M. D. Soxhlet extraction. [žiūrēta 2017-04-05]. Prieiga per: <http://cnqzu.com/library/Anarchy%20Folder/Chemistry/Crystalization,%20Purification,%20Separation/Encyclopedia%20of%20Separation%20Science/Level%20III%20%20Practical20Applications/ENVIRONMENTAL20APPLICATIONS%20%20Soxhlet%20Extraction.pdf>;
30. FOLIN, O., AND V. CIOCALTEU. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Biological Chemistry*, 1927, pp. 627–650;
31. BRAND-WILLIAMS, W., et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 1995, 28(1), pp. 25–30;
32. PELLEGRINI, R. N., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(9–10), pp. 1231–1237;

33. Prior, H., et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Food Chem*, 2003, pp. 3273–3279;
34. Gruszka, J. RP-LC for determination of plastochromanol, tocotrienols and tocopherols in plant oils. *Chromatographia*, 2007, pp. 909–913;
35. Osborne, T. B. The proteins of wheat kernel, 1907, Carnegie Inst., Washington, DC.
36. Sanchez, J. C., D.F. Hochstrasser. High-resolution, IPG-based, mini two-dimensional gel electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 1999, pp. 227-233;
37. Oomaha, B. D., et al. Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 2002, pp. 33–43;
38. Erasmus, U. Fats that Heal, Fats that Kill. *Alive Books*, 1999, Burnaby, British Columbia, Canada;
39. Da Porto, C., et al. Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products* (36), 2012, pp. 401–404;
40. Callaway, J., et al. Efficacy of dietary hempseed oil in patients with atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Treatment*, 2005, pp. 87–94;
41. Kriese, U., et al. Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica* (137), 2004, pp. 339–351;
42. Leizer, C., et al. The Composition of Hemp Seed Oil and Its Potential as an Important Source of Nutrition. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, Vol. 2(4), 2000;
43. Chemistry of BHA and BHT Food Preservatives, žiūrėta [2017-04-10]. Prieiga per: <https://www.thoughtco.com/bha-and-bht-food-preservatives-607393>;
44. Almeida, E.S., et al. Behaviour of the antioxidant tert-butylhydroquinone on the storage stability and corrosive character of biodiesel. *FUEL* 90(11), 2011, pp. 3480-3484;
45. Uluata, S., et al. Antioxidant Activities and Oxidative Stabilities of Some Unconventional Oilseeds Oil Chem Soc., 2012, 89(4), pp. 551–559;
46. LST 1959. Įvardytų rūšių augaliniam aliejui taikomas Maisto kodekso standartas (CODEX STAN 210:1999, 1 peržiūra:2001, 1 keitinys:2003);
47. EUROPOS PARLAMENTO IR TARYBOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 1333/2008 2008 m. gruodžio 16 d. dėl maisto priedų (Tekstas svarbus EEE) (OL L 354, 31.12.2008, p.16);
48. Mansouri, H., et al. Effects of abscisic acid on content and biosynthesis of terpenoids in *Cannabis sativa* at vegetative stage. *BIOLOGIA PLANTARUM* 56 (1), 2012, pp. 153-156, 2012;

49. AOCS Lipid Library, Analysis of Oxidized Fatty Acids, [žiūrėta 2017-04-15]. Prieiga per: <http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=39198>;
50. Casimir C. Akoh. Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. The University of Georgia, 2002. ISBN: 0-8247-0749-4;
51. Sapino, S., et al. Hemp-seed and olive oils' Their stability against oxidation and use in O/IAf emulsions, 2005. Turin, Italy;
52. Russo, R., et al. Evaluation of Protein Concentration, Amino Acid Profile and Antinutritional Compounds in Hempseed Meal from Dioecious and Monoecious Varieties. *American Journal of Plant Sciences* (6), 2015, pp. 14-22;
53. Sunday, A., et al. A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids*, 2015 (43), pp. 743–752;
54. Docimo, T., et al. Molecular characterization of edestin gene family in *Cannabis sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry*. Volume 84, 2014, pp. 142–148;
55. Tang, C.H., et al. Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Food Chem.*, (54), 2006, pp. 8945–8950.
56. Wang, X.S., et al. Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chem.*, (107), 2008, pp. 11–18.
57. Gruzdienė, D., N. Vaitkūnaitė. Lietuvoje užaugintų maistinių kanapių sėklų (*Cannabis sativa* L.) aliejaus sudėtis ir savybės, 2011, Kaunas;
58. Teh, S., J. Birch, Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, No. 30, 2013, pp. 26 – 31;
59. Protein Electrophoresis Methods, [žiūrėta 2017 05 02]. Prieiga per: <http://www.bio-rad.com/en-lt/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods>;
60. The Ultimate Guide to Antioxidants, [žiūrėta 2017 05 03]. Prieiga per: <http://articles.mercola.com/antioxidants.aspx>.
61. Duralox Oxidation Management Systems, [žiūrėta 2017 05 20]. Prieiga per internetą: <https://www.kalsec.com/products/duralox/>;
62. Glutamine, [žiūrėta 2017 05 31]. Prieiga per internetą: <https://examine.com/supplements/glutamine/>.
63. The truth about fats: the good, the bad, and the in-between, [žiūrėta 2017 06 01]. Prieiga internetu: <http://www.health.harvard.edu/staying-healthy/the-truth-about-fats-bad-and-good>.
64. Aladic, K., et al. Supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Industrial Crops and Products*, 2015, P. 472–478.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovui prof. dr. Rimantui Petrui Venskutoniui už darbo temos idėją, pastabas, supratingumą, bei nuolatinį skatinimą tobulėti. Dėkoju jaunesniosioms mokslo darbuotojoms Ritai Kazernavičiūtei ir Ramutei Maždžierienei už pagalbą bei konsultacijas atliekant įvairius tyrimus.