



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Karolina Gaigalaitė

**Judros (*Camelina sativa*) sėklų vertingųjų komponentų
frakcionavimas bei jų savybių įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Lekt. dr. Paulius Kraujalis

KAUNAS, 2017

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**Judros (*Camelina sativa*) sėklų vertingųjų komponentų
frakcionavimas bei jų savybių įvertinimas**

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

Vadovas

Lekt. dr Paulius Kraujalis

Recenzentas

Lekt. dr. Milda Pukalskienė

Projektą atliko

Karolina Gaigalaitė



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Karolina Gaigalaitė

(Studento vardas, pavardė)

Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Judros (*Camelina sativa*) sėklų vertingųjų komponentų frakcionavimas bei jų savybių
įvertinimas“

AKADEMINIO SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

20 17 m. birželio 2 d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Karolinos Gaigalaitės**, baigiamasis projektas tema „Judros (*Camelina sativa*) sėklų vertingųjų komponentų frakcionavimas bei jų savybių įvertinimas“ 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)

Gaigalaitė, Karolina. Judros (*Camelina sativa*) sėklų vertingųjų komponentų fracionavimas bei jų savybių įvertinimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovas lekt. dr. Paulius Kraujalis; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: *Camelina sativa*; *antioksidacinis aktyvumas*; *riebalų rūgštys*; *tokoferoliai*; *oksidacinis stabilumas*.

Kaunas, 2017. 88 p.

SANTRAUKA

Įvairių rūšių aliejingų augalų sėklose susikaupia bioaktyvūs junginiai kaip vitaminai, riebalų rūgštys, tokoferoliai ir antioksidantai. Didelė dalis šių junginių yra randama aliejuje, tačiau nemažai bioaktyviųjų junginių lieka sėklų išspaudose. Judra (lot. *Camelina sativa*) yra augalas brandinantis sėklas, kurių sudėtyje yra iki 40 % aliejaus ir yra natūralus Omega-3 ir Omega-6 riebalų rūgščių šaltinis.

Magistro darbo tikslas – įvertinti skirtingų ekstrakcijos metodų įtaką funkcionaliųjų komponentų išgavimui iš judros sėklų (lot. *Camelina sativa*), taikant šiuolaikinius ekstrakcijos metodus dideliame slėgyje bei tradicinius ekstrakcijos metodus. Nustatyti gautų frakcijų cheminę sudėtį bei antioksidacines savybes.

Ekstraktai iš judros sėklų buvo išskirti naudojant tradicinius ir šiuolaikinius ekstrakcijos metodus, tokius kaip Soksleto ekstrakcija, superkryzinė CO₂ ekstrakcija, ekstrakcija padidintame slėgyje naudojant įvairius tirpiklius. Naudojant paviršiaus atsako metodą atliktas ekstrakcijos padidintame slėgyje heksanu kintamųjų parametru optimizavimas (laikas, temperatūra ir tirpiklio tūris), kuriems esant yra gaunama didžiausia lipofilinio ekstrakto išeiga. Po superkryzinės CO₂ ekstrakcijos bandinio liekanai atlikta ekstrakcija padidintame slėgyje, naudojant skirtingo poliškumo tirpiklius bei fermentinę hidrolizę.

Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas išmatuotas pritaikius DPPH• radikalo ir ABTS^{•+} radikalo blukinimo metodus. Išmatuota deguonies radikalų surišimo geba ORAC metodu, o bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas *Folin-Ciocalteu's* metodu. Kietos liekanos antioksidacinis aktyvumas išmatuotas taikant QUENCHER procedūrą.

Gautų ekstraktų riebalų rūgščių kompozicija ištirta naudojant dujų chromatografijos metodą, tokoferolių kiekis identifikuotas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu, o preliminarus kitų bioaktyviųjų komponentų įvertinimas atliktas taikant ultra efektyviąją skysčių chromatografiją. Lipofilinių ekstraktų oksidacinis stabilumas įvertintas Oksipres metodu.

Gaigalaitė, Karolina. *Fractionation Of Valuable Components Of Camelina (Camelina Sativa) and Their Properties Evaluation: Master's thesis in Food Science and Safety / supervisor lect. dr. Paulius Kraujalis. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.*

Research area and field: Technological Sciences, Food Technology

Key words: *Camelina sativa; antioxidant activity; fatty acids; tocopherols; oxidative stability.*

Kaunas, 2017. 88 p.

SUMMARY

Various types plant oily seeds accumulate bioactive compounds like vitamins, fatty acids, tocopherols and antioxidants. Many of these compounds are found in the oil, but also many of these bioactive compounds remain in seed cakes. Camelina (lot. Camelina sativa) is a plant, which ripen seeds containing up to 40 % of oil and is a natural source of Omega-3 and Omega-6 fatty acids.

The aim of Master's study is to isolate functional compounds from camelina seeds using non-conventional and conventional extraction methods. Chemical analysis of extracts and also evaluation of camelina solid residues and extracts antioxidant properties.

Extracts from the camelina seeds were isolated using traditional and modern extraction techniques such as Soxhlet extraction, supercritical CO₂ extraction, accelerated solvent extraction. Response Surface Methodology was used for the optimization of accelerated hexane extraction to set variable parameters (time, temperature, solvent volume) giving the maximum yields of lipophilic extracts. After supercritical CO₂ extraction obtained residue were extracted by accelerated solvent extraction with different polarity solvents. And also enzymatic hydrolysis were done.

Antioxidant activity of extracts were measured using DPPH[•] radical and ABTS^{•+} radical fading methods. Also oxygen radical absorbance capacity (ORAC) were evaluated using ORAC method. Total phenolic compounds amounts were determined by *Folin-Ciocalteu's* method. Solid residues antioxidant activity were estimated by previously reported analysis methods using QUENCHER method.

Fatty acids composition of lipophilic extracts were analyzed by gas chromatography, tocopherol content identified by high performance liquid chromatography and preliminary bioactive compounds evaluation was performed by ultra high performance liquid chromatography. Oxidative stability of lipophilic extracts was measured using Oxipres method.

Turinys

ĮVADAS	11
1.LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1.Paplitimas ir panaudojimas pramonėje	13
1.2.Judros biocheminė sudėtis ir maistinė vertė	14
1.2.1.Judros aliejuje esančios riebalų rūgštys	16
1.1.1.Tokoferoliai	18
1.3.Lipidų peroksidacijos procesas	18
1.4.Antioksidantai	20
1.4.1.Natūralūs antioksidantai	20
1.4.2.Sintetiniai antioksidantai.....	21
1.5.Bioaktyvių junginių išskyrimo metodai.....	21
1.5.1.Sokseleto ekstrakcija	23
1.5.2.Superkrizinių skysčių ekstrakcija	24
1.5.3.Ekstrakcija padidintame slėgyje tirpikliais (EPS)	27
1.5.4.Fermentinė ekstrakcija	27
1.6.Procesų optimizavimas	28
2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI	30
2.1.Tyrimo objektas, jo apdirbimas	30
2.2.Tyrimo metodai.....	30
2.2.1.Cheminiai reagentai ir medžiagos.....	30
2.2.2.Cheminės komponentų sudėties nustatymas.....	31
2.2.3.Tyrimų eiga.....	33
2.2.4.Antioksidaciniai ekstraktų ir kietosios frakcijos tyrimai	37
2.2.5. Riebalų oksidacijos kinetikos ir stabilumo tyrimai.....	40
2.2.6.Riebalų rūgščių kompozicijos nustatymas dujų chromatografijos metodu	41
2.2.7.Tokoferolių kiekio nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.....	42
2.2.8.Ekstraktų analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UHPLC-Q-TOF)	42
3.REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	43
3.1.Judros sėklų cheminių komponentų sudėtis.....	43
3.2.Judros sėklų ekstrakcija Sokseletu bei gautų frakcijų antioksidacinių savybių įvertinimas.....	44
3.2.1.Sokseleto ekstrakcija	44
3.2.2.Lipofilinio ekstrakto antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.....	44
3.2.3.Liekanos po Sokseleto ekstrakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	45
3.3.Judros sėklų ekstrakcija superkriziniu CO ₂ bei gautų frakcijų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.....	45
3.3.1.Lipofilinių ekstraktų išskyrimas superkriziniu CO ₂	45
3.3.2.Lipofilinio ekstrakto antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	48

3.3.3.Liekanos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	49
3.4.Judros sėklų ekstrakcijos padidintame slėgyje optimizavimas.....	50
3.4.1.Eksperimentinio modelio sudarymas ir optimalių ekstrakcijos sąlygų nustatymas.....	50
3.4.2.Lipofilinių ekstraktų (gautų optimaliomis sąlygomis) antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.....	55
3.4.3.Liekanos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	56
3.5.Judros sėklų rafinavimas taikant pakopinę ekstrakcijos metodiką.....	56
3.5.1.Sėklų ekstrakcija padidintame slėgyje.....	56
3.5.2.Ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas	57
3.6.Judros sėklų fracionavimas taikant fermentinę hidrolizę bei gautų fraksijų antioksidacinis įvertinimas.....	59
3.6.1.Sėklų fermentinė hidrolizė.....	59
3.6.2.Ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas	60
3.6.3.Liekanos antioksidacinių savybių įvertinimas.....	62
3.7.Lipofilinių ekstraktų oksidacinio stabilumo įvertinimas	64
3.7.1.Peroksidų kiekio nustatymas lipofiliniuose ekstraktuose	64
3.7.2.Lipofilinių ekstraktų oksidacinio stabilumo įvertinimas Oksipres metodu.....	65
3.8.Judros lipofilinių ekstraktų bioaktyviųjų junginių nustatymas.....	67
3.8.1.Riebalų rūgščių kompozicijos nustatymas.....	67
3.8.2.Tokoferolių kiekio įvertinimas	70
3.8.3.Preliminarus bioaktyviųjų komponentų identifikavimas taikant ultraefektyviają skysčių chromatografiją	72
IŠVADOS	75
Literatūros sąrašas.....	78

SANTRUMPOS

*AAPH	2,2'-azobio (2-amidinpropano) dihidrochloridas (angl. <i>2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride</i>)
*ABTS ^{•+}	2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgštis (angl. <i>radical cation of 2,2'-azino-di-3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid</i>)
EPS	ekstrakcija padidintame slėgyje
*ANOVA	dispersijos analizė (angl. <i>Analysis of variance</i>)
BFJK	bendras fenolinių junginių kiekis
CO ₂	anglies dioksido dujos
*DPPH [•]	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalas (angl. <i>2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl</i>)
F	Fišerio kriterijus
GRE	galio rūgšties ekvivalentai
*HPLC	efektyviosios skysčių chromatografija (angl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
IP	indukcinis periodas
JAV	Jungtinės Amerikos Valstijos
*ORAC	deguonies radikalų absorbcijos galia (angl. <i>oxygen radical absorption capacity</i>)
*L-ORAC	lipofilinių junginių deguonies radikalų absorbcijos galia (angl. <i>lipophilic oxygen radical absorption capacity</i>)
*PBS	fosfatinis buferinis tirpalas (angl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PS	peroksidų skaičius
RR	riebalų rūgštys
SKE-CO ₂	superkrizinė ekstrakcija CO ₂ dujomis
SM	sausos medžiagos
SN	standartinis nuokrypis
TE	trolokso ekvivalentai
*TROLOX	6-hidroksil-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis (angl. <i>6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid</i>)

*UHPLC-Q-TOF	ultra efektyviosios skysčių chromatografija (angl. <i>ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight</i>)
*QUENCHER	antioksidacinio aktyvumo nustatymo sausoje medžiagoje metodika (angl. <i>QUick, Easy, New, CHEap, Reproducible</i>)
α -T	α -tokoferolis
β -T	β -tokoferolis
δ -T	δ -tokoferolis
γ -T	γ -tokoferolis
I SKE-CO ₂	superkazinė ekstrakcija CO ₂ dujomis, esant 40 °C, 36 MPa
I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH	Frakcija po SKE-CO ₂ (40 °C, 36 MPa) ir ekstrakcijos acetonu ir etanolu padidintame slėgyje
I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=3,5	Frakcija po SKE-CO ₂ (40 °C, 36 MPa), ekstrakcijos acetonu, etanolu padidintame slėgyje ir fermentinės hidrolizės (kai pH=3,5)
I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=3,5/H ₂ O	Frakcija po SKE-CO ₂ (40 °C, 36 MPa), ekstrakcijos acetonu, etanolu padidintame slėgyje, fermentinės hidrolizės (kai pH=3,5) ir ekstrakcijos vandeniu padidintame slėgyje
I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=4,5	Frakcija po SKE-CO ₂ (40 °C, 36 MPa), ekstrakcijos acetonu, etanolu padidintame slėgyje ir fermentinės hidrolizės (kai pH=4,5)
I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=4,5/ H ₂ O	Frakcija po SKE-CO ₂ (40 °C, 36 MPa), ekstrakcijos acetonu, etanolu padidintame slėgyje, fermentinės hidrolizės (kai pH=4,5) ir ekstrakcijos vandeniu padidintame slėgyje
II SKE-CO ₂	Superkazinė ekstrakcija CO ₂ dujomis, esant 70 °C, 45 MPa
II SKE-CO ₂ /Acet/EtOH	Frakcija po SKE-CO ₂ (70 °C, 45 MPa) ir ekstrakcijos acetonu ir etanolu padidintame slėgyje
II SKE-CO ₂ / Acet/EtOH/pH=3,5	Frakcija po SKE-CO ₂ (70 °C, 45 MPa), ekstrakcijos acetonu, etanolu padidintame slėgyje ir fermentinės hidrolizės (kai pH=3,5)

- II SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=3,5/ H₂O Frakcija po SKE-CO₂ (70 °C, 45 MPa), ekstrakcijos acetonu, etanolu padidintame slėgyje, fermentinės hidrolizės (kai pH=3,5) ir ekstrakcijos vandeniu padidintame slėgyje
- II SKE-CO₂/ Acet/EtOH/pH=4,5 Frakcija po SKE-CO₂ (70 °C, 45 MPa), ekstrakcijos acetonu, etanolu padidintame slėgyje ir fermentinės hidrolizės (kai pH=4,5)
- II SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5/ H₂O Frakcija po SKE-CO₂ (70 °C, 45 MPa), ekstrakcijos acetonu, etanolu padidintame slėgyje, fermentinės hidrolizės (kai pH=4,5) ir ekstrakcijos vandeniu padidintame slėgyje

*- Santrumpų atitikmuo anglų kalboje, kurios yra plačiai žinomos ir suprantamos.

IVADAS

Įprasti aliejiniai augalai, pavyzdžiui, rapsai, garstyčios, sezamas, sojos pupelės, linų sėmenys yra pagrindiniai aliejaus, kuris yra naudojamas maisto gamybai, šaltiniai. Rapsai ir garstyčios yra pagrindiniai žieminiai pasėliai, kurie sudaro 10–13 % viso maistui skirto aliejaus. Deja, dėl šių aliejų sudėtyje esančios didelės koncentracijos eruko rūgšties ir gliukozinoliatų, jų naudojimas maisto pramonėje yra šiek tiek ribotas. Todėl didėja domėjimasis kitais aliejiniais augalais ir ieškoma naujų alternatyvų [1].

Judra yra vienmetis pasėlis, dažniausiai sėjamas rudenį arba pavasarį. Šis augalas Europoje yra auginamas jau nuo Bronzos amžiaus [2]. Judros sėklų rasta archeologinių kasinėjimų metu Skandinavijoje ir Vakarų Europoje [3]. Judros sėklos buvo rastos 4 a. pr. Kr. žmogaus mumijos skrandyje, kurį archeologinių tyrimų metu atkasė Danijos durpynuose. Antropologai nustatė, kad šio žmogaus paskutinis valgytas maistas buvo sriuba, pagaminta iš įvairių daržovių, miežių, sėmenų, ramunėlių ir judros. Senaisiais laikais judros aliejus buvo plačiai naudojamas. Romėnai judros aliejų naudojo kaip lempų kurą, masažo aliejų, taip pat vartojo maistui ir gyvulių šėrimui [2]. Judra buvo auginama kaip pasėlis Europos šalyse ir Rusijoje prieš Antrąjį pasaulinį karą iki šeštojo dešimtmečio [3].

Praėjus šiek tiek laiko susidomėjimas judra atgijo, kai buvo atlikti tyrimai, kurių metu buvo ištirta judros aliejaus cheminė sudėtis ir buvo nustatyta, kad šios sėklos yra geras riebalų rūgščių šaltinis, ypač omega-3 riebalų rūgščių. Nesochiųjų riebalų rūgščių aliejuje yra apie 90 %, iš kurių 50 % sudaro polinesočiosios riebalų rūgštys. Taip pat šis aliejus yra geras tokoferolių šaltinis [3]. Šie junginiai turi teigiamos maistinės vertės bei teigiamą fiziologinį poveikį. Judros aliejus sumažina trigliceridų ir cholesterolio kiekį kraujo serume. Aliejus dėl unikalios riebalų rūgščių sudėties yra tinkamas tiesioginiam vartojimui ir gali būti naudojamas salotų ir maisto ruošimui, omega-3 riebalų rūgštimis praturtinto margarino, majonezo gamybai [1-3].

Nors judra nėra tas augalas, kurio derlius būtų vienas iš didžiausių tarp aliejingų augalų, tačiau tai yra labai ekonomišką pasėlis dėl minimalių finansinių ir darbo sąnaudų. Judros sėklos dirvoje sudygsta anksti pavasarį, nespėjus sudygti kitiems pasėliams [2]. Šio augalo augimui nereikalinga daug azoto turinti dirva, yra atsparus klimato kaitai, nereikalauja didelio kiekio cheminių medžiagų apsaugai nuo parazitų ir ligų, nereiklus priežiūrai, palyginus nemažas derlus [3].

Darbo tikslas – įvertinti skirtingų ekstrakcijos metodų įtaką funkcionaliųjų komponentų išgavimui iš judros sėklų (lot. *Camelina sativa*), taikant šiuolaikinius ekstrakcijos metodus dideliame slėgyje bei tradicinius ekstrakcijos metodus. Nustatyti gautų frakcijų cheminę sudėtį, bei antioksidacines savybes.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti judros sėklų cheminių medžiagų sudėtį.
2. Palyginti judros sėklų ekstraktų kiekį išskirtą taikant ekstrakciją superkritiniu CO₂ bei soksletu ir įvertinti gautų frakcijų antioksidacines savybes.
3. Nustatyti optimalias ekstrakcijos padidintame slėgyje sąlygas bei įvertinti gautų frakcijų antioksidacines savybes.
4. Įvertinti judros sėklų frakcionavimo galimybes taikant pakopinės ekstrakcijos organiniais tirpikliais metodiką padidintame slėgyje, bei iširti gautų frakcijų antioksidacinį aktyvumą.
5. Panaudojant fermentinę hidrolizę iš judros sėklų išskirti bioaktyvias frakcijas ir nustatyti jų antioksidacinį aktyvumą bei iširti liekanos ekstrakcijos vandeniui padidintame slėgyje galimybes.
6. Nustatyti gautų aliejinių ekstraktų oksidacinį stabilumą.
7. Įvertinti judros sėklų ekstraktų bioaktyvių komponentų sudėtį taikant chromatografinius metodus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Paplitimas ir panaudojimas pramonėje

Judra (lot. *C. Sativa*) priklauso bastutinių (lot. *Brassicaceae*) augalų šeimai. Šiai šeimai priklauso aliejingi augalai, pvz.: garstyčios, rapsai. Taip pat ir daržovės: kopūstai, kalafiorai, brokoliai. Judra dar yra vadinama „netikraisiais linais“, „Olandijos linais“, „Vokietijos sezamu“, „Sibiro aliejumi“ [4].

Judra yra kilusi iš pietryčių Europos ir pietvakarių Azijos [5]. Molekulinės analizės tyrimai parodė, kad Rusijos–Ukrainos regionas pasižymi didele įvairove judros rūšių, todėl galima daryti išvadą, kad čia gali būti šio augalo kilmės centras [6]. Archeologiniai tyrimai rodo, kad judros auginimas prasidėjo neolito laikais pietryčių Europoje, o geležies amžiuje judra buvo svarbus pasėlis beveik visoje Europoje [7].

Judra yra vienmetis augalas auginamas vasaros metu. Tai trumpo sezoniškumo pasėlis, subręsta per 85–100 dienų. Augalas užauga 30–100 cm aukščio (žr. 1 pav.). Stiebas yra lygus, šakotas arba turintis plaukelius. Augalui subrendus stiebas sumedėja. Lapai yra strėlės formos, 5–8 cm ilgio su lygiais kraštais. Ant kiekvieno stiebo viršuje yra žiedynas. Žiedai yra blyškiai gelsvos spalvos su 4 vainiklapiais (5–7 mm skersmens). Subrendus judrai, žiedai pereina į kriaušės pavidalo kapsules, kuriose būna sėklos. Sėklos yra ovalo formos, rudos spalvos [8].



1 pav. Judra (lot. *Camelina Sativa*)

Judros aliejus naudojamas maisto pramonėje, nes turi potencialios naudos žmonių sveikatai. Jis gali būti naudojamas kepti, salotoms gaminti, tačiau nepatartina jo naudoti gruzdinimui. Dėl didelio kiekio polinesočiųjų riebalų rūgščių ir Omega-3 riebalų rūgščių, judros aliejus taip pat naudojamas maisto papildų gamyboje. Buvo nustatyta, kad vartojant judros aliejų mažėja cholesterolio kiekis kraujyje [9].

Judros aliejus ir išspaudos yra naudojamas gyvūnams šerti. Šis aliejus naudojamas dėl didelio kiekio Omega-3 riebalų rūgščių, o išspaudos pasižymi dideliu kiekiu baltymų. Atlikti tyrimai parodė, kad judros aliejus arba išspaudos padidina lipidų kiekį lašišose ir Atlantinėse menkėse nepakeisdamas žuvų filė juslinių savybių [10]. Žuvis maitinant didesniais kiekiais judros išspaudų, pastebėtas žuvų svorio mažėjimas [11]. Šeriant viščiukus pašarais su 6 % judros aliejaus priedu, sumažėja cholesterolio kiekis kraujo plazmoje ir padidėja polinesočiųjų riebalų rūgščių kiekis krūtinėlėje, o vištos mėsos juslinės savybės išlieka tokios pačios, t. y. neblogėja [12]. Karves šeriant pašarais su judros aliejaus priedu ar išspaudomis padidėja pieno primilžis ir pasikeičia pieno sudėtis, ypač riebalų rūgščių kompozicija [13].

1.2. Judros biocheminė sudėtis ir maistinė vertė

Aliejus yra pagrindinis judros sėklų produktas, jo kiekis sėklose siekia iki 40 % [14]. Tai aukso geltonumo skystis, turintis riešutų ir garstyčių aromatą [15]. Aliejuje yra 64 % polinesočiųjų, 30 % mononesočiųjų ir 6 % sočiųjų riebalų rūgščių. Riebalų rūgščių kiekiai judros aliejuje priklauso nuo sąlygų, kuriomis buvo auginami pasėliai. Išsamesnė riebalų rūgščių sudėtis aptariama 1.2.1. skyriuje. Taip pat aliejus turi didelį kiekį γ -tokoferolių (vitaminas E), kurie pailgina aliejaus laikymo laiką be specialių sąlygų [14]. Išsamesnis tokoferolių aptarimas 1.2.2. skyriuje.

Mitybinė vertė taip pat yra įvertinama pagal sėklose esančių amino rūgščių kiekį. Judros sėklose yra randama 18 amino rūgščių, iš kurių 8–9 yra nepakeičiamos (žr. 1 lentelė). Argininas (8,15 %) yra labiausiai dominuojanti nepakeičiamoji amino rūgštis. Leucino nustatyta 6,63 %. Kitų nepakeičiamųjų rūgščių: glicino, prolino ir valino buvo nustatyta apie 5 %. Tarp pakeičiamųjų amino rūgščių dominuojanti yra glutamo rūgštis (16,40 %) [16].

1 lentelė. Amino rūgščių kiekiai judros sėklose [16]

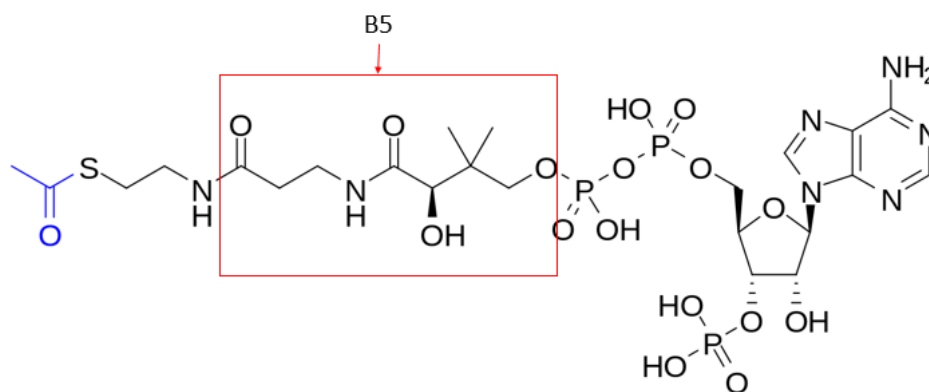
Amino rūgštis	Kiekis, %	Amino rūgštis	Kiekis, %
Alaninas	4,61	Lizinas	4,95
Argininas	8,15	Metioninas	1,72
Asparto rūgštis	8,71	Fenilalaninas	4,19
Cisteinas	2,12	Prolinas	5,09
Glutamo rūgštis	16,4	Serinas	5,04
Glicinas	5,44	Treoninas	4,25
Histidinas	2,60	Triptofanas	1,15
Izoleucinas	3,96	Tirozinas	3,04
Leucinas	6,63	Valinas	5,42

Judros išspaudas sudaro 13 % likutinio aliejaus, 6 % pelenų, 12 % ląstelienos, 30 % baltymų, 27 % ne azotinių ir kitų medžiagų, pvz., vitaminai [17]. Judros išspaudose randama angliavandenių – monosacharidų, disacharidų, oligosacharidų, polisacharidų ir ląstelienos. Monosacharidai ir disacharidai yra lengvai virškinami ir pasisavinami žmogaus organizme, tačiau šių junginių kiekis judros išspaudose yra mažas. Pavyzdžiui, išspaudose sacharozės yra 5,5 %, tai du kartus didesnis kiekis nei esantis linų sėmenyse (2,8 %), tačiau mažesnis nei rapsų (6,8 %) [18]. Oligosacharidų – rafinozės, stachiozės ir pektino išspaudose yra labai mažai (mažiau nei 1 %) [19]. Pagrindinių angliavandenių kiekiai judros išspaudose pateikiami 2 lentelėje.

2 lentelė. Angliavandenių kiekiai judros sėklose [19]

Angliavandenis	Kiekis, %	Angliavandenis	Kiekis, %
Gliukozė	0,42	Krakmolas	1,21
Sacharozė	5,5	Pektinas	0,96
Rafinozė	0,64	Ląsteliena	12,8
Stachiozė	0,36	Ligninas	7,4

Judros išspaudos yra geras vitaminų B1 (tiamino), B3 (niacino), B5 (pantoteno r.) šaltinis. Šių vitaminų kiekiai judros išspaudose ir palyginimas su kitais augalais pateikiamas 3 lentelėje [20]. Tiaminas (B1) gamtoje egzistuoja kaip tiamino pirofosfatas. Jis veikia kaip Kofermentas ir yra svarbus nervų sistemai. Niacinas (B3) turi dvi formas – nikotino rūgštis ir nikotinamido. Šis vitaminas yra dažnai randamas, tačiau retai randamas laisva forma. Dažniausiai niacinas egzistuoja NAD⁺ ir NADP⁺ kofermentų forma. Pantoteno rūgštis (B5) turi įvairių metabolinių funkcijų. Ji yra kofermento A (CoA) struktūrinis vienetas (žr. 2 pav.) ir veikia kaip acilo baltymų nešiklis. Kofermentas A palaiko nervinių impulsų perdavimą, hemoglobino, sterolių ir steroidinių hormonų sintezę, palaiko normalų cukraus kiekį kraujyje [19, 20].



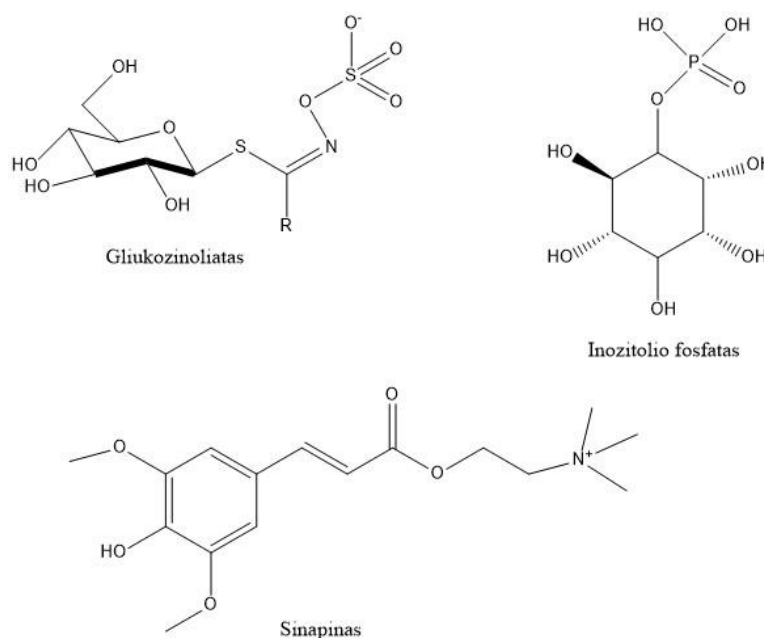
2 pav. Kofermentas A

Judros išspaudose yra mažas kiekis makromineralų. Didžiausi kiekiai yra kalio, kalcio ir fosforo (1,0–1,6 %). Tačiau išspaudos pasižymi didesniais kiekiais mikroelementų – geležies (329 µg/g), mangano (40 µg/g) ir cinko (69 µg/g) [19].

3 lentelė. Judros išspaudose esančių vitaminų palyginimas su kitų aliejinių augalų [20]

Augalas	Tiaminas, µg/g	Niacinas, µg/g	Pantoteno r. , µg/g
Judra	18	194	11
Linų sėmenys	6	91	11
Rapsai	8	-	16

Judros išspaudose taip pat randami nedideli kiekiai antimonybinių medžiagų. Tai yra augalų gaminami antriniai metabolitai, pvz.: gliukozinoliatai, sinapinas, inozitolio fosfatai (žr. 3 pav.) ir kondensuoti taninai. Gliukozinoliatų skilimo produktai – izotiocianatai, tiocianatai, nitrilai trikdo skydliaukės, vaisingumo ir reprodukcinę veiklą, dirgina virškinamojo trakto gleivinę. Sinapinas – tai junginys, suteikiantis kartų skonį ir nepageidaujamą kvapą. Inozitolio fosfatas sudaro kompleksus su daugeliu mineralinių komponentų (Ca, Mg, Zn, Fe) ir juos padaro biologiškai nepasiekiamais organizmui. Kondensuotieji taninai nusodina baltymus, slopina virškinamojo trakto fermentus sudarydami su jais kompleksus, todėl maiste esantys baltymai tampa sunkiau virškinami. Taip pat kondensuotieji taninai sudaro kompleksus su vitaminu B12, dėl ko mažėja šio vitamino absorbcija organizme [21].



3 pav. Antimonybinės medžiagos esančios judros sėklose

1.2.1. Judros aliejuje esančios riebalų rūgštys

Nuo aplinkos sąlygų ir augimo regiono priklauso aliejaus kiekis sėklose bei jo sudėtis. Pagrindinės riebalų rūgštys esančios judros aliejuje yra α-linoleno, linolo, oleino, eikozano ir

palmitino [1]. Nedideliais kiekiais buvo identifikuotos šios riebalų rūgštys – stearino, arachidinio, eruko ir nervono [22]. Judros sėklose yra labai daug (50 %) polinesočiųjų riebalų rūgščių. Didžiausiais kiekiais yra randamos linolo ir α -linoleno rūgštys ir yra Omega-3 rūgščių šaltinis. Šie junginiai turi teigiamą poveikį mitybai ir fiziologiniam poveikiui [15]. Pagrindinės riebalų rūgštys randamos judros aliejuje, o jų kiekių palyginimas skirtingų tyrėjų duomenimis pateikiamas 4 lentelėje.

4 lentelė. Riebalų rūgščių kiekiai judros aliejuje

Riebalų rūgštis	Kiekis, %			
	[15]	[1]	[23]	[22]
Palmitino rūgštis	6,43	5,7-8,4	5,5	5,3-5,6
Stearino rūgštis	2,57	1,4-3,5	2,3	2,3-2,7
Oleino rūgštis	17,4	14,2-19,4	14,9	14,0-16,9
Linolo rūgštis	16,9	19,0-24,0	15,8	13,5-16,5
α -linoleno rūgštis	35,2	27,1-34,7	38,9	34,9-39,7
Arachidinio rūgštis	1,24	-	0,4	1,2-1,5
Eikozano rūgštis	14,9	12,3-14,7	16,2	15,1-15,8
Eruko rūgštis	1,6	0,0-4,0	2,4	2,6-3,0

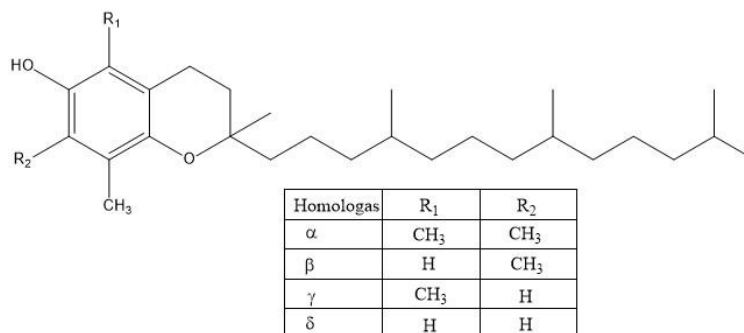
Palyginus judros aliejaus lakiųjų riebalų rūgščių kiekius su kitų augalų aliejais (rapsai, balža, linai, soja, saulėgrąžos) pastebimi skirtumai (žr. 5 lentelė). Judros aliejus yra vienintelis, kuris turi arachidinio rūgšties dideliu kiekiu (13 %), taip pat šis aliejus turi šiek tiek didesnę kiekį eruko rūgšties nei linų (0,9 %), tačiau daug mažiau nei balžų aliejus (54 %) [1]. Taip pat judros aliejus pasižymi didesniu α -linoleno rūgšties kiekiu (30 %), tačiau mažesniu nei linų (45 %).

5 lentelė. Aliejingų augalų aliejuose esančių riebalų rūgščių palyginimas [1]

Augalas	Palmitino rūgštis	Stearino rūgštis	Oleino rūgštis	Linolo rūgštis	α -linoleno rūgštis	Arachidinio rūgštis	Eruko rūgštis
Judra	6,4	2,8	15,9	20,9	30,7	13,6	3,0
Rapsai	62	0,0	61,3	21,6	6,6	-	-
Balža	2,4	0,4	18,4	10,7	5,1	-	54,0
Linai	5,1	4,6	24,3	16,3	45,1	-	0,9
Soja	10,4	4,0	27,2	45,5	7,2	-	-
Saulėgrąžos	6,1	3,8	17,4	69,3	-	-	-

1.1.1. Tokoferoliai

Tokoferoliai veikia kaip antioksidantai, kurie stabdo peroksidacijos procesus ir kontroliuoja laisvųjų radikalų kiekius [24, 25]. Tokoferolio formulė yra sudaryta iš chromanolio žiedo, prie kurio antrojo anglies atomo yra prisijungusi 15 anglies atomų grandinė. Tokoferoliai turi keturias izomerines formas (α , β , γ , δ). Šios formos tarpusavyje skiriasi metilo grupių išsidėstymu chromanolio žiede [26] (žr. 4 pav.).



4 pav. Tokoferolių struktūrinė formulė

Bendras tokoferolių kiekis šviežiame judros aliejuje yra 751 mg/kg. Dominuojantis tokoferolis yra γ (710 mg/kg). α ir δ tokoferolių kiekiai atitinkamai yra 41 mg/kg ir 12 mg/kg. β - tokoferolio yra nustatytas pats mažiausias kiekis – 3,4 mg/kg [27].

Palyginus judros ir kitų aliejingų augalų aliejų tokoferolių sudėtį [1, 27], matoma, kad γ -tokoferolis judros aliejuje pasižymi didžiausiu kiekiu (710 mg/kg). Tačiau α , β , δ – tokoferolių kiekiai judros aliejuje yra iki kelių dešimčių kartų mažesni nei rapsų, kukurūzų, saulėgrąžų, sojų ar linų sėmenų (žr. 6 lentelė).

6 lentelė. Tokoferolių kiekiai dažniausiai vartojamuose augaliniuose aliejuose, mg/kg [1, 27]

Augalinis aliejus	α -tokoferolis	β -tokoferolis	γ -tokoferolis	δ -tokoferolis
Judra	41	3	710	12
Rapsų	180	-	340	-
Kukurūzų	222	1	570	23
Saulėgrąžų	671	23	4	-
Sojų	116	17	578	263
Linų sėmenų	-	-	588	6

1.3. Lipidų peroksidacijos procesas

Didelis laisvųjų radikalų arba reaktyvių deguonies darinių kiekis daro didelę žalą lipidams. Didžiausi kiekiai reaktyvių deguonies darinių susidaro mitochondrijose, Endoplazminiame tinkle, taip pat vykstant įvairiems mechanizms, kuriuose veikia fermentai. Šie dariniai susidaro

veikiant jonizuojančiai spinduliutei, ultravioletiniams spinduliams, patogeninėms infekcijoms, aplinkos toksinams [28].

Dažniausiai sutinkamos reaktyvių deguonies darinių formos yra hidroksilo radikalas ($\text{HO}\cdot$) ir peroksido radikalas ($\text{HO}_2\cdot$). Hidroksilo radikalas ($\text{HO}\cdot$) yra mažos molekulinės masės, labai judrus, vandenyje tirpus ir chemiškai pats reaktyviausias iš reaktyvių deguonies darinių. Hidroksilo radikalas ($\text{HO}\cdot$) sukelia oksidacinę žalą ląstelėse [29]. Buvo nustatyta, kad $\text{HO}\cdot$ radikalas susidaro biologinėse sistemose, vykstant Fentono reakcijai. Fentono reakcijos metu laisvoji geležis (Fe^{2+}) reaguoja su vandenilio peroksidu (H_2O_2) ir lygiagrečiai vykstant Haberio-Vaiso reakcijai (žr. 5 pav.), kurios metu susidaro Fe^{2+} , sąveikaujant superoksidui ($\text{O}_2\cdot^-$) su geležies jonu (Fe^{3+}). Šiose oksidacijos-redukcijos reakcijose gali dalyvauti ne tik geležis, bet ir Cu, Ni, Co [29].



5 pav. Fentono ir Haberio-Vaiso reakcijų mechanizmai [29]

Peroksido radikalas ($\text{HO}_2\cdot$) dalyvauja lipidų peroksidacijos procesuose. Šis radikalas taip pat susidaro vykstant Fentono ir Haberio-Vaiso reakcijoms vandenilio peroksidui (H_2O_2) sąveikaujant su aktyviaisiais metalais (Fe, Cu, Ni, Co). $\text{HO}_2\cdot$ radikalas inicijuoja polinesočiųjų fosfolipidų grandinės oksidacijos reakcijas [30, 31].

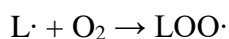
Lipidų peroksidacija tai procesas, kurios metu oksidantai, kaip laisvieji radikalai, atakuoja lipidus turinčius anglis-anglis dvigubą ryšį, ypač polinesočiųsias riebalų rūgštis [32]. Taip pat glikolipidai, fosfolipidai ir cholesterolis gali būti paveikti peroksidacijos proceso. Lipidus taip pat gali oksiduoti ir fermentai [29].

Lipidų peroksidacijos procese yra išskiriami trys etapai – pradėtis, sklidimas ir baigtis [29, 33, 34].

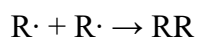
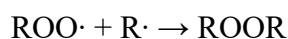
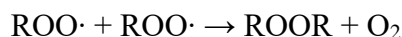
1. Pradėtis etapo metu reaguoja lipidai (L) su laisvuju radikalais ($\text{R}\cdot$), pavyzdžiui hidroksilo radikalais ($\text{HO}\cdot$), ir susidaro lipidinis radikalas ($\text{L}\cdot$) [32].



2. Sklidimo etape lipidinis radikalas ($\text{L}\cdot$) greitai reaguoja su deguonimi, susidarant lipidiniam peroksi radikalui ($\text{LOO}\cdot$), kuris sąveikauja su kitais lipidais ir tęsia radikalų susidarymo grandinę ($\text{L}\cdot$) [32].



3. Baigtis įvyksta, kai susijungia du laisvieji radikalai, kurie sudaro neradikalinį produktą [32].



Lipidų peroksidacijos metu ir deguoniui reaguojant su polinesočiaisiais riebalais susidaro įvairių oksidacijos produktų. Pagrindiniai oksidacijos produktai yra lipidų hidroperoksidai (LOOH) [29]. Hidroperoksidai yra pagrindinis pirminis oksidacijos produktas, susidarantis sklidimo etape. Šie junginiai jungiasi su įvairiomis lipidų struktūromis, kaip laisvosios riebalų rūgštys, trigliceroliai, fosfolipidai ir steroliai [33].

Taip pat susidaro nemažai antrinių oksidacijos produktų, kaip malondialdehidas, propanalis, heksanalis ir 4-hidroksinonenalis. Malondialdehidas turi didžiausią mutageninį poveikį, o 4-hidroksinonenalis – toksiškiausią [29]. Malondialdehidas yra pagrindinis baigties etapo produktas, susidarantis skylant arachidono ir kitoms didesnės molekulinės masės polinesočiosioms riebalų rūgštims [29].

1.4. Antioksidantai

Antioksidantai, tai junginiai, kuriems esant mažomis koncentracijomis, sustabdomi oksidaciniai procesai, sujungiami reaktyvūs deguonies dariniai [35]. Pagal veikimo mechanizmą antioksidantai yra skirstomi į pirminius ir antrinius. Pirminiai antioksidantai, taip pat yra vadinami grandinę suardančiais. Tai yra junginiai, kurie neutralizuoja laisvuosius radikalus padaro juos stabilus, taip sustabdydami grandininę reakciją [36]. Pirminiams antioksidantams yra priskiriami fenoliniai junginiai, galo rūgštis ir jos dariniai, flavanoidai, tokoferoliai, askorbo rūgštis, BHA, BHT, THBP, TBHQ. Antriniai antioksidantai veikia tada, kai matricoje yra kitų antioksidantų ir jie veikia sinergistiškai. Antriniai antioksidantai radikalų nepaverčia į stabilus junginius. Šiems antioksidantams yra priskiriamas sieros dioksidas, sulfitai ir lecitinas [36, 37].

1.4.1. Natūralūs antioksidantai

Natūralūs antioksidantai yra labiausiai paplitę prieskoniuose, prieskoninėse žolelėse, sėklose, grūduose, aliejuose, arbatose. Šie antioksidantai kartu veikdami su žmogaus organizme esančiais antioksidantais stabdo oksidacinio streso žalą. Natūraliems antioksidantams yra priskiriami tokoferoliai (išsamiau aptariama 1.2.2. skyriuje), flavonoidai, fenolinės rūgštys [38].

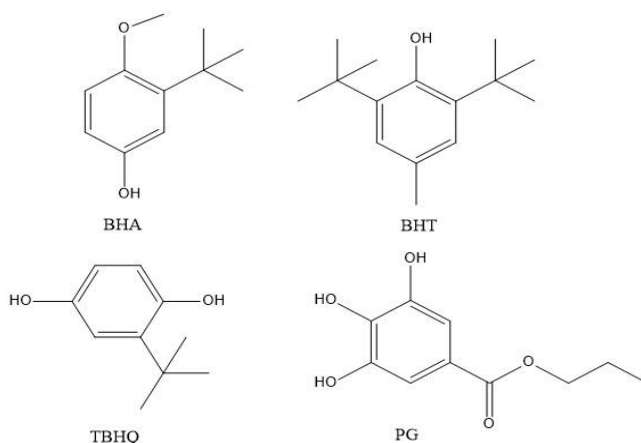
Flavanoidai sudaro didelę grupę fenolinių antioksidantų, plačiai paplitusių augaluose. Tai yra heterocikliniai junginiai, kurie suteikia geltoną-oranžinę spalvą. Flavanoidai yra skirstomi į

flavonus, flavanolių, izoflavonus, flavononus ir chalkonus. Šie junginiai yra daugelyje augalų, dažniausiai randami lapuose ir žieduose. Flavanoidai suriša radikalus, metalų chelatus ir slopina lipoksigenazės veikimą [39]. Judros sėklose yra identifikuoti šie flavanoidiniai junginiai – kvercitrinas (0,27 %), flavanoidiniai diglikozidai (0,11 %), rutinas (0,52 %) [40].

Fenolinės rūgštys yra plačiai paplitusios augaluose, jos dažniausiai yra esterių arba glikozidų pavidalu. Buvo nustatyta, kad monofenolinės rūgštys yra silpnesni antioksidantai, nei polifenolinės. Taip pat hidroksi grupių buvimas fenolio žiede orto arba para padėtyse padidina antioksidacinį aktyvumą [39]. Judros sėklose didžiausiais kiekiais buvo nustatyti šie fenoliniai junginiai – sinapinas (0,22 %), elago rūgštis (0,11 %), sinapino rūgštis (0,10 %), fenolinė rūgštis (0,06 %) [40].

1.4.2. Sintetiniai antioksidantai

Populiariausi sintetiniai antioksidantai yra fenoliniai junginiai, tai būtų butilhidroksianizolis (BHA), butilintas hidroksitoluenas (BHT), butilhidroksinonas (TBHQ), galo rūgšties esteriai (pavyzdžiui propilgalatas (PG)) (žr. 6 pav.). Sintetiniai fenoliniai antioksidantai dažniausiai turi alkilo grupių, tam kad padidėtų jų tirpumas riebaluose ir aliejuose. Augaliniams aliejams pats tinkamiausias antioksidantas yra TBHQ. BHA ir BHT, kurie yra stabilūs šilumai, todėl dažnai yra naudojami stabilizuoti riebalus, kurie yra naudojami keptiems ar gruzdintiems produktams gaminti. Galatų pagrindinis trūkumas yra tas, kad jie su geležies jonais suformuoja tamsius darinius ir yra šilumai jautrūs junginiai. Kai kurie antioksidantai, kaip BHA ir BHT, yra naudojami norint sustiprinti sinergistinį antioksidantų poveikį [39].



6 pav. Populiariausi sintetiniai antioksidantai [41]

1.5. Bioaktyvių junginių išskyrimo metodai

Iš augalų gautų bioaktyvių junginių kokybinės ir kiekybinės analizės tikslumas priklauso nuo tinkamai parinkto ekstrakcijos metodo [42, 43]. Ekstrakcija yra pirmasis žingsnis vedantis prie tolesnių tyrimų. Pagrindiniai veiksniai darantys įtaką ekstrakcijos efektyvumui yra parinktas

tirpiklis, temperatūra, slėgis, laikas ir taip pat augalo biologinė struktūra [44]. Dėl tobulinamų ekstrakcijos metodų, farmacijos, maisto priedų pramonė labai susidomėjo biologiškai aktyviais junginiais, gaunamais iš augalinių žaliavų [45, 46]. Biologiškai aktyvūs junginiai yra išskiriami iš įvairių augalo dalių, tokių kaip lapai, stiebai, žiedai, sėklos, vaisiai [47].

Augaliniai ekstraktai, gali būti gaunami vykdant įvairius ekstrakcijos metodus. Šie metodai tarpusavyje turi daug bendro: (1) išgauti tikslią bioaktyvių junginių grupę iš augalo matricos; (2) padidinti analizės metodų selektyvumą; (3) padidinti biologinių metodų jautrumą, padidinant tikslių junginių analizę; (4) konvertuoti biologiškai aktyvius junginius į tokias formas, kurios yra lengviau randamos ir atskiriamos [42, 47].

Tradiciniams ekstrakcijos metodams yra priskiriama ekstrakcija vandens garais, maceravimas ir Soksleto ekstrakcija. Šie metodai remiasi ekstrakcija skirtingais tirpikliais, naudojant šilumą ir/arba maišymą. Modernūs/netradiciniai ekstrakcijos metodai yra „draugiškesni“ aplinkai, nes yra mažiau sunaudojama sintetinių ir organinių cheminių medžiagų, sutrumpėja ekstrakcijos laikas, gaunama didesnė išeiga ir geresnės kokybės ekstraktas bei didesnis bioaktyvių junginių selektyvumas. Netradiciniams ekstrakcijoms metodams yra priskiriami – ultragarsas, impulsinis elektrinis laukas, fermentinė hidrolizė, ekstruzija, mikrobanginis šildymas, ekstrakcija virškriziniais skysčiais ir ekstrakcija padidintame slėgyje, naudojant įvairius tirpiklius [47].

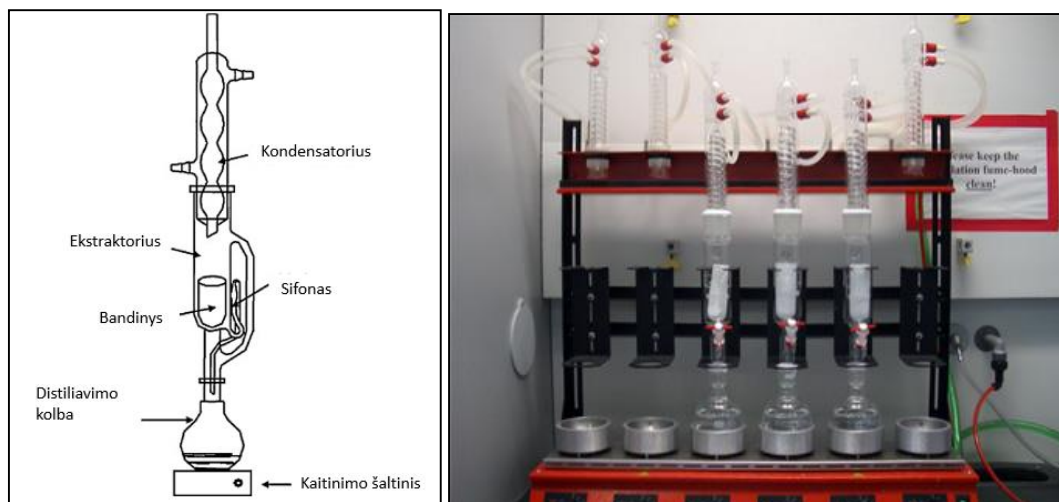
Ekstrakcijos efektyvumas dažniausiai priklauso nuo parinkto tirpiklio. Tikslinių junginių poliškumas yra pagrindinis faktorius parenkant tinkamą tirpiklį [48]. Molekulinis giminingumas tarp tirpiklio ir žaliavos, masės mainai, aplinkos apsauga, toksiškumas žmogui yra pagrindiniai kriterijai parenkant tinkamą ekstrakcijai tirpiklį, norint išskirti bioaktyvius junginius. 7 lentelėje yra pateikiami pavyzdžiai, kaip nuo parinkto tirpiklio priklauso išskiriamų tikslių junginių grupės [47, 48].

7 lentelė. Tirpikliai ir juose tirpstančios junginių klasės [47, 48]

Vanduo	Etanolis	Metanolis	Chloroformas	Dichlormetanas	Eteris	Acetonas
Antocianinai	Taninai	Antocianinai	Terpenoidai	Terpenoidai	Alkaloidai	Flavanoidai
Taninai	Polifenoliai	Terpenoidai	Flavanoidai		Terpenoidai	
Saponinai	Flavanoliai	Saponinai				
Terpenoidai	Terpenoidai	Taninai				
	Alkaloidai	Flavonai				
		Polifenoliai				

1.5.1. Soksleto ekstrakcija

Vokiečių chemikas Soksletas 1879 metais pasiūlė šį ekstrakcijos metodą. Iš pradžių Soksleto ekstrakcija buvo naudojama norint išskirti lipidų frakciją, tačiau dabar šis metodas yra naudojamas ir kitų junginių išskyrimui [49].



7 pav. Soksleto aparatas

Ekstrahuojama medžiaga patalpinama į ekstraktorių, kuris užpildomas kondensuotu tirpikliu, kuris kondensuojasi kondensatoriuje iš distiliavimo kolbos. Kai tirpiklis ekstraktoriuje pasiekia perpildymo lygį, tirpiklis per sifoną patenka atgal į distiliavimo kolbą. Šioje kolboje išekstrahuota medžiaga nuo tirpiklio yra atskiriama distiliavimo būdu ir tirpiklis vėl kaupiasi ekstraktoriuje. Šis procesas kartojamas tol, kol pasibaigia ekstrakcija (žr. 7 pav.) [50].

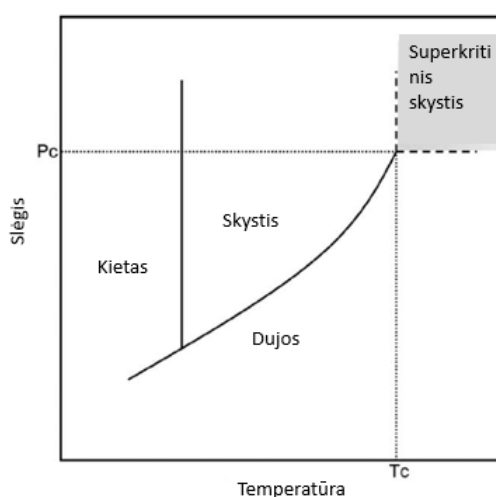
Soksleto ekstrakcija gali būti vykdoma naudojant įvairius tirpiklius. Nuo pasirinkto tirpiklio priklauso ekstrakto išeiga ir bioaktyviųjų junginių sudėtis [51]. Plačiausiai naudojamas tirpiklis yra heksanas. Heksano virimo temperatūra yra pakankamai žema 63–69 °C ir gerai tirpina aliejus iš augalinės žaliavos. Tačiau heksanas yra priskiriamas prie oro užterštumą didinančių teršalų. Alternatyvių tirpiklių, kaip izopropanolis, etanolis, vanduo, naudojimas padidėjo, norint išvengti aplinkos, sveikatos ir saugos problemų [50]. Naudojant alternatyvius tirpiklius gaunama mažesne išeiga, nes sumažėja molekulinis giminingumas tarp tirpiklio ir tirpinamos medžiagos. Taip pat šie tirpikliai gali kainuoti brangiau. Ekstrakcijai vykdyti gali būti naudojami tirpiklių mišiniai, norint padidinti skystosios fazės poliariškumą. Pavyzdžiui izopropanolio ir heksano mišinys padidina išeigą [52].

Soksleto ekstrakcijos efektyvumas priklauso nuo žaliavos matricos savybių ir dalelių dydžio. Kuo smulkesnės dalelės, tuo didesnis ekstrahuojamos žaliavos paviršiaus plotas ir tuo didesnė išeiga [53]. Po Soksleto ekstrakcijos, tirpiklis iš ekstrakto yra pašalinamas garinant. Ekstrakcijos ir garinimo metu naudojamos temperatūros turi nemažą įtaką ekstrakto kokybei [51, 54].

Pagrindinis Soksleto ekstrakcijos privalumas yra tas, kad šis metodas yra labai paprastas ir pigus. Taip pat nėra pasiekiami koncentracijų pusiausvyra, nes su kieta faze visada kontaktuoja šviežias tirpiklis [50, 55]. Didžiausias trūkumas yra tai, kad ši ekstrakcija trunka ilgai ir sunaudojamas nemažas kiekis tirpiklio. Taip pat ekstrakcijos metu gali vykti kai kurių junginių terminis skilimas, nes ilgą laiką ekstrakcija vyksta tirpiklio virimo taške [56]. Šis metodas yra pamatinis metodas lyginant su kitais ekstrakcijos metodais.

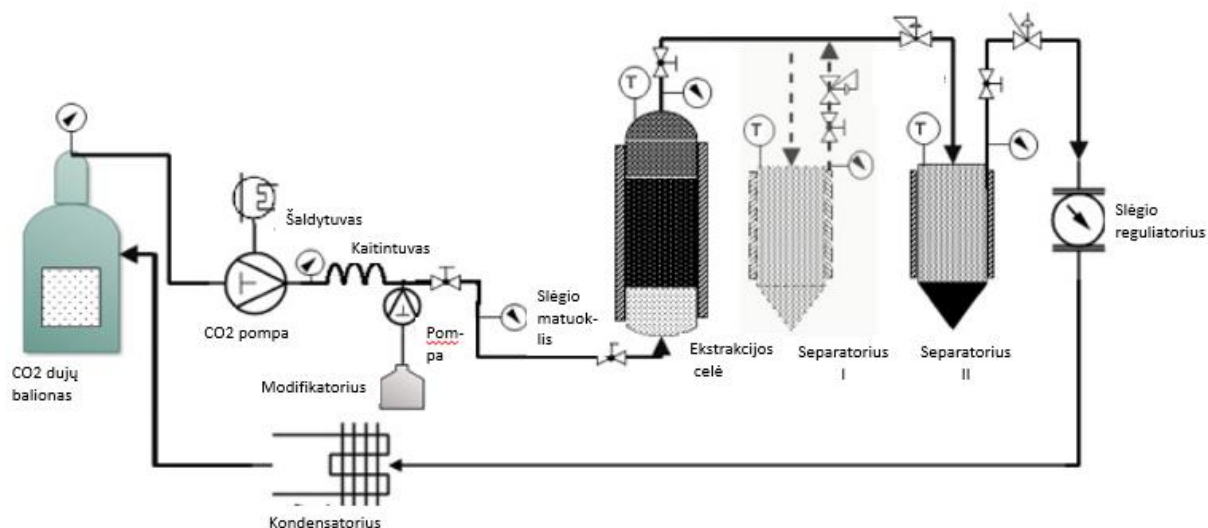
1.5.2. Superkritinių skysčių ekstrakcija

Kai tirpiklio slėgis ir temperatūra pasiekia kritinius taškus, jis tampa superkritiniu skysčiu (žr. 8 pav). Kritinė temperatūra – tai aukščiausia temperatūra, kuriai esant dujos gali pereiti į skysčių fazę, padidėjus slėgiui. O kritinis slėgis – tai didžiausias slėgis, kuriam esant skystis gali pereiti į dujinę fazę, padidėjus temperatūrai. Esant šioms sąlygoms superkritiniai skysčiai yra tarp dujų ir skysčių, nes superkritinio skysčio tankis yra panašus į skysčių, o klampumas į dujų. Superkritinė būseną yra apibūdinama kaip būseną, kai skystis ir dujos nėra atskiriamos viena nuo kitos arba tai yra būseną, kurioje skystis yra suspaudžiamas [57, 58].



8 pav. Slėgio ir temperatūros diagrama, parodanti superkritinį tašką [59]

Superkritinės ekstrakcijos metu augalinė žaliava yra patalpinama į ekstrakcijos celę (žr. 9 pav.), kurioje yra įtaisytas temperatūros valdiklis ir slėgio įėjimo bei išėjimo vožtuvai, tam kad būtų palaikomos reikalingos ekstrakcijos sąlygos. Pompa ekstrakcijos celę pripildo superkritiniu skysčiu. Skystis su ištirpusiais junginiais patenka į separatorius, kur jie yra atskiriami [50].



9 pav. SKE-CO₂ ekstraktoriaus schema [60]

Tam, kad sėkmingai būtų atlikta superkryzinė skysčių ekstrakcija, būtina atsižvelgti į kelis veiksnius – tinkamai parinktas superkryzinis skystis, augalinės žaliavos paruošimas ir ekstrakcijos sąlygos (slėgis, temperatūra ir laikas) [50].

8 lentelėje matoma, kad kritinė temperatūra dujų ir skysčių gali skirtis šimtais laipsnių, todėl galima įvairius superkryzinius skysčius pritaikyti specifiniams tikslams. Pavyzdžiui, anglies dioksido, etano ir etileno kritinės temperatūros yra neaukštos, šie superkryziniai skysčiai gali būti naudojami norint išskirti karščiui jautrius junginius, kaip skonį suteikiančias medžiagas, labilius lipidus, reaktyvius monomerus. Junginiai, kurie yra mažiau jautrūs temperatūrai, kaip polimerai, ekstrahuojami C₃ ir C₄ angliavandeniliais, kurių kritinė temperatūra yra 100–150 °C. Kuo didesnė angliavandenilio molekulinė masė, kaip cikloheksanas ar benzenas, tuo aukštesnė kritinė temperatūra (250–300 °C) ir yra naudojami nelakių junginių išskyrimui, kaip įvairių naftos frakcijų [61].

8 lentelė. Tirpiklių kritinės temperatūros ir slėgiai [61]

Tirpiklis	Kritinė temperatūra, °C	Kritinis slėgis, bar
Anglies dioksidas	31,1	73,8
Etanas	32,2	48,8
Etilenas	9,3	50,4
Propanas	96,7	42,5
Propilenas	91,9	46,2
Cikloheksanas	280,3	40,7
Benzenas	289,0	48,9
Toluenas	318,6	41,1
Vanduo	374,2	220,5

Anglies dioksidas yra laikomas geriausiu tirpikliu. Jo kritinė temperatūra yra apie 31–34 °C, kuri yra artima kambario temperatūrai ir žemas kritinis slėgis (74 bar), dėl ko galima ekstrakciją vykdyti esant vidutiniam slėgiui (nuo 100 iki 450 bar) [62]. Daugelis bioaktyviųjų junginių, kaip fenoliniai junginiai, alkaloidai, glikozidiniai junginiai, prastai tirpsta anglies dioksido, todėl jie negali būti išekstrahuoti [63]. Vienintelis anglies dioksido trūkumas yra tas, kad jis pasižymi mažu poliškumu, todėl jis tinka lipidų, riebalų ir mažo poliškumo medžiagų ekstrahavimui. Dėl mažo anglies dioksido poliškumo buvo pradėti naudoti cheminiai modifikatoriai [64, 65]. Nedidelis kiekis modifikatoriaus, gali padidinti anglies dioksido poliškumą [47, 66]. Modifikatoriais gali būti metanolis, etanolis, acetonitrilas, acetonas, vanduo, etilo eteris ir dichlormetanas. Metanolis yra dažniausiai naudojamas modifikatorius, nes jis geriausiai padidina anglies dioksido poliškumą ir yra maišomas su anglies dioksidu iki 20 % [62, 64]. Tačiau naudojant metanolį kaip modifikatorių, turi būti naudojama aukštesnė ekstrakcijos temperatūra, kad būtų pasiekta superkritinė būseną, dėl ko gali būti prarasta dalis termolabilių junginių [47]. Etanolis yra geriausias modifikatorius, nes jis yra mažiausiai toksiškas [62, 64].

Kitas svarbus veiksnys efektyviai ekstrakcijai yra augalinės žaliavos paruošimas. Svarbu, kad ekstrahuojamoje žaliavoje nebūtų didelio kiekio vandens. Didelis drėgmės kiekis žaliavoje gali sukelti mechaninių problemų, gali susiformuoti ledo kamščiai sistemoje [64]. Taip pat yra svarbus augalinės žaliavos dalelių dydis. Didelės dalelės gali prailginti ekstrakcijos laiką, nes ilgiau vyksta vidinė difuzija. Smulkios dalelės paspartina ekstrakciją, tačiau taip pat gali sukelti ir sunkumų, nes gali iškilti problemų palaikant tinkamą ir pastovų anglies dioksido srautą [50].

Nuo tikslinių junginių tirpumo ir/arba selektyvumo priklauso ekstrakcijos efektyvumas, kuris yra pasiekiamas kontroliuojant superkritinio skysčio temperatūrą ir tankį [67]. Dažniausiai yra pageidautina, kad tikslinis junginis ar junginiai būtų išgaunami tomis sąlygomis, kuriose jis tampa tirpus skystyje, kad kitų junginių tirpumas būtų kiek įmanoma sumažintas [68]. Ekstrakcijos laikas irgi turi įtakos ekstrakto išeigai ir sudėčiai. Žemos molekulinės masės ir nepoliniai junginiai yra geriau atskiriami nuo augalinės matricos ekstrakcijos metu, kai yra naudojamas anglies dioksidas [67, 69].

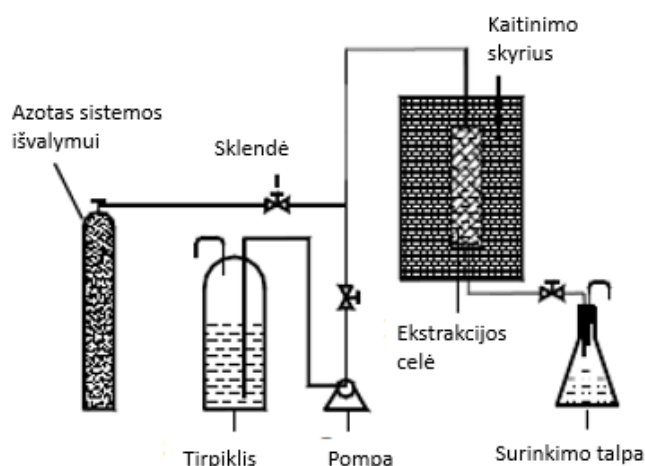
Superkritinės skysčių ekstrakcijos privalumai yra šie: (1) superkritinių skysčių difuzijos koeficientas yra didesnis, mažesnis klampumas ir paviršiaus įtempimas, dėl ko yra efektyvesni masių mainai; (2) ekstrakcijos laikas yra trumpesnis, nei tradicinių metodų; (3) superkritinių skysčių selektyvumas yra didesnis nei paprastų tirpiklių; (4) ekstrakcija gali būti vykdoma kambario temperatūroje, todėl yra išsaugomi temperatūrai neatsparūs junginiai; (5) superkritinė ekstrakcija yra aplinkai draugiška, nes mažais kiekiais yra naudojami organiniai tirpikliai [64].

1.5.3. Ekstrakcija padidintame slėgyje tirpikliais (EPS)

Ekstrakcija padidintame slėgyje, tai yra kietos medžiagos–skystis ekstrakcijos būdas, kuris yra atliekamas esant aukštesnei temperatūrai, kuri paprastai yra 50–200 °C bei esant slėgiui tarp 10–15 MPa. Ekstrakcijos padidintame slėgyje metodas yra panašus į superkriazinę ekstrakciją tirpikliais, nes tirpikliai yra veikiami slėgio, tačiau tirpiklis yra žemiau kritinės būsenos. Ekstrakcija yra vykdoma palaikant slėgį, tam kad tirpiklis būtų išlaikytas skystoje būsenoje, esant aukštai temperatūrai. Taip pat greičiau tirpikliu yra užpildoma ekstrakcijos celė ir padidėja ekstrakcijos galia. Temperatūra pagreitina ekstrakcijos kinetiką ir tokiu būdu yra pasiekama saugi ir greita ekstrakcija [70-72]. Tipinė ekstrakcijos padidintame slėgyje schema pateikiama 10 paveiksle [50].

Taip pat šiam metodui reikia mažesnio kiekio tirpiklio dėl naudojamo ekstrakcijai slėgio ir temperatūros. Kuo aukštesnė ekstrakcijos temperatūra, tuo didesnis ekstrahuojamų junginių tirpumas, pagreitėja masės mainai, sumažėja klampumas ir paviršiaus įtempimas, dėl ko ir padidėja išeiga [73]. Didžiausias šio metodo trūkumas yra tas, kad ekstrakcijai yra naudojama aukštesnė temperatūra, dėl ko gali būti prarasta dalis karščiui neatsparių junginių [50].

EPS ekstrakcijai yra dažniausiai naudojami organiniai tirpikliai. Taip pat gali būti naudojamas ir vanduo, kuris dar yra vadinamas subkrizinu vandeniu [50, 74, 75]. Palyginus EPS ir Soksleto ekstrakcijas, pastebima, kad EPS ekstrakcija sutrumpina ekstrakcijos laiką ir sumažina tirpiklio kiekį [47, 72]. Šiuo metu EPS gali būti alternatyva superkriazinei CO₂ ekstrakcijai, norint išskirti polinius junginius [71].



10 pav. Ekstrakcijos padidintame slėgyje ekstrakatoriaus schema [50]

1.5.4. Fermentinė ekstrakcija

Superkriazinė ekstrakcija ar ekstrakcija padidintame slėgyje yra naudojama norint išskirti bioaktyvius junginius iš augalų. Organinių tirpiklių naudojimas turi ir neigiamų aspektų tokių kaip pavojus saugai, dideli energijos ištekliai, žema produkto kokybė, žala gamtai ir taip pat

toksikologinis pavojus [76, 77]. Taip pat ne visada visi junginiai gali būti išskirti naudojant organinius tirpiklius, nes dalis bioaktyviųjų junginių augalo matricoje yra pasiskirstę ląstelės citoplazmoje, o kita dalis junginių yra vandenilniais arba hidrofobiniais ryšiais sujungti su polisacharidu ligninu, ir šie junginiai negali būti išskirti naudojant įprastinius tirpiklius. Fermentinė ekstrakcija yra laikoma efektyviu ekstrakcijos metodu, norint išskirti augalo matricoje sujungtus junginius ir norint padidinti jų išėigą [78].

Naudojant fermentus bioaktyviųjų junginių ekstrakcijai yra alternatyvusis metodas ekstrakcijoms, kurioms yra reikalingi įvairūs organiniai tirpikliai. Specifinių fermentų, pavyzdžiui α -amilazė, pektinazė, naudojimas hidrolizei padidina išėigą, nes yra hidrolizuojami ląstelės sienelės struktūriniai komponentai [78, 79]. Fermentinės hidrolizės metu yra gaunama didelė išėiga junginių, tokių kaip polisacharidai, aliejai, natūralūs pigmentai, skonį suteikiančios medžiagos ir junginiai pasižymintys medicininio poveikiu [80-82].

Fermentai yra ekstrakcijos katalizatoriai, kurie modifikuoja, sintetina ar atskiria bioaktyvius junginius iš augalinės žaliavos. Fermentinė hidrolizė išsiskiria tuo, kad ji pasižymi selektyumu esant švelnioms sąlygoms vandeniniuose tirpaluose [83, 84]. Fermentai turi savybę ardyti ląstelių sieneles ir membranas, dėl ko yra geriau išskiriami bioaktyvūs junginiai [85].

Fermentinė ekstrakcija sulaukia vis daugiau dėmesio ir yra pritaikoma pramonėje, nes šis metodas yra priskiriamas ekologiškoms technologijoms. Dalis fermentų jau yra pritaikyta pramonėje, pavyzdžiui proteazės ir lipazės – odos priežiūros produktuose [86], fosfolipazė – sojos aliejaus rafinavime [87], pektinazės, celiulazės, hemiceliulazės yra plačiai naudojamos sulčių gamyboje, nes yra suardomos ląstelių sienelės, dėl ko yra išgaunama sulčių daugiau, taip pat iš suardytų ląstelių sienelių yra atskeliami fenoliniai junginiai, dėl kurių pagerėja produkto kokybė ir padidėja antioksidacinės savybės [88].

Kad efektyviausiai vyktų fermentinė hidrolizė, būtina žinoti katalizines fermento savybes, optimalias veikimo sąlygas (pH, temperatūra, laikas) ir parinkti tinkamą fermentą ar jų kombinaciją fermentuojamai augalinei žaliavai [88].

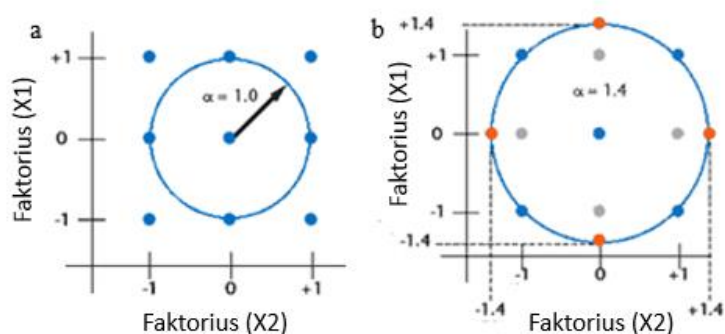
Fenoliniai junginiai (pasižymintis antioksidacinėmis savybėmis) gali būti atskirti nuo augalų ląstelių sienelių struktūrinių komponentų, naudojant fermentinę hidrolizę, kuriai vykdyti yra pasirenkamas fermentinis preparatas Viscozyme®L, kurio sudėtyje yra keli fermentai (karbohidrazės, kurios hidrolizuoja augalo ląstelės sienelėje esančius polisacharidus) – celiulazės, hemicelulazės, ksilanazės. Šis fermentinis preparatas yra naudojamas norint išskirti ekstraktus iš grūdų, sėklų, įvairių daržovių, vaisių arba uogų [89].

1.6. Procesų optimizavimas

Optimizavimas (proceso veikimo tobulinimas) atliekamas tam, kad būtų gaunama maksimali atsako vertė. Paviršiaus atsako metodika yra statistinis metodas, kuris yra naudojamas siekiant

įvertinti kelių veiksnių poveikį ir/ar jų sąveiką vienam arba keliems kintamiesiems. Centriškai kompozicinis eksperimentų planavimas yra populiari paviršiaus atsako metodikos forma, kuri yra naudojama daugelyje mokslinių tyrimų norint optimizuoti procesų parametrus. Centriškai kompozicinis eksperimentų planavimas yra labai efektyvus metodas, nes suteikia labai daug informacijos apie kintamųjų įtaką optimizuojamam procesui. Šiam metodui reikia mažiau eksperimentų, tam kad būtų gaunami statistiškai patikimi rezultatai [90].

Centriškai kompozicinis eksperimentų planavimas gali būti atliktas dviem būdais: centriniu ir rotabiliniu (žr. 11 pav.)



11 pav. Centrinis (a) ir rotabilinis (b) centriškai kompoziciniai eksperimentų planavimai

Plane kintamųjų vertės yra užkoduojamos. Faktoriai taškai (pasirinkti ekstremumai koduojami ± 1 , 0 – centriniai taškai ir $\pm\beta$ – ašiniai taškai (žr. 9 lentelė).

9 lentelė. Užduotos ir tikrosios vertės

Užkoduota vertė	Tikroji vertė
$-\beta$	x_{\min}
-1	$[(x_{\max} + x_{\min})/2] - [(x_{\max} - x_{\min})/2\alpha]$
0	$(x_{\max} + x_{\min})/2$
+1	$[(x_{\max} + x_{\min})/2] + [(x_{\max} - x_{\min})/2\alpha]$
$+\beta$	x_{\max}

Čia: x_{\min} ir x_{\max} atitinkamai yra minimali ir maksimali x vertė; $\alpha = 2k^{1/4}$; k yra kintamųjų skaičius.

Atsako kintamasis y gali būti išreikštas kaip:

$$y = f(x_1, x_2) + \varepsilon \quad (1)$$

Čia: x_1 ir x_2 yra nepriklausomi kintamieji; $f(x_1, x_2)$ – paviršiaus atsakas; ε – eksperimentinės klaidos narys

Pirmos eilės modelis turi linijinę priklausomybę ir gali būti išreikštas formule:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (2)$$

Čia: β_0 – pastovus narys; x_{ij} – nepriklausomi kintamieji; ε – eksperimentinės klaidos narys.

Siekiant nustatyti kritinį tašką yra naudojama antro laipsnio polinominė lygtis [91]:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

Čia: β_{ij} – kvadratiniai parametro koeficientai; ε – eksperimentinės klaidos narys; x_{ij} – nepriklausomi kintamieji; k – kintamųjų skaičius.

2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas, jo apdirbimas

Tyrimams atlikti naudojamos 2015 m. derliaus Lietuvoje užaugintos judros sėklos. Sėklos iki tyrimų buvo laikomos gerai vėdinamame, tamsiame kambaryje. Sėklos buvo susmulkintos laboratoriniame cikloniniame malūne (*Retch*, Vokietija), naudojant 1,0 mm sietą ir suskirstytos į skirtingo dydžio frakcijas naudojant 0,5 ir 0,23 mm dydžio akučių sietelius į šias frakcijas: 1,0–0,5 mm, 0,5–0,23 mm, <0,23 mm. Dalelių procentinis pasiskirstymas sumaltose judros sėklose per 1 mm dydžio akutes ir jas prasijojus per 0,5 ir 0,23 mm akučių dydžio sietus pateiktas 10 lentelėje. Iš gautų rezultatų matome, kad didžiausia dalį sudaro stambiausia frakcija (55,43 %), o mažiausią – smulkiausia (<0,23 mm).

10 lentelė. Dalelių pasiskirstymas sumaltose judros sėklose

Frakcijos dydis	<0,23 mm	0,23–0,5 mm	0,5–1,0 mm
%	19,00±0,75	25,57±0,87	55,43±0,51

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Cheminiai reagentai ir medžiagos

Tyrimams naudoti tirpikliai: heksanas (C_6H_{14}), acetonas (C_3H_6O), etilo alkoholis (C_2H_5OH) (Stumbras, Kaunas, Lietuva), metanolis (CH_3OH), CO_2 dujos (99,9 %, Gaschema, Jonava, Lietuva), distiliuotas vanduo (vandens gryninimo sistema *Milipore*, *Bedford MA*, JAV), acetonitrilas (*Sigma-Aldrich*, *Steinheim*, Vokietija).

Naudoti reagentai: natrio chloridas (NaCl) (*Lach-Ner*, *Brno*, Čekija), dihidrofosfatas (KH_2PO_4) (*Panreac*, Barselona, Ispanija), natriohidrofosfato–dodekahidratas ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$) (*Merck KGaA*, *Darmstadt*, Vokietija), kalio chloridas (KCl) (*Lach-Ner*, *Brno*, Čekija), natrio karbonatas (Na_2CO_3) (*Sigma-Aldrich*, *Tokyo*, Japonija), Folin–Ciocalteu (*Sigma-Aldrich*, *Buchs*, Šveicarija), kalio persulfatas ($K_2S_2O_8$) (*Lach-Ner*, *Brno*, Čekija), ABTS⁺ (*Sigma-Aldrich*, *Steinheim*, Vokietija), fluoresceinas (*Sigma-Aldrich*, *Steinheim*, Vokietija), azobis (*Sigma-Aldrich*, *Steinheim*, Vokietija), Galo rūgštis ($C_7H_6O_5$) (*Sigma-Aldrich*, *Steinheim*, Vokietija),

DPPH (*Sigma-Aldrich Steinheim*, Vokietija), TROLOX (*Sigma-Aldrich, Steinheim*, Vokietija), boro trifluoridas 24% metanolyje (*Acros organics*, Belgija), citrinų rūgštis (*Sigma-Aldrich, Steinheim*, Vokietija), Vyscozyme L (*Novozymes, Bagsvaerd*, Danija).

Kitos medžiagos: mikrokristalinė celiuliozė (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, JAV*), diatomitinė žemė (*Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, JAV*).

2.2.2. Cheminės komponentų sudėties nustatymas

2.2.2.1. Drėgmės kiekio nustatymas

Drėgmės kiekis judros sėklose nustatytas remiantis LST ISO 712:2000 [92]. Į iki pastovios masės iškaitintus biuksus 0,0002 g tikslumu pasveriami 3–5 g judros sėklų (sumaltų iki 0,5 mm dydžio dalelių). Pasverti bandiniai džiovinami krosnelėje, esant 100–105 °C temperatūrai. Pirmą kartą bandiniai pasveriami po 2 h, po to svėrimai kartojami kas 30–60 min., kol dviejų pakartotinių svėrimų rezultatai skirsis 0,001–0,005 g. Prieš svėrimą biuksai 20–25 min atšaldomi eksikatoriuje. Eksperimentas kartojamas tris kartus.

Bandinio drėgmės kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{(m_1 - m)}, \% \quad (4)$$

Čia: m – biukso svoris, g; m_1 – biukso svoris su bandiniu iki džiovinimo, g; m_2 – biukso svoris su bandiniu po džiovinimo, g.

2.2.2.2. Riebalų kiekio nustatymas Soksleto metodu

Riebalų kiekis nustatytas remiantis LST ISO 1443:2000 [93]. Išdžiovintas iki pastovaus svorio 3–5 g tiriamasis bandinys (gautas po drėgmės matavimo) be nuostolių pernešamas ant filtrinio popieriaus. Filtras su bandiniu standžiai susukamas. Suvyniotas į filtrą bandinys pasveriamas 0,0002 g tikslumu. Ekstrahuojama heksanu 6 h. Pasibaigus ekstrakcijai, bandiniai išimami iš ekstraktoriaus ir laikomi traukos spintoje, tam kad iš tiriamosios žaliavos pasišalintų heksano likučiai. Po to bandiniai 20–30 min džiovinami esant 100–105 °C temperatūrai ir pasveriami. Eksperimentas pakartojamas tris kartus.

Bandinio riebalų kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{(a - b) \cdot 100}{m}, \% \quad (5)$$

Čia: a – suvynioto į filtrą bandinio svoris prieš ekstrakciją, g; b – suvynioto į filtrą bandinio svoris po ekstrakcijos, g; m – analizei paimto mėginio masė, g.

2.2.2.3. Baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu

Baltymų kiekis Kjeldalio metodu yra nustatytas remiantis LST ISO 20483:2006 [94]. Kjeldalio kolboje pasveriami apie 1 g sumaltų (0,5 mm) judros sėklų. Atliekamas mėginio mineralizavimas atliekamas koncentruota H₂SO₄ (20 ml) ir katalizatoriaus tablete (sudėtis: K₂SO₄; CuSO₄*5H₂O; TiO₂). Kolba elektriniu kaitintuvu kaitinama (68–72 °C temperatūra), kol tirpalas kolboje tampa skaidrus, melsvai-žalsvo atspalvio. Pasibaigus kaitinimui kolbos atvėsinaimos.

Gautas mineralizato tirpalas distiluojamas vandens garais automatine distiliavimo įranga 5 min. Išsiskyre amoniako garai kondensuojami grįžtamajame šaldytuve ir surenkami distiliato surinkimo kolbutėje. Į distiliatą įlašinus Taširo indikatorių titruojama 0,01 N HCl, kol žalsva bandinio spalva pakinta į pilkai violetinę. Eksperimentas kartojamas tris kartus.

Lygiagrečiai atliekamas kontrolinis bandinys, į distiliacijos kolbą vietoje mineralizato pilant 20 ml konc. H₂SO₄.

Azoto kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{1,4 \cdot 0,01 \cdot (V_1 - V_0)}{m}, \% \quad (6)$$

Čia: 1,4 – azoto kiekis, kurį sujungia 1 ml 0,01 N HCl; V₁ – 0,01 N HCl kiekis, sunaudotas iš distilijuojamo mineralizato išsiskyrusiam amoniakui sujungti, ml; V₀ – 0,01N, sunaudotas tuščiajam mėginiui nutitruoti, ml; m – pasvertas analizei medžiagos kiekis, g; 0,01 – druskos rūgšties, naudotos titravimui, normalingumas.

Baltyminių medžiagų kiekis apskaičiuojamas, padauginus nustatytą azoto kiekį iš perskaičiavimo koeficiento 6,25.

2.2.2.4. Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas

Mineralinių medžiagų kiekis judros sėklose nustatytas remiantis LST ISO 2171:2007 [95]. Į tigli 0,0002 g tikslumu pasveriami 2–5 g tiriamųjų judros sėklų (sumaltų iki 0,5 mm dydžio). Bandinys apanglinamas elektrine plytele (1–2 h), kol iš tiglio nustoja rūkti dūmai. Po to tigli perkeliamas į mufelį, įkaitinta iki 600–650 °C temperatūros. Mufelyje deginama tol kol dviejų nuoseklių svėrimų rezultatai skiriasi 0,0001–0,0005 g. Deginimas trunka apie 15–16 h. Eksperimentas kartojamas tris kartus.

Pelenų kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{(m_2 - m) \cdot 100}{m_1 - m}, \% \quad (7)$$

Čia: m – tiglio svoris, g; m₁ – tiglio svoris su bandiniu, g; m₂ – tiglio svoris su pelenais, g.

2.2.3. Tyrimų eiga

Iš judros sėklų siekiant išgauti funkcionaliaisiais komponentais praturtintus ekstraktus, taikyti įvairūs ekstrakcijų metodai. 12 paveiksle pateikiama ekstraktų gamybos ir tyrimų schema.

Soksleto ekstrakcija naudojant tirpiklį heksaną buvo atlikta su visomis dalelių frakcijomis esant 68–72 °C, 360 min.

SKE-CO₂ esant 40 °C temperatūrai ir 36 MPa slėgiui buvo atlikta su visomis dalelių frakcijomis, o SKE-CO₂ esant 70 °C temperatūrai ir 45 MPa slėgiui atlikta su 0,5–1,0 mm ir 0,23–0,5 mm dalelių frakcijomis. Su smulkiausia frakcija SKE-CO₂ atlikti nepavyko, nes bandinys ekstrakcijos inde susipresuoja.

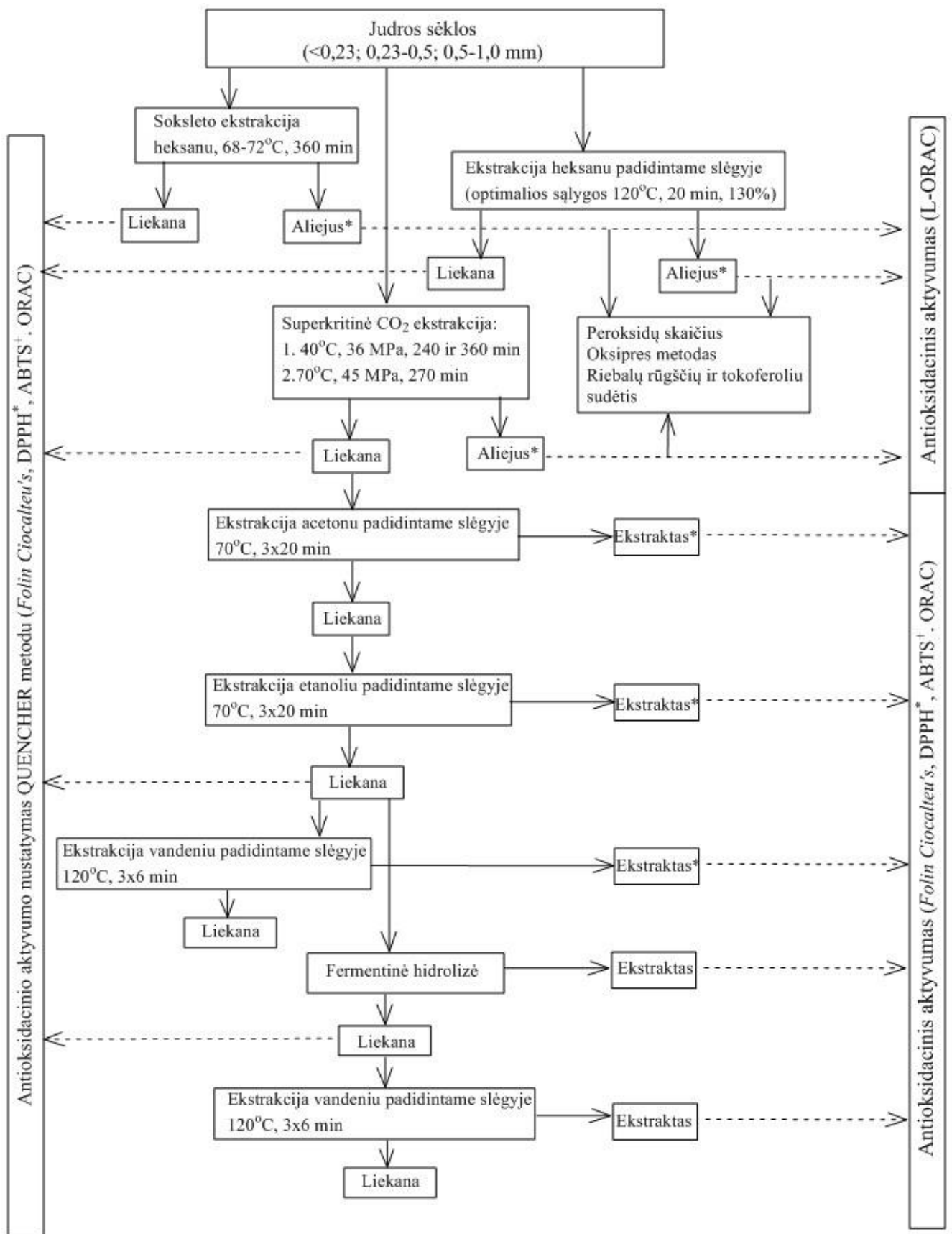
Po SKE-CO₂ liekana (0,23–0,5 mm) buvo toliau ekstrahuojama taikant pakopinę ekstrakcijos metodiką tirpikliais padidintame slėgyje; acetonu, etanoliu ir vandeniui. Gauta kietoji liekana po ekstrakcijos etanoliu buvo toliau apdirbama taikant fermentinę hidrolizę, kaip fermentinį preparatą naudojant *Viscozyme L*. Fermentinė hidrolizė taikyta siekiant atlaisvinti bioaktyvius komponentus. Fermentacija atlikta naudojant skirtingo rūgštingumo buferinius tirpalus (pH=3,5 ir 4,5). Fermentuota liekana ekstrahuota padidintame slėgyje naudojant vandenį.

Matematinis optimizavimo planas ekstrakcijai heksanu padidintame slėgyje buvo atliktas su 0,23–0,5 mm dydžio frakcija. Nustačius optimalias sąlygas, ekstrakcija buvo pakartota su 0,5–1,0 mm ir <0,23 mm dydžio frakcijomis.

Bandinių liekanų antioksidacinės savybės po taikytų ekstrakcijos metodų buvo analizuojamos šiais metodais: *Folin-Ciocalteu* 's, DPPH^{*}, ABTS^{*+} ir ORAC taikant QUENCHER procedūrą.

Lipofilinių ekstraktų (aliejų), gautų po Soksleto, SKE-CO₂ ir ekstrakcijos padidintame slėgyje heksanu, antioksidacinis aktyvumas išmatuotas naudojant L-ORAC metodiką (pritaikytas lipofiliniams ekstraktams ORAC metodas), naudojant chromatografinius metodus nustatyta lakiųjų riebalų rūgščių kompozicija bei tokoferolių kiekiai, o oksidacinis stabilumas išmatuotas Oksipres metodu.

Gautų ekstraktų antioksidacinis stabilumas nustatytas naudojant *Folin-Ciocalteu* 's, DPPH^{*}, ABTS^{*+} ir ORAC metodus taikant tradicinę tyrimų procedūrą.



*-atliktas bioaktyviųjų junginių identifikavimas

12 pav. Ekstraktų gamybos ir tyrimų schema

2.2.3.1. Soksleto ekstrakcija

Soksleto ekstrakcija atlikta remiantis *Luque de Castro* (1998) metodika [96] naudojant automatinį Soksleto ekstraktorių (*Behr Labor-Technik, Düsseldorf, Vokietija*). 20 g susmulkintų sėklų suskirstytų į frakcijas (1,0–0,5 mm, 0,5–0,23 mm, <0,23 mm) susukama į filtrinį popierių. Prieš ekstrakciją paketėliai yra pasveriami analitinėmis svarstyklėmis. Ekstrakcijai vykdyti naudojamas tirpiklis heksanas. Ekstrakcija vykdoma 6 h, palaikant 68–72 °C temperatūrą. Po ekstrakcijos gautas ekstraktas garinamas rotaciniu garintuvu (*Biuchi labortechnik AG, Konstanz, Šveicarija*) ir prapučiamas azoto dujomis, tam kad būtų pašalintas tirpiklis. Ekstraktai sveriami analitinėmis svarstyklėmis ir paskaičiuojamos išeigos g/100 g. Ekstraktai saugomi rudo stiklo buteliukuose šaldiklyje iki kitų tyrimų.

Po ekstrakcijos gauta liekana džiovinamas 24 h 40 °C iki pastovios masės. Paskaičiuojamas svorio pokytis prieš ir po ekstrakcijos. Sausa liekana saugoma sandariai uždarytuose maišeliuose, tamsioje sausoje vietoje.

2.2.3.2. Superkryzinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE - CO₂)

Ekstrakcija atlikta „*Helix*“ ekstrakcijos sistema (*Applied Separation, Allen–town, PA, JAV*), naudojant 99,9 % grynumo CO₂ (*Gaschema, Jonava, Lietuva*) dujas.

20 g sumaltos ir išskirstytos į frakcijas (1,0–0,5 mm, 0,5–0,23 mm, <0,23 mm) tiriamosios medžiagos sudedama į 50 cm³ celę. Celės abu galai užkemšami absorbentu – vata. Ekstrakcija vykdoma esant 2 L/min (įprastomis sąlygomis) CO₂ srautui. Ekstrakcijai reikalinga temperatūra ir slėgis yra kontroliuojami automatiškai būdu, o laikas reguliuojamas rankiniu būdu. SKE – CO₂ vykdyta esant dvejoms sąlygoms:

1. Temperatūra – 40°C, slėgis – 36 MPa, laikas – 240 ir 360 min;
2. Temperatūra – 70°C, slėgis – 45 MPa, laikas – 270 min.

Statinė ekstrakcija vykdoma 10 min. Pasibaigus statinei ekstrakcijai, vykdoma dinaminė. Ekstrakcijos metu išsiskiriantis ekstraktas renkamas į permatomo stiklo buteliukus, kurie iš anksto yra pasveriami. Po ekstrakcijos buteliukas su ekstraktu paliekamas kambario temperatūroje, tam kad nugaruotų ekstrakto likęs anglies dvideginis. Buteliukas yra sveriamas ir paskaičiuojama išeiga g/100 g. Ekstraktas saugomas rudo stiklo buteliukuose ir užšaldomas iki sekančių eksperimentų. Liekana po ekstrakcijos saugomas sandariai uždarytuose maišeliuose, tamsioje sausoje vietoje.

2.2.3.3. Ekstrakcija padidintame slėgyje (EPS)

Ekstrakcija atlikta su ekstrakcijos sistema ASE (*Dionex ASE 350, Dionex Corporation, Sunnyvale, JAV*).

Naudojant EPS buvo atliktas optimizavimas su 0,5–0,23 mm frakcija, naudojant tirpiklį heksaną. Siekiant iš judros sėklų išekstrahuoti polines medžiagas, po SKE – CO₂ (dalelių dydis – 0,5–0,23 mm) buvo atlikta daugiapakopė ekstrakcija padidintame slėgyje acetonu ir etanolu, esant 70°C temperatūrai 20 min ir atliekant 3 ciklus, bei su vandeniu, esant 70°C temperatūrai 6 min ir atliekant 3 ciklus. Acetonas, etanolis ir vanduo pasirinkti dėl jų savybių selektyviai tirpinti skirtingo poliškumo junginius.

Organiniai tirpikliai buvo pašalinti rotaciniu garintuvu. Vandeniai ekstraktai išdžiovinami taikant liofilizacijos metodą. Sukoncentruoti ekstraktai laikomi šaldytuve (-18 °C) tamsiuose buteliukuose.

2.2.3.4. Fermentinė hidrolizė

3,5g judros sėklų po ekstrakcijos padidintame slėgyje etanolu, 0,5–0,23 mm dydžio, sumaišoma vandeniniame tirpale (citratinis buferis pH 3,5 ir 4,5) kūginiuose užsukamuose mėgintuvėliuose, į kuriuos automatine pipete pridedama 197 µl fermentinio preparato (*Viscozyme L*). Fermentinė hidrolizė trunka 6 h 15 min pastoviai purtant ir palaikant 50 °C temperatūrą. Fermentinė hidrolizė inaktyvuojama 100 °C 10 min laikant vandenyje, o po to atšaldant lediniame vandenyje 10 min. Lygiagrečiai yra padaromas kontrolinis mėginys nenaudojant fermentinio preparato.

Po fermentinės hidrolizės, mėginiai yra centrifuguojami (400 rpm, 10 min), vandeninė fazė yra atskiriama. Vandeninė fazė ir liekana yra liofilizuojami. Sausas ekstraktas ir sausas likutis yra saugojami stiklo buteliukuose šaldiklyje iki kitų tyrimų. Ekstrakcijos išeigos išreiškiamos g/100 g fermentuojamos žaliavos.

2.2.3.5. Ekstrakcijos padidintame slėgyje heksanu (EPS) planavimas

EPS optimalios sąlygos didžiausiai ekstrakto išeigai gauti, naudojant tirpiklį heksaną, nustatytos atlikus matematinį centriškai kompozicinį eksperimentų planavimą (CCD – *central composite design*) atsako paviršiaus metodu, naudojant statistinę programą *Design – expert 7.0.0.* („Stat–Ease Inc“, Mineapolis, JAV). Optimizuojant EPS metodą, buvo keičiami trys parametrai – temperatūra, laikas ir tirpiklio tūris. Tyrimų duomenys išanalizuoti dispersinės ir koreliacinės–regresinės analizės metodais. Atlikta dvidešimt ciklų, skirtingomis sąlygomis, su trimis pakartojimais. Ekstrakcijos temperatūra (A), laikas (B) ir tūris (C) užkoduoti trimis lygiais (-1, 0, +1). Šie trys parametrai svarbūs ekstrakcijos išeigai (Y, g/100 g). Nepriklausomi kintamieji pavaizduoti 11 lentelėje.

11 lentelė. Patikrinti faktoriai ir lygiai projektuojant eksperimentą

Simboliai	Nepriklausomi kintamieji	Užkoduoti lygiai		
		-1	0	1
A	T (°C)	80	100	120
B	t (min)	10	15	20
C	V (%)	70	100	130

Ekstrakcijos išeiga (Y, %) apskaičiuojama pagal formulę:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j>1}^3 b_{ij} x_i x_j \quad (8)$$

Čia: b_0 – laisvasis statistinio modelio narys; b_i – pagal eksperimento rezultatus apskaičiuoti pirmo laipsnio statistinio modelio koeficientai; b_{ij} – lygties koeficientai įvertinantys porinės sąveikos efektus, $i \neq j$.

Modelio adekvatumas nustatytas įvertinant koeficientų reikšmingumą, regresijos koeficientą (R^2) ir Fišerio testo vertę (F), gautą dispersinėje analizėje (ANOVA). Paviršiaus atsako metodas ir kontūrų plotas sukurtas naudojant kvadratinį daugianarį. Nepriklausomas kintamasis su mažiausiu atsako efektu laikomas centrinėje taško vertėje, o kitų dviejų kintamųjų lygiai eksperimento svyravimo metu keičiami.

2.2.4. Antioksidaciniai ekstraktų ir kietosios frakcijos tyrimai

Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas įvertintas taikant tradicinę tyrimų procedūrą. Tyrimams paruošti koncentruoti ekstraktų tirpalai tirpinti vandenyje arba metanolyje, priklausomai nuo jų tirpumo, kurie vėliau buvo skiedžiami metanoliu arba vandeniu priklausomai nuo tyrimams pasirinktos modelinės sistemos. Kadangi Soksleto, SKE-CO₂ ir EPS heksanu ekstrakcijos metu gauti ekstraktai lipofiliški, todėl vietoje metanolio ar vandens tirpinimui naudojamas 7 % RMCD tirpalas (50 % acetonas/50 % vanduo).

Tiriant kietosios frakcijos antioksidacinį aktyvumą taikyta QUENCHER procedūra, kietoji frakcija yra maišoma su mikrokristaline celiulioze. Ši procedūra atliekama pagal modifikuotą Gökmen et al. (2009) metodiką [97]. Tyrimams atlikti buvo ruošiami skirtingų koncentracijų pradinės bei po ekstrakcijų likusios liekanos ir celiuliozės mišiniai priklausomai nuo tiriamosios sistemos.

Absorbcijos matuotos *Spectronic Genesys 8* spektrofotometru. Antioksidacinio aktyvumo matavimai kartoti 5–6 kartus.

2.2.4.1. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK)

Bendras fenolinių junginių kiekis yra išmatuojamas pagal modifikuotą *Singleton, Orthofer ir Lamuela-Raventos* (1999) metodiką [98] ir išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentais (GRE, mg galo rūgšties/g bandinio).

Taikant tradicinę tyrimų analizę 150 µl bandinio arba metanolio (kontrolinis bandinys) sumaišoma su 750 µl *Folin – Ciocalteu* 's reagentu (2 M), prieš tai šį reagentą praskiedus distiliuotu vandeniu (1:9), po 3 min reakcijos įpilama 600 µl Na₂CO₃ tirpalo (75 g/l). Paruošti bandiniai laikomi tamsoje 120 min. Absorbicija matuojama esant 760 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=0,0117x+0,0081$; $R^2 = 0,9976$.

Atliekant QUENCHER procedūrą į mėgintuvėlius dedama 10 mg pradinio mišinio skiedinio arba 10 mg mikrokristalinės celiuliozės (kontroliniam bandiniui), įpilama 150 µl dist. H₂O ir 750 µl *Folin-Ciocalteu* 's tirpalo (0,1 ml *Folin-Ciocalteu* 's fenolinio reagento (2 N/0,9 ml dist. H₂O) ir, po 3 min. reakcijos, 600 µl Na₂CO₃ (75 g/l). Galo rūgšties kalibracinei kreivei paruošti 10 mg mikrokristalinės celiuliozės sumaišoma su 150 µl galo rūgšties tirpalo (0–80 µg/ml dist. H₂O) arba dist. H₂O (kontroliniam bandiniui), 750 µl *Folin-Ciocalteu* 's tirpalo ir 600 µl Na₂CO₃ (75 g/l). Bandiniai purtomi 120 min., centrifuguojami (14000 aps./min., 5 min.). Absorbicija matuojama esant 760 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=0,0108x+0,0024$; $R^2=0,9999$.

2.2.4.2. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH^{*}) radikalų sujungimo metodas

DPPH^{*} laisvųjų radikalų sujungimo geba išmatuojama spektrofotometriškai pagal modifikuotą *Brand-Williams, Cuvelier ir Berset* (1995) metodiką [99] ir išreiškiama trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu (TEAG_{DPPH}, mg Trolokso/g bandinio).

Taikant tradicinę tyrimų analizę 500 µl bandinio arba metanolio (kontrolinis bandinys) sumaišoma su 1000 µl DPPH^{*} radikalų ištirpintu metanolyje (esant 517 nm bangos ilgiui, absorbicija lygi 0,800±0,010 A). Paruošti bandiniai laikomi tamsoje 120 min. Absorbicija matuojama esant 517 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=1,3284x-1,8618$; $R^2 = 0,9974$.

Atliekant QUENCHER procedūrą 10 mg bandinio arba celiuliozės (kontrolinis bandinys) sumaišoma su 500 µl metanolio ir 1000 µl 897 µmol/l DPPH^{*} metanoliniu. Kalibracinei kreivei paruošti 10 mg mikrokristalinės celiuliozės sumaišoma su 500 µl Trolokso tirpalo (0–60 µmol/l metanolio) arba metanolio (kontroliniam bandiniui) ir 1000 µl darbinio DPPH^{*} tirpalo. Bandiniai purtomi 120 min., centrifuguojami (14000 aps./min., 5 min.). Absorbicija matuojama esant 517 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=1,422x-1,3594$; $R^2 = 0,9966$

2.2.4.3. 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgštis (ABTS^{•+}) laisvųjų radikalų sujungimo metodas

ABTS^{•+} laisvųjų radikalų sujungimo geba išmatuojama spektrofotometriškai pagal modifikuotą *Re* ir kt. (1999) metodiką [100] ir išreiškiama Trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu (TEAG_{ABTS}, mg Trolokso/g bandinio). Stabilūs ABTS^{•+} radikalai gauti sumaišius 50 ml ABTS^{•+} tirpalo (2 mmol/l fosfatinio PBS buferinio tirpalo, ruošiamo 1 l dist H₂O ištirpinant 8,18 g NaCl, 0,27 g KH₂PO₄, 1,42 g Na₂HPO₄ ir 0,15 g KCl (pH = 7,4)) su 200 µl K₂S₂O₈ tirpalo (70 mmol/l dist. H₂O) ir išlaikant gautą mišinį tamsoje 16–18 val. Darbinis ABTS^{•+} tirpalas ruošiamas praskiedžiant koncentruotą mišinį PBS buferiniu tirpalu iki 0,700±0,005 absorbcijos vertės 734 nm bangos ilgiuje.

Taikant tradicinę tyrimų analizę 25 µl bandinio arba metanolio (kontrolinis bandinys) sumaišoma su 1500 µl darbinio ABTS^{•+} tirpalo. Paruošti bandiniai laikomi tamsoje 120 min. Absorbcija matuojama esant 734 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=0,0659x-0,2274$; $R^2 = 0,9989$.

Atliekant QUENCHER procedūrą į mėgintuvėlius dedama 10 mg pradinio mišinio skiedinio arba 10 mg mikrokristalinės celiuliozės (kontroliniam bandiniui), įpilama 25 µl metanolio ir 1500 µl darbinio ABTS^{•+} tirpalo. Kalibracinei kreivei paruošti 10 mg mikrokristalinės celiuliozės sumaišoma su 25 µl Trolokso tirpalo (0–1000 µmol/l metanolio) arba metanolio (kontroliniam bandiniui) ir 1500 µl darbinio ABTS^{•+} tirpalo. Bandiniai purtomi tamsoje 120 min., centrifuguojami (14000 aps./min., 5 min.). Absorbcija matuojama esant 734 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=0,0686x-1,4856$; $R^2 = 0,9962$

2.2.4.4. Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas (ORAC)

ORAC tyrimas atliktas pagal *Prior* ir kt. (2003) pasiūlytą metodiką su nežymiais pakeitimais [101] ir išreiškiama Trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu (TEAG_{ORAC}, mg Trolokso/g bandinio). Eksperimentas pagrįstas peroksido radikalų surišimu, kurį generuoja azobis (AAPH). Pirmiausiai yra ruošiami fluoresceino tirpalai:

1. Ruošiamas S1 tirpalas. Į 100 ml matavimo kolbą yra pasveriami 0,045 g fluoresceino miltelių ir užpilama dalimi PBS tirpalo. Tirpinama ultragarso vonelėje, kol fluoresceino milteliai ištirpsta. Po tirpinimo fluoresceino tirpalas praskiedžiamas PBS tirpalu iki žymės.
2. Tirpalo S2 ruošimui, paaimama 0,5 ml S1 ir 100 ml matavimo kolboje praskiedžiama PBS tirpalu iki žymės.
3. S3 ruošiamas paaimant 0,8 ml S2 tirpalo ir 50 ml matavimo kolboje praskiedžiant iki PBS tirpalu iki žymės.

Taikant tradicinę tyrimų analizę 25 µl bandinio arba metanolio (tuščias bandinys) ir 120 µl fluoresceino supilama į supilamas į juodą nepermatomą 96 šulinėlių lėkštelę. Inkubuojama 15 min, esant 37 °C temperatūrai. Po inkubacijos su daugiakanale pipete įpilame 25 µl AApH. Fluorescencija matuojama 120 ciklų (ciklo trukmė 1,1 min). Po kalibracine kreive esantis plotas (AUC) kiekvienam bandiniui apskaičiuojamas integruojant santykinę fluoresceino kreivę. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=0,1297x+3,5824$; $R^2 = 0,9576$.

AUC apskaičiuojamas pagal formulę:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=120} \frac{f_i}{f_0} \quad (9)$$

Čia: f_0 – pradinė fluoresceino vertė (0 min); f_i – fluoresceino vertė tam tikrą laiką (i-tąją min).

Atliekant QUENCHER procedūrą į mėgintuvėlius dedama 10 mg pradinio mišinio skiedinio arba 10 mg mikrokristalinės celiuliozės (kontroliniam bandiniui) sumaišoma su 150 µl PBS tirpalu ir 900 µl fluoresceinu (S3 tirpalas). Maišoma 10 s, purtoma 250 rpm 60 min tamsoje ir centrifuguojama 4500 rpm 5 min. Optiškai skaidrus skystis (175 µl) pipete supilamas į juodą nepermatomą 96 šulinėlių lėkštelę. Inkubuojama 15 min, esant 37° C temperatūrai. Po inkubacijos su daugiakanale pipete įpilame 25 µl AApH. Fluorescencija matuojama 150 ciklų (ciklo trukmė 1,1 min). Kalibracinės kreivės lygtis: $y=0,2062x+1,2901$; $R^2 = 0,9846$.

2.2.5. Riebalų oksidacijos kinetikos ir stabilumo tyrimai

2.2.5.1. 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. Peroksidų kiekis judros lipofiliniuose ekstraktuose nustatytas remiantis Drėgmės kiekis judros sėklose nustatytas remiantis LST EN ISO 3960:2010, matavimo vienetas – mekv/1000 g [102].

Analitinėmis svarstyklėmis pasveriamas riebalų bandinys $5 \pm 0,05$ g. Pasverti riebalai ištirpinami chloroformo ir ledinės acto rūgšties (2:3) tirpale ir įpilama 0,5 ml šviežiai paruošto sotaus KJ tirpalo. Gautas mišinys plakamas 1 min. Mėginys praskiedžiamas 30 ml distiliuotu vandeniu ir titruojamas 0,01 N natrio tiosulfato tirpalu. Titravimui naudojami keli lašai indikatoriaus – 1 % krakmolo kleisterio. Titruojama, kol pranyksta mėlyna spalva. Lygiagrečiai atliekamas kontrolinis mėginys, lygiai tokiomis pat sąlygomis, tik be riebalų. Peroksidų kiekis išreiškiamas mekv aktyvaus deguonies/1000 g aliejaus. Peroksidų kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

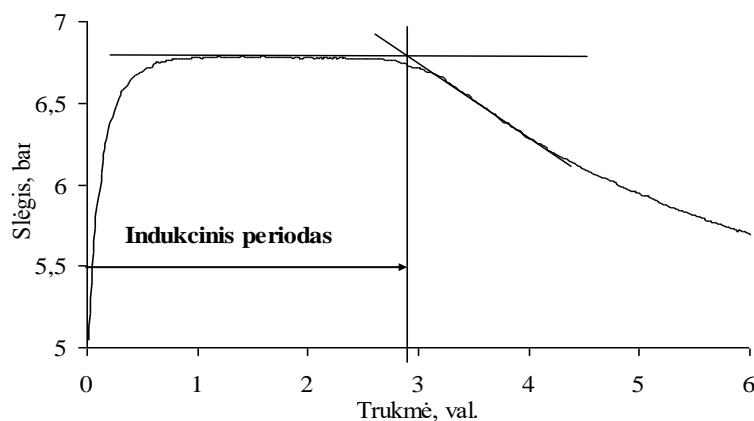
$$PS = \frac{(V - V_1) \cdot N \cdot 1000}{m} \quad (10)$$

Čia: V, V₁ – natrio tiosulfato tirpalo kiekiai sunaudoti nutitruoti tiriamajam ir kontroliniam mėginiams, ml; N – natrio tiosulfato koncentracija; m – riebalų masė naudota tyrimui, g.

2.2.5.2. Aliejaus oksidacinio stabilumo nustatymas Oksipres metodu

Instrumentiniu Oksipres metodu nustatant aliejaus indukcinį periodą valandomis (toliau IP, h), tiriamas aliejaus stabilumas oksidacijai aukštoje temperatūroje (110°C), esant deguonies slėgiui [103].

Analitinėmis svarstyklėmis pasveriami 5±0,001 g tiriamojo aliejaus ir patalpinamas į reakcijos celę. Oksidacinis stabilumas tiriamas 110 °C temperatūroje, esant 5 bar deguonies slėgiui. Šis tyrimas atliekamas 6 valandas. Prietaisas brėžia deguonies slėgio kitimo kreivę ir apskaičiuoja indukcinį periodą valandomis (IP) (žr. 13 pav.).



13 pav. Oksipresu užrašyta oksidacijos kinetinė kreivė ir indukcinio periodo nustatymo liestinės [104]

2.2.6. Riebalų rūgščių kompozicijos nustatymas dujų chromatografijos metodu

Riebalų rūgščių kompozicijos tyrimas atliktas remiantis W. Moreda ir kiti (2001) metodika su nežymiais pakeitimais [105]. Trigliceridų esterinimui ir laisvų rūgščių apmuilinimui 0,5 g aliejaus ir 4 ml metanolinio NaOH (0,5 N) supilama į 50 ml apvaliadugnę kolbą ir kaitinama su grįžtamuju šaldytuvu, kol išnyksta riebalų fazė (apie 5–10 min). Virimui sulyginti galima įdėti pemzos gabaliuką.

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, Italija*) 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, JAV*)). 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 (*SupelcoTM*). Rūgščių metilo esteriai identifikuojami pagal išlaikymo laikus, o procentinė riebalų rūgščių sudėtis apskaičiuojama smailių plotus lyginant su etaloniniais smailių plotais.

2.2.7. *Tokoferolių kiekio nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu*

Kiekybinė tokoferolių analizė atlikta pagal *Gruszkaand ir Kruk (2003)* pasiūlytą metodiką su nežymiais pakeitimais [106]. Efektyvioji skysčių chromatografija buvo atlikta naudojant *Perkin Elmer Series 200 HPLC* sistemą, naudojant atvirkštinių fazių C_{30} kolonėlę (250 mm ilgio, 4,6 mm vidinio skersmens, 5 μm porų dydžio). Tokoferoliai iš kolonėlės išplaunami naudojant acetoneitrilo, metanolio ir dichlormetano mišinį (72/22/6, v/v/v). Mobiliosios fazės tekėjimo greitis buvo 1 ml/min, bandinio injekuojamas tūris – 20 μl . Tokoferoliai aptinkami naudojant fluorescencijos detektorių, esant 290 nm sužaditimui 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. Tokoferoliai identifikuoti palyginus jų sulaikymo laikus su standartų sulaikymo laikais. Kiekybinam nustatymui buvo sudarytos kalibracinės kreivės tokoferoliams 0–10 $\mu\text{g/ml}$. Tokoferolių kalibracinių kreivių lygtys:

$$\alpha\text{-T } y=926419,16x-50094,22; R^2 = 1,00;$$

$$\beta\text{-T } y=1569714,76x-18\ 876,34; R^2 = 1,00;$$

$$\delta\text{-T } y=3045275,71x-129\ 477,66; R^2 = 1,00$$

$$\gamma\text{-T } y=2\ 041788,93x+111\ 757,52; R^2 = 1,00$$

2.2.8. *Ekstraktų analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UHPLC-Q-TOF)*

Preliminari ekstraktų analizė naudojant ultra efektyviosios skysčių chromatografiją atlikta pagal V. Kraujalytės (2013) pasiūlytą metodiką su nežymiais pakeitimais [107]. Ekstraktų chromatografinė analizė buvo atlikta *Waters Acquity* sistema (*Waters, Milford, JAV*), kuri buvo sujungta su hibridiniu kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru (angl. Q-TOF) (*Bruker Daltonic, Brėmenas, Vokietija*). Analičių skirstymas atliktas atvirkštinių fazių analitine kolonėle *Acquity BEH C18, Amide 2,1* \times 100 mm, sorbento dalelių dydis – 1,7 μm (*Waters, Milford, JAV*), kuria buvo palaikoma 40 °C temperatūra. Eliuentų sistema: A – 0,4 % skruzdžių rūgštis (v/v), B – 100 % acetoneitrilas. Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min., įleidžiamas tūris – 1 μl . Ekstraktų

koncentracija 1 mg/ml. Iš kolonėlės išeinantys junginiai aptikti diodų matricos detektoriumi (DMD) esant 100–500 nm bangos ilgiui. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas neigiamos elektrinės jonizacijos režimu, kurio parametrai buvo kontroliuojami *HyStar* programine įranga. Jonizacija buvo atlikta naudojant +4000 V įtampą, fragmentavimo celės įtampa 3 eV, azoto dujos buvo naudotos kaip išpurškiančios (slėgis 2 bar) ir džiovinančios dujos, kurių tėkmės greitis 10 l/min. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės, standartinių junginių masių spektrus, eliucijos trukmės sutapimą, MS/MS režimu gautus fragmentus bei lyginant juos su literatūros duomenimis ir duomenų bazėse esančia informacija (*Metlin*, *Chemspider*).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Judros sėklų cheminių komponentų sudėtis

Judros sėklų pagrindiniai cheminiai komponentai pateikiami 12 lentelėje ir palyginami su kitų mokslininkų gautais duomenimis. Iš gautų duomenų matoma, kad baltymų (21,52 g/100 g) ir riebalų (37,82 g/100 g) kiekiai gauti eksperimento metu įeina į teorinių rezultatų ribas (baltymai 18,87–21,97 g/100g; riebalai 30,10–49,7 g/100 g). O pelenų kiekis (4,21 g/100 g) gautas nežymiai mažesnis (4,25–5,24 g/100 g). Teorinės cheminės sudėties vertės yra pateikiamos nemažos apimties intervale, nes jų kiekiai priklauso nuo daugelio faktorių, kaip pasėlių auginimo ir klimato sąlygos, dirvožemio sudėties [14].

12 lentelė. Judros sėklų cheminė sudėtis

Cheminės sudėties komponentas	Nustatyta, g/100 g	g/100 g [111]
Baltymų kiekis	21,52±0,17	18,87–21,97
Riebalų kiekis	37,82±0,59	30,10–49,7
Pelenų kiekis	4,21±0,08	4,25–5,24
Drėgmės kiekis	6,14±0,17	–

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN.

Zubr (2003) [108] atliko tyrimus su judros sėklomis auginomomis Šiaurės Europoje ir Skandinavijoje. Buvo nustatyta, kad judros augimui ir cheminių medžiagų kiekiui daugiausiai įtakos daro klimato sąlygos ir dirvožemio sudėtis, nei judros veislė. Vidutinis judros aliejaus kiekis buvo nustatytas 42,1 %, o baltymų – 43,3 %. *Angelini* ir kiti (1997) [109] atliko tyrimus su sėklomis, kurios buvo auginamos Viduržemio jūros klimato juostoje (Piza, Vidurio Italija). Ir gauti rezultatai parodė, kad didžiausias aliejaus kiekis yra 33 %. Tai įrodo, kad aukšta temperatūra ir nedidelis kiekis kritulių sumažina riebalų kiekį judros sėklose. Taip pat aliejaus kiekis sėklose sumažėja, jei dirvožemyje yra nepakankamai azotinių medžiagų [110].

3.2. Judros sėklų ekstrakcija Soksletu bei gautų frakcijų antioksidacinių savybių įvertinimas

3.2.1. Soksleto ekstrakcija

Su visomis judros sėklų frakcijomis (<0,23 mm; 0,23–0,5 mm; 0,5–1,0 mm) atlikta Soksleto ekstrakcija naudojant tirpiklį heksaną. Eksperimento metu gautos lipofilinių ekstraktų išeigos pateikiamos 13 lentelėje.

13 lentelė. Ekstraktų išeigos, gautos atliekant Soksleto ekstrakciją

Ekstraktų išeigos, g/100 g sėklų		
<0,23 mm	0,23–0,5 mm	0,5–1,0 mm
46,29±0,33 ^c	34,98±0,06 ^b	31,44±0,35 ^a

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių toje pačioje eilutėje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, $p < 0.05$).

Iš gautų rezultatų matoma, kad didžiausia išeiga gaunama iš <0,23 mm frakcijos (46,29 g/100 g sėklų). Apie 10 % mažesnė išeiga gauta iš 0,23–0,5 mm frakcijos 34,98 g/100 g sėklų. Mažiausia ekstrakto išeiga gauta iš stambiausios frakcijos (0,5–1,0 mm) 31,44 g/100 g sėklų.

Kitų autorių tyrimuose [112] Soksleto ekstrakcijai buvo naudojamos iki 0,3 mm sumaltos judros sėklos (12 g). Ekstrakcija vykdyta 6 valandas. Gauta išeiga 35,9 g/100 g sėklų, kuri yra artima ekstrakto išeigai gautai iš 0,23–0,5 mm frakcijos (34,98 g/100 g sėklų), tačiau yra ~10% mažesnė palyginus iš <0,23 mm frakcijos gauto ekstrakto išeiga (46,29 g/100 g sėklų).

3.2.2. Lipofilinio ekstrakto antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Lipofilinio ekstrakto, gauto Soksleto ekstrakcijos metu, antioksidacinis aktyvumas išmatuotas adaptuotu L-ORAC metodu. Antioksidacinis aktyvumas išreikštas ekstrakto masei bei sėklų masei. Rezultatai pateikiami 14 lentelėje.

14 lentelė. Ekstrakto gauto po Soksleto ekstrakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Frakcijos	L-ORAC	
	mg TE/g ekstrakto	mg TE/g sėklų
<0,23 mm	96,01±3,18 ^{ab}	44,44±1,47 ^c
0,23–0,5 mm	101,04±3,15 ^b	35,35±1,10 ^b
0,5–1,0 mm	92,75±2,99 ^a	29,16±0,94 ^a

Nurodytos vidutinės penkių pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, $p < 0.05$).

Atskirų frakcijų antioksidacinio aktyvumo rezultatų vertės skyrėsi nereikšmingai ($p < 0,05$) (92,75–101,04 mg TE/g ekstrakto). Iš gautų rezultatų matoma, kad didžiausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo ekstraktas, išgautas iš 0,23–0,5 mm frakcijos (101,04 mg

TE/g ekstrakto), kurio vertė yra artima ekstraktui gautam iš <0,23 mm frakcijos (96,01 mg TE/g ekstrakto). Nežymiai mažesnę antioksidacinę aktyvumą turi 0,5–1,0 mm frakcijos ekstraktas 92,75 mg TE/g ekstrakto. Taip pat matoma, kad didelio statistinio skirtumo tarp L-ORAC verčių ekstraktuose nėra.

3.2.3. Liekanos po Soksleto ekstrakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Judros sėklų liekanos po Soksleto ekstrakcijos antioksidacinis aktyvumas išmatuotas naudojant DPPH[•], ABTS^{•+} ir ORAC metodais, o bendras fenolinių junginių kiekis *Folin-Ciocalteu*'s metodu taikant QUENCHER procedūrą. Rezultatai pateikiami 15 lentelėje.

15 lentelė. Liekanos po Soksleto ekstrakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Frakcijos	BFJK	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	ORAC
	mg GRE/g		mg TE/g	
<0,23 mm	21,82±1,89 ^c	24,95±0,27 ^c	83,10±0,98 ^c	84,88±4,22 ^c
0,23–0,5 mm	16,88±0,95 ^b	16,55±1,10 ^b	78,59±1,10 ^b	57,50±4,73 ^a
0,5–1,0 mm	11,38±0,95 ^a	11,01±0,39 ^a	74,97±1,67 ^a	65,98±5,40 ^b

Nurodytos vidutinės penkių pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, $p < 0.05$).

BFJK vertė kinta 11,38–21,82 mg GRE/g intervale. Didžiausiu fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo <0,23 mm frakcijos liekana (21,82 mg GRE/g). Beveik dvigubai mažesniu fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo 0,5–1,0 mm frakcijos liekana (11,38 mg GRE/g).

Palyginus radikalų blukinimo metodus DPPH[•] ir ABTS^{•+}, pastebima, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo <0,23 mm frakcijos liekana ($TEAG_{DPPH}=24,95$ mg TE/g; $TEAG_{ABTS}=83,10$ mg TE/g), o mažiausiu 0,5–1,0 mm frakcijos liekana ($TEAG_{DPPH}=11,01$ mg TE/g; $TEAG_{ABTS}=74,97$ mg TE/g).

Matuojant deguonies radikalų surišimo gebą (ORAC) vertės kinta nuo 65,98 iki 84,88 mg TE/g. Didžiausią surišimo gebą turi <0,23 mm frakcijos liekana (84,88 mg TE/g). Matuojant šiuo metodu mažiausią antioksidacinę aktyvumą turi 0,23–0,5 mm frakcijos liekana (57,50 mg TE/g), atvirkščiai nei išmatuotas kitais metodais.

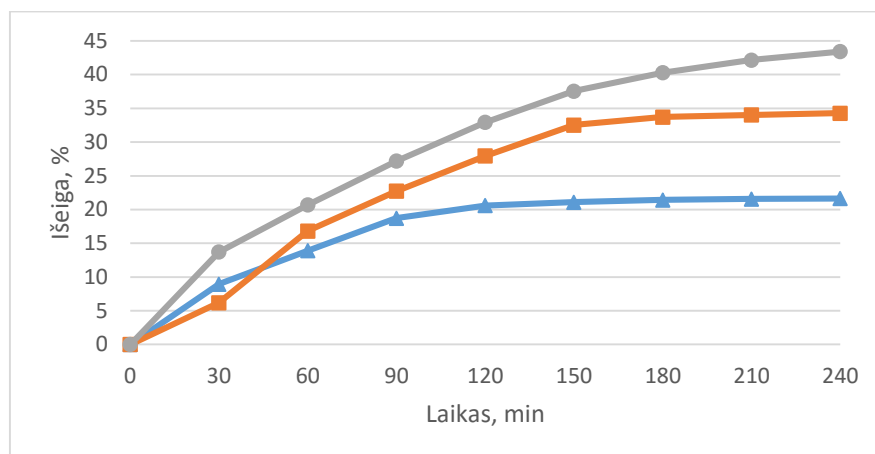
3.3. Judros sėklų ekstrakcija superkritiniu CO₂ bei gautų frakcijų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

3.3.1. Lipofilinių ekstraktų išskyrimas superkritiniu CO₂

SKE-CO₂ ekstrakcija vykdyta su visomis frakcijomis <0,23 mm, 0,23–0,5 mm ir 0,5–1,0 mm. Ekstrakcijai vykdyti buvo pasirinktos dvi skirtingos procesų sąlygos. Pirmomis sąlygomis buvo pasirinktos optimalios burnočio sėklų SKE-CO₂ sąlygos (temperatūra – 40 °C, slėgis – 36 MPa) [113]. Antrosios sąlygos buvo pasirinktos pagal kitų tyrėjų atliktus tyrimus, kur buvo nustatytos

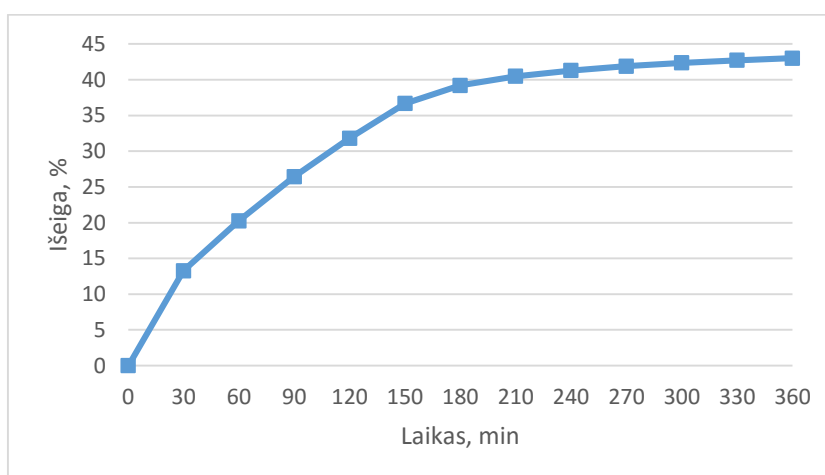
optimalios SKE-CO₂ sąlygos judros sėklos (temperatūra – 70 °C, slėgis – 45 MPa) [112]. SKE-CO₂ reikalingas laikas buvo nustatytas eksperimentiškai analizuojant ekstrakcijos kinetiką palaikant pastovų tirpiklio srautą (2 L/min). Eksperimento metu kas 30 min buvo matuojama ekstrakto išeiga, eksperimentas buvo baigtas kai bendra ekstrakcijos išeiga daugiau nedidėjo.

Grafikas vaizduojantis ekstrakto išeigos priklausomybę nuo laiko pirmomis sąlygomis (40 °C, 36 MPa) pavaizduotas 14 paveiksle.



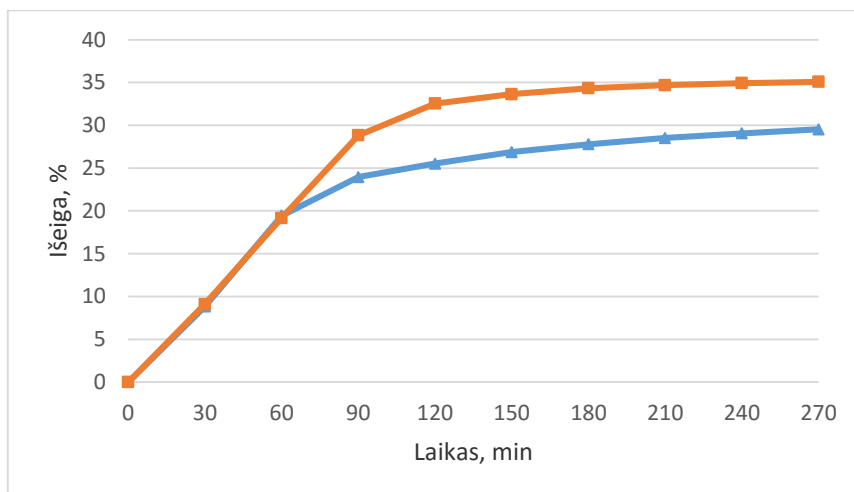
14 pav. Ekstraktų išeigų priklausomybė nuo laiko, gautų atliekant superkritinę CO₂ ekstrakciją pirmomis sąlygomis (40 °C, 36 MPa). ● - <0,23 mm; ■ – 0,23-0,5 mm; ▲ - 0,5-1,0 mm

Iš gautų rezultatų matoma, kad su 0,23–0,5 ir 0,5–1,0 mm dydžio frakcijomis didžiausia ekstrakcijos išeiga pasiekama per 240 min, tačiau ekstrakciją vykdant su <0,23 mm frakcijos bandiniu ekstrakcijos išeiga nenusistovėjo. Todėl buvo nuspręsta SKE-CO₂ vykdyti toliau kol bus pasiekama stabili ekstrakto išeiga. Iš grafiko (žr. 15 pav) matoma, kad didžiausia išeiga gauta ekstrahuojant 360 min.



15 pav. Ekstrakto išeigos priklausomybė nuo laiko, gauto atliekant superkritinę CO₂ ekstrakciją pirmomis sąlygomis (40 °C, 36 MPa) su <0,23 mm dalelėmis

Grafikas vaizduojantis ekstrakto išeigos priklausomybę nuo laiko, taikant antrąsias sąlygas (70 °C, 45 MPa, 2 L/min), pavaizduotas 16 paveiksle. Iš grafiko matome, kad SKE-CO₂ su 0,23–0,5 ir 0,5–0,1 mm frakcijomis išeiga nusistovi per 270 min. SKE-CO₂ su <0,23 mm frakcijos bandiniu neatlikta. Dėl didelio CO₂ dujų slėgio, bei aukštos temperatūros sąveikos bandinys ekstrakcijos celėje susipresuoja ir ekstrakcija nevyksta.



16 pav. Ekstraktų išeigų priklausomybė nuo laiko, gautų atliekant superkritinę CO₂ ekstrakciją antromis sąlygomis (70 °C, 45 MPa). ■ – 0,23–0,5 mm, ▲ – 0,5–1,0 mm.

Eksperimento metu gautos ekstraktų išeigos pirmomis (40 °C, 36 MPa) ir antromis (70 °C, 45 MPa) sąlygomis pateikiamos 16 lentelėje.

16 lentelė. Ekstraktų išeigos, gautos atliekant SKE-CO₂

Ekstraktų išeigos, g/100 g sėklų		
<0,23 mm	0,23–0,5 mm	0,5–1,0 mm
I SKE-CO ₂		
43,16±0,39 ^c	34,18±0,18 ^b	21,11±0,76 ^a
II SKE-CO ₂		
-	35,35±0,40 ^b	29,91±0,55 ^a

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių toje pačioje eilutėje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, $p < 0.05$).

Pirmomis ekstrakcijos sąlygomis (I SKE-CO₂), matoma, kad išeiga tarp skirtingų sėklų frakcijų kito plačiame intervale nuo 21,11 iki 43,16 g/100 g sėklų. Didžiausia išeiga gauta su smulkiausia <0,23 mm frakcija (43,16 g/100 g sėklų). Su 0,23–0,5 mm frakcija gauta 10 % mažesnė išeiga (34,18 g/100 g sėklų) nei su smulkiausia frakcija. O su 0,5–1,0 mm frakcija gauta dvigubai mažesnė išeiga (21,11 g/100 g sėklų) nei su <0,23 mm frakcija. Atromis ekstrakcijos sąlygomis (II SKE-CO₂), gauta išeiga su 0,23–0,5 mm frakcija yra gaunama apie 5 % didesnė (35,35 g/100 g sėklų) nei su 0,5–1,0 mm frakcija (29,91 g/100 g sėklų). Ekstraktų išgava gauta

skirtingomis sąlygomis tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė ($p > 0,05$) lyginant vidurinių (0,23–0,5 mm) bei smulkiausių (0,5–1,00 mm) frakcijas.

Palyginus SKE-CO₂ ir Soksleto ekstrakcijų išėigas pastebima, kad su <0,23 mm ir 0,23–0,5 mm dydžio dalelėmis išėigų vertės yra panašios. Atlikus SKE-CO₂ su <0,23 mm frakcija gauta 3 % mažesnė išėiga, nei atlikus Soksleto ekstrakciją (46,29 g/100 g sėklų), o su 0,23–0,5 mm frakcija atlikus SKE-CO₂ išėigos (34,18 ir 35,35 g/100 g sėklų) yra gaunamos labai artimos Soksleto išėigai (34,98 g/100 g sėklų). Didesnis skirtumas tarp išėigų gautas ekstrahuojant 0,5–1,0 mm frakciją.

Mokslinėje literatūroje [112] rastos SKE-CO₂ optimalios sąlygos judros aliejaus išėigimui iš sumaltų sėklų. Ekstrakcijai buvo naudojama 20 g iki 0,3 mm dydžio sumaltų sėklų. Eksperimento metu buvo nustatytos šios optimalios sąlygos 45 MPa slėgis, 70 °C temperatūra, ekstrakcija vykdyta 250 min esant 1 l/min CO₂ slėgiui. Gauta išėiga 25,1 %. Ekstrakcijos laiką prailginus iki 510 min išėiga pasiekia 31,6 %.

3.3.2. Lipofilinio ekstrakto antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Lipofilinių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas išmatuotas adaptuotu L-ORAC metodu. Antioksidacinis aktyvumas išreikštas ekstrakto masei bei sėklų masei. Rezultatai pateikiami 17 lentelėje.

17 lentelė. Ektrakto gauto po SKE-CO₂ antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Frakcijos	L-ORAC	
	mg TE/g ekstrakto	mg TE/g sėklų
	I SKE-CO ₂	
<0,23 mm	44,49±3,39 ^a	19,20±1,46 ^{bc}
0,23–0,5 mm	57,16±3,21 ^c	19,54±1,10 ^c
0,5–1,0 mm	56,70±2,46 ^c	11,97±0,52 ^a
	II SKE-CO ₂	
0,23–0,5 mm	48,65±3,27 ^{ab}	17,20±1,16 ^b
0,5 – 1,0 mm	51,62±2,46 ^{bc}	20,59±0,98 ^c

Nurodytos vidutinės penkių pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, $p < 0,05$).

Ektrakto gauto pirmomis sąlygomis (I SKE-CO₂) antioksidacinis aktyvumas kito intervale 44,49–57,16 mg TE/g ekstrakto. Didžiausiu antioksidaciniu aktyviu pasižymi ekstraktas gautas iš 0,23–0,5 mm frakcijos (57,16 mg TE/g ekstrakto), kurio vertė yra labai artima gauto iš 0,5–1,0 mm frakcijos (56,70 mg TE/g ekstrakto). Mažiausią antioksidacinį aktyvumą turi ekstraktas gautas iš pačios smulkiausios <0,23 mm frakcijos (44,49 mg TE/g ekstrakto). Ektrakto gauto II SKE-CO₂ antioksidacinis aktyvumas kinta siaurame intervale (48,65–51,62 mg TE/g ekstrakto). Įvertinus

antioksidacinių savybių skirtumus tarp tų pačių frakcijų, bet esant skirtingoms sąlygoms, pastebima, kad atliekant SKE-CO₂ pirmomis sąlygomis, gaunamas ekstraktas turintis daugiau antioksidacinių junginių savo sudėtyje. Taip yra dėl to, kad daugelis antioksidacinių junginių nėra stabilūs aukštoje temperatūroje.

Soksleto metodu išskirtas ekstraktas pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei SKE-CO₂ metodu. SKE-CO₂ metodu išskirto ekstrakto L-ORAC vertės kito nuo 44,49 iki 57,16 mg TE/g ekstrakto. Du kartus didesnis antioksidacinis aktyvumas yra ekstraktų gautų Soksleto metodu (92,75 – 101,04 mg TE/g ekstrakto. Ekstraktų, išskirtų taikant Soksleto ekstrakciją heksanu, didesnis antioksidacinis aktyvumas galėjo būti dėl to, kad šiuo metodu buvo išekstrahuota daugiau bioaktyvių junginių.

3.3.3. Liekanos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Judros sėklų liekanos antioksidacinis aktyvumas išmatuotas naudojant radikalų surišimo gebą DPPH[•], ABTS^{•+} ir ORAC metodais, o bendras fenolinių junginių kiekis *Folin-Ciocalteu*'s metodu. Rezultatai pateikiami 18 lentelėje.

18 lentelė. Liekanos po SKE-CO₂ antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Frakcijos	BFJK	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	ORAC
	mg GRE/g	mg TE/g		
I SKE-CO ₂				
<0,23 mm	18,15±1,23 ^b	16,82±0,47 ^b	77,11±0,29 ^b	69,56±5,57 ^d
0,23–0,5 mm	20,54±0,79 ^c	22,10±1,20 ^c	75,84±2,08 ^b	82,91±7,62 ^c
0,5–1,0 mm	12,57±0,35 ^a	11,47±0,72 ^a	72,19±2,12 ^a	51,64±4,91 ^c
II SKE-CO ₂				
0,23–0,5 mm	17,38±0,69 ^b	16,18±0,42 ^b	77,11±0,29 ^b	37,13±2,87 ^b
0,5–1,0 mm	11,51±1,03 ^a	11,28±0,50 ^a	78,05±0,55 ^b	22,60±1,13 ^a

Nurodytos vidutinės penkių pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, (p < 0.05).

BFJK atlikus I SKE-CO₂ sąlygomis vertės kinta nuo 12,57 iki 202,54 mg GRE/g. Didžiausią fenolinių junginių kiekį turi 0,23–0,5 mm liekana (20,54 mg GRE/g), o mažiausią – 0,5–1,0 mm liekana (12,57 mg GRE/g). Atlikus II SKE-CO₂ sąlygomis didžiausiu fenolinių junginių kiekiu pasižymi 0,23–0,5 mm liekana (17,38 mg GRE/g), o mažiausiu 0,5–1,0 mm liekana (11,51 mg GRE/g), kurio vertė yra panaši į to pačio dydžio likučio po I SKE-CO₂ sąlygomis (12,57 mg GRE/g).

Atlikus radikalo blukinimo metodą DPPH[•], pastebima, kad I SKE-CO₂ sąlygomis didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymi 0,23–0,5 mm liekana (22,10 mg TE/g), o du kartus mažesniu – 0,5-1,0 mm liekana (11,47 mg TE/g), kurio vertė yra lygi tos pačios liekanos po II SKE-CO₂

(11,28 mg TE/g). Iš kito radikalų blukino metodo ABTS⁺ matoma, kad tiek I SKE-CO₂ tiek II SKE-CO₂ sąlygomis atlikus SKE-CO₂ vertės yra siaurame intervale 72,19–78,5 mg TE/g. Reikšminio statistinio skirtumo tarp šių verčių nėra. Didžiausia antioksidacinio aktyvumo vertė gauta II SKE-CO₂ sąlygomis su 0,5–1,0 mm liekana (78,05 mg TE/g).

Atlikus deguonies radikalų surišimo matavimus (ORAC), matoma kad I SKE-CO₂ vertės kinta nuo 51,64 iki 82,91 mg TE/g. Didžiausia surišimo geba pasižymi 0,23–0,5 mm liekana (82,91 mg TE/g), o mažiausia – 0,5–1,0 mm liekana (51,64 mg TE/g). II SKE-CO₂ liekanos deguonies surišimo geba yra žymiai mažesnė, vertės kinta intervale 22,60–37,13 mg TE/g. Mažesnė geba gauta dėl to, kad ekstrakcijai vykdyti buvo naudojama aukšta temperatūra (70 °C) ir dalis bioaktyvių junginių galėjo skilti.

Palyginus SKE-CO₂ ir Soksleto liekanų antioksidacinius aktyvumus matoma, kad BFKJ kiekis liekanoje po Soksleto ekstrakcijos (11,38–21,82 mg GRE/g) ir liekanoje po SKE-CO₂ (11,51–20,54 mg GRE/g) yra panašus. Taip pat atlikus radikalų blukimo metodus DPPH^{*} ir ABTS⁺ didelio skirtumo tarp liekanų po Soksleto (TEAG_{DPPH}=11,01–2,82 mg TE/g; TEAG_{ABTS}=74,97–83,10 mg TE/g) ir SKE-CO₂ (TEAG_{DPPH}=11,28–16,82 mg TE/g; TEAG_{ABTS}=72,19–78,05 mg TE/g) nėra pastebima. Didesnis skirtumas pastebimas atlikus deguonies radikalų surišimo matavimu ir matoma, kad po Soksleto ekstrakcijos liekana yra aktyvesnė (57,50–84,88 mg TE/g) nei po SKE-CO₂ ekstrakcijos (22,60–82,91 mg TE/g).

3.4. Judros sėklų ekstrakcijos padidintame slėgyje optimizavimas

3.4.1. Eksperimentinio modelio sudarymas ir optimalių ekstrakcijos sąlygų nustatymas

Naudojant netradicinius padidinto slėgio ekstrakcijos metodus yra sumažinamos tirpiklių sąnaudos ir tuo pačiu padidinamos ekstraktų išeigos, dėl ko sumažėja vykdyti ekstrakcijai reikalingi kaštai. Norint tai pasiekti, būtina parinkti ekstrakcijai reikalingas optimalias sąlygas, kaip laikas, slėgis, temperatūra. Iš pradžių ekstrakcijai heksanu padidintame slėgyje atlikti buvo pasirinkta smulkiausia frakcija (<0,23 mm), nes atliekant kitas ekstrakcijas, kaip Soksleto ar SKE-CO₂, buvo gaunamos didžiausios išeigos. Tačiau atlikus matematinį optimizavimo planą buvo gauti labai dideli nuokrypiai ir nepastebėtas atsikartojamumas tarp rezultatų. Todėl ekstrakcija padidintame slėgyje buvo atlikta su viduriniąja frakcija (0,23–0,5 mm), nes su šia frakcija yra gaunama antra pagal dydį išeiga. EPS ekstrakcijos optimizavimas buvo atliktas parenkant tris kintančias optimizavimo vertes: temperatūra (A), bendras ekstrakcijos laikas (B) ir tirpiklio tūris (C). Eksperimento optimalių verčių nustatymui, buvo naudojamas centriškai kompozicinis planas. Gauti eksperimento duomenys apdoroti *Design-Expert 7.0.* programa. Taip pat naudotas paviršiaus atsako metodas, nes išeigos kiekis priklauso nuo kelių kintamųjų (temperatūros, laiko ir tirpiklio tūrio), o eksperimento tikslas – optimizuoti (gauti didžiausią) išeigą. Naudojant

centriškai kompozicinį planą buvo įvertinta kintamųjų įtaka lipofilinio ekstrakto išeigai ir parinktos optimalios kintamųjų vertės. Judros ekstrakto išeigos analizei buvo sudarytas 3 kintančių parametru 20 ciklu planas, kurį sudarė 6 centriniai taškai ir 14 faktoriai taškai. Plano centrinių taškų vertės – 100°C temperatūra, 15 minučių ir 100% tirpiklio tūrio. Pagal sudaryta centriškai kompozicinį planą atlikus eksperimentą buvo gauta, kad lipofilinio ekstrakto išeiga yra nuo 27,91 iki 33,12 g/100 g sėklų (19 lentelė)

19 lentelė. Judros sėklų ekstrakcijos parametrai pagal centriškai kompozicinį planą ir gautos išeigos.

Eil. nr.	Temperatūra, °C	Laikas, min	Tūris, % (ml)	Išeiga, g/100 g sėklų
1	80	10	70 (46,1)	27,91±0,33 ^a
2	120	10	70 (44,8)	30,61±0,31 ^c
3	80	20	70 (45,2)	28,90±0,07 ^b
4	120	20	70 (44,9)	31,95±0,02 ^g
5	80	10	130 (65,7)	28,05±0,08 ^a
6	120	10	130 (65,4)	30,54±0,49 ^c
7	80	20	130 (65,7)	29,20±0,11 ^b
8	120	20	130 (65,3)	33,12±0,08 ^h
9	80	15	100 (54,8)	29,34±0,06 ^b
10	120	15	100 (55,0)	32,04±0,04 ^g
11	100	10	100 (55,6)	29,38±0,04 ^b
12	100	20	100 (56,7)	31,73±0,08 ^{fg}
13	100	15	70 (46,1)	30,67±0,09 ^{cd}
14	100	15	130 (65,9)	31,36±0,03 ^f
15	100	15	100 (56,1)	31,51±0,02 ^{fg}
16	100	15	100 (47,5)	31,50±0,01 ^{fg}
17	100	15	100 (54,3)	30,79±0,05 ^{cde}
18	100	15	100 (54,2)	30,73±0,41 ^{cde}
19	100	15	100 (54,7)	31,28±0,01 ^{ef}
20	100	15	100 (54,4)	31,21±0,07 ^{def}

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, (p < 0.05).

Modelio analizė (ANOVA) pateikiama 20 lentelėje. Didelė modelio F-kriterijau reikšmė (35,890) ir maža p-reikšmė (<0,0001) parodo, kad modelis yra reikšmingas. Gautą determinacijos koeficientą ($R^2 = 0,94$) palyginus su teoriniu determinacijos koeficientu ($R^2 = 0,81$) matoma, kad modelis yra adekvatus ir yra pastebimas ryšys tarp kintamųjų parametru vertės ir išeigos kiekio.

20 lentelė. Centriškai kompozicinio plano dispersinė analizė

Kintamieji	Kvadratų suma	Kvadratų vidurkis	F-kriterijus	p-reikšmė
Modelis	35,21	3,91	35,890	<0,0001 reikšmingas
A-Temperatūra	22,08	22,08	202,57	<0,0001
B-Laikas	7,07	7,07	64,88	<0,001
C-Tūris	0,50	0,50	4,56	0,0584
AB	0,40	0,40	3,63	0,0858
AC	0,054	0,054	0,50	0,4959
BC	0,24	0,24	2,25	0,1647
A ²	0,53	0,53	4,84	0,0524
B ²	0,90	0,90	8,29	0,0164
C ²	0,035	0,035	0,32	0,5823
Liekana (Residual)	1,09	0,11	-	-
<i>Klaidos tikimybė</i>	0,51	0,10	0,89	0,5484 nereikšmingas

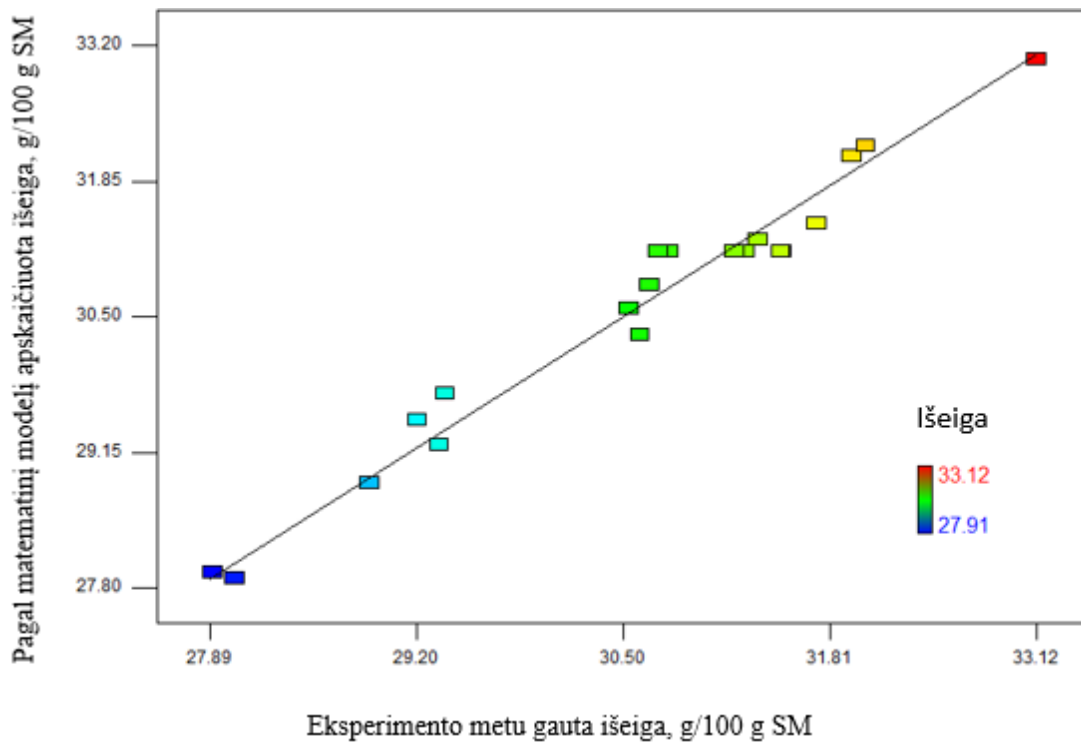
F – Fišerio kriterijus; p – reikšmė, jei < 0,05, tada kintamasis yra statistiškai reikšmingas

Paviršiaus atsako metodologija buvo naudota tam, kad būtų nustatytos optimalios kintamųjų vertės, kurioms esant yra didžiausia ekstrakcijos padidintame slėgyje heksanu lipofilinio ekstrakto išeigai. Modelyje dominuoja šeši parametrai : A, B, C, A², B², C², kuriais išreiškiama antro laipsnio polinominė regresinė lygtis, kuri parodo kintamųjų ryšį vienas su kitu:

$$\text{Išeiga (g/100 g SM)} = 31,15 + 1,49 \times A + 0,84 \times B + 0,22 \times C + 0,22 \times A \times B + 0,082 \times A \times B + 0,17 \times B \times C - 0,44 \times A^2 - 0,57 \times B^2 - 0,11 \times C^2 \quad (11)$$

Prognozuojamų išeigos verčių, apskaičiuotų naudojant matematinį modelį, ir eksperimento metu gautų verčių palyginimas pateikiamas 17 paveiksle.

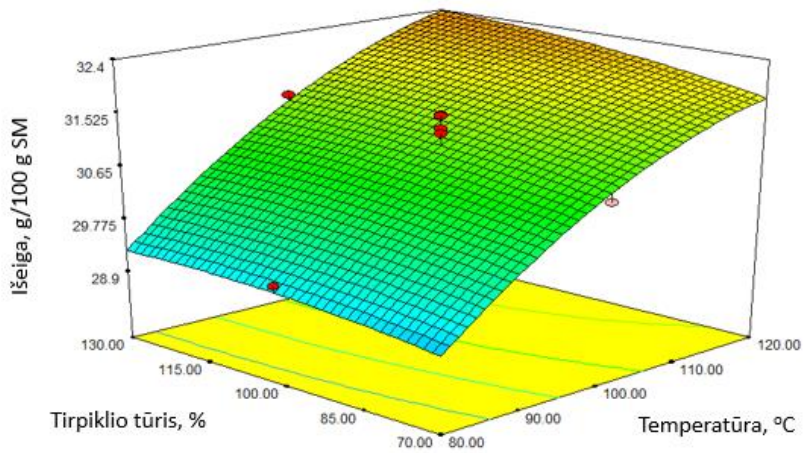
Sudarius antrojo laipsnio polinominį modelį nustatyti optimalūs ekstrakcijos heksanu padidintame slėgyje parametrai – 120 °C, 20 min ir 130 % tirpiklio tūrio. Optimaliomis sąlygomis gauta lipofilinio ekstrakto išeiga 33,12 g/100 g sėklų atitiko programos *Design-Expert 7.0*. teoriškai įvertintą išeiga 33,06 g/100 g sėklų. Taip pat matoma, kad temperatūra ir ekstrakcijos laikas turi didžiausia įtaką lipofilinio ekstrakto išeigai.



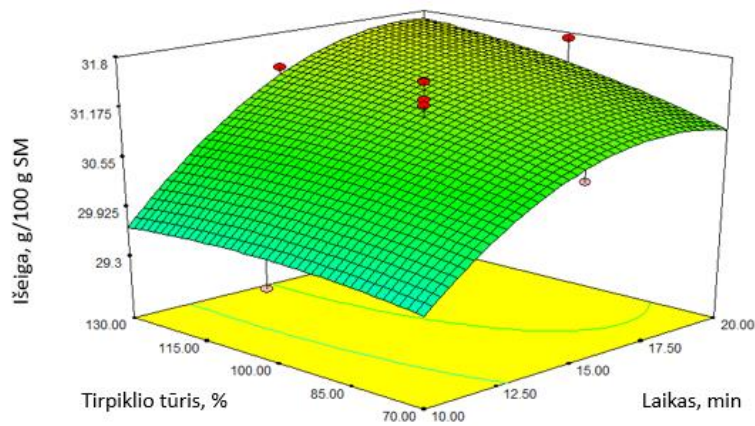
17 pav. Ekstrakto išeigos, gautos eksperimento metu ir apskaičiuotos sudarytu matematiniumi modeliu

Erdviniai (3D) grafikai rodo ekstrakcijos temperatūros, laiko ir tirpiklio tūrio įtaką lipofolinio ekstrakto išeigai. Grafikai gaunami vieną kintamąjį (ekstrakcijos parametą) pasirenkant pastovaus dydžio, o kitus du kintančiais. Taip pastebimas atsakas. Pirmame grafike (18 pav, a) matoma, kaip keičiasi lipofolinio ekstrakto išeiga, kai laikas yra pastovus (15 min), o temperatūra ir tirpiklio tūris keičiasi. Temperatūra turi daug didesnę įtaką išeigos pokyčiui, nei ekstrakcijai naudojamo tirpiklio tūris. Temperatūros didėjimas nuo 80 iki 120 °C išeigą padidina 2,7 %. O tirpiklio tūri didinant nuo 70 iki 130 % išeiga padidėja tik ~0,7 %. Panaši išeigos kitimo tendencija yra pastebima, kai yra pastovi ekstrakcijos temperatūra 100 °C (18 pav, b). Laiko prailginimas daro daug didesnę įtaką, nei tirpiklio tūris. Laikui kintant nuo 10 iki 20 min, išeiga padidėja 2,4 %. Ekstrakcijai naudojamo tirpiklio tūris, kintant nuo 70 iki 130 %, išeigą padidina ~0,7 %. Didžiausią įtaką ekstrakcijos padidėjimui daro temperatūra ir ekstrakcijos laikas, kai tirpiklio tūris yra pastovus 100 % (18 pav, c). Laikui kintant 10–20 min, ekstrakcijos išeiga padidėja 2,4 %. O temperatūrai kintant nuo 80 iki 120 °C, išeiga padidėja net 2,7 %. Iš grafikuose esančių duomenų matome, kad didžiausią įtaką išeigos kiekiui turi ekstrakcijos temperatūra, o tik po to ekstrakcijos laikas. O mažiausią įtaką išeigos kiekiui daro ekstrakcijai naudojamu tirpiklio tūris.

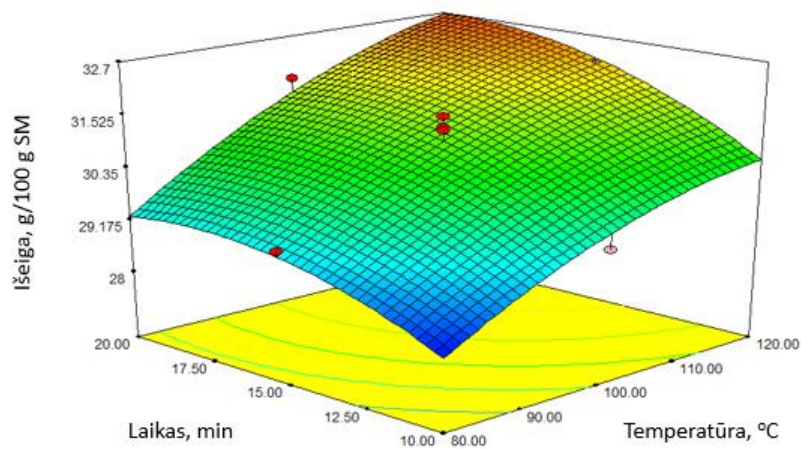
a) Pastovus ekstrakcijos laikas, 15 min
Ekstrakcijos temperatūros ir tirpiklio tūrio įtaka



b) Pastovi ekstrakcijos temperatūra, 100 °C
Ekstrakcijos laiko ir tirpiklio tūrio įtaka



c) Pastovus tirpiklio tūris, 100 %
Ekstrakcijos laiko ir temperatūros įtaka



18 pav. Judros sėklių ekstrakcijos padidintame slėgyje heksanu atsako paviršiaus kreivės, parodančios lipofilinio ekstrakto išėigos priklausomybę nuo optimizuojamų kintančių parametru

Nustačius optimalias ekstrakcijos sąlygas, EPS atlikta su likusiomis frakcijomis – 0,5–1,0 mm ir <0,23 mm. Eksperimento metu gautos ekstraktų išeigos pateikiamos 21 lentelėje.

21 lentelė. Ekstraktų išeigos, gautos atliekant EPS heksanu

Ekstraktų išeigos, g/100 g sėklų		
<0,23 mm	0,23–0,5 mm	0,5–1,0 mm
44,79±0,21 ^c	33,19±0,11 ^b	25,23±0,23 ^a

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių eilutėje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, (p < 0.05).

Iš gautų rezultatų matoma, kad mažiausia ekstrakto išeiga gauta iš 0,5–1,00 mm frakcijos (25,23 g/100 g sėklų). Mažiausia išeiga gauta dėl to, kad šios frakcijos dalelės yra didžiausios, tai yra mažiausias paviršiaus plotas. Taip pat ekstrakcijos efektyvumas sumažėjo dėl ilgesnės tirpiklio difuzijos į bandinio dalelę. Didžiausias ekstrakto kiekis gautas iš pačios smulkiausios frakcijos (<0,23 mm) 44,79 g/100 g sėklų, kuri yra ~10 % didesnė, nei ekstrakto išeiga gauta iš 0,23–0,5 mm frakcijos (33,19 g/100 g sėklų).

3.4.2. *Lipofilinių ekstraktų (gautų optimaliomis sąlygomis) antioksidacinio aktyvumo įvertinimas*

Ektrakto antioksidacinis aktyvumas išmatuotas adaptuotu L-ORAC metodu. Antioksidacinis aktyvumas išreikštas ekstrakto masei bei sėklų masei. Rezultatai pateikiami 22 lentelėje.

22 lentelė. Ektrakto gauto po EPS heksanu antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Frakcijos	L-ORAC	
	mg TE/g ekstrakto	mg TE/g sėklų
<0,23 mm	238,73±4,74 ^a	106,93±3,81 ^b
0,23–0,5 mm	317,43±5,53 ^c	105,34±2,50 ^b
0,5–1,0 mm	265,78±6,00 ^b	67,06±1,51 ^a

Nurodytos vidutinės penkių pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, (p < 0.05).

Ekstraktų laisvųjų deguonies radikalų surišimo geba kinta plačiame intervale 238,73–317,43 mg TE/g ekstrakto. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas iš 0,23–0,5 mm frakcijos gauto ekstrakto (317,43 mg TE/g ekstrakto). Mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymi ekstraktas gautas iš <0,23 mm frakcijos (238,73 mg TE/g ekstrakto). Tarp visų ekstraktų antioksidacinių verčių matomas statistinis skirtumas (p < 0,05).

3.4.3. Liekanos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Judros sėklų liekanos antioksidacinis aktyvumas po EPS išmatuotas naudojant radikalų surišimo gebą DPPH[•], ABTS^{•+} ir ORAC metodais, o bendras fenolinių junginių kiekis *Folin-Ciocalteu*'s metodu. Rezultatai pateikiami 23 lentelėje.

23 lentelė. Liekanos po EPS heksanu antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Frakcijos	BFJK	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	ORAC
	mg GRE/g		mg TE/g	
<0,23 mm	14,96±0,28 ^c	37,83±1,70 ^c	82,20±0,32 ^b	54,23±2,26 ^c
0,23–0,5 mm	10,41±0,17 ^b	24,90±1,39 ^b	76,98±0,29 ^a	34,01±3,47 ^a
0,5–1,0 mm	7,91±0,31 ^a	15,12±0,99 ^a	76,75±0,33 ^a	28,26±1,95 ^a

Nurodytos vidutinės penkių pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, $p < 0.05$).

BFJK liekanoje po EPS heksanu kinta nuo 7,91 iki 14,96 mg GRE/g. Didžiausią fenolinių junginių kiekį turi <0,23 mm liekana (14,96 mg GRE/g), dvigubai mažesnis kiekis nustatytas 0,5–1,0 mm liekanoje (7,91 mg GRE/g).

Palyginus radikalo blukinimo metodus DPPH[•] ir ABTS^{•+} matoma, kad didžiausią antioksidacinį aktyvumą turi <0,23 mm liekana ($TEAG_{DPPH}=37,83$ mg TE/g; $TEAG_{ABTS}=82,20$ mg TE/g). O mažiausiu 0,5–1,0 mm liekana ($TEAG_{DPPH}=15,12$ mg TE/g; $TEAG_{ABTS}=76,75$ mg TE/g).

Didžiausia deguonies radikalų surišimo geba (ORAC) kinta plačiame intervale nuo 28,26 iki 54,23 mg TE/g. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas <0,23 mm liekanoje (54,23 mg TE/g). Mažiausias antioksidantų kiekis, beveik du kartus, ORAC metodu nustatytas 0,5–1,0 mm liekanoje 28,26 mg TE/g.

3.5. Judros sėklų rafinavimas taikant pakopinę ekstrakcijos metodiką

3.5.1. Sėklų ekstrakcija padidintame slėgyje

Judros sėklų 0,23–0,5 mm liekana, gauta po I SKE-CO₂ ir II SKE-CO₂, toliau nuosekliai ekstrahuota didėjančio poliškumo tirpikliais (acetonas-etanolis-vanduo) (žr. 12 pav.). Pirmajame etape iš žaliavos buvo išekstrahuotas lipofilinis ekstraktas, tačiau tiriamosiose sėklose liko didelis kiekis vertingųjų junginių, kurie gali būti išskirti naudojant poliškesnius tirpiklius nei superkritis CO₂. Eksperimento metu gautos acetoninių, etanolinių ir vandeninių ekstraktų išėigos pateikiamos 24 lentelėje.

Atliekant pakopinę EPS su I SKE-CO₂ liekana didžiausias kiekis ekstrakto gaunamas naudojant subkritinį vandenį (9,45 g/100 g). Nežymiai mažesnę ekstrakto kiekį (8,65 g/100 g) gauname naudojant acetoną. Mažiausias kiekis ekstrakto gautas atliekant ekstrakciją su etanoliu –

6,09 g/100 g. Didelių skirtumų tarp išeigų nebuvo pastebėta atlikus pakopinę EPS su po II SKE-CO₂ liekana. Išeigos kinta mažame intervale 6,69–7,33 g/100 g. Didžiausia išeiga pasiekta naudojant subkritinį vandenį 7,33 g/100 g, o mažiausia – su acetonu 6,69 g/100 g.

24 lentelė. Ekstraktų išeigos, gautos taikant pakopinę metodiką

Tirpiklis	Ekstrakto išeiga	
	g/100 g	g/100 g sėklų
Liekana po I SKE-CO ₂		
Acetonas	8,65±0,18 ^d	5,96±0,13 ^c
Etanolis	6,09±0,08 ^a	4,11±0,09 ^{ab}
Vanduo	9,45±0,13 ^c	6,34±0,26 ^d
Liekana po II SKE-CO ₂		
Acetonas	6,69±0,23 ^b	4,63±0,28 ^b
Etanolis	7,07±0,11 ^{bc}	4,42±0,14 ^{ab}
Vanduo	7,33±0,37 ^c	4,60±0,04 ^b

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, (p < 0.05).

Palyginus skirtingomis sąlygomis atliktų SKE-CO₂ ekstraktų išeigas esant tokiems pats tirpikliams pastebima, kad daugeliu atveju didesnės išeigos gaunamos atlikus pakopines ekstrakcijas su I SKE-CO₂ liekana. Acetoninių (8,65 g/100 g) ir subkritinio vandens (9,45 g/100 g) ekstraktų išeigos yra 2 % didesnės nei su II SKE-CO₂ liekana (atitinkamai 6,69 ir 7,33 g/100 g).

3.5.2. Ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas

Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas išmatuotas naudojant radikalų surišimo gebą DPPH^{*}, ABTS⁺⁺ ir ORAC metodais, o bendras fenolinių junginių kiekis *Folin-Ciocalteu's* metodu. Rezultatai pateikiami 25 lentelėje. Antioksidacinis aktyvumas išreikštas ekstrakto masei bei sėklų masei.

BFJK judros ekstraktuose kito nuo 36,23 iki 149 mg GRE/g ekstrakto. Naudojant etanolį buvo gautas didžiausias fenolinių junginių kiekis ekstraktuose (145,40 ir 149,40 mg GRE/g ekstrakto). Ekstrahuojant acetonu fenolinių junginių išskiriama ~3 kartus mažiau (50,76 ir 66,86 mg GRE/g ekstrakto) nei etanolium. Ekstraktai, gauti ekstrahuojant subkritiniu vandeniu, pasižymėjo mažiausiu šių junginių kiekiu 38,88 ir 36,23 mg GRE/g ekstrakto.

25 lentelė. Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas

Tirpiklis	BFJK		DPPH*		ABTS* ⁺		ORAC	
	mg GRE/g ekstrakto	mg GRE/g sėklų	mg TE/g ekstrakto	mg TE/g sėklų	mg TE/g ekstrakto	mg TE/g sėklų	mg TE/g ekstrakto	mg TE/g sėklų
Liekana po I SKE-CO ₂								
Acetonas	50,76±0,70 ^c	3,03±0,01 ^c	63,53±1,32 ^c	3,79±0,08 ^d	121,92±0,80 ^c	7,23±0,09 ^d	191,28±6,14 ^b	11,40±0,49 ^d
Etanolis	145,40±1,20 ^e	5,98±0,05 ^e	108,84±2,12 ^e	4,47±0,09 ^e	229,43±2,68 ^d	9,43±0,11 ^e	466,21±6,28 ^e	19,16±0,92 ^e
Vanduo	38,88±0,23 ^b	2,47±0,01 ^b	35,84±1,55 ^b	2,27±0,10 ^b	99,21±1,53 ^b	6,29±0,05 ^c	96,74±6,21 ^a	6,13±0,39 ^b
Liekana po II SKE-CO ₂								
Acetonas	66,86±0,73 ^d	3,10±0,03 ^d	69,13±3,72 ^d	3,20±0,17 ^c	120,49±2,72 ^c	5,58±0,13 ^b	216,63±9,55 ^c	10,03±0,63 ^c
Etanolis	149,38±0,51 ^f	6,60±0,02 ^f	134,29±2,24 ^f	5,94±0,10 ^f	267,93±2,03 ^e	11,84±0,09 ^f	437,58±7,58 ^d	19,34±0,97 ^e
Vanduo	36,23±0,53 ^a	1,6±0,02 ^a	30,60±0,84 ^a	1,41±0,04 ^a	88,18±2,26 ^a	4,06±0,09 ^a	97,24±8,72 ^a	4,47±0,24 ^a

Nurodytos vidutinės penkių pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, (p < 0.05).

Judros sėklų ekstraktų DPPH• radikalų surišimo geba kito nuo 30,60 iki 134,29 mg TE/g ekstrakto. Ekstraktai, kurie gauti naudojant tirpiklį etanolį, pasižymėjo didžiausia radikalų surišimo geba (108,84 ir 134,29 mg TE/g ekstrakto). Apie 3–4 kartus mažesniu antioksidaciniu aktyvumu (lyginant su etanoliniais ekstraktais) pasižymi ekstraktai, gauti naudojant subkritinį vandenį, jų radikalų surišimo geba kinta nuo 30,60 iki 35,84 mg TE/g ekstrakto. Tokia pati tendencija pastebima atlikus ABTS⁺ radikalų blukinimo metodu. Šio metodo vertės kinta plačiame intervale 88,18–267,93 mg TE/g ekstrakto. Kaip ir DPPH• metode, buvo nustatyta, kad didžiausias antioksidacinis aktyvumas yra tų ekstraktų, kurie gauti naudojant tirpiklį etanolį, ir jų vertės kito nuo 229,43 iki 267,93 mg TE/g ekstrakto. Taip pat daugiau nei du kartus mažesniu aktyvumu pasižymi ekstraktai, naudojami kaip tirpiklį subkritinį vandenį (22,18–99,21 mg TE/g ekstrakto).

Matuojant deguonies surišimo vertes (ORAC) matomas dar didesnis antioksidacinio aktyvumo skirtumas tarp ekstraktų, gautų naudojant skirtingus tirpiklius. Vertės kinta dar didesniame intervale 96,74–466,21 mg TE/g ekstrakto. Pastebima ta pati tendencija, kad etanolis yra efektyviausias tirpiklis, norint išskirti bioaktyvius junginius iš žaliavos (466,21 ir 437,58 mg TE/g ekstrakto). 2–2,5 kartus mažiau antioksidacinių junginių išskiria acetonas (191,28 ir 216,63 mg TE/g ekstrakto), o 5 kartus mažiau vertingų junginių išekstrahuojama naudojant subkritinį vandenį (96,74 ir 97,24 mg TE/g ekstrakto)

3.6. Judros sėklų frakcionavimas taikant fermentinę hidrolizę bei gautų frakcijų antioksidacinis įvertinimas

3.6.1. Sėklų fermentinė hidrolizė

Taikant padidinto slėgio ekstrakcijos metodus iš augalų galima išskirti iki 50% lipofilinių bei hidrofilinių ekstraktų, kuriuose yra naudingų bioaktyviųjų junginių. Norint padidinti išskiriamą šių junginių kiekį yra naudojami fermentinės hidrolizės metodai.

Liekana po ekstrakcijos etanoliu padidintame slėgyje paveikiama fermentais siekiant suskaldyti stambiamolekulinius junginius iki mažesnės molekulinės masės junginių. Naudotas fermentinis preparatas *Viscozyme L* ir palaikomos tinkamos fermentinės hidrolizės sąlygos: fermento-substrato santykis - 6,7 %, temperatūra - 50 °C, laikas - 372 min. Fermentinė hidrolizė atlikta esant skirtingiems pH - 3,5 ir 4,5. Liekanos, likusios po ekstrakcijos su subkritiniu vandeniu, nebuvo fermentuojamos.

Po fermentacijos likusi liekana ekstrahuota vandeniu padidintame slėgyje, norint ištirti ar liekanoje dar yra likusių vertingų bioaktyviųjų junginių. Fermentinės hidrolizės rezultatai pateikiami 26 lentelėje g/100 g fermentuojamos medžiagos.

26 lentelė. Tirpiųjų junginių išeiga naudojant fermentinį preparatą *Viscozyme L* ir naudojant subkritinį vandenį.

Frakcijos	Išeiga, g/100 g
I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=3,5	14,69±0,57 ^{b*}
I SKE-CO ₂ / Acet/EtOH/pH=4,5	11,47±0,40 ^{a*}
II SKE-CO ₂ / Acet/EtOH/pH=3,5	15,89±0,25 ^{c*}
II SKE-CO ₂ / Acet/EtOH/pH=4,5	12,49±0,38 ^{a*}
I SKE-CO ₂ / Acet/EtOH/pH=3,5/H ₂ O	15,21±0,26 ^{b***}
I SKE-CO ₂ / Acet/EtOH/pH=4,5/ H ₂ O	16,11±0,32 ^{b***}
II SKE-CO ₂ / Acet/EtOH/pH=3,5/ H ₂ O	12,30±0,59 ^{a**}
II SKE-CO ₂ / Acet/EtOH/pH=4,5/ H ₂ O	13,01±0,30 ^{a**}

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje iki brūkšnio nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, $p < 0.05$). *-Išeiga buvo apskaičiuota iš liofilizuoto filtrato atėmus kontrolinio mėginio masę. **-Išeiga paskaičiuota nuo po SKE-CO₂/EtOH fermentuotos masės.

Didžiausias tirpiųjų medžiagų kiekis gautas hidrolizuojant II SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=3,5 (15,89 g/100 g). Nežymiai mažesnis kiekis gautas hidrolizuojant Po I SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=3,5 (14,69 g/100 g). Fermentinei hidrolizei naudojant mažiau rūgštinį buferį (pH=4,5) sumažėja išskiriamų tirpiųjų medžiagų kiekis, kuris kinta nuo 11,47 iki 12,49 g/100 g.

Po fermentinės hidrolizės, likusią liekana ekstrahuojant vandeniu padidintame slėgyje, taip pat buvo išskirta vandenyje tirpių medžiagų. Išeiga kinta nuo 12,30 iki 16,11 g/100 g. Didžiausias vandenyje tirpių medžiagų kiekis išskirtas iš I SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=3,5/H₂O ir I SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5/H₂O, atinkamai 15,21 ir 16,11 g/100 g. Kaip matoma, naudoto fermentinei hidrolizei buferinio tirpalo pH įtakos išskiriamų tirpiųjų medžiagų kiekiui neturi.

Atlikus fermentinę hidrolizę su liekana, likusia po ekstrakcijos padidintame slėgyje etanoliu ir panaudojus ekstrakciją padidintame slėgyje vandeniu, yra gaunamos didesnės išeigos, nei atlikus SKE-CO₂/Acet/EtOH/H₂O (žr. 3.5.1. skyrių). Pirmuoju atveju gautos išeigos kinta nuo 12,30 iki 16,11 g/100 g, antruoju – 7,33–9,45 g/100 g. Didesnė išeiga gaunama po fermentinės hidrolizės, nes fermentai hidrolizuoja stambiamolekulinius junginius į mažesnės molekulinės masės (pvz. krakmolas → gliukozė) ir taip pat yra išskiriami augalo matricoje sujungti vandenyje tirpūs junginiai.

3.6.2. Ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas

Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas išmatuotas naudojant radikalų surišimo gebą DPPH[•], ABTS^{•+} ir ORAC metodais, o bendras fenolinių junginių kiekis *Folin-Ciocalteu's* metodu. Rezultatai pateikiami 27 lentelėje. Antioksidacinis aktyvumas išreikštas ekstrakto masei.

BFJK kiekis po fermentinės hidrolizės gautuose ekstraktuose kinta siaurame intervale nuo 16,50 iki 19,69 mg GRE/g ekstrakto. Didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas II SKE-

CO₂/Acet/EtOH/pH=3,5 (19,69 mg GRE/g ekstrakto). Labai artima vertė gauta I SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=3,5 (18,99 mg GRE/g ekstrakto). Mažiausias bioaktyviųjų junginių kiekis gautas I SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5 (16,50 mg GRE/g ekstrakto). Atlikus radikalų blukimo metodus DPPH[•] ir ABTS^{•+} taip pat gautos vertės tarpusavyje yra panašios, TEAG_{DPPH}=10,15-13,34 mg TE/g ekstrakto; TEAG_{ABTS}=104,08-110,92 mg TE/g ekstrakto. Didžiausios šių metodų vertės gautos I SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=3,5, TEAG_{DPPH}=13,34 mg TE/g ekstrakto; TEAG_{ABTS}=110,92 mg TE/g ekstrakto. Platesniame intervale antioksidacinės gaunamos atlikus ORAC metodą (76,98-101,88 mg TE/g ekstrakto). Iš gautų rezultatų matoma, kad fermentinei hidrolizei naudojamas sausa liekana ar buferinio tirpalo pH, neturi didelės įtakos išskiriant bioaktyviuosius junginius.

27 lentelė. Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas

Frakcijos	BFJK	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	ORAC
	mg GRE/g ekstrakto	mg TE/ g ekstrakto		
Po I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=3,5	18,99±0,23 ^b	13,34±0,18 ^d	110,92±1,45 ^d	101,88±6,84 ^c
Po I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=4,5	16,50±0,26 ^a	11,30±0,31 ^b	104,08±0,34 ^a	76,98±7,31 ^a
Po II SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=3,5	19,69±0,15 ^c	12,27±0,23 ^c	109,13±0,86 ^c	94,74±8,50 ^{bc}
Po II SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=4,5	18,74±0,24 ^b	10,15±0,35 ^a	106,88±0,59 ^b	87,56±7,30 ^{ab}
Po I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=3,5/H ₂ O	46,56±0,26 ^c	52,33±3,31 ^c	139,03±1,54 ^b	241,24±11,45 ^c
Po I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=4,5/H ₂ O	41,77±0,22 ^b	45,51±1,22 ^b	141,64±1,60 ^b	219,19±8,38 ^b
Po II SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=3,5/H ₂ O	60,38±0,43 ^d	74,07±2,90 ^d	197,12±2,01 ^c	414,81±6,91 ^d
Po II SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=4,5/H ₂ O	35,33±0,70 ^a	41,18±0,78 ^a	112,89±2,77 ^d	182,80±8,84 ^a

Nurodytos vidutinės penkių pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje iki brūkšnio nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, $p < 0.05$).

Kitokia tendencija yra pastebima atlikus ekstrakcija vandeniu papildintame slėgyje. BFJK vandenyje tirpioje medžiagoje kinta plačiame intervale nuo 35,33 iki 60,38 mg GRE/g ekstrakto. Didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas II SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=3,5/ H₂O (60,8 mg GRE/g ekstrakto). I SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=3,5/H₂O ir I SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5/H₂O ekstraktų vertės gautos artimos viena kitai, atitinkamai 46,56 ir 41,77 mg GRE/g ekstrakto. Mažiausias kiekis vertingųjų junginių nustatytas II SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5/H₂O (35,33 mg GRE/g ekstrakto). DPPH[•] ir ABTS^{•+} radikalų blukimo metodų vertės taip pat nustatytos plačiame intervale, TEAG_{DPPH}=41,18-74,07 mg TE/g ekstrakto; TEAG_{ABTS}=112,89-197,12 mg TE/g ekstrakto. Didžiausiomis antioksidacinių junginių vertėmis pasižymi SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=3,5/H₂O (TEAG_{DPPH}=74,07 mg TE/g ekstrakto; TEAG_{ABTS}=112,89 mg TE/g

ekstrakto). Šis ekstraktas atlikus laisvųjų deguonies radikalų surišimo gebą, taip pat parodė didžiausią vertę 414,18 mg TE/g ekstrakto. Iš gautų rezultatų matoma, kad didžiausias kiekis bioaktyviųjų junginių išskirtas iš II SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=3,5/H₂O, o mažiausias – II SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5/H₂O. Taip yra dėl to, kad fermentai suardo augalo ląsteles sienes ir ląstelėje esantys tirpūs bioaktyvūs junginiai tampa lengviau prieinami įvairių tirpiklių.

Atlikus fermentinę hidrolizę su liekana likusia po ekstrakcijos padidintame slėgyje etanoliu ir panaudojus ekstrakciją padidintame slėgyje vandeniu yra gaunamos didesnės ekstraktų antioksidacinio aktyvumo vertės, nei atlikus SKE-CO₂/Acet/EtOH/H₂O (žr. 3.5.2. skyrių). Tik II SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5/H₂O ekstrakto (35,33 mg GRE/g ekstrakto) BFJK yra artimas I SKE-CO₂/Acet/EtOH/H₂O ir II SKE-CO₂/Acet/EtOH/H₂O vertėms (atitinkamai 38,88 ir 36,23 mg GRE/g ekstrakto). Kitų ekstraktų gautų po fermentinės hidrolizės ir ekstrakcijos padidintame slėgyje vandeniu, BFJK vertės gautos didesnės. Atlikus radikalų blukinimo metodus DPPH[•] ir ABTS^{•+} gautų rezultatų matoma, kad taip pat po fermentinės hidrolizės ir ekstrakcijos padidintame slėgyje antioksidacinės vertės atitinkamai 1,5–2 ir 1,2–2 karto gaunamos didesnės nei SKE-CO₂/Acet/EtOH/H₂O. Taip pat 1,9–4,2 karto didesnės vertės gautos atlikus deguonies radikalų surišimo gebos matavimus su ekstraktu gautu po fermentinės hidrolizės ir ekstrakcijos padidintame slėgyje vandeniu, nei su SKE-CO₂/Acet/EtOH/H₂O. Didesnės antioksidacinio aktyvumo vertės gaunamos yra dėl to, kad fermentinis preparatas atlaisvina sėklų matricoje surištus antioksidacinius junginius, kurie yra tirpūs vandenyje.

3.6.3. Liekanos antioksidacinių savybių įvertinimas

Antioksidaciniai tyrimai buvo atlikti žaliavai prieš fermentaciją (I SKE-CO₂/Acet/EtOH ir II SKE-CO₂/Acet/EtOH), liekanai po fermentacijos bei liekanai po ekstrakcijos subkritiniu vandeniu. Likučių antioksidacinis aktyvumas išmatuotas naudojant radikalų surišimo gebą DPPH[•], ABTS^{•+} ir ORAC metodais, o bendras fenolinių junginių kiekis *Folin-Ciocalteu*'s metodu. Rezultatai pateikiami 28 lentelėje.

Žaliavų prieš fermentaciją antioksidacinio aktyvumo vertės yra panašios ir reikšminio skirtumo tarp jų nėra. Fenolinių junginių kiekis nustatytas lygiai toks pat 7,83 mg GRE/g. Radikalų blukinimo metodų DPPH[•], ABTS^{•+} ir laisvųjų deguonies radikalų surišimo gebos kinta siauruose intervaluose – TEAG_{DPPH}=4,65–5,33 mg TE/g; TEAG_{ABTS}=31,35–32,79 mg TE/g; TEAG_{ORAC}=60,87–63,72 mg TE/g. Frakcijų I SKE-CO₂/Acet/EtOH ir II SKE-CO₂/Acet/EtOH antioksidacinio aktyvumo pokyčiai buvo paklaidų ribose ir galima teigti, kad SKE-CO₂ sąlygos įtakos tolimesniems ekstrakcijos procesams neturėjo.

BFJK liekanoje po fermentacijos kinta nuo 3,58 iki 7,22 mg GRE/g. Iš gautų rezultatų matoma, kad didesnis fenolinių junginių kiekis išskirtas, atliekant fermentaciją, kai pH yra 4,5

(5,83–7,22 mg GRE/g). Iš likučio po fermentacijos, esant pH=3,5, fenolinių junginių išekstrahuota iki dviejų kartų mažiau (3,58–4,56 mg GRE/g). DPPH• gautų rezultatų vertės kinta nežymiai, nuo 2,26 iki 2,68 mg TE/g. O radikalų blukinimo ABTS•+ metodo antioksidacinė geba yra pasiskirsčiusi platesniame diapazone (25,23–33,15 mg TE/g). Čia taip pat matoma, kad didžiausias antioksidacinis aktyvumas (33,15 ir 32,47 mg TE/g) yra likučio, kuris buvo fermentuotas esant pH=4,5. Ta pati tendencija pastebima atlikus ORAC metodą, vertės kinta nuo 24,05 iki 32,82 mg TE/g ir didžiausias antioksidacinis aktyvumas yra I SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5 ir II SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5, atitinkamai 32,82 ir 27,78 mg TE/g.

28 lentelė. Liekanos prieš ir po fermentinės hidrolizės bei po ekstrakcijos vandeniu padidintame slėgyje antioksidacinių savybių įvertinimas

Frakcijos	BFJK	DPPH•	ABTS•+	ORAC
	mg GRE/g		mg TE/g	
I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH	7,83±0,12	5,33±0,15	32,79±1,62	63,72±5,81
II SKE-CO ₂ /Acet/EtOH	7,83±0,13	4,65±0,15	31,35±1,38	60,87±4,22
Po I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=3,5	4,56±0,08 ^b	2,54±0,08 ^b	25,23±1,36 ^a	26,49±1,74 ^a
Po I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=4,5	7,22±0,31 ^d	2,68±0,07 ^b	33,15±1,40 ^b	32,82±3,10 ^b
Po II SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=3,5	3,58±0,07 ^a	2,26±0,18 ^a	25,91±1,55 ^a	24,05±2,34 ^a
Po II SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=4,5	5,83±0,07 ^c	2,61±0,06 ^b	32,47±1,09 ^b	27,78±2,41 ^a
Po I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=3,5/H ₂ O	2,13±0,04 ^a	2,42±0,10 ^a	11,37±0,74 ^a	4,02±0,40 ^{ab}
Po I SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=4,5/H ₂ O	2,71±0,12 ^b	2,66±0,09 ^b	24,06±1,15 ^d	5,62±0,42 ^c
Po II SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=3,5/H ₂ O	1,99±0,03 ^a	2,35±0,16 ^a	19,37±1,15 ^b	3,48±0,16 ^a
Po II SKE-CO ₂ /Acet/EtOH/pH=4,5/H ₂ O	2,63±0,12 ^b	2,54±0,09 ^{ab}	21,72±1,21 ^c	4,50±0,19 ^b

Nurodytos vidutinės penkių pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje iki brūkšnio nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, (p < 0.05).

Norint maksimaliai išskirti bioaktyvius junginius iš likusios po fermentinės hidrolizės liekanos, buvo atlikta ekstrakcija vandeniu padidintame slėgyje. Iš gautų rezultatų matoma, kad liekanos turi labai mažus likusius antioksidacinių junginių kiekius. Fenolinių junginių kiekis kinta nuo 1,99 iki 2,71 mg GRE/g. Didesni jų kiekiai gauti I SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5/H₂O ir II SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5/H₂O, atitinkamai 2,71 ir 2,63 mg GRE/g. Radikalų blukinimo metodai DPPH•, ABTS•+ bei laisvųjų deguonies radikalų surišimo geba (ORAC) irgi parodė tokius pačius rezultatus, kad didesnės antioksidacinės vertės gautos su I SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5/H₂O ir II SKE-CO₂/Acet/EtOH/pH=4,5/H₂O liekanomis. Mažos antioksidacinių junginių vertės liekanose parodo, kad kompleksiskai taikant įvairius ekstrakcijų

metodus (rafinuojant biožaliavą) (žr. 12 pav.) buvo maksimaliai išskirti bioaktyvieji junginiai iš tiriamosios žaliavos.

3.7. Lipofilinių ekstraktų oksidacinio stabilumo įvertinimas

Riebalų oksidacija riboja aliejų naudojimo galimybes maisto pramonėje ir įvairių papildų gamyboje. Oksidacijos produktų kiekio nustatymas yra svarbus maisto kokybei ir saugai [114]. Oksidacinis stabilumas parodo aliejaus atsparumą deguoniui. Nesočiųjų riebalų rūgščių oksidacijos metu susiformuoja blogą skonį suteikiantys junginiai ir sumažinama maistinė aliejaus vertė [115]. Hidroperoksidadai yra pirminiai oksidacijos produktai, kurie yra nestabilūs ir lengvai skyla į alkoholius, aldehidus ir ketonus [116]. Tai yra pagrindiniai junginiai, kurie suteikia produktui apkartusį skonį [117].

3.7.1. Peroksidų kiekio nustatymas lipofiliniuose ekstraktuose

Nemažai yra metodų skirtų įvertinti maisto produktų oksidasidacijai. Šie metodai yra pagrįsti pirminių ir antrinių oksidacijos produktų matavimu [118]. Literatūroje randama labai daug tyrimų metodų, kuriais galima įvertinti maisto produktų ir aliejų oksidacijos vertes. Vienas iš metodų yra peroksidų skaičiaus nustatymas [119]. Šiuo metodu tiesiogiai yra nustatoma hidroperoksidų koncentraciją, kuri parodo pradinių oksidacijos produktų kiekį [120].

Titruojamasis peroksidų kiekis buvo nustatytas ekstraktuose, kurie buvo gauti atliekant įvairius ekstrakcijos metodus (žr. 12 pav.). Tam kad aliejus būtų tinkamas naudoti pramonėje, jo peroksidų vertė neturi viršyti 10 mekv O₂/1000g [121]. Gauti rezultatai pateikiami 29 lentelėje.

Peroksidų skaičius tirtuose ekstraktuose kinta plačiose vertėse nuo 1,79 iki 9,58 mekv O₂/1000 g. Mažiausias peroksidų skaičius nustatytas EPS heks 0,23–0,5 mm ekstrakto (1,79 mekv O₂/1000 g), o didžiausias - I SKE-CO₂ 0,23-0,5 mm (9,58 mekv O₂/1000 g). Palyginus ekstraktų pagal naudotus ekstrakcijos metodus pastebima, kad mažiausią PS vertę turi ekstraktai gauti ekstrakcijos padidintame slėgyje heksanu metodu (1,79-2,55 mekv O₂/1000 g). Mažas peroksidų kiekis gautas dėl to, kad ekstrakcija vyksta trumpą laiką (20 min), esant aukštai temperatūrai (120 °C) dideliame slėgyje (1,03 MPa) bei azoto dujų aplinkoje. Didesnis PS kiekis nustatytas ekstraktuose gautuose Soksleto metodu (3,15–5,03 mekv O₂/1000 g). Didesnį peroksidų kiekį galėjo įtakoti tai, kad ekstrakcija vyko ilgą laiką (360 min) aukštoje temperatūroje bei atmosferos sąlygomis. Daugiausiai riebalų oksidacijos produktų nustatyta ekstraktuose, kurie išgauti vykdant SKE-CO₂ (5,25–9,58 mekv O₂/1000 g). SKE-CO₂ metu galėjo būti išskirti komponentai, kurie greitai oksiduojasi bei skatina prooksidacinius procesus.

Iš gautų rezultatų galima padaryti išvadą, kad riebalų oksidacijos produktų kiekis ekstraktuose priklauso nuo atliekamų ekstrakcijos proceso bei naudotų sąlygų: trukmės, slėgio ir

temperatūros. Ekstraktuose nustatytas peroksidų skaičius neviršija tinkamumo vartoti ribų ir gali būti naudojami tolimesniuose tyrimuose.

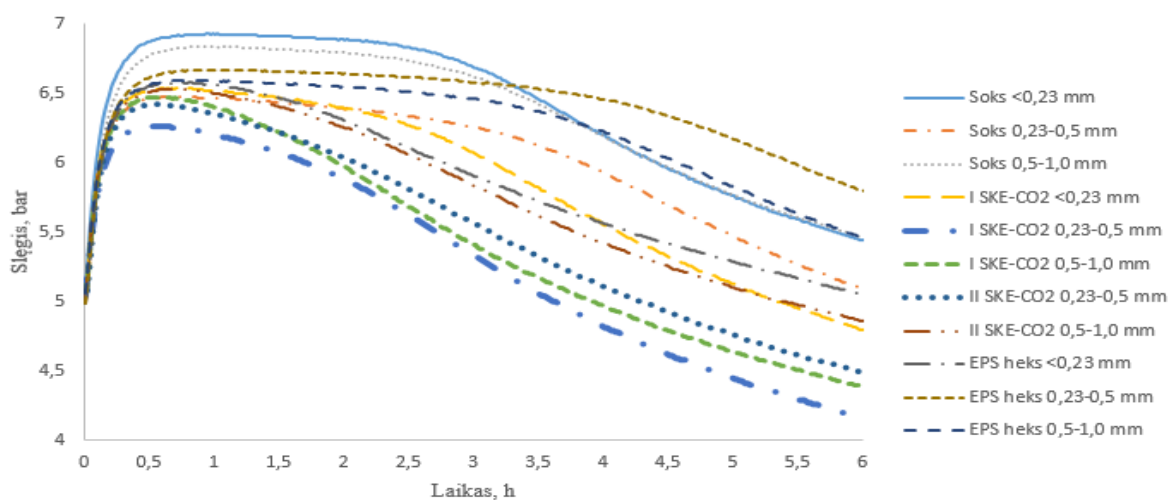
29 lentelė. Peroksidų kiekis ekstraktuose

Frakcijos	PS , mekv O ₂ /1000 g
Soks <0,23 mm	3,91±0,07 ^d
Soks 0,23–0,5 mm	3,15±0,00 ^c
Soks 0,5–1,0 mm	5,03±0,07 ^e
I SKE-CO ₂ <0,23 mm	5,25±0,10 ^e
I SKE-CO ₂ 0,23–0,5 mm	9,58±0,05 ^g
I SKE-CO ₂ 0,5–1,0 mm	7,17±0,04 ^f
II SKE-CO ₂ 0,23–0,5 mm	7,26±0,13 ^f
II SKE-CO ₂ 0,5–1,0 mm	7,26±0,19 ^f
EPS heks <0,23 mm	1,99±0,11 ^a
EPS heks 0,23–0,5 mm	1,79±0,00 ^a
EPS heks 0,5–1,0 mm	2,55±0,02 ^b

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, (p < 0.05).

3.7.2. Lipofilinių ekstraktų oksidacinio stabilumo įvertinimas Oksipres metodu

Lipofilinių ekstraktų stabilumui įvertinti naudojamas Oksipres metodas. Šis metodas yra pagrįstas pagreitinotos oksidacijos stebėjimu. Matavimas vyksta tol kol užfiksuojami antriniai oksidacijos produktai. Oksidacinis stabilumas buvo nustatytas ekstraktuose, kurie buvo gauti atliekant įvairius ekstrakcijos metodus. Gauti rezultatai pateikiami 30 lentelėje ir 19 paveiksle.



19 pav. Tirtų ekstraktų indukciniai periodai valandomis

Indukcinių periodų vertės pasiskirstę plačiame intervale nuo 1,10 iki 3,97 h. Trumpiausias laikas ekstrakto I SKE-CO₂ 0,23-0,5 mm (1,10 h), o ilgiausias - EPS heks 0,23–0,5 mm (3,97 h). Palyginus ekstraktus pagal naudotus ekstrakcijos metodus pastebima, kad ilgiausias indukcijos periodas yra tų ekstraktų, kurie buvo gauti ekstrakcijos padidintame slėgyje heksanu metu 3,24–3,97 h. Nežymiai trumpesnis laikas, kol užfiksuojami oksidacijos procesai yra ekstraktų išskirtų Soksleto ekstrakcijos metodu (2,69–3,13 h). Greičiausiai oksidinasi ekstraktai gauti vykdant SKE-CO₂, šių ekstraktų IP yra nuo 1,10 iki 2,35 h. Atliekant ekstrakciją anglies dioksidu išekstrahuojami įvairūs lipidai (pvz. fosfolipidai), kurie skatina ekstrakto prooksidaciją. Iš gautų rezultatų pastebima ta pati tendencija, kaip ir nustatinėjant peroksidų skaičių ekstraktuose. Stabilumui didžiausią įtaką daro ekstrakcijos metu palaikomos sąlygos, kurių svarbiausios yra temperatūra, laikas ir slėgis.

30 lentelė. Tirtų ekstraktų indukciniai periodai valandomis

Frakcijos	IP, h
Soks <0,23 mm	2,99±0,04 ^f
Soks 0,23–0,5 mm	3,13±0,03 ^{fg}
Soks 0,5–1,0 mm	2,69±0,04 ^e
I SKE-CO ₂ <0,23 mm	1,74±0,03 ^c
I SKE-CO ₂ 0,23–0,5 mm	1,10±0,02 ^a
I SKE-CO ₂ 0,5–1,0 mm	2,35±0,01 ^d
II SKE-CO ₂ 0,23–0,5 mm	1,47±0,01 ^b
II SKE-CO ₂ 0,5–1,0 mm	1,52±0,06 ^b
EPS heks <0,23 mm	3,62±0,05 ^h
EPS heks 0,23–0,5 mm	3,97±0,02 ^j
EPS heks 0,5–1,0 mm	3,24±0,10 ^g

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, (p < 0.05).

Mokslinėje literatūroje nepavyko rasti judros lipofilinio ekstrakto oksidacinio stabilumo tyrimų Oksipres metodu. Todėl buvo ieškota informacijos apie kitų bastutinių (lot. *Brassicaceae*) šeimos aliejingų augalų (kaip garstyčios, rapsai) aliejų tyrimus. V. Kraujalienė ir kiti (2016) atliko kontrolinį bandymą su dezodoruotu rapsų aliejumi „Tyras“ (Obelių Aliejus, Lietuva), kurio sudėtyje nėra jokių antioksidantų. Šio aliejaus indukcinis periodas – 2,18 h [122]. Palyginus rapsų aliejaus ir judros lipofilinių ekstraktų, gautų įvairiais ekstrakcijos metodais, indukcinis periodus matoma, kad rapsų aliejaus IP yra panašiausias į I SKE-CO₂ 0,5–1,0 mm (2,35 h). Soksleto ekstrakcijos ir ekstrakcijos padidintame slėgyje heksanu metodais gautų ekstraktų IP yra nuo 0,5

iki 1,7 h ilgesni nei rapsų aliejaus. O ekstraktų išskirtų superkrizinis CO₂ ekstrakcijos metodais IP yra mažesnis nuo 0,4 iki 1,1 h mažesnis, nei rapsų.

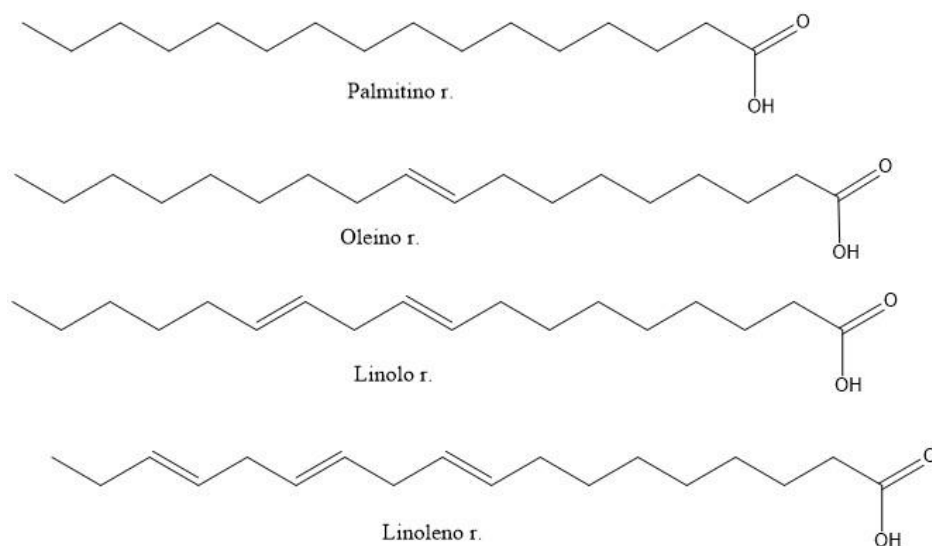
3.8. Judros lipofilinių ekstraktų bioaktyviųjų junginių nustatymas

3.8.1. Riebalų rūgščių kompozicijos nustatymas

Riebalai yra viena iš maistinių medžiagų svarbių žmogaus mityboje. Metabolizmo metu susidaro daug biologiškai aktyvių lipidų molekulių, kurios dažniausiai veikia kaip tarpininkai perduodant signalus ir taip pat yra ląstelių sienelių komponentai. Bet kokie pokyčiai metabolizmo grandinėje sukelia membranos sudėties modifikacijas, pakinta pralaidumas, taip pat sutrinka signalu perdavimas. Dėl šių priežasčių gali atsirasti pataloginiai pokyčiai, kaip vėžys, širdies ir kraujagyslių ligos, medžiagų apykaitos sutrikimai [120, 123, 124, 125]. Lipidai susideda iš riebalų rūgščių, kurios yra skirstomos pagal dvigubuosius ryšius – sočiosios RR (neturi dvigubųjų ryšių), mononesočiosios RR (viena dviguba jungtis), polinesočiosios (2–6 dvigubi ryšiai). Žmogaus organizmas negali sintetinti polinesočiųjų RR, kuriuose pirmas dvigubas ryšys yra prie 3 (ω -3) arba 6 (ω -6) anglies atomo, t.y. nepakeičiamos RR, kurias žmogus turi gauti su maistu [126, 127]. Linoleno, dokozaheksaeno, eikozapentaeno rūgštys priklauso ω -3 RR grupei, o linolo ir archidono rūgštys - ω -6 grupei [128, 129]. Vienas iš svarbiausių veiksnių, nusakančių aliejaus maistinę vertę yra RR sudėtis.

Judros lipofilinių ekstraktų, gautų įvairiais ekstrakcijos metodais, riebalų rūgščių kompozicijos sudėtis pateikiama 31 lentelėje. Tirtuose ekstraktuose didžiausias kiekis nustatytas palmitino (C16:0) RR, kurios kiekis yra nuo 5,15 iki 8,18 % nuo bendro chromatogramos smailių ploto. Mažesniu kiekiu aptikta stearino r. (C18:0) (2,02–2,70 % nuo bendro chromatogramos smailių ploto). Taip pat dalyje tirtų ekstraktų yra nesočioji RR arachidino, kurios kiekis kinta nuo 1,04 iki 1,50 % nuo bendro chromatogramos smailių ploto. Mononesočiosios RR - oleino r. (C18:1) nuo 14,05 iki 16,79 % nuo bendro chromatogramos smailių ploto ir eikozano r. (C20:1) nuo 8,23 iki 16,95 % nuo bendro chromatogramos smailių ploto. Aštuoniuose ekstraktuose yra eruko r. (C22:1) (1,23-2,24 % nuo bendro chromatogramos smailių ploto). Didžiausiu kiekiu judros ekstraktuose buvo nustatyta polinesočioji RR (Omega-3) linoleno r. (C18:3) 24,20-38,12 % nuo bendro chromatogramos smailių ploto. Sekanti pagal kiekį yra (omega-6) linolo r. (C18:2), kurios kiekis ekstraktuose kito nuo 15,69 iki 18,83 % nuo bendro chromatogramos smailių ploto. Taip pat visuose tirtuose mėginiuose mažais kiekiais buvo identifikuota polinesočioji RR eikozadienoeno r. (C20:2) apie 1–2 % nuo bendro chromatogramos smailių ploto. Iš gautų rezultatų matoma, kad judros lipofiliniai ekstraktai yra geri nepakeičiamųjų omega-3 ir omega-6 polinesočiųjų RR ir mononesočiosios oleino rūgšties šaltinis. Pagrindinių riebalų rūgščių struktūrinės formulės pateikiamos 20 paveiksle.

Literatūroje galima rasti labai daug atliktų tyrimų, kurių metu iširta judros aliejaus riebalų rūgščių kompozicija. Pavyzdžiui, *Singh* ir kiti (2014) nustatė, kad judros aliejus yra geras šių riebalų rūgščių šaltinis: palmitino (C16:0) – 6,43 %, stearino (C18:0) – 2,60 %, oleino (C18:1) – 14,81 %, eikozano (C20:1) – 16,97 %, eruko (C22:1) – 8,43 %, linolo (C18:2) – 18,12 %, linoleno (C18:3) – 32,57 % [130]. *Rodríguez-Rodríguez* ir kiti (2013) nustatė, kad judros aliejuje riebalų rūgščių kiekiai yra šie: palmitino (C16:0) – 6,1–7,6 %, stearino (C18:0) – 2,3–3,5 %, oleino (C18:1) – 14,3–18,9 %, linolo (C18:2) – 18,6–24,4 %, linoleno (C18:3) – 26,8–32,4 %, eikozano (C20:1) – 13,3–15,3 %, eruko (C22:1) – 2,2–3,4 % [131]. Abiejų tyrėjų duomenys sutampa, tik *Singh* ir kiti (2014) eikozano rūgštis nustatė ~1 % daugiau, o eruko rūgštis judros aliejuje nustatė 3–4 kartus daugiau. Palyginus šiuos duomenis su šio darbo rezultatais, pastebima, kad rezultatai yra labai panašūs. Nežymūs skirtumai pastebimi dėl naudotų skirtingų ekstrakcijos metodų ir sąlygų, nustatymo metodų, judros augimo sąlygų ir naudotas eksperimentams judros porūšis.



20 pav. Pagrindinių riebalų rūgščių judros lipofiliniuose ekstraktuose struktūrinės formulės

31 lentelė. Riebalų rūgščių kompozicijos sudėtis

Frakcijos	Palmitino r. (C16:0)	Stearino r. (C18:0)	Oleino r. (C18:1)	Linolo r. (C18:2)	Arachidino r. (C20:0)	Eikozano r. (C20:1)	Linoleno r. (C18:3)	Eikozadieno r. (C20:2)	Eruko r. 8,43 (C22:1)
Soks <0,23 mm	6,56±0,59 ^{cde}	2,37±0,01 ^{ab}	14,70±0,18 ^{abcd}	17,56±0,33 ^{cd}	-	11,20±0,15 ^b	38,02±0,82 ^e	1,52±0,15 ^{bcd}	1,54±0,16 ^a
Soks 0,23-0,5 mm	6,31±0,31 ^{cd}	2,02±0,02 ^a	14,05±0,04 ^a	18,10±0,11 ^{de}	1,21±0,02 ^b	13,41±0,62 ^c	36,13±0,32 ^{cd}	1,66±0,05 ^{cd}	2,15±0,15 ^b
Soks 0,5-1,0 mm	6,61±0,03 ^{cde}	2,70±0,35 ^b	16,79±0,09 ^f	18,28±0,35 ^{de}	-	8,23±0,01 ^a	24,20±0,04 ^a	1,09±0,02 ^a	-
I SKE-CO ₂ <0,23 mm	5,73±0,26 ^{abc}	2,38±0,01 ^{ab}	14,40±0,05 ^{ab}	16,92±0,01 ^{bc}	1,23±0,02 ^b	14,01±0,10 ^c	37,33±0,05 ^{de}	1,72±0,03 ^d	2,21±0,06 ^b
I SKE-CO ₂ 0,23-0,5 mm	7,20±0,14 ^{def}	2,42±0,00 ^{ab}	14,89±0,02 ^{bcde}	18,72±0,01 ^e	-	10,69±0,10 ^b	38,12±1,45 ^e	1,36±0,02 ^b	1,23±0,02 ^a
I SKE-CO ₂ 0,5-1,0 mm	5,47±0,19 ^{ab}	2,32±0,01 ^{ab}	14,52±0,02 ^{abc}	16,38±0,08 ^{ab}	1,21±0,02 ^b	13,92±0,15 ^c	38,09±0,02 ^e	1,72±0,02 ^d	2,24±0,04 ^b
II SKE-CO ₂ 0,23-0,5 mm	7,70±0,45 ^f	2,48±0,01 ^b	14,62±0,07 ^{abcd}	18,83±0,13 ^e	1,04±0,06 ^a	11,37±0,54 ^b	36,73±0,17 ^{cde}	1,47±0,05 ^{bc}	1,60±0,11 ^a
II SKE-CO ₂ 0,5-1,0 mm	7,49±0,50 ^{ef}	2,47±0,02 ^b	15,58±0,38 ^e	17,23±0,44 ^c	-	11,45±1,25 ^b	38,12±0,87 ^e	1,45±0,15 ^b	1,52±0,42 ^a
EPS heks <0,23 mm	7,48±0,32 ^{ef}	2,70±0,35 ^b	15,27±0,37 ^{cde}	17,53±0,48 ^{cd}	-	11,44±0,25 ^b	36,54±0,68 ^{cde}	1,42±0,02 ^b	1,57±0,05 ^a
EPS heks 0,23-0,5 mm	8,12±0,35 ^f	2,68±0,00 ^b	15,05±0,15 ^{bcde}	18,47±0,26 ^e	1,21±0,08 ^b	12,06±0,67 ^b	35,05±0,39 ^{bc}	1,49±0,05 ^{bc}	-
EPS heks 0,5-1,0 mm	5,15±0,02 ^a	2,61±0,00 ^b	15,36±0,74 ^d	15,69±0,08 ^a	1,50±0,01 ^c	16,95±0,39 ^d	33,53±0,32 ^b	1,93±0,01 ^e	-

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, $p < 0.05$).

3.8.2. Tokoferolių kiekio įvertinimas

Grupė junginių, kurie yra tirpūs riebaluose ir yra vitamino E dariniai, yra vadinami bendrinio pavadinimu – tokoferoliais. Jie veikia kaip antioksidantai ir yra iš sėklų gaunamo aliejaus komponentas. Tokolių kiekis ir sudėtis priklauso nuo augalo rūšies bei veislės. Norint įvertinti tokoferolių biologinį efektyvumą, svarbu žinoti bendrą tokoferolių sumą, bei atskirų tokoferolių izomerų kiekį [132]. Tokoferolių identifikavimui ir jų kiekio nustatymui lipofiliniuose ekstraktuose atlikta efektyvioji skysčių naudojant atvirkštines fazes ir yra nustatoma šoninė grandinės struktūra bei metilo grupių skaičius.

Pastebėta, kad judros ekstraktai, gauti atlikus įvairius ekstrakcijos metodus, savo sudėtyje turi palyginus nemažus kiekius tokoferolių (žr. 32 lentelė). Bendras tokoferolių kiekis ekstraktuose kinta nuo 382,45 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto iki 985,38 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto. Didžiausias šių junginių kiekis nustatytas ekstraktuose, gautuose atliekant Soksleto ekstrakciją (860,77–985,38 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto). Panašus kiekis tokoferolių identifikuotas ekstraktuose gautuose po I SKE-CO₂ ir EPS heks, atitinkamai 662,44–776,29 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto ir 638,39–700,39 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto. Mažiausiai šių junginių rasta ekstraktuose po II SKE-CO₂ (382,45–392,58 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto). Palyginus bendrą tokoferolių kiekį sėklose, pastebima, kad didžiausias tokoferolių kiekis 309,80–398,41 $\mu\text{g/g}$ sėklų gautas atliekant tradicinę ekstrakcijos metodą – Soksleto ekstrakciją. Mažesnis kiekis šių antioksidantų nustatytas atlikus I SKE-CO₂ ir EPS heks, atitinkamai 139,81–335,00 $\mu\text{g/g}$ sėklų ir 164,24–285,93 $\mu\text{g/g}$ sėklų. Mažiausiai tokoferolių identifikuota 114,39–138,77 $\mu\text{g/g}$ sėklų atliekant II SKE-CO₂.

Judros ekstraktuose identifikuoti γ -T ir δ -T (žr. 21 pav.). γ -T kiekis ekstraktuose kinta plačiame intervale nuo 360,80 iki 960,45 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto. Didžiausias kiekis nustatytas 836,65–960,45 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto atlikus Soksleto ekstrakciją, o mažiausiai (apie 2,5 karto mažiau) rasta 360,80–371,04 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto atlikus II SKE-CO₂. Ekstraktuose esantis δ -T kiekis ženkliai nesiskiria 20,30–26,86 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto. Didžiausias kiekis identifikuotas 24,12–26,86 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto atlikus Soksleto ekstrakciją. Po II SKE-CO₂ ir EPS heks gauti ekstraktai turi mažiausią šio junginio kiekį, atitinkamai 21,54–21,65 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto ir 20,30–22,21 $\mu\text{g/g}$ ekstrakto. Iš gautų rezultatų matoma, kad efektyviausias metodas, norint išskirti kuo didesnę tokoferolių kiekį, yra Soksleto ekstrakcija.

32 lentelė. Tokoferolių kiekiai tirtuose judros lipofiliniuose ekstraktuose

Frakcijos	γ-tokoferolis		δ-tokoferolis		Bendras tokoferolių kiekis	
	μg/g ekstrakto	μg/g sėklų	μg/g ekstrakto	μg/g sėklų	μg/g ekstrakto	μg/g sėklų
Soks <0,23 mm	836,65±2,02 ^g	387,25±0,94 ^j	24,12±1,06 ^{bc}	11,16±0,49 ^e	860,77	398,41
Soks 0,23–0,5 mm	945,17±1,57 ^h	330,62±0,55 ⁱ	26,86±0,41 ^d	9,39±0,14 ^d	972,03	340,01
Soks 0,5–1,0 mm	960,45±4,09 ^j	301,96±1,29 ^g	24,93±1,64 ^{cd}	7,84±0,52 ^c	985,38	309,80
I SKE-CO ₂ <0,23 mm	752,81±5,15 ^f	324,87±2,22 ^h	23,48±0,64 ^{bc}	10,13±0,28 ^d	776,29	335,00
I SKE-CO ₂ 0,23–0,5 mm	702,99±5,08 ^e	240,25±1,74 ^e	23,70±0,96 ^{bc}	8,10±0,33 ^c	726,69	248,35
I SKE-CO ₂ 0,5–1,0 mm	640,93±5,52 ^c	135,27±1,16 ^b	21,51±1,09 ^{ab}	4,54±0,23 ^a	662,44	139,81
II SKE-CO ₂ 0,23–0,5 mm	371,04±2,76 ^a	131,16±0,98 ^b	21,54±1,09 ^{ab}	7,61±0,39 ^c	392,58	138,77
II SKE-CO ₂ 0,5–1,0 mm	360,80±6,67 ^a	107,91±2,00 ^a	21,65±0,35 ^{ab}	6,48±0,10 ^b	382,45	114,39
EPS heks <0,23 mm	616,79±6,91 ^b	276,26±3,09 ^f	21,60±0,71 ^{ab}	9,67±0,32 ^d	638,39	285,93
EPS heks 0,23–0,5 mm	678,59±3,42 ^d	225,19±1,13 ^d	22,21±0,32 ^{ab}	7,37±0,11 ^{bc}	700,39	234,86
EPS heks 0,5–1,0 mm	630,68±5,27 ^j	159,12±1,33 ^c	20,30±0,79 ^d	5,12±0,20 ^a	650,98	164,24

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN. Skirtingos mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus (ANOVA ir Tukey's kriterijus, (p < 0.05).

Iš 33 lentelėje pateiktų duomenų matoma, kad bendrai ekstraktuose buvo identifikuota 19 junginių. Fragmentacijos metu susidaręs jonas $[M-H]^-$ $m/z=195,051$ atitiko formulę $C_6H_{11}O_7$. Junginys identifikuotas kaip gliukono r. **(1)**. Junginio **(2)** molekuliniam jonui $[M-H]^-$ $m/z=179,0561$ priskirta formulė $C_6H_{11}O_3$ ir ši junginys nustatytas kaip gliukozė. Jonas $[M-H]^-$ $m/z=341,1089$ atitiko formulę $C_{12}H_{21}O_{11}$. Junginys identifikuotas kaip sachrozė **(3)**. Analizuojant junginius **(4)**, **(5)** ir **(6)** atitinkamai nustatyti susidarę jonai $[M-H]^-$ $m/z=133,0142$, $m/z=191,056$ ir $m/z=191,0197$, kuriems priskiriamos formulės $C_4H_5O_5$, $C_7H_{11}O_6$ ir $C_6H_7O_7$. Šie junginiai identifikuoti kaip obuolių r., chino r. ir citrinų r. Junginio **(7)** formulė $C_9H_9O_5$ ir molekulinio jono $[M-H]^-$ $m/z=197,0455$ identifikuota kaip siringo r. Junginių **(8)** ir **(9)** molekuliniai jonai $[M-H]^-$ $m/z=153,0193$ ir $m/z=137,0244$ atitiko molekulinės formules $C_9H_9O_5$ bei $C_7H_5O_3$ ir buvo identifikuotas kaip dihidroksibenzoininė r. ir hidroksibenzoininė r. Fragmentacijos metu susidaręs jonas $[M-H]^-$ $m/z=451,1246$ atitiko formulę $C_{21}H_{23}O_{11}$. Junginys identifikuotas kaip katechino heksosidas **(10)**. Junginio **(11)** molekuliniam jonui $[M-H]^-$ $m/z=179,0350$ priskirta formulė $C_9H_7O_4$ ir ši junginys nustatytas kaip kavos r. Junginio **(12)** formulė $C_{27}H_{29}O_{16}$ ir molekulinis jonas $[M-H]^-$ $m/z=609,1461$ identifikuota kaip rutinas. Junginių **(13)** ir **(14)** molekuliniai jonai $[M-H]^-$ $m/z=295,2279$ ir $m/z=297,2435$ atitiko molekulinės formules $C_{18}H_{31}O_3$ bei $C_{18}H_{33}O_3$ ir buvo identifikuotas kaip hidroksioktadekadieninė r. ir hidroksioktadekeninė r. Junginio **(15)** formulė $C_{14}H_{21}O$ ir molekulinis jonas $[M-H]^-$ $m/z=205,1598$ identifikuotas kaip oktilfenolis. Taip pat buvo identifikuotos linoleno **(16)**, linolo **(17)**, palmitino **(18)** ir eruko **(19)** riebalų rūgštys, kurių molekuliniai jonai yra $[M-H]^-$ $m/z=277,2173$, $[M-H]^-$ $m/z=279,233$, $[M-H]^-$ $m/z=255,233$ ir $[M-H]^-$ $m/z=337,3113$ bei atitiko molekulinės formules $C_{18}H_{29}O_2$, $C_{18}H_{31}O_2$, $C_{16}H_{31}O_2$ ir $C_{22}H_{41}O_2$. 33 junginiai nebuvo identifikuoti dėl sudėtingos ekstraktų bioaktyvių junginių kompozicijos.

Mažiausiai nustatyta ir identifikuota junginių lipofiliniuose ekstraktuose, o daugiausiai – I SKE-CO₂/Acet/EtOH/H₂O ir II SKE-CO₂/Acet/EtOH/H₂O. Visuose ekstraktuose buvo identifikuoti šie pikai – **(14)** hidroksioktadekeninė r. (6,4 min, 297,2435 m/z, C₁₈H₃₃O₃), **(15)** oktilfenolis (6,7 min, 205,1598 m/z, C₁₄H₂₁O).

33 lentelė. Judros sėklų ekstraktų nustatytų junginių smailių plotai

Smailės nr.	RT, min	MS [M-H] ⁺ m/z	Formulė [M-H]	Junginys	Junginių smailių plotai, sutartiniai vienetai									
					Soks 0,23-0,5 mm	I SKE-CO ₂ 0,23-0,5 mm	II SKE-CO ₂ 0,23-0,5 mm	EPS heks 0,23-0,5 mm	I SKE-CO ₂ /Acet	II SKE-CO ₂ /Acet	I SKE-CO ₂ /Acet/ EtOH	II SKE-CO ₂ /Acet/ EtOH	I SKE-CO ₂ /Acet/ EtOH/H ₂ O	II SKE-CO ₂ /Acet/ EtOH/H ₂ O
1	0,3	195,051	C ₆ H ₁₁ O ₇	Gliukono r.	-	-	-	-	-	-	-	2645	43521	49115
2	0,3	179,0561	C ₆ H ₁₁ O ₆	Gliukozė	-	-	-	-	-	-	-	1137	7348	9626
3	0,4	341,1089	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	Sacharozė	-	-	-	-	-	28686	14942	155445	76501	84426
4	0,4	133,0142	C ₄ H ₅ O ₅	Obuolių r.	-	-	-	-	-	-	-	-	26291	18900
5	0,4	191,056	C ₇ H ₁₁ O ₆	Chino r.	-	-	-	-	-	-	-	-	4393	8514
6	0,9	191,0197	C ₆ H ₇ O ₇	Citrinų r.	-	-	-	-	-	-	-	-	85981	85319
7	1,3	197,0455	C ₉ H ₉ O ₅	Siringo r.	-	-	-	-	-	-	1034	-	-	1360
8	1,4	153,0193	C ₇ H ₅ O ₄	Dihidroksibenzoininė r	-	-	-	-	-	1636	-	2345	1885	1479
9	1,7	137,0244	C ₇ H ₅ O ₃	Hidroksibenzoininė r.	-	-	-	-	-	1774	-	3838	1275	2032
10	1,7	451,1246	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₁	Katechino heksosidas	-	-	-	-	-	8799	2454	43848	4330	4786
11	1,9	179,0350	C ₉ H ₇ O ₄	Kavos r.	-	-	-	-	-	-	-	-	1067	1317
12	2,2	609,1461	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	Rutinas	-	-	-	-	1079	9963	11933	227190	13156	4198
13	6,1	295,2279	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	Hidroksioktadekadieninė r.	-	1570	1915	1944	2007	3247	2517	-	1049	-
14	6,4	297,2435	C ₁₈ H ₃₃ O ₃	Hidroksioktadekeninė r.	7755	7398	5710	6219	8481	7911	7546	12345	10366	10640
15	6,7	205,1598	C ₁₄ H ₂₁ O	Oktilfenolis	53175	50703	49358	51643	52660	54432	53800	55666	53145	53695
16	7,6	277,2173	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	Linoleno r.	87087	106820	100732	88639	106112	68445	30467	4310	-	-
17	8,1	279,233	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	Linolo r.	50476	57421	55901	55402	70174	62939	22578	7485	-	-
18	8,6	255,233	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	Palmitino r.	12508	12596	12979	12136	16004	15911	10326	7669	-	-
19	9,9	337,3113	C ₂₂ H ₄₁ O ₂	Eruko r.	27798	31389	34129	25168	21034	11521	13900	4864	-	-

IŠVADOS

1. Įvertinus judros sėklų cheminių medžiagų sudėtį, buvo nustatyta, kad sėklose yra 6,14 g/100g drėgmės, baltymų – 21,52 g/100 g, riebalų – 37,82 g/100 g, o pelenų kiekis 4,21 g/100 g.
2. Atlikus ekstrakciją superkritiniu CO₂ pirmomis sąlygomis (40 °C, 36 MPa, 240 ir 360 min) su <0,23 mm, 0,23-0,5 mm ir 0,5-0,1 mm frakcijomis atitinkamai išskirtas ekstraktų kiekis – 43,16 g/100 g, 34,18 g/100 g ir 21,11 g/100 g. O atlikus ekstrakciją antromis sąlygomis (70 °C, 45 MPa, 270 min) su 0,23-0,5 mm ir 0,5-1,0 mm frakcijomis, atitinkamai išskirti šie ekstraktų kiekiai – 35,35 g/100 g ir 29,91 g/100 g. Soksleto ekstrakcijos metu iš <0,23 mm frakcijos išskirta – 46,29 g/100 g ekstrakto, kurio kiekis yra 3 % didesnis, nei taikant superkritinę CO₂ ekstrakciją. Su 0,23-0,5 mm sėklų frakcija atlikus Soksleto ekstrakciją gaunama ekstrakto išeiga (34,98 g/100 g) labai panaši, kaip ir išeiga gauta, pritaikius superkritinę CO₂ ekstrakciją. Atlikus Soksleto ekstrakciją su <0,23 mm frakcija yra gaunama mažiausia išeiga (31,44 g/100 g), kuri yra 1 - 10 % didesnė nei atliekant superkritinę CO₂ ekstrakciją su ta pačia sėklų frakcija. Judros sėklų ekstraktai išskirti taikant Soksleto ekstrakciją pasižymėjo 2 kartus didesne reaktyvių deguonies radikalų surišimo geba (92,75–101,04 mg TE/g ekstrakto), nei ekstraktai gauti taikant superkritinę CO₂ ekstrakciją (44,49–57,16 mg TE/g ekstrakto). Atlikus QUENCHER procedūrą ir antioksidacinę aktyvumą išmatavus *Folin-Ciocalteu's*, DPPH[•] ir ABTS^{•+} metodais matoma, kad didelio skirtumo tarp verčių liekanose po Soksleto ir superkritinės CO₂ ekstrakcijų nėra, o deguonies radikalų surišimo gebos matavimas parodė, kad liekana po Soksleto ekstrakcijos yra aktyvesnė.
3. Nustatytos optimalios ekstrakcijos heksanu padidintame slėgyje parametrų vertės didžiausiai aliejingo ekstrakto išeigai gauti: temperatūra 120 °C, laikas 20 min ir tirpiklio tūris 130 %. Esant optimalioms sąlygoms iš <0,23 mm frakcijos buvo išskirta 44,79 g ekstrakto iš 100 g sėklų, 0,23-0,5 mm – 33,19 g/100 g sėklų ir 0,5-1,0 mm – 25,23 g/100 g sėklų. Įvertinta šių ekstraktų deguonies radikalų surišimo geba, kuri kito nuo 238,73–317,43 mg TE/g ekstrakto. Taip pat pritaikius QUENCHER procedūrą nustatytas bendras fenolinių junginių kiekis (7,91–14,96 mg GRE/g), atlikti radikalų blukinimo metodai DPPH[•] ir ABTS^{•+} (atitinkamai 15,12–37,83 mg TE/g ir 76,75–82,20 mg TE/g) bei išmatuota deguonies radikalų surišimo geba (28,26–54,23 mg TE/g).
4. Vykdamas judros sėklų liekanos (po superkritinės CO₂ ekstrakcijos) ekstrakciją skirtingo poliškumo tirpikliais (acetonu, etanoliu ir vandeniui) padidintame slėgyje, žymių skirtumų tarp gautų ekstraktų kiekiui nepastebėta. Didžiausiu fenolinių junginių kiekiu

pasižymėjo etanoliniai ekstraktai, o mažiausiu – vandenyje tirpūs ekstraktai. Atlikus radikalų blukinimo metodus DPPH[•] ir ABTS^{•+} buvo nustatyta, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymi etanoliniai ekstraktai, du kartus mažesniu – acetoniniai, o mažiausiu – vandeniniai. Ta pati priklausomybė pastabėta, atlikus deguonies radikalų surišimo gebos matavimus.

5. Atlikus fermentinę hidrolizę su kietu likučiu po ekstrakcijos etanolium padidintame slėgyje gauta nuo 11,47 iki 15,89 g tirpių medžiagų vandenyje iš 100 g fermentuojamos medžiagos. Su liekana likusia po fermentacijos atlikus ekstrakciją vandeniu padidintame slėgyje gaunama nuo 12,30 iki 16,11 g tirpių medžiagų iš 100 g sufermentuotos žaliavos. Ekstrakte po fermentacijos nustatytas bendras fenolinių junginių kiekis (16,50–19,69 mg GRE/ g ekstrakto), atlikti radikalų blukinimo metodai DPPH[•] ir ABTS^{•+} (atitinkamai 10,15–13,34 mg TE/g ekstrakto ir 104,08–109,13 mg TE/g ekstrakto), taip pat išmatuota deguonies radikalų surišimo geba (76,98–101,88 mg TE/g ekstrakto). Palyginus vandeninių ekstraktų gautų atlikus ekstrakcijas su liekana po ekstrakcijos etanolium ir fermentinės hidrolizės, matoma, kad didesniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymi vandeniniai ekstraktai gauti atliekant ekstrakciją vandeniu padidintame slėgyje su sufermentuota žaliava.
6. Aliejiniuose ekstraktuose nustatytas peroksidų skaičius kito nuo 1,79 iki 9,58 mekv O₂/1000 g. Peroksidų skaičius tirtuose aliejinguose ekstraktuose neviršijo leidžiamos nerafinuotiems aliejams 15 mekv O₂/1000 g ribos, todėl šie ekstraktai galėjo būti naudojami tolesniuose tyrimuose. Išmatavus lipofilinių ekstraktų oksidacinį stabilumą Oksipres metodu, gautos indukcinio periodo vertės kinta nuo 1,10 iki 3,97 h. Stabiliausi ekstraktai yra gauti vykdant ekstrakciją heksanu padidintame slėgyje, o mažiausiai stabilūs gauti superkryzinės CO₂ ekstrakcijos metodu.
7. Aliejinguose ekstraktuose dujų chromatografijos metodu buvo nustatyta riebalų rūgščių kompozicija. Ekstraktuose buvo nustatyta 10 riebalų rūgščių, iš kurių identifikuotos 9 (palmitino, stearino, arachidino, oleino, eikozano, eruko, linoleno, linolo, eikozadienoeno riebalų rūgštys). Efektyviosios skysčių chromatografijos metodu nustatyti tokoferolių kiekiai ekstraktuose. Bendras tokoferolių kiekis ekstraktuose yra nuo 382,45 µg/g ekstrakto iki 985,38 µg/g ekstrakto. Judros ekstraktuose identifikuoti γ-tokoferolis ir δ-tokoferolis, kurių ekstraktuose atitinkamai yra 360,80–960,45 µg/g ekstrakto ir 20,30–26,86 µg/g ekstrakto. Aliejinguose, acetoniniuose, etanoliniuose ir vandeniuose ekstraktuose ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu identifikuoti bioaktyvūs junginiai. Bendrai ekstraktuose identifikuota 19 junginių. Mažiausiai identifikuota junginių aliejinguose ekstraktuose,

o daugiausiai – vandeniniuose. Visuose ekstraktuose buvo identifikuoti šie du junginiai
– hidroksioktadekeninė r., oktilfenolis.

Literatūros sąrašas

1. WARAICH, E. A., et al. Camelina sativa, a climate proof crop, has high nutritive value and multiple-uses: a review. Australian Journal of Crop Science, 2013, pp. 1551–1559. ISSN 1835–2707;
2. PILGERAM, A. L., et al. Camelina sativa, A Montana Omega-3 and Fuel Crop. Issues in New Crops and New Uses, 2007;
3. ZUBR, J. Oil-seed crop: Camelina sativa. Industrial Crops and Products. 1997, pp. 113–119;
4. BUDIN, J. T., et al. Some Compositional properties of Camelina (*Camelina sativa* L.Crantz) seeds and oils. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1995, pp. 309–315;
5. FRANCIS, A., et al. The Biology of Canadian Weeds. Agriculture and Agri-Food Canada, 2009;
6. GHAMKHAR, K., et al. C. Camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz) as an alternative oilseed: molecular and ecogeographic analyses. Genome, 2010, pp. 558–567;
7. KNORZER, K. H. Entwicklung und Ausbreitung des Leindotters (*Camelina sativa* s.l.). [English abstract]. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 1978, pp. 187–195;
8. ENHRENSING, D. T., GUY, S. O. Camelina. Oilseed Crop, 2008;
9. KARVONEN, H. M., et al. Effect of alpha-linolenic acid rich Camelina sativa oil on serumfatty acid composition and serum lipids in hypercholesterolemic subjects. Metabolism, 2002, pp. 1253-1260;
10. HIXSON, S.M., et al. Full substitution of fish oil with camelina (*Camelina sativa*) oil, with partial substitution of fish meal with camelina meal, in diets for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its effect on tissue lipids and sensory quality. Food Chemistry, 2014, pp. 51-61;
11. YE, C.L., et al. The effects of camelina oil and solvent extracted camelina meal on the growth: carcass composition and hindgut histology of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr in freshwater. Aquaculture, 2016, pp. 397-404;
12. JA'SKIEWICZ, T., et al. Effect of the Camelina sativa oil on the performance, essential fatty acid level in tissues and fat-soluble vitamins content in the livers of broiler chickens. 2014, pp. 74-79;
13. HALMEMIES-BEAUCHET-FILLEAU, A., et al. Effect of plant oils and camelina expeller on milk fatty acid composition in lactating cows fed diets based on red clover silage. Journal of Dairy Science, 2011, pp. 4413-4430;

14. ZUBR, J. Unique dietary oil from *Camelina sativa* seed. *Agrofood industry*, 2011, pp. 42-46;
15. ABRAMOVIČ, H., ABRAM, V. Physico-chemical properties, composition and oxidative stability of camelina sativa oil. *Food Technology and Biotechnology*, 2005;
16. ZUBR, J. Dietary fatty acids and amino acids of *Camelina sativa* seed. *Journal of Food Quality*, 2002, pp. 451-462;
17. WANASUNDARA, J.P.D., et al. Process of aqueous protein extraction from Brassicaceae oilseeds. *Unites States Patent Application Publication*, 2010;
18. KNUDSEN, K.E.B., BETTY, W.L. Determination of Oligosaccharides in Protein-Rich Feedstuffs by Gas-Liquid Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991;
19. ZUBR, J. Carbohydrates, vitamins and minerals of *Camelina sativa* seed. *Nutrition and Food Science*, 2010, pp. 523-531;
20. IBRAHIM, F. M., et al. Medicinal Impacts and Cultivation of *Camelina* (*Camelina sativa*): Review. *International Journal of PharmTech Research*, 2015;
21. RUSSO, R., REGGIANI, R. Antinutritive compounds in twelve *Camelina sativa* genotypes. *American Journal of Plant Science*, 2012, pp 1408-1412;
22. ZUBR, J., MATTHAUS, B. Effects of growth conditions on fatty acids and tocopherols in *Camelina sativa* oil. *Industrial Crops and Products*, 2002, pp. 155-162;
23. EIDHIN D.N., et al. Oxidative stability of ω -3-rich camelina oil and camelina oil-based spread compared with plant and fish oils and sunflower spread. *Journal of Food Science*, 2003;
24. PALOZZA, P., et al. Design, synthesis, and antioxidant potency of novel alpha-tocopherol analogues in isolated membranes and intact cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008;
25. PALOZZA, P., et al. Comparative antioxidant activity of tocotrienols and the novel chromanylpolysisoprenyl molecule FeAox-6 in isolated membranes and intact cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2006;
26. NESARETMAN, K. Multitargeted therapy of cancer by tocotrienols. *Cancer Lett*, 2008, pp. 388-395;
27. ABRAMOVIČ, H., et al. Changes occurring in phenolic content, tocopherol composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil during storage. *Food Chemistry*, 2007;
28. MOLDOVAN, L., MOLDOVAN, N. I. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 2004, pp. 395-412;

29. AYALA, A., et al. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, pp. 31;
30. SCHNEIDER, C., et al. Intermolecular peroxy radical reactions during autoxidation of hydroxy and hydroperoxy arachidonic acids generate a novel series of epoxidized products. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, pp. 895-903;
31. BROWNE, R. W., AMSTRONG, D. HPLC analysis of lipid derived polyunsaturated fatty acid peroxidation products in oxidatively modified human plasma. *Clinical Chemistry*, 2000, pp. 829-836;
32. YIN, H., XU., L., PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 2011, pp. 5994-5972;
33. GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 1998, pp. 1529-1542;
34. KANNER, J., et al. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1987, pp. 317-364;
35. CAROCHO, M., FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, pp. 15-25;
36. SONG, M.Y., et al. Antiobesity activity of aqueous extracts of *Rhizoma Dioscoreae Tokoronis* on high-fat diet-induced obesity in mice. *Journal of medicinal food*, 2009, pp. 304-309;
37. BUTNARIU, M., GROZEA, I. Antioxidant (Antiradical) Compounds. *Bioequivalence and Bioavailability*, 2012;
38. PHAM-HUY, L. A., HE, H., PHAM-HUY, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International journal of biomedical science*, 2008, pp. 89-96;
39. POKORNY, J., YANISHLIEVA, N., GORDON, M. Antioxidants in food. Practical applications. *Woodhead Publishing in Food Science and Technology*, 2001, pp. 147-155;
40. JETTER, R. *Phytochemicals – Biosynthesis, Function and Application*. Volume 44. Springer, 2014; pp. 140-145
41. CAROCHO, M., FERREIRA, I. C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, pp. 15-20;

42. SMITH, R. M. Before the injection – modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography*, 2003, pp. 3-27;
43. SASIDHARAN, S., et al. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plant's extracts. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*, 2011;
44. HERNANDEZ, Y., LOBO, M. G., GONZALEZ, M. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chemistry*, 2009, pp. 734-741;
45. ANKLAM, E., et al. Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: a review. *Food Additives and Contaminants*, 1998, pp. 729-750;
46. AMBROSINO, P., et al. Extraction of azadirachtin A from neem seed kernels by supercritical fluid and its evaluation by HPLC and LC/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, pp. 5252-5256;
47. AZMIR, J., et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant material: A review. *Journal of Food Engineering*, 2013, pp. 426-436;
48. COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, pp. 564-582;
49. LUQUE DE CASTRO, M. D., PRIEDO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 2010, pp. 2383-2389;
50. WANG, L., WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 2006, pp. 300-312;
51. ZARNOWSKI, R., SUZUKI, Y. Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2004, pp. 649-663;
52. LI, H., PORDESIMO, L., WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 2004, pp. 731-738;
53. LUQUE-GARCIA, J. L., LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment—Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography*, 2004, pp. 237-242;
54. MAMIDIPALLY, P. K., LIU, S. X. First approach on rice bran oil extraction using limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2004, pp. 122-125;
55. LUQUE DE CASTRO, M. D., GARCIA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 1998, pp. 1-10;

56. CHEMAT, S., et al. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, 2004, pp. 188-195;
57. SAIRAM, P., RAO, K.N.V, BANJI, D. Supercritical Fluid Extraction (SFE)-An Overview. *Asian Journal of research in pharmaceutical science*, 2012, pp. 112-120;
58. SIHVONEN, M., et al. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. *Trends in Food Science and Technology*, 1999;
59. HERRERO, M., et al. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry*, 2006, pp. 136-148;
60. KRAUJALIS, P., et al. Supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction of valuable ingredients from *Viburnum opulus* pomace and berries and evaluation of product characteristics. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2017, pp. 99-108;
61. MCHUGH, M., KRUKONIS, V. *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*, Edition 2, 2013;
62. HAMBURGER, M., BAUMANN, D., ADLER, S. Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants—Effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochemical Analysis*, 2004, pp. 46-54;
63. TEMELLI, F., GUCLU-USTUNDAG, O. *Supercritical Technologies for Further Processing of Edible Oils*. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 2005;
64. LANG, Q., WAI, C.M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*, 2001, pp. 771-782;
65. GHAFOR, K., PARK, J., CHOI, Y. H. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from grape peel (*Vitis labrusca* B.) by using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2010, pp. 485-490;
66. HAWTHORNE, S. B., et al. Extraction of organic pollutants from environmental solids with sub- and supercritical water. *Analytical Chemistry*, 1994, pp. 2912-2920;
67. CHERCHI, G., et al. Extraction of *Santolina insularis* essential oil by supercritical carbon dioxide: Influence of some process parameters and biological activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 2001, pp. 35-43;
68. DEL VALLE, J. M., et al. Supercritical CO₂ extraction of Chilean hop (*Humulus lupulus*) ecotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, pp. 1349-1356;

69. POIANA, M., FRESA, R., MINCIONE, B. Supercritical carbon dioxide extraction of bergamot peels. Extraction kinetics of oil and its components. *Flavour and Fragrance Journal*, 1999, pp. 358-366;
70. BRANCHET, A., et al. Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Journal of Separation Science*, 2001, pp. 865-873;
71. KAUFMAN, B., et al. Study of factors influencing pressurized solvent extraction of polar steroids from plant material. *Chromatographia*, 2001, pp. 394-398;
72. RICHTER, B. E., et al. Accelerated solvent extraction: A technology for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 1996, pp. 1033-1039;
73. IBAMEZ, E., et al. Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. In: Hayes, M. (Ed.), *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. Springer, 2012;
74. ESKILSSON, C. S., et al. Pressurized hot water extraction of insecticides from process dust. *Journal of separation science*, 2004, pp. 59-64;
75. LI, H., PORDESIMO, L., WEISS, J. High intensity ultrasoundassisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 2004, pp. 731-738;
76. TEO, C.C., et al. Pressurized hot water extraction. *Journal of chromatography*, 2010, pp. 2484-2494;
77. LUQUE-GARCIA, J. L., LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment—Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography*, 2004, pp. 237-242;
78. ROSENTHAL, A., D.L. PYLE, and K. NIRANJAN. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extractin. *Journal of Enzymology Microbial Technology*, 1996, pp. 402-420;
79. SINGH, V., et al. Recovery of fiber in the corn dry-grind ethanol process: A feedstock for valuable coproducts. *Cereal Chemistry*, 1999, pp. 868-872;
80. WU, Y., et al. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. *Food chemistry*, 2005, pp. 1599-1605;
81. PASSOS, C.P., et al. Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chemistry*, 2009, pp. 48-53;

82. YANG, Y-C., et al. Optimisation of microwave-assisted enzymatic extraction of corilagin and geraniin from *Geranium sibiricum* Linne and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 2010;
83. GARDOSI, L., et al. Guidelines for reporting of biocatalytic reactions. *Trends in Biotechnology*, 2009, pp. 171-180;
84. MAMIDIPALLY, P. K., LIU, S. X. First approach on rice bran oil extraction using limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2004, pp. 122-125;
85. PINELO, M., et al. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends of Food Science and Technology*, 2006, pp. 579-590;
86. VEIT, T. Biocatalysis for the production of cosmetic ingredients. *Engineering in Life Science*, 2004, pp. 508-511;
87. DE, M. L., et al. Phospholipases and their industrial applications: mini review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, pp. 290-300;
88. PURI, M., SHARMA, D., BARROW, C. J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 2012, pp. 37-44;
89. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/v2010?lang=en®ion=LT> [žiūrėta 2017 02 27];
90. TAN, C.-H. et al. Extraction and physicochemical properties of low free fatty acid crude palm oil. *Food Chemistry*, 2009, pp. 645-650;
91. BEZERRA, M. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 2008, pp. 965-977;
92. LST ISO 712:2000. Grūdai ir grūdų produktai. Drėgmės kiekio nustatymas. Įprastinis pamatinis metodas. Lietuvos standartizacijos departamentas Vilnius, 2000;
93. LST ISO 1443:2000. Mėsa ir mėsos produktai. Bendrojo riebalų kiekio nustatymas (tpt ISO 1443:1973(E)). Lietuvos standartizacijos departamentas Vilnius, 2000;
94. LST ISO 20483:2006. Varpinių ir ankštinių javų grūdai. Azoto kiekio nustatymas ir žalių baltymų kiekio apskaičiavimas. Lietuvos standartizacijos departamentas Vilnius, 2006;
95. LST ISO 2171:2007. Varpinių, ankštinių javų grūdai ir jų šalutiniai produktai. Pelenų, gautų po sudeginimo, nustatymas. Lietuvos standartizacijos departamentas Vilnius, 2007;
96. LUQUE DE CASTROL, M. D., GARCIA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 1998, pp. 1-10;

97. GOKMEN, V., et al. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in food science and technology*, 2009, pp. 278-288;
98. SINGLETON, V. L., et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, pp. 152–178;
99. BRAND-WILLIAMS, W., et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 1995, pp. 25-33;
100. RE, R., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, p.1231–1237;
101. PRIOR, R.L., et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003;
102. LST EN ISO 3960:2010. Gyvūniniai ir augaliniai riebalai ir aliejus. Peroksidų skaičiaus nustatymas. Jodometrinis (vizualus) nustatymas pagal ekvivalentinį tašką (ISO 3960:2007, pataisyta 2009-05-15 versija);
103. TROJAKOVA, L., et al. Determination of the Oxidative Stability of Fats and Oils Using the Oxipres Apparatus. *Czech J. Food Sci.*, 1999, pp. 68–72;
104. GRUZDIENĖ, D. Lietuvoje užauginto aliejinio burnočio sėklų (*Amaranthus*) aliejaus cheminė sudėtis ir savybės. *Veterinarija ir zootechnika*, 2007;
105. MOREDA, W., et al. Gas and Liquid Chromatography of Hydrocarbons in Edible Vegetable Oils. *Journal of Chromatography*, 2001, pp. 159–171;
106. GRUZKA, J., KRUK, J. RP-LC for determination of plastochromanol, tocotrienols and tocopherols in plant oils. *Chromatographia*, 2007, pp. 909-913;
107. KRAUJALYTĖ, V., et al. Antioxidant properties and polyphenolic compositions of fruits from different European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes. *Food Chemistry*, 2013, pp. 3695–3702;
108. ZUBR, J. Qualitative variation of *Camelina sativa* seed from different locations. *Industrial Crop. Prod.* 2003, pp. 161–169;
109. ANGELINI, L.G., et al. Variation in agronomic characteristics and seed oil composition of new oilseed crops in central Italy. *Ind. Crop. Prod.* 1997, pp. 313–323;
110. SOLIS, A., et al. Camelina seed yield response to nitrogen, sulfur, and phosphorus fertilizer in South Central Chile. *Ind. Crop. Prod.* 2013, pp. 132–138.
111. TONCEA, I., et al. The seed's and oil composition of *Camelina* – first romanian cultivar of camelina (*Camelina sativa*, L. Crantz). *Romanian Biotechnological Letters*, 2013, pp. 8594-8602;

112. BELAYNEHA, H. D., et al. Extraction of omega-3-rich oil from *Camelina sativa* seed using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2015, pp. 153–159;
113. KRAUJALIS, P., VENSKUTONIS, P. R. Optimisation of supercritical carbon dioxide extraction of amaranth seeds by response surface methodology and characterization of extracts isolated from different plant cultivars. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2013, pp. 80–86
114. FRANKEL, E. N., et al. Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002;
115. GUILLEN, M. D. ir CABO, N. Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, pp. 2028–2036;
116. WSOWICZ, E., et al. Oxidation of lipids in food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2004, pp. 87–100;
117. VAN DE VOORT, F. R., et al. The determination of peroxide value by fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1994, pp. 921–926;
118. ROHMAN, A., et al. Monitoring the oxidative stability of virgin coconut oil during oven test using chemical indexes and FTIR spectroscopy. *International Food Research Journal*, 2011, pp. 303–310;
119. MEHTA, B. M., et al. Comparison of five analytical methods for the determination of peroxide value in oxidized ghee. *Food Chemistry*, 2015, pp. 449–453;
120. CEBI, N., et al. Prediction of peroxide value in omega-3 rich microalgae oil by ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometrics. *Food Chemistry*, 2017, pp. 188–196;
121. Codex Standard for Named Vegetable Oils (CODEX-STAN 210 - 1999)
122. KRAUJALIENĖ, V., et al. Biorefining of *Bergenia crassifolia* L. roots and leaves by high pressure extraction methods and evaluation of antioxidant properties and main phytochemicals in extracts and plant material. *Industrial Crops and Products*, 2016, pp. 390–398;
123. MIŠURCOVA, I., et al. Seaweed lipids as nutraceuticals. *Adv. Food Nutr. Res.* 2011, pp. 339–355;
124. BRENNAN, J.T. Efficiency of conversion of α -linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr. Opin. Clin. Nutr.* 2002, pp. 127–132;

125. HUANG, CH., FRETER, C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, pp. 924–949;
126. PROUST, F., et al. Fatty acid profiles among the Inuit of Nunavi: Current status and temporal change. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 2014, pp. 159–167;
127. ORSAVOVA, J., et al. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *Molecular Science*, 2015, pp. 12871-12890;
128. SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.*;
129. SIMOPOULOS, A. S. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 2016;
130. SINGH, B. K., et al. Fatty acid composition and seed meal characteristics of Brassica and allied genera. *Natl. Acad. Sci. Lett.*, 2014, pp. 219–226;
131. RODRIGUEZ, M. F., et al. Characterization of the morphological changes and fatty acid profile of developing *Camelina sativa* seeds. *Industrial Crops and Products*, 2013, pp. 673– 679;
132. KRAUJALIS, P., VENKUTONIS, R. P. Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2013;

Padėka

Dėkoju mokslinio darbo vadovui lekt. dr. Pauliui Kraujaliui už pagalbą atliekant tyrimus, konsultacijas rašant magistro baigiamąjį darbą. Taip pat dėkoju KTU maisto mokslo ir technologijų katedros darbuotojams ir doktorantams už pagalbą atliekant tyrimus ir palaikymą.

Nuoširdžiai dėkoju savo šeimai, artimiesiems ir draugams už meilę, palaikymą ir supratingumą.