

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

DALIA URBONAVIČIENĖ

**LIKOPENAS POMIDORUOSE IR POMIDORŲ PRODUKTUOSE:
JO STABILUMAS IR IZOMERIZACIJA
PERDIRBIMO IR LAIKYMO METU**

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

2017, Kaunas

Disertacija rengta 2010-2017 metais Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakultete Maisto mokslo ir technologijos katedroje ir Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Sodininkystės ir daržininkystės instituto Biochemijos ir technologijos laboratorijoje. Dalį disertacijos tyrimų rėmė Lietuvos mokslo taryba ir LR Švietimo ir mokslo ministerija iš ilgalaikės programos “Sodininkystė ir daržininkystė: agrobiologiniai pagrindai ir technologijos”.

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. Pranas VIŠKELIS (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T).

Redagavo: Aurelija Gražina Rukšaitė (leidykla „Technologija“)

Chemijos inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:

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

Doc. dr. Loreta BAŠINSKIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T);

Prof. habil. dr. Mirosława KRAUZE-BARANOWSKA (Gdanskio medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, farmacija, 08B);

Doc. dr. Audrius PUKALSKAS (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T);

Prof. dr. Kristina RAMANAUSKIENĖ (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, farmacija, 08B).

Disertacija bus ginama viešame chemijos inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2017 m. birželio 20 d. 11 val. Kauno technologijos universiteto Disertacijų gynimo salėje.

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

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

Disertacijos santrauka išsiųsta 2017 m. gegužės 19 d.

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

Simboliai ir santrumpos

AF – atvirkščios fazės

AR – aptikimo riba

β -KAR – β karotenas

CKRP – centriškai kompozicinis rotabilus planas

CO₂ – anglies dioksidas

ΔE – spalvos pokytis

ESC – efektyvioji skystinė chromatografija

KT šviesoje – laikymo sąlygos kambario temperatūroje + 20 ± 1 °C, natūralioje šviesoje, kuri dienos ir nakties metu buvo skirtinga

KT tamsoje – laikymo sąlygos kambario temperatūroje + 20 ± 1 °C, tamsoje

L. sakei – *Lactobacillus sakei* KTU06-7

LIK – likopenas

MMP – maltos mėsos pūsgaminis

Nd – neaptikta

NR – nustatymo riba

P. acidilactici – *Pediococcus acidilactici* KTU05-7

P. pentosaceus – *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8

PB – pieno rūgšties bakterijos

PKA – principinė komponentų analizė

PM – pomidorų miltai

PomKuk – pomidorų ir kukurūzų sulčių gėrimas

PomMor – pomidorų ir morkų sulčių gėrimas

PomOb – pomidorų ir obuolių sulčių gėrimas

R² – regresijos koeficientas

RŠ – regimosios šviesos spinduliai

SF – spontaninė fermentacija

SK – superkrizinė ekstrakcija

SM – sausos medžiagos

ŠT tamsoje – laikymo sąlygos šaldytuve +1 ± 1 °C temperatūroje, tamsoje

TT tamsoje – laikymo sąlygos termostatuojant +37 ± 1 °C temperatūroje, tamsoje

TT UV – laikymo sąlygos termostatuojant +37 ± 1 °C temperatūroje, šviesos šaltinis – ultravioletinė lempa

UV – ultravioletiniai spinduliai

1. ĮVADAS

Temos aktualumas. Pastaruoju metu patrauklaus funkcinio maisto pasiūla dėl padidėjusio vartotojų susidomėjimo ir rūpinimosi savo sveikata išaugo. „Natūralumas“ tampa vis svarbesne bet kurio maisto gaminio savybe, todėl tokių produktų paklausa didėja visame pasaulyje. Žmogaus sveikata yra neatsiejama nuo mitybos: tik pasirinkus tinkamą ir kokybišką maistą, galima tikėtis naudos mūsų sveikatai. Šis pasirinkimas gali lemti mūsų gyvenimo kokybę, jo visavertiškumą. Didžioji dalis mokslinių straipsnių pabrėžia biologiškai veiklių junginių (karotenoidų, polifenolių, fitosterolių) naudą žmogaus organizmui kaip apsaugą nuo širdies ir kraujagyslių ligų, artrito, diabeto ir panašių ligų. Pastaruoju metu išryškėja vartotojų požiūris, kad maistas nėra skirtas tik alkiui numalšinti, bet kartu su maistu norima gauti kuo optimalesnį kiekį biologiškai veiklių junginių. Karotenoidai yra grupė junginių, kurie dažniausiai yra žinomi kaip augaliniai pigmentai ir vartojami kaip natūralūs maistiniai dažikliai. Plačiausiai moksliniu požiūriu buvo tyrinėjamas β karotenas, tačiau pastarąjį dešimtmetį didelis dėmesys yra skiriamas likopenui. Problema ta, kad karotenoidų, taip pat ir likopeno, suteikiančio pomidorams raudoną spalvą, žmogaus organizmas nesintetina – jis turi būti gaunamas su maistu ar maisto papildais.

Likopenas nėra gausiai paplitęs maisto produktuose. Didžiausi jo kiekiai yra randami pomidoruose ir pomidorų produktuose. Pomidorai ir pomidorų produktai yra svarbi žemės ūkio produkcija visame pasaulyje. Daugiau nei 80 proc. pomidorų, auginamų visame pasaulyje, yra perdirbama į pomidorų sultis, pastą, kečupą ir padažą. Likopenas yra svarbus dėl savo naudingų savybių žmonių sveikatai. Jis apsaugo žmogaus organizmą nuo žalingo oksidacinio streso. Oksidacinis stresas yra viena iš pagrindinių priežasčių, sukeliančių lėtines ligas, tokias kaip širdies ir kraujagyslių ligos, įvairios vėžio rūšys (virškinamojo trakto, gimdos kaklelio, krūties, odos, šlapimo pūslės ir prostatos), hipertenzija, osteoporozė, neurodegeneracinės ligos. Mokslininkų įrodyta, kad karotenoidai, ypač likopenas, yra vieni stipriausių augalinių antioksidantų. Manoma, kad šias savybes nulemia likopeno molekulės struktūra. Likopenas yra neciklinis polienas, turintis 11 konjuguotųjų dvigubųjų jungčių. Nustatyta, kad žmogaus organizmo skysčiuose ir audiniuose 25–70 proc. likopeno vyrauja *cis*-izomerų pavidalu. Šie tyrimai iškelia hipotezę, kad biologiškai organizmui naudingesni yra *cis*-likopeno izomerai, o ne šviežiuose pomidoruose vyraujantys *trans*-izomerai (apie 95 proc., palyginti su bendru likopeno kiekiu šviežiuose pomidoruose). Taip pat nustatyta, kad, atliekant *in vivo* tyrimus, *cis*-likopeno izomerai pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu, taip pat ir didesniu biologiniu pasisavinamumu.

Deja, bet tik 10 proc. likopeno yra pasisavinama iš maisto produktų. Vyrauja nuomonė, kad biologiškai vertingų junginių ir maistinių medžiagų biologinis pasisavinamumas svarbesnis nei šių medžiagų koncentracija. Taigi likopeno

nauda sveikatai labiausiai priklauso nuo pasisavinamumo, t. y. nuo likopeno frakcijos, kuri yra išlaisvinama iš maisto matricos ir yra geriausiai pasisavinamas iš perdirbtų pomidorų produktų nei iš šviežių pomidorų. Manoma, kad technologinių procesų parametrai, tokie kaip temperatūra, slėgis, trukmė, apšvita ir kt., ir jų sąveika turi įtakos likopeno molekuliniam pokyčiams ir sukelia izomerizaciją iš *trans*- į *cis*-. Kiti veiksniai, tokie kaip likopeno vartojimas su auginiais aliejais, pagerina likopeno pasisavinamumą.

Perdirbant pomidorus susidaro dideli kiekiai šalutinių pomidorų perdirbimo produktų (žievelių, sėklų). Pomidorų nokimo metu žievelėse yra sukaupiamas didžiausias karotenoidų (ypač likopeno) kiekis. Šalutiniai perdirbimo produktai yra didelė ekologinė problema, tačiau, nepaisant to, tai pigus alternatyvus biologiškai vertingų junginių šaltinis. Didžiausia likopeno ekstrahavimo iš pomidorų žievelių problema yra jo tirpumas. Likopeno ekstrahavimas iš pomidorų šalutinių perdirbimo produktų naudojant tradicinius ekstrakcijos metodus, tokius kaip ekstrakcija organiniais tirpikliais, išeiga nėra pakankama. Dėl šių priežasčių yra bandoma ieškoti efektyvių pirminio žaliavos apdorojimo technologinių procesų, leidžiančių padidinti likopeno išgavimo efektyvumą.

Koncentruotų karotenoidų frakcijų išskyrimas iš šalutinių pomidorų perdirbimo žaliavų, optimizuojant technologinius procesus, yra svarbus siekiant sukurti tradicinius maisto produktus su didesniu likopeno *cis*-izomerų kiekiu, siekiant suteikti gaminiams funkcionaliąsias savybes.

Pagrindinis šio darbo tikslas – ištirti skirtingų perdirbimo technologijų ir technologinių parametru įtaką likopeno stabilumui ir galimai izomerizacijai pomidoruose ir pomidorų produktuose perdirbimo ir laikymo metu.

Tyrimo tikslui įgyvendinti buvo sprendžiami šie uždaviniai:

1. Išvystyti ir pritaikyti efektyviosios skysčių chromatografijos metodiką likopeno, likopeno *trans*- ir *cis*-izomerų kokybinės ir kiekybinės sudėties nustatymui pomidoruose, pomidorų produktuose ir išskirtose frakcijose.
2. Nustatyti optimalias lipofilinės frakcijos iš pomidorų šalutinių perdirbimo produktų išgavimo superkrizinės ekstrakcijos anglies dvideginio sąlygas (temperatūrą, slėgį, ekstrakcijos trukmę), siekiant gauti didžiausią ekstrakto išeigą ir likopeno *cis*-izomerų išeigą ekstraktoje.
3. Ištirti skirtingų technologinių parametru sąveiką ir jų įtaką likopeno stabilumui ir izomerizacijai skirtingose modelinėse sistemose laikymo metu.
4. Įvertinti fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis įtaką karotenoidų išgavai iš pomidorų ir šalutinių pomidorų perdirbimo produktų.
5. Ištirti galimybę panaudoti likopeno ekstraktus ir fermentuotus pomidorų produktus kuriant funkcionalių prototipinius maisto produktus.
6. Įvertinti likopeno ekstrakto uždegimą slopinančias ir antiproliferacines savybes ląstelių kultūrose.

Mokslinio darbo naujumas

1. Pirmą kartą buvo pritaikytas, išvystytas ir validuotas efektyviosios skysčių chromatografijos metodas kiekybinei ir kokybinei likopeno ir likopeno *cis*-izomerų (5-*cis*; 7-*cis*; 9-*ci*; 13-*cis*; 15-*cis*) analizei atlikti.

2. Nustatytos optimalios superkrizinės ekstrakcijos anglies dvideginio sąlygos, siekiant išgauti lipofilinę frakciją iš šalutinių pomidorų perdirbimo produktų su didesne *cis*-likopeno izomerų koncentracija.

3. Pirmą kartą buvo tiriama pomidorų ir šalutinių pomidorų perdirbimo produktų fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis įtaka karotenoidų išgavai.

4. Pirmą kartą buvo tirtas ekstrakto su *cis*-likopeno izomerais poveikis uždegimą slopinamosioms ir antiproliferacinėms savybėms.

Teorinė ir praktinė darbo vertė

Šiame darbe gauti tyrimų duomenys praplečia mokslines žinias apie technologinių procesų parametrus, kurie turi įtakos likopeno ir kitų karotenoidų ekstrakcijai iš pomidorų ir pomidorų šalutinių perdirbimo produktų, taip pat technologinių procesų parametrus, kurie daro įtaką likopeno stabilumui ir izomerizacijai perdirbimo ir laikymo metu. Žinios apie likopeno ekstrakciją, stabilumą ir izomerizaciją yra naudingos kuriant ir gaminant preparatus su *cis*-likopeno izomerų ekstraktais ir gaminant maisto produktus ar jų ingredientus su didesniu kiekiu biologiškai veiklių karotenoidų.

Gauti duomenys apie likopeno ekstrahavimą superkritiniais skysčiais yra naudingi biorafinuojant pomidorų šalutinius perdirbimo produktus, ir šis procesas gali būti pagrindas kuriant racionalias technologijas, kurių metu siekiama išgauti didelės vertės biologiškai veiklius komponentus, kartu padidinant pramonėje perdirbamų pomidorų gamybos efektyvumą.

Pomidorų fermentavimas pieno rūgšties bakterijomis yra naudingas siekiant sukurti naujus funkcionaliuosius maisto produktus ir jų ingredientus.

Likopeno izomerizuoti ekstraktai gali būti naudojami kaip maisto priedai ar maisto papildai, turintys uždegimo slopinamąjį ir antiproliferacinį poveikį.

Lipofiliniai ekstraktai su *cis*-likopeno izomerais (60 proc.), ekstrahuoti superkrizinio anglies dvideginio iš šalutinių pomidorų perdirbimo produktų, buvo pritaikyti kosmetikos pramonėje. Pomidorų sulčių mišinių su izomerizuotu likopeno ekstraktu technologija įdiegta į gamybą.

Darbo rezultatų aprobavimas

Disertacijos tema paskelbti keturi moksliniai straipsniai, turintys cituojamumo rodiklį (angl. *Impact Factor*) *Clarivate Analytical Web of Science* duomenų bazės žurnaluose, du moksliniai straipsniai publikuoti recenzuojamuose mokslo žurnaluose, kurie yra referuojami kitose tarptautinėse duomenų bazėse. Du straipsniai atspausdinti konferencijų medžiagoje. Pagrindiniai disertacijos teiginiai pristatyti aštuoniose tarptautinėse

konferencijose, tarptautiniame kongrese ir simpoziume (dvylika pranešimų).

Darbo apimtis ir struktūra

Disertaciją sudaro įvadas, literatūros apžvalga, tyrimo objektas ir metodai, tyrimų rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas (185 literatūros šaltiniai), priedai, disertacijos tema paskelbtų darbų sąrašas. Bendra disertacijos apimtis – 117 puslapių, juose pateikta 16 lentelių ir 37 paveikslai.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Skirtingų technologinių procesų parametrų sąveika (ekstrakcijos trukmė, temperatūra, slėgis) gali būti pakeičiama taip, kad būtų padidinta *cis*-likopeno izomerų išėiga galutiniame produkte, siekiant padidinti ekstraktų ir gaminių funkcionaliąsias savybes.

2. Koncentruoti likopeno preparatai gali būti vartojami kaip maisto priedų ingredientai, turintys uždegimo slopinamąjį ir antiproliferacinį poveikį.

2. TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Tyrimų objektas

Pomidorai ('Admiro' F1, 'Ronaldo' F1, 'Cunero' F1) tyrimams atlikti užauginti Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Sodininkystės ir daržininkystės instituto (LAMMC SDI) šiltnamiuose ir bandymų laukuose. Pomidorų ir pomidorų produktai paruošti LAMMC SDI Biochemijos ir technologijos laboratorijoje. Šalutinių pomidorų perdirbimo produktų miltai gauti iš įmonės „Obipektin“ (Šveicarija).

2.2. Tyrimo metodai

Karotenoidų, likopeno ir jo izomerų kiekybinė ir kokybinė analizė. Darbe buvo naudojamas atvirkščių fazių (AF) efertyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodas. ESC sistemą sudarė „Waters, 2695“ (JAV) chromatografas su automatiniu dozatoriumi su 100 µl bandinio kilpa, keičiamo bangos ilgio dviejų spindulių ultravioletinės – regimosios spinduliuotės („Waters, 2489“, UV–Vis detector, JAV) ir diodų matricos detektorius („Waters, 2998“, DAD detector, JAV), kolonėlė, termostatuojama 25 °C temperatūroje („Waters, MA 01757“, JAV). Naudota atvirkštinių fazių C30 (5 µm; 250×4 mm) chromatografinė kolonėlė (YMC Europe GmbH, Vokietija) sujungta su C30 prieškolonėle (5 µm, 10×4,0 mm, YMC Europe, Dinslaken, Vokietija). Junginių detekcija atlikta ties 473 nm bangos ilgiu (UV-RŠ), o junginiai buvo indentifikuojami DAD 200–600 nm. Tėkmės greitis – 0,60 ml/min. Mobiliąją fazę sudarė metanolis (A) ir metil-*tret*-butilo eteris (B). Gradientas buvo keičiamas tokia tvarka: 0–5 min. 40 proc. B (60 proc. A), 50 min. 83 proc. B (17 proc. A), 55 iki 65 min. 100 proc. B ir 75 min. 40 proc. B (60 proc. A). Mėginio tūris 10 µl. Gauti duomenys apdoroti „Waters Empower“ programa (Milfordas, JAV).

Spalvų matavimas. „MiniScan XE Plus“ analizatoriumi matuotos spalvų koordinatės vienodo kontrasto spalvų erdvėje (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, Virginia, USA). Šviesos atspindžio režimu buvo matuojami parametrai L^* , a^* ir b^* (atitinkamai: šviesumas, raudonumo ir geltonumo koordinatės pagal CIEL*a*b* skalę) ir apskaičiuojamas spalvos grynumas (C) (1), tonas (h) (2) bei spalvos pokytis (ΔE) (3):

$$C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}, \quad (1)$$

$$h^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right), \quad (2)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}. \quad (3)$$

Karotenoidų ir likopeno ekstrakcija superkriziniais skysčiais iš pomidorų antrinių žaliavų. Naudotas superkrizinės CO₂ (SK-CO₂) ekstrakcijos metodas. Liofilizuoti pomidorai susmulkinti cikloniniu malūnu, išsijoti per 0,2 mm dydžio sietą ir ekstrahuoti SK-CO₂. SK-CO₂ ekstrakcijos deriniai atlikti optimizuojant ekstrakcijos proceso kintamųjų dydžius – ekstrakcijos temperatūrą, slėgį ir ekstrakcijos trukmę. Eksperimentinių kintamųjų optimalioms vertėms nustatyti, t. y. visam antro laipsnio statistiniam modeliui sudaryti, naudotas centriškai kompozicinis rotabilus planas (CKRP), o duomenys apdoroti programa „Design-Expert 7.0“. Naudojant CKRP įvertinta proceso kintamųjų įtaka bendrai ekstrakto išeigai ir įvertinta ekstraktų sudėtis. Nustatytos optimalios procesų kintamųjų vertės.

Likopeno aliejinės modelinės sistemos pagreitintomis sąlygomis tyrimas. Buvo paruošta likopeno modelinė sistema iš homogenizuotų pomidorų masės su homogenizatoriumi MMB 2000 UC („Bosch“, Vokietija) sumaišius su aliejumi (pirmo spaudimo rapsų aliejus, Lietuva) tūriniu santykiu 1:1 (laboratorinė maišyklė ER-10, („VEB MLW Prufgerate“, Vokietija). Maišymo metu (2 val.) aplinkos sąlygos buvo termostatuojamos ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) (termostato modelis 9100, „PolyScience“, JAV). Lipofilinė frakcija atskirta centrifuguojant (centrifuga ППЖ-1 („Texnocom“, Rusija). Gauti ekstraktai padalinti ir išpilstyti į hermetiškus mėgintuvėlius po 2 ml ir termostatuojami atitinkamomis sąlygomis 200 dienų.

Taikant efektyviają skysčių chromatografiją ir spalvų koordinačių analizę, tirtas likopeno, likopeno *trans*- bei *cis*-izomerų ir β karoteno stabilumas aliejinėje modelinėje sistemoje skirtingomis laikymo sąlygomis per 200 dienų: ŠT tamsoje (šaldytuve $1 \pm 1^\circ\text{C}$ temperatūroje, tamsoje), KT šviesoje (kambario temperatūroje – $20 \pm 1^\circ\text{C}$, natūralioje šviesoje, kuri dienos ir nakties metu buvo skirtinga), KT tamsoje (kambario temperatūroje – $20 \pm 1^\circ\text{C}$, tamsoje), TT UV (termostatuojant $37 \pm 1^\circ\text{C}$ temperatūroje, šviesos šaltinis – ultravioletinė lempa)

ir TT tamsoje (termostatuojant 37 ± 1 °C temperatūroje, tamsoje). Kontrolinis bandinys buvo likopeno koncentracija aliejinėje modelinėje sistemoje pradžioje eksperimento (0 diena). Priimta, kad likopeno *trans*-izomerų koncentracija eksperimento pradžioje buvo 100 proc., o lokopeno *cis*-izomerų koncentracija – 0 proc.

Fermentacijos technologijos įtaka karotenoidų išskyrimui iš pomidorų ir pomidorų šalutinių perdirbimo produktų. Šviežių pomidorų tyrė, skirtingų veislių pomidorai („Cunero“ ir „Ronaldo“) ir šalutinių pomidorų perdirbimo produktų miltai buvo fermentuojami grynomis pieno rūgšties bakterijų kultūromis *Lactobacillus sakei* KTU05-6 (*L. sakei*), *Pediococcus acidilactici* KTU05-7 (*P. acidilactici*) ir *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8 (*P. pentosaceus*), kurios charakterizuojamos kaip bakteriocinus gaminančios bakterijos, gautos iš Kauno technologijos universiteto Maisto mokslo ir technologijos katedros.

Fermentuotų pomidorų panaudojimas maltos mėsos frikadelėms papildyti funkcionaliaisiais priedais. Pomidorų milteliai gauti iš įmonės „Obipektin“ (Šveicarija), jie buvo fermentuojami grynomis pieno rūgšties bakterijų kultūromis (*L. sakei*, *P. acidilactici* ir *P. pentosaceus*). Sumaišius pomidorų miltelius (300 g) su atitinkamu vandens kiekiu ir PB kultūros suspensijos (10 g), inkubuojami atitinkamoje temperatūrose (35 °C – *P. pentosaceus*, 30 °C – *L. sakei*, 32 °C – *P. acidilactici*) 48 val. Spontaniinė fermentacija vykdyta 30 °C 48 val., be išgrynintų pieno rūgšties bakterijų priedo. Kiaulienos faršas pirktas artimiausiame prekybos centre ir sumaišytas su fermentuota pomidorų frakcija (10 ir 30 proc.). Tirtos nevirtos ir virtos (vandenyje 100 °C temperatūroje, 10 min.) frikadelės.

Pomidorų sulčių ir pomidorų sulčių su priedais mišinių, papildytų izomerizuotu likopeno ekstraktu, tyrimas. Paruošti trijų skirtingų pomidorų ir obuolių sulčių mišiniai 85:15, 75:25 ir 65:35 v/v (atitinkamai PomOb15proc., PomOb25proc., PomOb35proc.), trijų skirtingų pomidorų ir morkų sulčių mišiniai 60:40, 50:50 ir 40:60 v/v (atitinkamai PomMor40proc., PomMor50proc., PomMor60proc.), ir trijų skirtingų pomidorų ir kukurūzų sulčių mišiniai 85:15, 75:25 ir 65:35 v/v (atitinkamai PomKuk15proc., PomKuk25proc., PomKuk35proc.). Į visus sulčių mėginius, išskyrus kontrolinį – pomidorų sultys be priedų, buvo pridėta 5 proc. pomidorų ekstraktu su *cis*-likopeno izomerais. Sultys buvo homogenizuojamos ir pasterizuojamos (10 min. esant 95 ± 5 °C), tuomet išpilstomos į 350 ml stiklinius indus. Pasterizuotos sultys buvo uždarnos metaliniai dangteliais ir saugomos tamsioje patalpoje, $+20 \pm 2$ °C aplinkos temperatūroje (maždaug 4 savaites).

Likopeno uždegimą slopinančio aktyvumo įvertinimas ląstelių kultūrose. Tyrimų metu naudotos pelių makrofagų J774 ląstelės, suspenduotos PBS buferyje. Vandenilio peroksido gamyba makrofagų kultūroje matuota fluorimetriškai (sužadinimas – 544 nm, išspinduliavimas – 590 nm). H₂O₂

koncentracija nustatyta pagal H_2O_2 kalibracinę kreivę.

Proliferacinio aktyvumo ir uždegimo slopinamųjų savybių vertinimas.
Proliferaciniam aktyvumui įvertinti žinomas makrofagų kiekis buvo pasėtas lėkštelėse. Gyvų ir negyvų ląstelių kiekis apskaičiuotas po 24 val. ląstelių inkubavimo su ekstraktu, naudojant šviesinį mikroskopą.

Tyrimai buvo kartoti po tris kartus, gauti rezultatai įvertinti statistiniais metodais.

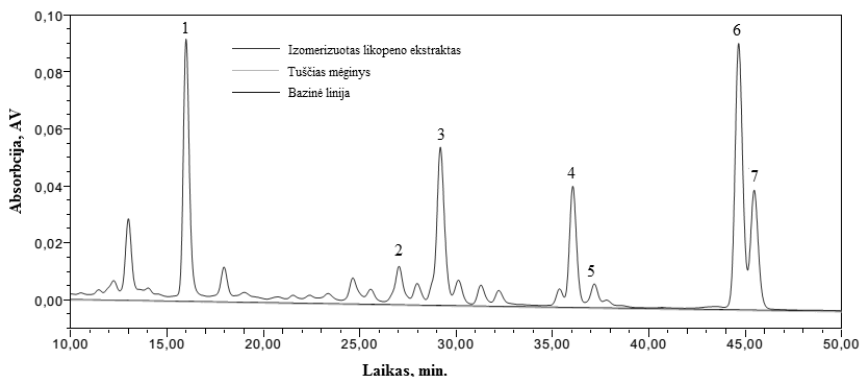
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Likopeno izomerų ir β karoteno kokybinės ir kiekybinės sudėties tyrimas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu ir metodo validavimas

Siekiant kokybiškai ir kiekybiškai įvertinti žaliavos, ekstraktų ir prototipinių maisto produktų sudėtį ir identifikuoti biologiškai vertingus junginius, būtina taikyti ypač atrankius šiuolaikinius analizės metodus. Todėl yra siekiama sukurti naujas analitines metodikas ir pritaikyti jas konkrečios žaliavos bei modelinėse maisto produktų sistemose esančių biologiškai veiklių komponentų tyrimams atlikti. Efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodas yra vienas iš dažniausiai pasirenkamų metodų karotenoidų ir jų izomerų, taip pat likopeno (LIK) ir β karoteno kokybinės ir kiekybinės sudėties tyrimams atlikti. ESC metodikos suteikia galimybę analizuoti karotenoidus įvairiuose mėginiuose, tiek žaliavoje, tiek maisto produktuose, tiek sudėtingose modelinėse sistemose. Tačiau, atlikus išsamią literatūros apžvalgą, nustatyta, kad nėra ESC metodų, skirtų kompleksiniam individualių likopeno izomerų, ypač skirtingų *cis*-izomerų, indentifikavimui.

Šioje darbo dalyje išvystyta, pritaikyta ir validuota ESC metodika, taip pat identifikuoti skirtingi likopeno izomerai, norint ne tik ištirti likopeno stabilumą ir bendrą *cis*- ir *trans*-izomerų kiekį, bet ir įvertinti susidariusių skirtingų izomerų stabilumą (*5-cis*, *7-cis*, *9-cis*, *13-cis*, *15-cis* ir *trans*-). Chromatogramoje identifikuoti net šeši likopeno izomerai. Nustatyta, kad eliucijos smailė, matoma ties 16,0 minute, yra β karotenas. Didžiausia eliucijos smailė chromatogramoje yra *trans*-likopeno izomeras (išėjimo iš kolonėlės laikas – 44,7 min.). Pirmoji eliucijos smailė chromatogramoje yra *15-cis*-likopeno izomeras (24,7 min.), po to matoma *13-cis* izomero eliucijos smailė (29,2 min.). Tarp 36 ir 38 minučių chromatogramoje matomos *9-cis* ir *7-cis* izomerų (atitinkamai 36,1 ir 37,2 min.), 45,5 min. – *5-cis* likopeno izomero eliucijos smailės (1 pav.).

Atliekant augalinių žaliavų ir pagamintų produktų tyrimus, būtina taikyti optimizuotus ESC metodus ir validuoti jų metodikas, kurios leistų patikimai, tiksliai bei atkartojamai įvertinti tiriamų ekstraktų sudėtį, junginių pasiskirstymą ir stabilumą. ESC metodo validacija atlikta pagal šiuos pasirinktus validacijos parametrus: specifiškumą, glaudumą (preciziją), aptikimo ribą (AR), nustatymo ribą (NR) ir tiesiškumą.



1 pav. Pomidorų ekstrakto ESC UV-RŠ chromatograma: β karotenai (1), *15-cis*-LIK (2), *13-cis*-LIK (3), *9-cis*-LIK (4), *7-cis*-LIK (5), *trans*-LIK (6), *5-cis*-LIK (7). Kolonėlė – atvirkščių fazių YMC C30 (5 μ m, 250 \times 4 mm) sujungta su C30 prieškolonėlė (5 μ m, 10 \times 4,0 mm). Judrios fazės sudėtis: A eliuentas – 100 proc. metanolis; B – 100 proc. metil-*tret*-butilo eteris. Gradientas: 0–5 min. 40 proc. B (60 proc. A), 50 min. 83proc. B (17 proc. A), 55 iki 65 min. 100 proc. B ir 75 min. 40 proc. B (60 proc. A). Tėkmės greitis – 0,6 ml min⁻¹, įleidžiamas tūris – 10 μ l

Metodo atrankumas, t. y. smailių indentifikavimas ir grynumas, buvo įvertintas palyginus analičių sulaikymo laikus ir UV-RŠ absorbcijos spektrus su etaloninių junginių sulaikymo laikais ir izomerizuoto standartinio likopeno tirpalo junginių sulaikymo laikais ir spektrinėmis charakteristikomis. Identifikuotų junginių tapatybė patvirtinta priedo metodu, į analizuojamąjį ekstraktą pridėjus etaloninio junginio, stebint smailės formos ir spektrinių charakteristikų pokyčius. Tiesiškumo tyrimai atlikti vertinant tiriamo junginio smailės ploto pokyčio priklausomybę nuo koncentracijos. Buvo sudarytos visų analičių kalibravimo grafikų regresijos lygtys ir įvertinti regresijos koeficientai (R^2), kurių reikšmės buvo artimos 1 (0,99), tai patvirtina naudojamos ESC metodikos tiesiškumą (1 lentelė). Apskaičiuotos tiriamųjų analičių aptikimo ribos reikšmės varijavo nuo 0,22 μ g ml⁻¹ iki 0,41 μ g ml⁻¹, o kiekinio nustatymo ribos kito nuo 0,65 μ g ml⁻¹ iki 0,83 μ g ml⁻¹.

ESC metodikos glaudumui įvertinti apskaičiuotas standartinių junginių tyrimo metu gaunamų rezultatų pakartojamumas ir atkuriamumas. Pakartojamumui (*analizė po analizės*) apskaičiuoti atliktos šešios trijų skirtingų koncentracijų standartinių mišinių injekcijos tą pačią dieną ir apskaičiuotas variacijos koeficientas indentifikuotų junginių smailių plotams. Indentifikuotų junginių variacijos koeficientas yra 1,47 proc. (2 lentelė). Atkuriamumo (to paties mėginio analizė skirtingomis dienomis, *diena po dienos*) – po šešias to paties pavyzdžio injekcijas tris skirtingas dienas. Indentifikuotų junginių variacijos koeficientas neviršija 2,36 proc. (2 lentelė). Rezultatų tarpinis preciziškumas apskaičiuotas naudojant tris skirtingas dienas atliktų tyrimų

rezultatus (šešios vidutinės koncentracijos standartų mišinio analizės atliktos per tris skirtingas dienas, iš viso 18 tyrimų). Atlikta to paties bandinio („Admiro“ veislės pomidorų liofilizuotų miltelių) ekstrakcija po ekstrakcijos. Ekstraktų variacijos koeficientas 3,54 proc. smailės plotui. Gauti rezultatai, apibūdinantys išvystytos ESC metodikos glaudumą, pateikti 2 lentelėje.

1 lentelė. Identifikuotų junginių lygtys, regresijos koeficientai, nustatymo ir aptikimo ribos

Junginys	AR ^a (µg/ml)	NR ^b (µg/ml)	Tiesiškumo intervalas (µg/ml)	Kalibracinė kreivė	R ²
<i>trans</i> -likopenas	0,23	0,71	0,625–100	$y=6,53 \times 10^4 x + 2,57 \times 10^3$	0,999
<i>trans</i> -beta karotenas	0,41	0,83	0,625–100	$y=5,43 \times 10^4 x + 2,67 \times 10^3$	0,998
<i>15-cis</i> -likopenas	0,22	0,65	0,625–100	$y=6,53 \times 10^4 x + 2,57 \times 10^3$	0,999
<i>13-cis</i> -likopenas	0,31	0,70	0,625–100	$y=6,53 \times 10^4 x + 2,57 \times 10^3$	0,999
<i>9-cis</i> -likopenas	0,25	0,67	0,625–100	$y=6,53 \times 10^4 x + 2,57 \times 10^3$	0,999
<i>7-cis</i> -likopenas	0,27	0,71	0,625–100	$y=6,53 \times 10^4 x + 2,57 \times 10^3$	0,999
<i>5-cis</i> -likopenas	0,28	0,68	0,625–100	$y=6,53 \times 10^4 x + 2,57 \times 10^3$	0,999

^aAR – aptikimo riba, ^bNR – nustatymo riba, ^cR² – regresijos koeficientas

2 lentelė. ESC metodo glaudumo parametrų reikšmės

Junginys	Smailių plotų variacijos koeficientas (%) identifikuotų junginių		
	Analizė po analizės ^a	Diena po dienos ^b	Ekstrakcija po ekstrakcijos ^c
<i>trans</i> -likopenas	1,20	1,95	2,91
<i>trans</i> -beta karotenas	1,47	2,36	3,54

^aPakartojamumas

^bAtkuriamumas

^cTarpinis preciziškumas

Apibendrinant išvystytos ESC metodikos validacijos rezultatus, galima teigti, kad išvystyta metodika yra tinkama pomidorų, pomidorų ekstraktų, pomidorų prototipinių produktų bei pomidorų modelinėse sistemose likopeno ir likopeno izomerų kokybinės ir kiekybinės sudėties analizei atlikti. Gautos validacijos parametrų (glaudumo, tiesiškumo ir atrankumo) vertės patvirtina metodikos tinkamumą analizuoti likopeną, likopeno izomerus ir β karotoną. Ši metodika taikyta tolimesniuose tyrimuose.

3.2. Lipofilinės frakcijos iš pomidorų šalutinių perdirbimo produktų ekstrakcijos superkrižiniu anglies dvideginiu parametru optimizavimas ir ekstraktų sudėties įvertinimas

Dideliu kiekiu funkcionaliųjų ingredientų pasižymi augaliniai produktai, kurių potencialas maisto pramonėje nepakankamai efektyviai išnaudojamas. Vieni iš tokių yra šalutiniai pomidorų perdirbimo produktai (žievelės, sėklos, gyslos ir nedidelė dalis minkštimo), nes juose yra didelis kiekis funkcionaliųjų ingredientų – karotenoidų, iš kurių itin svarbus yra likopenas. Vienas iš galimų didelės vertės gamtinės kilmės medžiagų biorafinavimo būdų yra superkrižinė ekstrakcija naudojant anglies dvideginį (SK-CO₂), nes jis fiziologiškai nekenksmingas žmogaus organizmui, ekologiškai saugus naudoti, nedegus, pasižymi dideliu selektyvumu ir difuzija, tankis panašus į skysčių, lengvai pašalinamas iš galutinio produkto. Koncentruotų karotenoidų didelės vertės frakcijų išskyrimas iš šalutinių pomidorų perdirbimo produktų, optimizuojant technologinius ekstrakcijos parametrus, yra svarbus siekiant sukurti tradicinius maisto produktus su didesniu likopeno *cis*-izomeru kiekiu, siekiant suteikti gaminiams funkcionaliąsias savybes. Literatūros duomenimis, yra atlikta tyrimų siekiant išgauti likopeną iš šalutinių pomidorų perdirbimo produktų, tačiau nėra mokslinių duomenų, leidžiančių optimizuoti ir padidinti *cis*-likopeno izomerų išeigą išgautose frakcijose naudojant SK-CO₂.

Šios darbo dalies tikslas yra optimizuoti lipofilinės frakcijos, išgautos iš pomidorų šalutinių perdirbimo produktų, superkrižinės ekstrakcijos anglies dvideginiu pagrindinius parametrus (temperatūrą, slėgį, ekstrakcijos trukmę), siekiant gauti didžiausią ekstrakto išeigą ir likopeno *cis*-izomerų išeigą ekstrakto. SK-CO₂ ekstrakcijos sąlygoms optimizuoti naudotas centriškai kompozicinis rotabilus planas (CKRP), kuriame trys kintamieji (temperatūra, slėgis, ekstrakcijos trukmė) kito penkiais lygiais (3 lentelė). Lipofilinės frakcijai iš pomidorų šalutinių perdirbimo produktų ekstrahuoti naudotos pomidorų išspaudos, liofilizuotos ir sumaltos, kuriose dalelių dydis ≤0,2 mm. CO₂ srautas buvo stabilus (330 ml min⁻¹).

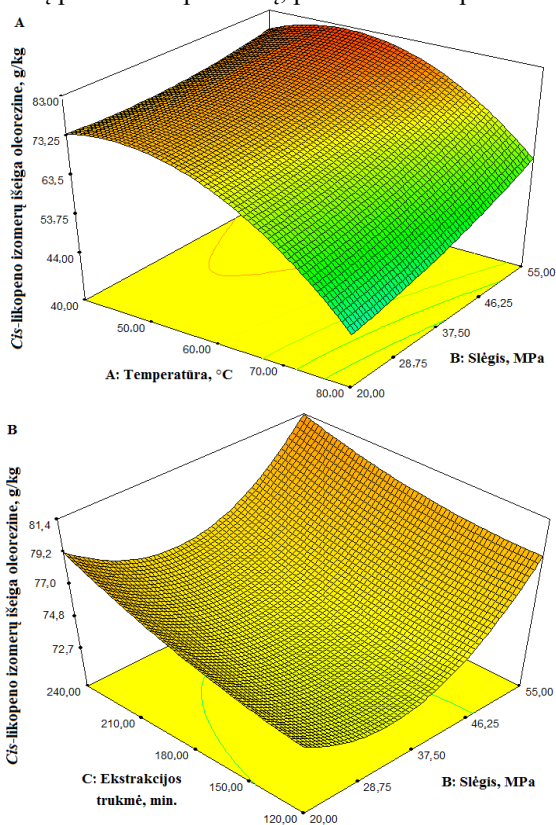
3 lentelė. Ekstrakcijos kintamieji ir jų vertės

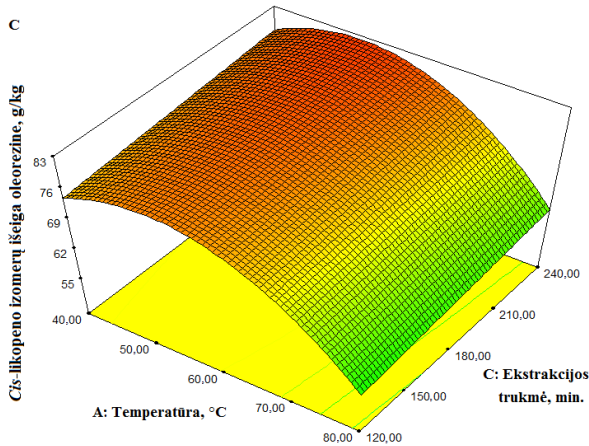
Eksperimentiniai faktoriai	Simboliai	Kintamųjų lygiai ^a				
		-1,682	-1	0	1	1,682
Ekstrakcijos temperatūra (°C)	T	26,36	40	60	80	93,64
Ekstrakcijos slėgis (MPa)	P	8,07	20	37,5	55	66,93
Ekstrakcijos trukmė (min.)	t	79,09	120	180	240	280,91

^a Kintamųjų lygiai: +1,682, -1,682 didžiausios ir mažiausios ašinės plano vertės, 0 – plano centrinės vertės, -1, +1 – pasirinktų ekstremumų faktorinės vertės

Optimizuotos lipofilinės frakcijos, išgautos iš pomidorų šalutinių perdirbimo produktų, superkrizinės ekstrakcijos anglies dvideginio sąlygos. Lipofilinės frakcijos (oleorezino, Y_{oleor}) išeiga iš šalutinių pomidorų perdirbimo produktų optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis (temperatūra 73,9°C; slėgis 53,7 MPa ir ekstrakcijos trukmė 155 min.) buvo 251,2 g/kg SM, t. y. 78 proc. visos ekstrakcijos išeigos, gautos naudojant tradicinę ekstrakciją Soksleto aparatu. O *cis*-likopeno izomerų (Y_{izom}) optimalios ekstrakcijos sąlygos buvo: temperatūra 52 °C; slėgis 55 MPa ir ekstrakcijos trukmė 180 min. Tokiomis sąlygomis gauta *cis*-likopeno izomerų oleorezine išeiga sudarė 62 proc. bendro likopeno kiekio oleorezine. Dominuojantys geometriniai *cis*-likopeno izomerai oleorezine buvo *9-cis* ir *5-cis*.

Trimatis atsako paviršiaus grafikas, vaizduojantis ekstrakcijos slėgio, temperatūros ir trukmės įtaką *cis*-likopeno izomerų išegai išgautose frakcijose iš šalutinių pomidorų perdirbimo produktų, pavaizduotas 2 paveiksle.





2 pav. Trimatis atsako paviršiaus grafikas, vaizduojantis temperatūros ir slėgio įtaką, esant ekstrakcijos trukmei 180 min. (A); laiko ir slėgio, esant temperatūrai 60 °C (B); ekstrakcijos trukmės ir temperatūros, esant slėgiui 37,5 MPa (C), įtaką *cis*-likopeno išegai oleorezine

Antro laipsnio regresijos lygties kintamieji ir koreliacijos koeficientai (T , P , t) nusako skirtingų ekstrakcijos parametrų ir jų sąveikos įtaką tikslinio produkto išegai (4 ir 5):

$$Y_{oleor} \text{ (oleorezino išegai, g/kg)} = 198,82 + 45,40 T + 26,99 P + 9,94 t + 15,25 T P + 2,03 T t - 1,8 P t - 7,64 T^2 - 15,91 P^2 - 4,57 t^2 \quad (4)$$

$$Y_{izom} \text{ (cis-likopeno izomerų išegai, g/kg)} = 71,50 - 11,83 T + 4,86 P + 2,14 t + 2,84 T P + 0,094 T t + 0,049 P t - 11,17 T^2 + 1,96 P^2 + 0,005 t^2 \quad (5)$$

Slėgis ir temperatūra ekstrakcijos metu turėjo didžiausią teigiamą įtaką oleorezino išegai ($p < 0,001$), o laiko įtaka buvo mažesnė ($p < 0,05$). Slėgio ir temperatūros įtaka ekstrakcijos metu turėjo didžiausią įtaką *cis*-likopeno izomerų išegai. Slėgis ir temperatūra lemia tirpiklio tankį: didinant slėgį, tankis ir ekstrahavimo geba didėja; didinant temperatūrą, didėja tirpinamos medžiagos garų slėgis, tačiau mažėja tirpiklio tankis ir lipofilinių medžiagų tirpinimo geba. Remiantis determinacijos koeficientu ($R^2(Y_{oleo})=0,98$ ir $R^2(Y_{izom})=0,96$), modelis atitinka eksperimentinius duomenis.

Šioje dalyje gauti duomenys apie likopeno ekstrahavimą superkritiniais skysčiais yra naudingi perdurbant šalutinius pomidorų produktus, ir šis procesas gali būti pagrindas kuriant racionalias, aplinką tausojančias, netermines, beatliekines perdurbimo technologijas, kurių metu siekiama išgauti didelės vertės

biologiškai veiklius komponentus. Pomidorų šalutinių žaliavų biorafinavimas prisideda prie tvarių gamybos technologijų kūrimo, kai atsiranda galimybė iš šalutinių pomidorų perdirbimo produktų išgauti vertingas frakcijas ir sukurti funkcionaliuosius didelės pridėtinės vertės maisto produktus ir papildus su didesniu *cis*-likopeno izomerų kiekiu.

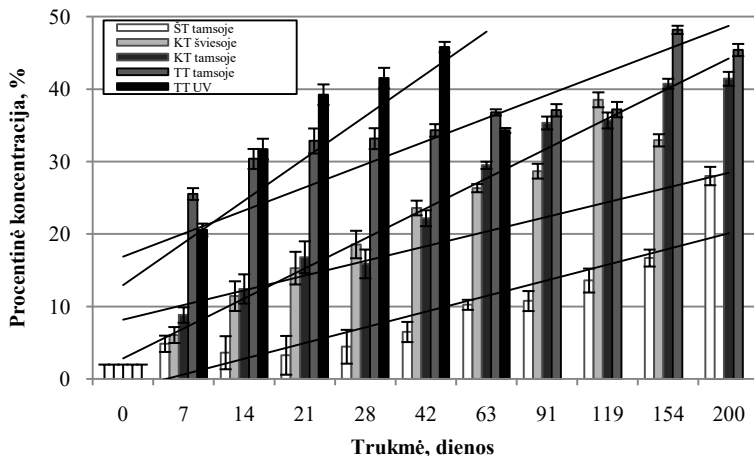
3.3. Likopeno aliejinėje modelinėje sistemoje pagreitintomis laikymo sąlygomis stabilumo ir izomerizacijos tyrimas

Literatūroje teigiama, kad biologiškai veiklių komponentų sudėtis ir jų biologinis pasisavinamumas, perdirbant pomidorus į pomidorų produktus ir naudojant skirtingus technologinių parametrų režimus, keičiasi. Yra duomenų apie karotenoidų stabilumą pomidorų perdirbimo metu, tačiau vis dar trūksta žinių apie skirtingų technologinių parametrų ir jų sąveikos įtaką skirtingų karotenoidų izomerų stabilumui ilgalaikio maisto produktų saugojimo metu.

Šioje darbo dalyje tirti likopeno stabilumas ir izomerizacija aliejinėje modelinėje sistemoje pagreitintomis laikymo sąlygomis. Taikant efektyviąją skysčių chromatografiją ir spalvų koordinačių analizę, tirtas bendras likopeno, likopeno *trans*- bei *cis*-izomerų ir β karoteno stabilumas bandiniuose, laikytuose 200 dienų skirtingomis sąlygomis (ŠT tamsoje, KT šviesoje, KT tamsoje, TT tamsoje, TT UV).

Tyrimo rezultatai parodė, kad likopeno stabilumą aliejinėje modelinėje sistemoje kompleksiskai veikė laikymo sąlygos (temperatūra nuo +1 iki +37 °C ir skirtinga apšvita nuo 0 iki 2500 Lux). Pagreitintomis laikymo sąlygomis buvo nustatyta, kad vyksta izomerizacija iš *trans*- į *cis*-likopeno izomerus ir likopeno skilimas.

Trans-likopeno izomerai izomerizavosi į *cis*-likopeno izomerus, kurių koncentracija per 200 dienų padidėjo ŠT tamsoje, KT tamsoje ir TT tamsoje, išskyrus KT šviesoje ir TT UV bandiniuose, kuriuose skilimo procesas buvo greitesnis nei izomerizacijos, atitinkamai po 154 ir 63 dienų. Daugiau nei 45 proc. bendra *cis*-likopeno izomerų koncentracija aliejinėje modelinėje sistemoje padidėjo laikant bandinius 37 °C temperatūroje (TT tamsoje mėginys) (3 pav.). Mažiausias poveikis izomerizacijos ir skilimo procesui buvo +1 °C tamsoje (ŠT tamsoje) (3 pav.).



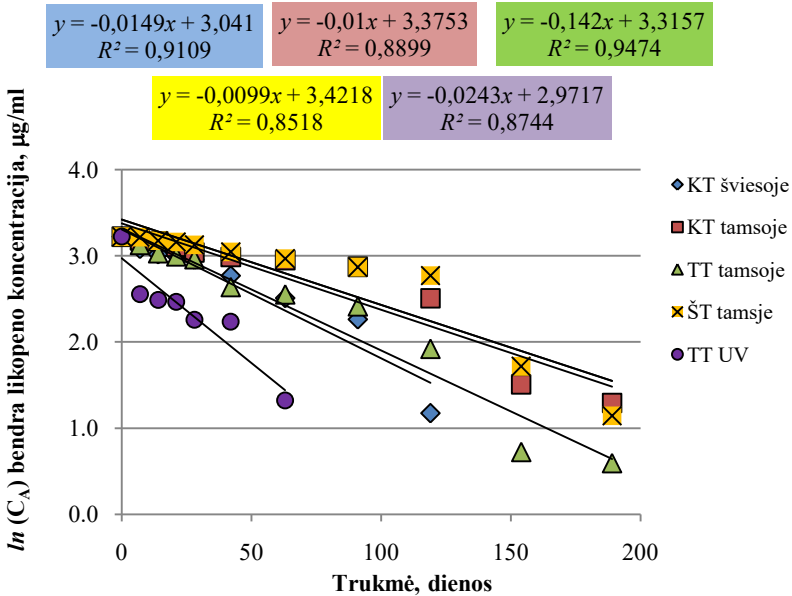
3 pav. Bendras *cis*-likopeno izomerų koncentracijos pokytis per 200 dienų skirtingomis laikymo sąlygomis

Bendras likopeno koncentracijos pokytis aliejinėje modelinėje sistemoje tirtas įvertinant kinetinius duomenis laikymo metu (4 pav.). Likopeno stabilumo aliejinėje modelinėje sistemoje reakcijos greičio konstanta (k) atitinka pirmo laipsnio reakcijos kinetinį modelį. Reakcijos greičio konstanta apibūdina bendros likopeno koncentracijos sumažėjimą ($\mu\text{g ml}^{-1}$) 0,009, 0,015, 0,010, 0,014 ir 0,024 veikiant skirtingai apšvitai ir skirtingai temperatūrai (atitinkamai ŠT tamsoje, KT šviesoje, KT tamsoje, TT tamsoje ir TT UV) aliejinėje modelinėje sistemoje. Didžiausia bendro likopeno pokyčio reakcijos greičio konstanta ($k=0,0243$) buvo nustatyta TT UV bandinyje (4 pav.). 4 pav. matome, kad eksperimentiniai taškai išsidėstę tiesiškai, o regresijos koeficientai (R^2) svyruoja nuo 0,89 iki 0,95 laikant KT šviesoje, KT tamsoje ir TT tamsoje, priešingai nei laikant ŠT tamsoje ir TT UV, kur R^2 yra lygus atitinkamai 0,85 ir 0,87.

Reakcijos greičio konstantų reikšmės gali svyruoti dėl daugelio priežasčių. Literatūroje yra teigiama, kad likopeno koncentracijos pokytis maisto modelinėse sistemose gali kisti kompleksiskai ir priklausomai nuo kitų sistemoje esančių komponentų. Taip pat buvo tiriamas β karoteno stabilumas aliejinėje modelinėje sistemoje. β karotenas buvo daug stabilesnis aliejinėje modelinėje sistemoje, jo skilimo greičio konstantos buvo 0,0007; 0,0045; 0,0006; 0,0012 ir 0,0065 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, veikiant skirtingai apšvitai ir skirtingoms temperatūroms (atitinkamai ŠT tamsoje, KT šviesoje, KT tamsoje, TT tamsoje ir TT UV) aliejinėje modelinėje sistemoje.

Buvo matuotas ir tirtas spalvos pokytis likopeno aliejinėje modelinėje sistemoje skirtingomis pagreitintomis laikymo sąlygomis per 200 dienų.

Didžiausias apskaičiuotas bendras spalvos pokytis (ΔE) buvo TT tamsoje (21,7), o mažiausias – ŠT tamsoje (0,81).



4 pav. Pirmojo laipsnio bendros likopeno koncentracijos logaritmo ($\ln C_A$) priklausomybė nuo reakcijos trukmės

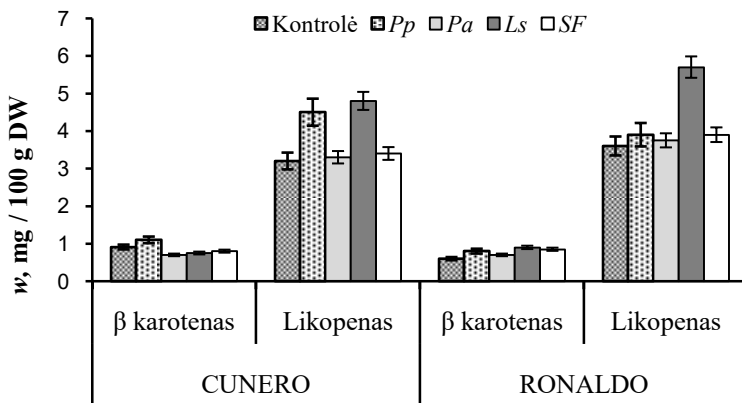
Pastaba. Pateikiami trijų skirtingų ekstraktų ESC rezultatų vidurkiai; C_A – bendra likopeno koncentracija

Likopenas aliejinėje modelinėje sistemoje stabiliausias buvo +1°C temperatūroje tamsoje. Likopenas aliejinėje modelinėje sistemoje buvo jautresnis aplinkos veiksniams, palyginti su β karotenu. Aliejinės modelinės sistemos spalvų pokytį po 200 dienų galima nulėmė susiformavę likopeno *cis*-izomerai ir likopeno skilimas, kuris, kaip manoma, lėmė aliejinės modelinės sistemos spalvos pokyčius skirtingomis laikymo sąlygomis. Spalvos pokytį galima buvo pastebėti ir vizualiai.

3.4. Fermentacijos pieno rūgšties bakterijomis įtakos likopenui pomidorų modelinėse sistemose tyrimas

Šiame darbo etape buvo tiriama skirtingų išgrynintų pienarūgštės bakterijų (*Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8) įtaka likopeno ir kitų karotenoidų išgavai. Likopeno ir β karoteno išgava iš nefermentuotų ir fermentuotų pomidorų pateikta 5 paveiksle.

Didžiausia išgava, gauta fermentuojant su *Lactobacillus sakei* (vidurkis 5,7 mg/100 g), rasta „Ronaldo“ veislės pomidorų tyrėje. Fermentacijos su pastarosiomis bakterijomis padidino karotenoidų išgavą iki 1,5 karto, palyginti su nefermentuotais pomidorais (5 pav.). Iš literatūros duomenų yra žinoma, kad, fermentuojant augalinę matricą, padidėja biologiškai veiklių junginių išgava.



Bandinių pavadinimai

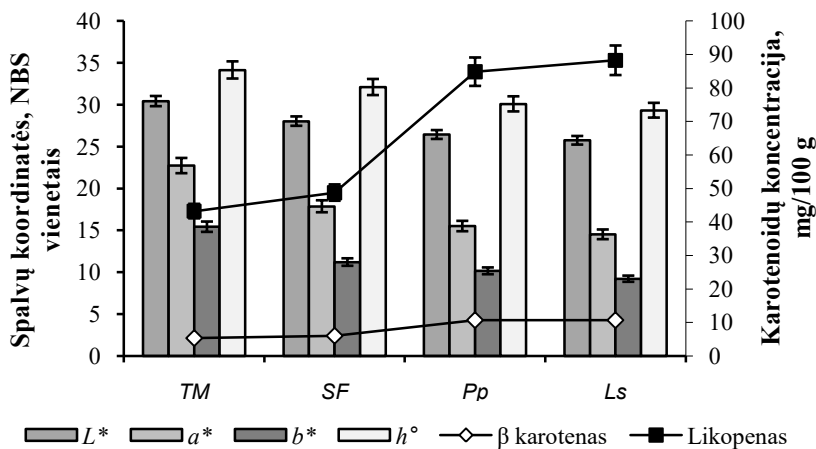
5 pav. β karoteno ir likopeno išgava iš nefermentuotų ir fermentuotų pomidorų su skirtingomis pienarūgštės bakterijomis

Bandiniai: kontrolė – nefermentuota pomidorų tyrė; pomidorų tyrė, fermentuota su: *Pp* – *P. pentosaceus*, *Pa* – *P. acidilactici*, *Ls* – *L. sakei*; *SF* – spontaniinė fermentacija

Tirta fermentacijos įtaka karotenoidų išgavai iš pomidorų šalutinių perdirbimo produktų (šalutinių pomidorų perdirbimo produktų miltai (PM)). Didžiausia bendra karotenoidų išgava gauta PM fermentuojant *L. sakei* pienarūgštės bakterijomis (88,2 mg/100g), mažiausia – nefermentuotuose PM (43,2 mg/100g) (6 pav.). Vertinant gautus tyrimo rezultatus galima teigti, kad fermentacija turi įtakos karotenoidų išgavai iš pomidorų ir šalutinių pomidorų perdirbimo produktų. Nustatyta, kad spalvų koordinatės koreliuoja su bendru karotenoidų kiekiu (6 pav.).

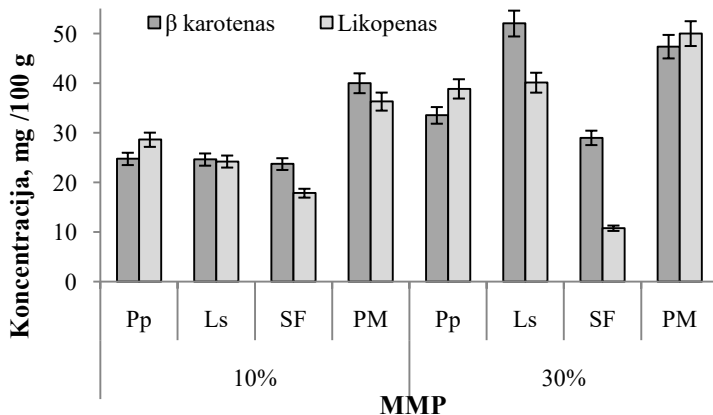
Dideliu kiekiu funkcionaliųjų ingredientų pasižymi augaliniai produktai. Kuriant maisto produktus, kuriuose gyvūniniai biologiškai vertingi baltymingi produktai derinami su funkcionaliaisiais – augaliniais, galima pasiekti gerų rezultatų, atitinkančių vartotojų lūkesčius (biologiškai veiklių medžiagų potencialas maisto pramonėje nepakankamai efektyviai išnaudojamas). Vieni iš tokių produktų galėtų būti pomidorai ir jų šalutiniai perdirbimo produktai, nes juose yra randama vertingų funkcionaliųjų ingredientų – karotenoidų, iš kurių

itin svarbus yra likopenas. Šioje darbo dalyje buvo siekiama maltos mėsos pusgaminius papildyti funkcionaliaisiais ingredientais (fermentuotomis pomidorų frakcijomis). Fermentuotais pomidorų miltais (PM) buvo papildyti maltos mėsos pusgaminiai (MMP) ir įvertintas likopeno ir β karoteno koncentracijos pokytis prieš ir po terminio apdorojimo. Taip pat buvo įvertintos juslinės MMP savybės.



6 pav. Spalvų charakteristikos ir karotenoidų kiekis nefermentuotų (PM) ir fermentuotų pomidorų milteliuose. SF – spontaniinė fermentacija, Pp – fermentuota su *P. pentosaceus*, Ls – fermentuota su *L. sakei*

MMP receptūroje buvo pasirinktas 10 ir 30 proc. fermentuotų PM priedas. Tačiau, vertinant technologines savybes, buvo pastebėta, kad 30 proc. priedas buvo per didelis ir sukėlė nepageidaujama galutinio gaminio savybių (pusgaminis buvo sunkiai formuojamas, birus po terminio apdorojimo). Buvo tiriama likopeno ir β karoteno koncentracija po terminio apdorojimo (verdant vandenyje 100 °C 10 min). Didžiausia likopeno koncentracija po terminio apdorojimo buvo nustatyta MMP su 30 proc. PM, fermentuotų *L. Sakei* bakterijų kultūromis, priedu (8,79 mg/100g), o su 10 proc. priedu buvo 2,74 mg/100 g.



7 pav. Likopeno ir β karoteno koncentracijos pokyčiai termiškai apdorotos maltos mėsos pusgaminiuose, papildytuose funkcionaliaisiais fermentuotais pomidorų šalutinių perdirbimo produktų miltais (su 10 ir 30 proc. priedais)

Maltoje kiaulienoje 10 proc. fermentuotų pomidorų produktų priedas pagerino spalvos priimtumą ir padidino galutinio produkto maistinę vertę, ir tai neturėjo įtakos vartotojams priimtino skonio savybėms. Remiantis gautais tyrimo rezultatais galima teigti, kad maltos mėsos pusgaminiams papildyti funkcionaliaisiais ingredientais geriausiai naudoti pomidorų miltelius, fermentuotus išgrynintomis *Lactobacillus sakei* pienarūgštės bakterijomis.

3.5. Pomidorų sulčių ir pomidorų sulčių su priedais mišinių, papildytų izomerizuotu likopeno ekstraktu, tyrimas

Daržovių sultys yra patrauklus kasdien vartojamas produktas, juse gausu įvairių biologiškai veiklių junginių. Dažniausiai vienos rūšies daržovių sultys nepasižymi patraukliomis juslinėmis savybėmis. Derinant skirtingų daržovių rūšių sultis su vaisių sultimis, gaunami patrauklūs juslinėmis, biocheminėmis ir mikrobiologinėmis savybėmis pasižymintys produktai. Pomidorų produktai vis populiareni tampa dėl mokslinių išvadų, kad likopenas turi teigiamą poveikį sveikatai. Buvo tiriama pomidorų sulčių ir pomidorų sulčių su priedais mišiniai, papildyti likopeno *cis*-izomerų ekstraktu.

4 lentelė. Bendras likopeno (LIK) ir likopeno izomerų bei β karoteno (β KAR) kiekis pomidorų ir pomidorų sulčių mišiniuose su likopeno *cis*-izomerų ekstrakto priedu

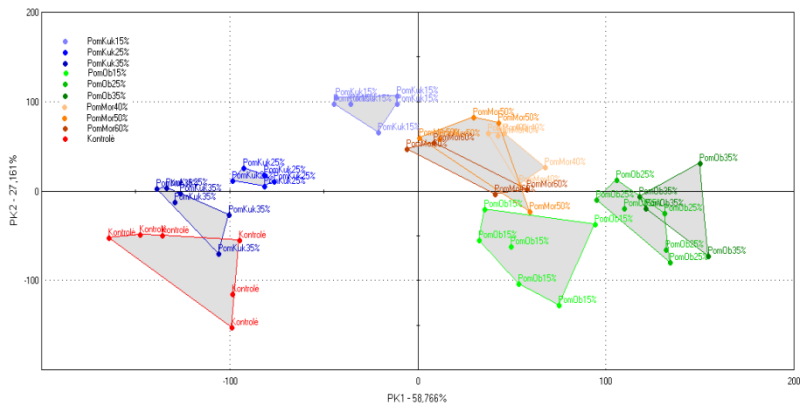
Bandiniai	Koncentracija mg/100 ml sulčių			
	β KAR	<i>trans</i> -LIK	Bendras <i>cis</i> -LIK	Bendras LIK
Kontrolė be priedų	0,96±0,030b,c	7,57±0,125b	0,37±0,031a	7,94±0,024a
PomOb15%	0,93±0,106h	9,67±0,123e	12,67±0,040h	22,34±0,026g
PomOb25%	0,74±0,135g	8,61±0,096d	11,27±0,047f	19,88±0,051e
PomOb35%	0,63±0,127f	7,04±0,077a	9,16±0,057b	16,21±0,036b
PomMor40%	4,67±0,014e	9,68±0,075e	12,37±0,020g	22,05±0,237f
PomMor50%	4,22±0,015d	8,23±0,074c	10,96±0,015e	19,19±0,025d
PomMor60%	6,95±0,007a	7,10±0,129a	9,54±0,040c	16,64±0,031c
PomKuk15%	1,17±0,047c	11,19±0,076g	14,46±0,030j	25,65±0,151i
PomKuk25%	0,98±0,015b,c	10,10±0,108f	12,95±0,050i	23,05±0,040h
PomKuk35%	0,75±0,026a,b	8,49±0,101c,d	10,81±0,035d	19,30±0,100d

Skirtingomis raidėmis pažymėti vidurkiai stulpeliuose statistiškai reikšmingai skiriasi, kai $p < 0,05$

Pirmiausia buvo ištirtas karotenoidų kiekis pomidorų sulčių ir pomidorų sulčių su priedais mišiniuose, papildytuose likopeno *cis*-izomerų ekstraktu. Pradinėse pomidorų sultyse be priedų vidutinė likopeno koncentracija buvo 7,94 mg 100 ml⁻¹, o *cis*-likopeno izomerai sudarė tik 4,7 proc. bendro likopeno kiekio. Pradinis β karoteno kiekis kontroliniame mėginyje buvo 0,96 mg 100 ml⁻¹. Likopeno ekstrakto priedas sulčių mišiniuose smarkiai padidino bendrą likopeno kiekį galutiniam produkte, o ypač *cis*-likopeno izomerų kiekį (4 lentelė). Likopeno kiekis pomidorų sulčių mišiniuose svyravo nuo 486,27 iki 769,35 mg 100 ml⁻¹, atitinkamai mėginiuose PomOb35proc. ir PomKuk15proc. Mažiausia likopeno ir jo izomerų koncentracija nustatyta sulčių mišiniuose, kuriuose obuolių, morkų ir kukurūzų sultys sudarė didžiausią procentinį kiekį. Pomidorų ir morkų sultyse buvo didžiausias β karoteno kiekis, palyginti su kontrole, nuo 4,4 iki 7,2 karto. Kaip teigiama literatūroje, sultys su dideliu β karoteno kiekiu padidina likopeno pasisavinamumą. Didžiausiu *cis*-likopeno kiekiu pasižymėjo pomidorų-kukurūzų sultys, kuriose pomidorų sultys sudarė 85 proc. bendro sulčių kiekio, bendras *cis*-likopeno kiekis buvo apie 433 mg 100 ml⁻¹ (4 lentelė).

Pomidorų sulčių ir pomidorų sulčių su priedais mišinių, papildytų likopeno ekstraktu, galimi skoninių savybių skirtumai buvo įvertinti „elektroniniu liežuviu“, kuris matuoja bendrą sukuriamą signalą bandinio

viršerdvėje. Gauti matavimai apdoroti statistiniais-matematiniais metodais, šiuo atveju duomenys pateikti principinės komponentų analizės (PKA) būdu. Nustatyta, kad šiuo metodu tirtų sulčių mėginiai buvo atskirti į atskiras labiau panašių sulčių grupes, tačiau grupėje keletas bandinių išsidėstė labai arti vienas kito (8 pav.).

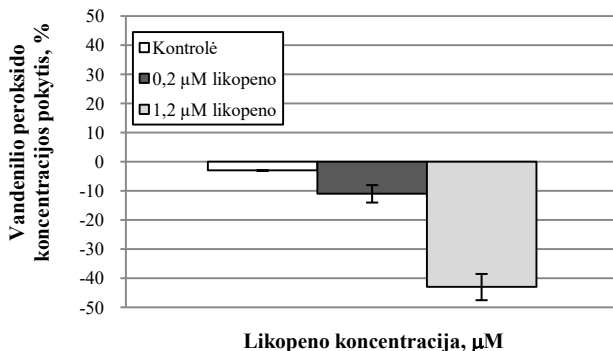


8 pav. Pomidorų sulčių ir sulčių mišinių, papildytų izomerizuotu likopeno ekstraktu, principinės komponentų analizės (PKA) diagrama

Degustuojant (duomenys nepateikti) geriausiomis skoninėmis savybėmis pasižymėjo pomidorų ir obuolių sulčių mišinys, kuriame obuolių sulčių kiekis buvo 35 proc., taip pat patraukliomis juslinėmis savybėmis pasižymėjo pomidorų ir morkų sulčių mišinys, kuriame morkų sultys sudarė 40 proc.

3.6. Likopeno antioksidacinio ir proliferacinio aktyvumo ląstelių kultūrose tyrimas

Naudodami eksperimentinį modelį, tyrėme likopeno poveikį pelių makrofagų J774 ląstelių kultūrai. Pasirinktos likopeno koncentracijos atitinka likopeno koncentracijas, nustatytas plazmoje (įvairių autorių duomenimis, jos yra nuo 0,2 iki 1,5 μM). Ankstesni tyrimai parodė, kad, makrofagų radikalų generacijai sužadinti pasirinkus forbolio miristato acetatą (PMA), jis tiesiogiai aktyvuoja proteinkinazę C, dėl to aktyvuojamos NADPH oksidazės ir sukeliamas oksidacinio streso proveržis. NADPH oksidazių generuojamas didelis reaktyviųjų deguonies rūšių kiekis dalyvauja įvairiuose uždegimo procesuose. Tyrimai parodė, kad tokiame modelyje likopenas (0,2 μM) 11 proc. sumažina vandenilio peroksido susidarymą, o didesnė koncentracija (1,2 μM) — apie 43 proc. (9 pav.).

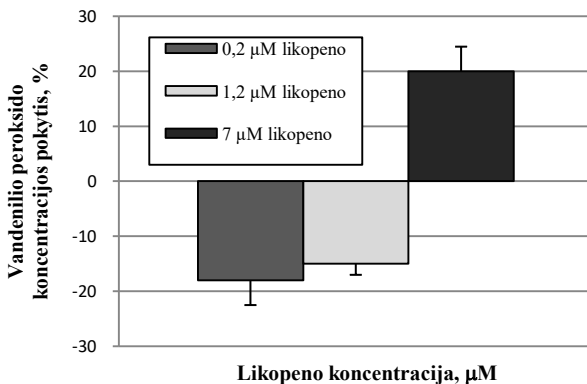


9 pav. Likopeno poveikis (netiesioginis) vandenilio peroksido generacijai makrofagų J774 ląstelių kultūroje

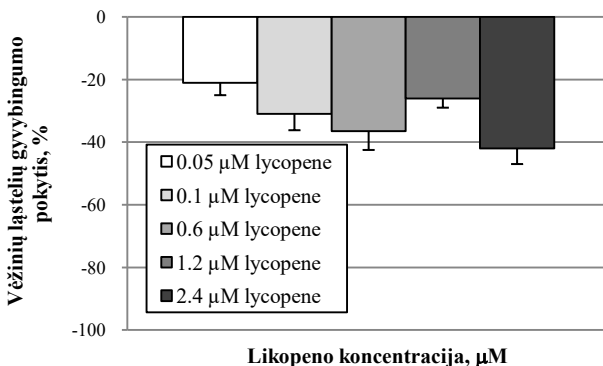
Tiesioginiais tyrimais nustatyta, kad likopenas (0,2 μM ir 1,2 μM) slopina vandenilio peroksido gamybą 15–18 proc., o didesnės nei nustatytos žmogaus plazmoje koncentracijos (7 μM) skatina vandenilio peroksido generaciją net 20 proc. (10 pav.). Taigi, apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad likopenas gali veikti NADPH oksidazės aktyvumą ir daryti įtaką su tuo susijusiai reaktyvių deguonies junginių generacijai ir turėti uždegimą slopinančių savybių, kadangi NADPH oksidazių generuojami aktyvieji deguonies junginiai dalyvauja įvairiuose uždegimo procesuose. Rezultatai rodo, kad poveikis priklauso nuo likopeno koncentracijos.

Norėdami iširti likopeno poveikį vėžinių ląstelių gyvybingumui, pasirinkome žiurkių glioblastomos C6 ląsteles. Glioblastoma yra viena iš agresyviausių ir dažniausiai pasitaikančių gliomos (piktybinių smegenų navikų) formų. Tikslios glioblastomos atsiradimo priežastys nėra žinomos, tačiau auglio vystymąsi gali nulemti ir jonizuojamoji spinduliuotė, elektromagnetinis laukas, infekcijos ir kitos nenustatytos priežastys. Ištyrę likopeno (0,05–2,4 μM) poveikį glioblastomos ląstelėms, nustatėme, kad, esant tirtoms koncentracijoms, slopinamas šių ląstelių gyvybingumas 20–42 proc. (11 pav.). Mažiausią poveikį turėjo 0,05 μM likopeno, o didžiausią (-42 proc.) – 2,4 μM likopeno.

Tyrimai parodė, kad likopenas glioblastomos ląstelėse skatina aktyvių deguonies formų susidarymą ir slopina šių ląstelių gyvybingumą. O makrofagų kultūroje NADPH oksidazių nulemta aktyvių deguonies formų generacija skatinama, ir tai gali būti siejama su likopeno uždegimo slopinamuoju poveikiu.



10 pav. Likopeno poveikis (tiesioginis) vandenilio peroksido susidarymas makrofagų J774 ląstelių kultūroje



11 pav. Likopeno poveikis žiurkių glioblastomos ląstelių gyvybingumui (MTT testas)

Apibendrinus *in vitro* tyrimus, eksperimentiniai duomenys parodė, kad tiriamas izomerizuotas likopeno ekstraktas (priklausomai nuo likopeno koncentracijos) mažina vandenilio peroksido gamybą J774 makrofagų kultūroje dėl tiesioginio surišimo ir galimo poveikio NADPH oksidazei. Gauti rezultatai parodė, kad koncentruotas *cis*-likopeno izomerais (60 proc.) ekstraktas pasižymi citotoksiniu efektyvumu žiurkių glioblastomos C6 ląstelėms. Likopeno izomerizuoti ekstraktai (su 60 proc. *cis*-izomerų) gali būti vartojami kaip maisto priedai ar maisto papildai, turintys uždegimo slopinamąjį ir antiproliferacinį poveikį žmogaus sveikatai.

IŠVADOS

1. Išvystytas ir pritaikytas bei validuotas efektyviosios skysčių chromatografijos metodas (ESC) likopeno, likopeno *trans*-, *cis*-izomerų (*5-cis*; *7-cis*; *9-cis*; *13-cis*; *15-cis*) ir β karoteno kokybinei ir kiekybinei sudėčiai įvertinti pomidoruose, pomidorų produktuose ir kompleksiniuose mišiniuose su pomidorais. Gauti ESC metodo validacijos parametrų įverčiai patvirtina taikytos sistemos jautrumą, glaudumą ir tiesiškumą. Geriausios chromatografinės sąlygos buvo pasiektos su atvirkščių fazių C30 kolonėle (5 μ m, 250 x 4,6 mm), metanolio/metil-*tret*-butilo eterio mišinio gradientine eliucija (tėkmės greitis 0,60 ml min⁻¹), junginių detekcija vykdyta ties 473 nm bangos ilgiu.

2. Optimalios superkristinės ekstrakcijos sąlygos siekiant išgauti didžiausią oleorezino kiekį iš pomidorų šalutinių perdirbimo produktų buvo: slėgis 53,7 MPa, 73,9 °C temperatūra ir ekstrakcijos trukmė 155 min., o optimalios sąlygos *cis*-likopeno izomerams išgauti oleorezine buvo: slėgis 55 MPa, temperatūra 52 °C, ekstrakcijos trukmė 180 min. Oleorezino išėiga iš šalutinių pomidorų perdirbimo produktų optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis buvo 251,2 g/kg SM. Dominuojantys geometriniai *cis*-likopeno izomerai oleorezine buvo *9-cis* ir *5-cis*. Bendra *cis*-likopeno izomerų koncentracija SK-CO₂ ekstrakto sudarė 62 proc. bendro likopeno kiekio oleorezine. Tai parodė, kad technologiniai parametrai gali būti pakeičiami taip, kad būtų padidinta *cis*-likopeno izomerų išėiga galutiniame produkte.

3. Nustatyta, kad likopeno stabilumą aliejinėje modelinėje sistemoje kompleksiskai veikė laikymo sąlygos (temperatūra nuo +1 iki +37 °C ir skirtinga apšvita nuo 0 iki 2500 Lux). Pagreitintomis sąlygomis buvo nustatyta izomerizacija iš *trans*- į *cis*-likopeno izomerus ir likopeno skilimas. Likopeno izomerizacijos laipsnis padidėjo esant 37 °C temperatūrai, susiformavus 5 indentifikuotiems *cis*-likopeno izomerams (*5-cis*, *7-cis*, *9-cis*, *13-cis* ir *15-cis*), o *trans*-likopeno skilimas padidėjo veikiant UV apšvitai. Labiausiai kito *5-cis*-likopeno koncentracija (nuo 0 iki 7,29 mg ml⁻¹) pagreitintomis sąlygomis, palyginti su kitais likopeno izomerais (*7-cis*, *9-cis*, *13-cis* ir *15-cis*). Didžiausias likopeno stabilumas buvo nustatytas +1 °C tamsoje.

4. Nustatyta, kad augalinės matricos fermentacija su išgrynintomis pienarūgštės bakterijomis (*Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8) daro įtaką karotenoidų (ypač likopeno) išėigai. Likopeno išėiga iš šalutinių pomidorų perdirbimo produktų padidėja (daugiau nei 37 proc.) fermentuojant *Lactobacillus sakei* KTU05-6 pienarūgštės bakterijomis.

5. Izomerizuoto likopeno ekstrakto (5 proc.) priedas pomidorų sulčių mišiniuose ir fermentuotų pomidorų frakcijų maltos mėsos produktuose padidina likopeno, ypač *cis*-likopeno izomerų, koncentraciją galutiniame produkte, ir tai padidina funkcionaliąsias produkto savybes:

a) priimtinausiomis skoninėmis savybėmis pasižymėjo pomidorų ir obuolių sulčių mišinys (su 35 proc. obuolių sulčių) bei pomidorų ir morkų sulčių mišinys (su 40 proc. morkų sulčių) su didesne *cis*-likopeno izomerų koncentracija.

b) maltoje kaulienoje 10 proc. fermentuotų pomidorų produktų priedas pagerino spalvos priimtinumą ir padidino galutinio produkto maistinę vertę, ir tai nedarė įtakos vartotojams priimtino skonio savybėms.

6. Izomerizuotas likopeno ekstraktas (60 proc. *cis*-izomerų nuo bendros likopeno koncentracijos) slopina reaktyvių deguonies formų gamybą ir glioblastomos ląstelių augimą. Vandenilio peroksido generacija J774 makrofagų kultūroje veikiant izomerizuotu likopeno ekstraktu sumažėja 43 proc., o žiurkių C6 glioblastomos ląstelių gyvybingumas sumažėja 42 proc. Koncentruoti likopeno izomerizuoti ekstraktai gali būti vartojami kaip maisto priedai ar maisto papildai, turintys uždegimo slopinamąjį ir antiproliferacinį poveikį.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

STRAIPSNIAI

Moksliniai straipsniai leidiniuose referuojamuose ir turinčiuose cituojamumo rodiklį *Clarivate Analytics Web of Science (CA WoS)* duomenų bazėje

1. URBONAVICIENE, D., VISKELIS, P., JANKAUSKIENE, J., BOBINAS, C. Lycopene and β -carotene in non-blanching and blanching tomatoes. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 2012, 10(2), 142-146.
2. BARTKIENE, E., VIDMANTIENE, D., JUODEIKIENE, G., VISKELIS, P., URBONAVICIENE, D. Lactic acid fermentation of tomato: Effects on cis/trans lycopene isomer, β -carotene mass fraction and formation of L(+)- and D(-)-Lactic acid. *Food Technology and Biotechnology*. 2013, 51(4), 471-478.
3. BARTKIENE, E., VIDMANTIENE, D., JUODEIKIENE, G., VISKELIS, P., URBONAVICIENE, D. The use of tomato powder fermented with *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus sakei* for the ready-to-cook minced meat product quality improvement. *Food Technology and Biotechnology*. 2015, 53(2), 163-170.
4. URBONAVICIENE, D., VISKELIS, P., VISKELIS, J., BOBINAS, C. Stability of tomato lycopene under thermal- and light-irradiation treatments in an oil-based model system. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2015, 102(2), 185-192.

Kitų tarptautinių duomenų bazių leidiniuose

1. URBONAVIČIENĖ, D., VIŠKELIS, P., VIŠKELIS, J., BOBINAS, Č. Likopeno ir β -karoteno kiekio prognozavimas pomidoruose pagal jų CIEL*a*b* spalvų koordinates. *Sodininkystė ir daržininkystė*. 2010, 29(3), 65-73.
2. URBONAVIČIENĖ, D., VIŠKELIS, P. Likopeno ir β -karoteno indentifikavimas pomidoruose efektyviosios skysčių chromatografijos metodu. *Sodininkystė ir daržininkystė*. 2013, 32(1-2), 77-90.

Knygų skyriai

1. JUODEIKIENE, G., BARTKIENE, E., VISKELIS, P., URBONAVICIENE, D., EIDUKONYTE, D., BOBINAS, C. Fermentation processes using bacteriocins producing lactic acid bacteria for biopreservation and improving functional properties of food products. *In Advances in Applied Biotechnology*. Ed. Marian P. Croatia: InTech, 2011, 63-100. ISBN 979-953-307-013-0
2. URBONAVICIENE, D., VISKELIS, P., BARTKIENE, E., JUODEIKIENE, G., VIDMANTIENE, D. The use of Lactic acid bacteria in the fermentation of fruits and vegetables: technological and functional properties. *In Biotechnology*. Ed. Deniz E., Croatia: InTech, 2014, 135-164. ISBN 978-953-51-4157-0

3. VISKELIS, P., RADZEVICIUS, A., URBONAVICIENE, D., VISKELIS, J., KARKLELIENE, R., BOBINAS, C. Biochemical parameters in tomato fruits from different cultivars to functional food for agricultural, industrial and pharmaceutical uses. *In Plants – Various Aspects*. Ed. Hany El-S. Croatia: InTech, 2015, 45-77.

Straipsniai konferencijų leidiniuose

1. URBONAVICIENE, D., VISKELIS, P., RUBINSKIENE, M. The stability of lycopene all-*trans* isomers in tomato products. *In Technologija of Internaional Conference of Lithuanian Chemical Society "Chemistry and Chemical Technology 2014"; "Chemistry and Chemical Technology" Proceedings of International Conference, Lithuania*. Kaunas: Technologija. 2014, 192-195. ISSN 2351-5643.
2. URBONAVICIENE, Dalia, BOBINAITE, Ramune, VISKELIS, Pranas, VISKELIS, Jonas, BOBINAS, Ceslovas. Characterisation of tomato juice and different tomato-based juice blends fortified with isomerised lycopene extract. *In International scientific conference „Rural Development 2015“ Proceedings*. 2016, 1-6. ISSN 1822-3230 / eISSN 2345-0916.

Pranešimai tarptautinėse konferencijose ir simpoziumuose ir jų santraukos

1. URBONAVICIENE, D., VISKELIS, J., VISKELIS, P. Isomerzation of lycopene in blanched tomatoes. *In Book of abstract, Food and nutrition, 5th Baltic conference on food science and technology (FoodBalt-2010), Tallinn, Estonia*. 2010, pp. 79-87.
2. URBONAVICIENE, D., BARTKIENE, E., VISKELIS, P., JUODEIKIENE, G., TUSIENE R. Possibilities to enrich meat products with lycopene from tomato. *In Abstract Book, 6th Baltic conference of food science and technology "Innovations for food science and production" (FoodBalt 2011), Jelgava, Latvia*. 2011, p. 20.
3. URBONAVICIENE, D., BARTKIENE, E., JUODEIKIENE, G., VISKELIS, P., LUZAITE, V. Lycopene and β -carotene content of fermented tomato products. *In Abstract Book, 6th Baltic conference of food science and technology "Innovations for food science and production" (FoodBalt 2011), Jelgava, Latvia*. 2011, p. 35.
4. URBONAVICIENE, D., VISKELIS, P. Stability of lycopene toward UV-irradiation in oil solution. *In Technologija, 7th Baltic Conference on Food Science and Technology "Innovative and healthy food for consumers" (FoodBalt 2012), Kaunas, Lithuania*. 2012, p. 125.
5. URBONAVICIENE, D., VISKELIS, P., RADZEVICIUS, A., VISKELIS, J., LUKSIENE, Z. Evaluation of the chemical composition of Lithuanian tomato varieties. *In Technologija, 7th Baltic Conference on Food Science and*

Technology "Innovative and healthy food for consumers" (FoodBalt 2012). Kaunas, Lithuania. 2012, p. 126.

7. URBONAVICIENE, D., BARTKIENE, E., VIDMANTIENE, D., JUODEIKIENE, G., VISKELIS, P. Lactic acid bacteria induced geometrical *trans-cis* isomerisation of lycopene from tomato. *In The 8th International Scientific Conference "The Vital Nature Sign" Abstract book, Kaunas, Lithuania. 2014, p. 14.*

8. URBONAVICIENE, D., VISKELIS, P. Content and isomeric ratio of lycopene in 'Semlo' variety of tomato. *In Abstract Book, 9th Baltic Conference of food science and technology "Food for Consumer Well-Being" (FoodBalt 2014), Jelgava, Latvia, 2014, p. 32.*

9. KUBILIUTE, M., URBONAVICIENE, D., VISKELIS, P. Superkriazinės ekstrakcijos anglies dvideginio įtaka likopeno izomerizacijai. *In Konferencijų pranešimų santraukos, Studentų mokslinė praktika 2014, II dalis, Vilnius, Lithuania. 2014, pp. 249-251.*

10. URBONAVICIENE, D., KUBILIUTE, M., BOBINAS, C., VISKELIS, P. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from tomato 'Admiro F1'. *In Abstract book, 10th Baltic Conference on Food Science and Technology "Future Food: Innovations, Science and Technology" (FoodBalt 2015), Kaunas, Lithuania. 2015, p. 24.*

11. URBONAVICIENE, D., BOBINAITE, R., VISKELIS, J., BOBINAS, C., VISKELIS, P. Optimisation of supercritical CO₂ extraction of lycopene from red tomato. *In Abstract Book, the 9th International Scientific Conference "The Vital Nature Sign", Kaunas, Lithuania. 2015, p. 16.*

12. VISKELIS, P., URBONAVICIENE, D., BOBINAS, C. Effect of supercritical CO₂ extraction on *trans/cis* lycopene isomerisation. *In Abstract, 12th International Congress on Engineering and Food (ICEF12), Quebec, Canada. 2015, p. 124.*

13. VISKELIS, P., RADZEVICIUS, A., VISKELIS, J., URBONAVICIENE, D., BOBINAS, C. Amount of carotenoids in different color tomatoes. *In Book of Abstracts, 1st Food-STA Virtual Conference "University-Industry educational and training initiatives", Austria, Vienna (BOKU). 2015, p. 45.*

14. URBONAVICIENE, D., BOBINAITE, R., BOBINAS, Č., RADZEVICIUS, A., VISKELIS, P. Chemical composition of high-pigment tomato puree with lycopene extract from tomato by-products. *In Book of abstract 2nd Euro-Mediterranean Symposium "Fruit and Vegetable Processing 2016", Avignon, France. 2016, p. 153.*

Rekomendacijos

1. RADZEVIČIUS, A., VIŠKELIS, J., URBONAVIČIENĖ, D., KARKLELIENĖ, R., MAROČKIENĖ, N., JUŠKEVIČIENĖ, D., VIŠKELIS, P. Pomidoruose esančių biocheminių elementų kiekio nustatymas nedestruktyviu

metodu. *Naujausios rekomendacijos žemės ir miškų ūkiui.*, LAMMC, Akademija, 2015, pp. 4-6. ISSN 2029-7548.

CURRICULUM VITAE

Vardas, pavardė: Dalia Urbonavičienė

Gimimo data: 1985 03 02

Studijos ir įgytas išsilavinimas:

- 1998–2004 m. Juozo Grušo vidurinė mokykla. Mokyklos baigimo atestatas.
- 2004–2008 m. Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, taikomosios chemijos bakalauro kvalifikacinis laipsnis.
- 2008–2010 m. Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, chemijos inžinerijos magistro kvalifikacinis laipsnis.
- 2010–2016 m. Studijos Kauno technologijos universiteto cheminės inžinerijos krypties doktorantūroje.

Kita informacija:

Lietuvos mokslų akademijos jaunųjų mokslininkų ir doktorantų mokslinių darbų konkurse 2015 m. pagyrimo raštas už mokslinį darbą „Perdirbimo technologinių procesų įtaka likopeno izomerizacijai“.

Lietuvos mokslo tarybos 2015 m. doktoranto stipendija už akademinis pasiekimus.

2015 m. KTU rektoriaus padėkos raštas už akademinis pasiekimus.

Lietuvos mokslo tarybos 2014 m. doktoranto stipendija už akademinis pasiekimus.

Dalyvavimas projektuose:

Mokslininkų grupių projektas „Likopeno ekstrakcija superkritiniais skysčiais ir ekstraktų panaudojimas inovatyvių produktų kūrimui“ nuo 2015 m.

Nacionalinė mokslo programa „Sveikas ir saugus maistas“ projektas „Auginimo ir laikymo būdų bei technologijų įtaka sodininkystės ir daržininkystės produktų kokybei“. 2011–2014 m.

„Daržovių sulčių ir panašių produktų techninio reglamentavimo rekomendacijų parengimas“ Sutartis su Nacionaline mokėjimo agentūra prie Žemės ūkio ministerijos 2014 05 27, Nr. MT-14-17 laikotarpiui nuo 2014 m. gegužės 27 d. iki 2014 m. lapkričio 10 d.

Ūkio subjektų taikomųjų mokslinių tyrimų užsakymai: sutartis su MB „Sulčių fabrikas“ 2014 m. sausio 4 d. Nr. BTL2014/01 „Dėl MTEP paslaugų atlikimo“. Darbo tikslas – sukurti morkų sulčių receptūras ir optimizuoti morkų sulčių technologinį procesą.

Mokslinio tyrimo paslaugos teikimo sutartis su UAB „Acorus Calamus“ 2014 11 12 Nr. 20141112 „Vaistinių arbatų liofilizacijos proceso optimizavimas ir įtakos jų vaistinėms savybėms tyrimai“.

Tarptautinė mokslo programa EUREKA E!5363 BaltVegStor. „Baltijos regione auginamų daržovių laikymo kontroliuojamoje atmosferoje parametrų optimizavimas ir naujų technologinių elementų kūrimas“. 2010–2012 m.

Tarptautinė mokslo programa EUREKA E!3474 HEALTHY MAN „Funkcinio maisto su natūraliu likopenu sukūrimas“. 2005–2006 m.

Ūkio subjektų taikomųjų mokslinių tyrimų užsakymai, BTL2013/04, UAB „Tobulas paveikslas“. 2013 06–2013 12.

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovui prof. dr. Pranui Viškeliui už disertacijos temos idėją, vertingas mokslines konsultacijas rengiant publikacijas ir disertaciją, pasitikėjimą ir palaikymą bei nuolatinį skatinimą tobulėti. KTU Maisto mokslo ir technologijos katedros kolegoms – už konsultacijas ir pagalbą atliekant tyrimus. Taip pat dėkoju LAMMC Sodininkystės ir daržininkystės instituto Biochemijos ir technologijos laboratorijos mokslininkams ir techniniam personalui už patarimus ir pagalbą rengiant šį mokslinį darbą. Dėkoju LSMU Farmacijos fakulteto mokslo darbuotojams už pagalbą atliekant tyrimus ir konsultacijas.

Nuoširdžiai dėkoju šeimai ir artimiesiems, kurie prisidėjo prie sėkmingo šio darbo įgyvendinimo.

Lycopene in tomatoes and tomato products: stability and isomerisation during processing and storage

ABSTRACT

Nowadays food is not intended to only satisfy hunger but also to prevent nutrition-related diseases and improve optimal wellness of the consumers. The advances in understanding the relationship between nutrition and health have resulted in the development and increased the demand of functional foods. Many research studies have demonstrated a significant link between the regular intake of phytochemicals (e.g. carotenoids, polyphenols, phytosterols) and the prevention of certain diseases, such as cancer, arthritis, diabetes and cardiovascular complications. Carotenoids are naturally occurring plant pigments that are responsible for the colours of different red, green, yellow and orange fruits and vegetables. While the most studied carotenoid is beta-carotene, other carotenoids, such as lycopene, are now receiving much attention due to their higher antioxidant activity and organ-specific functionality compared to beta-carotene. Carotenoids, including the red-coloured lycopene, cannot be synthesized by humans and, therefore, have to be obtained from food sources or in a form of dietary supplements.

Lycopene is narrowly distributed in foods. It is predominantly found in tomatoes and tomato products, therefore these fruits and tomato-based products contribute a significant amount of lycopene to the human diet. More than 80% of tomatoes grown worldwide are processed into products such as tomato juice, paste, puree, ketchup, sauce and salsa. Lycopene is important mainly due to its beneficial properties for human health. Lycopene exhibits antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic properties. High antioxidant activity of lycopene results from its polyene structure with 11 conjugated double bonds. In order to exert its health effects, lycopene has to be absorbed into the blood stream and reach its site of action. In the fluids and tissues of the human body, 25–70 % of lycopene is found in the form of various *cis*-isomers. It is indicated that the biological potency of *cis*-lycopene isomers is different from that of the *all-trans* form.

Based on the literature data, *cis*-lycopene isomers have a stronger *in vitro* antioxidant activity than the *all-trans* form. Therefore, *cis*-lycopene isomers are regarded as offering potentially better health benefits than the *trans*-isomers.

In fresh, red-coloured tomatoes *all-trans*-lycopene contains 94–96% of the total lycopene content. *All-trans*-lycopene is thermodynamically the most stable form. During exposure to thermoenergy, oxygen and light, lycopene can undergo isomerisation and degradation. Isomerisation converts *all-trans*-isomers to *cis*-isomers and increases the biological properties of lycopene. The opinion is that bioaccessibility and bioavailability of nutrients are more relevant for the nutritional value of foods than the nutrient concentration. However, the actual

health-related benefits of lycopene strongly depend on its bioaccessibility, i.e., the fraction of lycopene that could be released from the food matrix and made available for intestinal absorption.

The determination of the degree of lycopene isomerisation and stability during processing and storage would provide a measure of the potential health benefits of tomato-based foods. It is known that the absorption of consumed lycopene reaches only 10% (in some cases can increase up to 30%). Furthermore, lycopene absorption from fresh tomatoes is lower than from processed products (tomato paste or sauce). The technological processing (the effects of temperature, pressure, light, duration, etc.) of tomatoes may enhance the transformation of lycopene from *trans*- to *cis*-isomers. There are other factors that affect the process of lycopene absorption. For example, consuming fat with a lycopene-containing meal increases its absorption efficiency.

The industrial processing of tomatoes into tomato products generates large amounts of by-products (peel, pulp and seeds). These by-products create major disposal problems for the industry in terms of costs and potential negative impact on the environment, but they also represent a promising, low-cost source of carotenoids (primarily lycopene) which may be used in the end-products because of their favourable nutritional and technological properties. The main problem for the extraction of tomato by-products is the preparation of tomato by-products matrix. The recovery of lycopene and other carotenoids from tomato by-products is not straightforward, as it is revealed by the low extraction yields achievable with traditional solvent extraction procedures and new extraction methods, such as supercritical carbon dioxide extraction. For this reason, additional pretreatment of the tomato by-products could be used prior to the extraction. One of the possibilities to enhance the extraction of carotenoids could be fermentation of the plant matrix. Fermentation of the plant matrix with starter cultures reduces plant cell integrity, which improves solvent penetration and lycopene dissolution. Fermentation may increase the extraction yield of lycopene and other carotenoids.

The use of concentrated carotenoid extracts from tomato by-products in traditional foods may improve the functional properties of the product while increasing the efficiency of the industrial processing of tomatoes.

Aim and tasks of the work

The aim of this work is to evaluate the effect of different processing technologies and technological parameters on lycopene in tomatoes and tomato products, its stability and possible isomerisation during processing and storage.

The following objectives are raised to achieve the aim:

1. To develop a high performance liquid chromatography method for qualitative and quantitative analysis of lycopene and lycopene *trans*- and *cis*-isomers in tomatoes, tomato products and different isolated fractions.

2. To determine the optimal conditions (temperature, pressure, extraction time) for the extraction of non-polar fraction from tomato by-products using SC-CO₂ and to test the optimised extraction parameters in order to determine the total extraction yield and concentration of *cis*-isomers in the isolated fractions.

3. To evaluate the interaction of different technological parameters on lycopene stability and isomerisation grade in different food model systems during storage.

4. To assess the effect of fermentation with lactic acid bacteria on the recovery of carotenoids from tomatoes and tomato by-products.

5. To evaluate the application possibilities of fermented tomato fraction and lycopene-rich extract for food purposes by assessing their effect on various characteristics of ready-to-cook minced meat products and different juice blends.

6. To assess anti-inflammatory and anti-proliferative properties of the extract with isomerised lycopene.

Scientific novelty

The following scientific novelty was achieved by fulfilling the above-listed tasks:

1. An HPLC method suitable for the separation and quantitative determination of lycopene and its *trans*- and *cis*-isomers (*5-cis*; *7-cis*; *9-cis*; *13-cis*; *15-cis*) was developed and validated for the first time.

2. The SC-CO₂ extraction of tomato by-products was optimized for the isolation of non-polar fraction rich in lycopene *cis*- isomers.

3. The effect of fermentation with lactic acid bacteria on the recovery of carotenoids from tomatoes and tomato processing by-products was studied for the first time.

4. The anti-inflammatory and anti-proliferative properties of extract with isomerised lycopene were investigated for the first time.

Practical significance of the research

The data obtained in this study may be useful for understanding the combination of the technological process factors which influence the liberation and extraction of lycopene and other carotenoids from tomatoes and tomato by-products, as well as the factors which affect the stability and isomerisation of lycopene during processing and storage. The knowledge regarding lycopene extraction, stability and isomerisation might be helpful for the development and production of lycopene *cis*-isomers-rich preparations and to manufacture foods or their ingredients with enhanced levels of bioaccessible carotenoids.

The data regarding supercritical fluid extraction of lycopene could be useful for the valorisation of tomato by-products, and could serve as the basis for creating rational technology to isolate high-value biologically active components thus improving the efficiency of industrial tomato processing.

The knowledge about tomato fermentation process with lactic acid bacteria may be useful for developing new functional foods or their ingredients.

The knowledge regarding anti-inflammatory and anti-proliferative properties of isomerised lycopene extract could be useful for developing food supplements or preparations with improved beneficial effects on the human health.

The SC-CO₂ extract from tomato by-products with *cis*-isomers (60%) has found direct application in the cosmetic industry. The tomato-based juice blends fortified with isomerised lycopene extract have industrial applications.

Approbation of the work

The results of the research are presented in 4 scientific publications, corresponding to the main list of the Clarivate Analytical Web of Science database, and in 2 scientific articles in journals in other international scientific information databases. A part of the results has been published by a global publisher in three book chapters (InTech publications).

The results of the research have also been presented at 8 international scientific conferences, 1 international congress and 1 symposium (14 presentations).

Structure and outline of the dissertation

The results of the research are presented in 4 scientific publications, corresponding to the main list of the Clarivate Analytical Web of Science database, and in 2 scientific articles in journals in other international scientific information databases. A part of the results has been published by a global publisher in three book chapters (InTech publications).

The results of the research have also been presented at 8 international scientific conferences, 1 international congress and 1 symposium (14 presentations).

Statements presented for the defence

1. A combination of different technological process parameters (extraction time, temperature, pressure) could be modified to increase the concentration of the *cis*-lycopene isomers in the final product by improving product functionality.

2. The lycopene-rich preparations could be applied as pharmacological agents possessing anti-inflammatory and anti-proliferative activities.

Conclusions

1. High performance liquid chromatography method for the qualitative and quantitative analysis of lycopene and lycopene *trans*- and *cis*-isomers (*5-cis*; *7-cis*; *9-cis*; *13-cis*; *15-cis*) in tomatoes, tomato products and different isolated fractions from tomatoes was developed and validated with respect to precision, linearity and selectivity, and confirms the value of the methodology to analyse lycopene, lycopene isomers and β -carotene. The best chromatographic conditions were obtained with the RP-C30 (5 μ m, 250x4.6 mm) column, MeOH/TBME mobile phase gradient (flow rate 0.60 mL/min), at 473 nm detection.

2. The optimum parameters for the extraction of oleoresin from tomato by-products include 53.7 MPa pressure, 73.9 °C temperature and 155 min time, whereas the optimal extraction parameters of *cis*-lycopene isomers are 55 MPa pressure, 52 °C temperature and extraction time 180 min. The total oleoresin yield of tomato by-products was 251.2 g/kg DW. The dominant geometrical lycopene isomers in the extract are *9-cis* and *5-cis*. The total content of *cis*-lycopene isomers in the SC-CO₂ extract was 62% of the total lycopene content, showing that the SC-CO₂ extraction parameters could be modified to increase the concentration of *cis*-lycopene isomers in the extract.

3. The storage conditions (temperature from +1 to +37) and different light irradiation (200–2500 Lux) affects the stability of lycopene in tomato-based food model system. The *trans-cis* isomerization and *trans*-lycopene degradation occurred during the accelerated shelf-life storage. The isomerization rate of lycopene significantly increases at 37 °C causing the formation of 6 identified lycopene *cis*-isomers (*5-cis*, *7-cis*, *9-cis*, *13-cis* and *15-cis*), whereas *trans*-lycopene degradation in a tomato-based food model system increases with UV irradiation. The content of *5-cis*-isomer increases the most significantly (from 0 to 7.29 mg/mL) during shelf-life storage compared to other lycopene isomers (*7-cis*, *9-cis*, *13-cis* and *15-cis*). The highest stability of lycopene was observed at +1 °C in absence of light.

4. The fermentation of tomato by-products with selected lactic acid bacteria (*Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8) affects the recovery of total carotenoids (especially lycopene) from the plant matrix. The recovery of lycopene from tomato by-products is most significantly increased (up to 37 %) by the lactic acid fermentation with recognized as safe *Lactobacillus sakei* KTU05-6.

5. The added extract (5%) with isomerised lycopene in the juice blends and fermented tomato fractions in minced meat products increases the content of

lycopene and, especially, the percentage of its *cis*-isomers, thus improving functional properties of the products:

a) the tomato-apple juice blend (35% apple juice) and tomato-carrot juice blend (40% carrot juice) with increased *cis*-lycopene content had the most acceptable taste.

b) the addition of 10% of fermented tomato products to minced pork meat improves the colour and enhances the nutritional value of the final product without compromising the consumers' acceptance. The content of lycopene in the prepared minced meat products was 2.2 and 2.6 mg/100 g (product with *Lactobacillus sakei* KTU05-6 and *Pediococcus pentosaceus* KTU05-8 fermented tomato fraction, respectively).

6. The extract of isomerised lycopene (60% *cis*-isomers from the total content of lycopene) decrease generation of reactive oxygene species and viability of glioblastoma cells. The extract of isomerised lycopene decrease production of hydrogen peroxide by 43% in a J774 macrophages culture and decrease the viability of rat glioblastoma C6 cells by 42%. The concentrated extracts of isomerised lycopene could be applied as pharmacological agents possessing anti-inflammatory and anti-proliferative activities.

UDK 663/664.014+635.64] (043.3)

SL344. 2017-05-08, 2,75 leidyb. apsk. I. Tiražas 50 egz.

Išleido leidykla „Technologija“, Studentų g. 54, 51424 Kaunas

Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas