

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Asta Kavaliauskaitė

**Funkcionaliujų ingredientų sukūrimas iš bruknių
(*Vaccinium vitis-idaea*) išspaudų taikant aukšto slėgio ir
fermentinio apdorojimo biorafinavimo procesus**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis

KAUNAS, 2018

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**Funkcionaliuju ingredientu sukūrimas iš bruknių
(*Vaccinium vitis-idaea*) išspaudų taikant aukšto slėgio ir
fermentinio apdorojimo biorafinavimo procesus**

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

Vadovas

Prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis

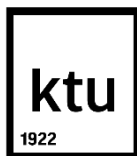
Recenzentė

Doc. dr. Ina Jasutienė

Projekto autorė

Asta Kavaliauskaitė

KAUNAS, 2018



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Asta Kavaliauskaitė

Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)

„Funkcionaliųjų ingredientų sukūrimas iš bruknių (*Vaccinium vitis-idaea*) išspaudų taikant aukšto slėgio ir fermentinio apdorojimo biorafinavimo procesus“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2018 m. birželio 4 d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Astos Kavaliauskaitės**, baigiamasis projektas tema „**Funkcionaliųjų ingredientų sukūrimas iš bruknių (*Vaccinium vitis-idaea*) išspaudų taikant aukšto slėgio ir fermentinio apdorojimo biorafinavimo procesus**“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

IŽANGA	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1 Bruknių morfologiniai požymiai, paplitimas ir panaudojimas pramonėje	15
1.2 Bruknių uogų maistinė ir cheminė sudėtis.....	16
1.3 Fenoliniai junginiai bruknių uogose	20
1.4 Lipidų peroksidacijos procesas	21
1.5 Antioksidantai	23
1.6 Bioaktyvių junginių išskyrimo metodai.....	23
1.6.1 Maceravimas – ekstrakcija tirpikliu	24
1.6.2 Soksleto ekstrakcija	25
1.6.3 Superkrizinė ekstrakcija.....	26
1.6.4 Pagreitinta ekstrakcija tirpikliais	29
1.6.5 Fermentinė ekstrakcija	30
2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI	32
2.1 Tyrimo objektas, jo apdirbimas	32
2.2 Tyrimo metodai.....	32
2.2.1 Cheminiai reagentai ir medžiagos.....	32
2.2.2 Cheminės sudėties nustatymas.....	33
2.2.3 Tyrimų eiga.....	35
2.2.4 Ekstraktų ir kietosios frakcijos antioksidacinių savybių įvertinimas.....	40
2.2.5 Peroksidų skaičiaus nustatymas jodometrinio metodu	43
2.2.6 Ekstraktų oksidacinio stabilumo nustatymas Oksipreso metodu.....	43
2.2.7 Ekstraktų oksidacinio stabilumo nustatymas Rancimato metodu.....	44
2.2.8 Riebalų rūgščių kompozicijos nustatymas dujų chromatografijos metodu	45
2.2.9 Bendro antocianinų kiekio nustatymas	45
2.2.10 Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė	46
2.2.11 Ekstraktų analizė ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodu.....	47
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	48
3.1 Sulčių iš bruknių uogų išskyrimas, išspaudų išeiga ir jų cheminė sudėtis	48
3.2 Superkrizinė ekstrakcija anglies dioksidu ir jos optimizavimas	49
3.3 Pagreitintos ekstrakcijos etanoliu optimizavimas iš bruknių išspaudų liekanos	54
3.4 Tradicinių, aukšto slėgio ir fermentinės hidrolizės ekstraktų iš bruknių išspaudų išėigų palyginimas	57
3.5 Ekstraktų ir kietosios frakcijos antioksidacinis aktyvumas	59
3.6 Lipofilinių ekstraktų tyrimai	62
3.6.1 Lipofilinių ekstraktų riebalų rūgščių sudėties nustatymas.....	62

3.6.2 Pradinio ekstrakto, gauto po superkryzinės ekstrakcijos anglies dioksidu, peroksidų skaičiaus nustatymas	63
3.7 Oksidacinio stabilumo įvertinimas Oksipres ir Rancimat metodais	63
3.8 Antocianinų tyrimai bruknių išspaudose ir jų ekstraktuose	65
3.8.1 Bendras antocianinų kiekis poliniuose ekstraktuose	65
3.8.2 Kokybinis ir kiekybinis antocianinų nustatymas bruknių išspaudose	67
3.9 Preliminarus bioaktyvių junginių identifikavimas taikant ultraefektyviąją skysčių chromatografiją	68
IŠVADOS	71
LITERATŪROS SARAŠAS	73

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Bruknė (<i>Vaccinium Vitis-idaea</i>)	15
2 pav. Soksleto aparatas	26
3 pav. Anglies dioksido slėgio ir temperatūros fazinė diagrama	27
4 pav. Superkrizinio ekstraktoriaus schema	28
5 pav. Pagreitinotos ekstrakcijos tirpikliais principinė schema	30
6 pav. Eksperimentinio darbo schema.....	36
7 pav. Oksipresu užrašyta oksidacijos kinetinė kreivė.....	44
8 pav. Rancimato nubrėžta oksidacijos kinetikos kreivė	45
9 pav. Prognozuojamų ir gautų ekstrakcijos išeigų palyginimas	51
10 pav. Bruknių išspaudų SKE atsako paviršiaus kreivės, vaizduojančios ekstrakto išeigos priklausomybę nuo optimizuojamų parametrų	53
11 pav. Ekstrakcijos išeigos priklausomybė nuo dinaminės ekstrakcijos trukmės	54
12 pav. Bruknių išspaudų PET su etanoliu atsako paviršiaus kreivė	55
13 pav. Etanolinių ekstraktų faktinių išeigų palyginimas su prognozuojamomis vertėmis	57
14 pav. Bruknių SKE–CO ₂ ekstraktas ir liekanos po įvairių atliktų ekstrakcijų.....	57
15 pav. Oksidacinis stabilumas Oksipres metodu	63
16 pav. Oksidacinis stabilumas Rancimat metodu	64
17 pav. Poliniai bruknių išspaudų ekstraktai	66
18 pav. Bruknių išspaudose identifikuoti antocianinai	68

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Angliavandenių kiekiai bruknių uogose	17
2 lentelė. Organinės rūgštys bruknių uogose.....	18
3 lentelė. Riebalų rūgščių sudėtis ir kiekiai bruknių sėklų aliejuje ir uogose	19
4 lentelė. Dažniausiai bruknėse identifikuojami fenoliniai junginiai.....	20
5 lentelė. Bruknėse nustatomų pagrindinių antocianinų kiekiai.....	21
6 lentelė. Tirpiklių įtaka biologiškai aktyvių junginių išskyrimui	25
7 lentelė. Patikrinti faktoriai ir lygiai projektuojant SKE–CO ₂ eksperimentą.....	37
8 lentelė. Patikrinti faktoriai ir lygiai suprojektuojant PET etanoliu eksperimentą	39
9 lentelė. Bruknių išspaudų cheminė sudėtis.....	48
10 lentelė. CKP parametrų vertės ir bruknių išspaudų SKE–CO ₂ ekstrakcijų rezultatai: 1–8 eksperimentiniai bandymai, 9–14 bandymai žvaigždiniuose taškuose ir 14–20 bandymai plano centre.....	50
11 lentelė. Bruknių išspaudų SKE–CO ₂ ekstrakcijos išėigų regresijos parametrų dispersinė analizė	51
12 lentelė. Bruknių išspaudų liekanos parametrai pagal CKP bei gautos ir prognozuojamos išėigos	55
13 lentelė. Bruknių išspaudų pagreitinotos ekstrakcijos etanoliu išėigų regresijos parametrų dispersinė analizė.....	56
14 lentelė. Ekstraktų išėigos gautos taikant skirtingus ekstrakcijos metodus	58
15 lentelė. Antioksidacinis aktyvumas bruknių išspaudų ekstraktuose ir kietosiose liekanų frakcijose.....	61
16 lentelė. Bruknių išspaudų lipofilinių ekstraktų riebalų rūgščių kompozicija.....	62
17 lentelė. Tirtų ekstraktų indukciniai periodai valandomis	64
18 lentelė. Bendras antocianinų kiekis bruknių išspaudų ekstraktuose.....	66
19 lentelė. Bruknių išspaudose identifikuotų antocianinų spektrinės charakteristikos	67
20 lentelė. Identifikuotų junginių charakteristikos bruknių išspaudų ekstraktuose	70

Kavaliauskaitė, Asta. Funkcionaliuųjų ingredientų sukūrimas iš bruknių (*Vaccinium vitis-idaea*) išspaudų taikant aukšto slėgio ir fermentinio apdorojimo biorafinavimo procesus. Magistro baigiamasis projektas / vadovas prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Maisto technologijos.

Reikšminiai žodžiai: bruknės, išspaudos, biorafinavimas, aukšto slėgio procesai, antioksidacinis aktyvumas.

Kaunas, 2018. 80 p.

Santrauka

Bruknių išspaudos laikomos šalutiniu gamybos produktu, kuris dažniausiai pašalinamas kaip atliekos, nors galėtų būti panaudojamas biologiškai aktyviųjų junginių išskyrimui. Remiantis atliktais moksliniais tyrimais, uogų išspaudose lieka didelė dalis bioaktyviųjų junginių: įvairių antocianinų, flavonoidų, fenolio rūgščių ir kitų junginių pasižyminčių teigiamu poveikiu sveikatai. Todėl, šias išspaudas naudinga perdirbti į funkcinius ingredientus, kuriuos būtų galima panaudoti maisto ir papildų pramonėje.

Šio darbo tikslas – išskirti funkcionaliuosius ingredientus iš bruknių išspaudų (*Vaccinium vitis-idaea*), taikant aukšto slėgio ir fermentinio apdorojimo biorafinavimo procesus bei palyginti su tradiciniais ekstrakcijos metodais. Nustatyti gautų frakcijų sudėtį, antioksidacines savybes, oksidacinį stabilumą, antocianinų kiekį.

Ekstraktai iš bruknių išspaudų buvo išskirti naudojant tradicines Soksleto ir maceravimo ekstrakcijas bei atliekant šiuolaikinius metodus, tokius kaip superkryzinė CO₂ ekstrakcija, pagreitinta ekstrakcija tirpikliais. Naudojant paviršiaus atsako metodą atlikti superkryzinės CO₂ ekstrakcijos ir pagreitinotos ekstrakcijos etanoliu kintamųjų parametrų optimizavimai, kuriems esant gaunama didžiausia ekstrakto išėiga. Po pagreitinotos ekstrakcijos etanoliu bandinio liekanai atlikta ekstrakcija subkritiniu vandeniu, o liekanai po maceravimo įvykdyta fermentinė hidrolizė.

Gautų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas nustatytas ABTS^{•+} radikalo blukinimo metodu, deguonies radikalų surišimo geba (ORAC), o bendras fenoliniųjų junginių kiekis nustatytas *Folin-Ciocalteu's* metodu. Kietos frakcijos antioksidacinis aktyvumas išmatuotas taikant QUENCHER procedūrą. Lipofilinių ekstraktų riebalų rūgščių sudėtis ištirta naudojant dujų chromatografijos metodą. Visų gautų ekstraktų oksidacinis stabilumas įvertintas Oksipres ir Rancimat metodais. Preliminarus bioaktyviųjų komponentų įvertinimas bei kokybinė ir kiekybinė antocianinų analizė atlikti taikant ultraefektyviąją skysčių chromatografiją. O bendras antocianinų kiekis poliniuose ekstraktuose nustatytas pH diferenciniu metodu.

Kavaliauskaitė, Asta. Development of functional ingredients from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) pomace by using high pressure and enzymatic biorefining processes. Master's Final Degree Project / supervisor prof. Petras Rimantas Venskutonis; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area: Technological Sciences, Food Technology.

Keywords: lingonberry, pomace, biorefining processes, high pressure, antioxidant activity.

Kaunas, 2018. 80 p.

Summary

Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) pomace is considered by-product, which is usually removed as a waste, although it could be used for the isolation of bioactive compounds. Some researches have already proven that berry pomace contains a large part of bioactive compounds, such as various anthocyanins, flavonoids, phenolic acids and other compounds that have a positive effect on health. Therefore, berry pomace is useful processing into functional ingredients that may find application in foods, nutraceuticals and cosmetics industries.

The aim of Master's study is to isolate functional ingredients from lingonberry pomace by using high pressure and enzymatic biorefining processes and compare them with conventional extraction methods. Analyzation of obtained extracts/fractions composition and also evaluation of lingonberry pomace solid residues and extracts antioxidant properties, extracts oxidative stability, amount of anthocyanins.

Extracts from lingonberry pomace were isolated using traditional (Soxhlet and maceration extractions) and modern techniques such as supercritical CO₂ extraction, accelerated solvent extraction with various solvents. Response Surface Methodology was used for the optimization of supercritical CO₂ extraction and accelerated ethanol extraction parameters, giving the maximum yields of extracts. For the optimization of accelerated extraction was used material after supercritical CO₂ extraction. After accelerated ethanol extraction under optimal conditions, obtained residue were extracted by accelerated solvent extraction with subcritical water. And obtained residue after maceration extraction were used for enzymatic hydrolysis.

Antioxidant activity of extracts were measured using ABTS^{•+} radical cation scavenging and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays. The total content of phenolic compounds in the extracts were determined by using *Folin-Ciocalteu's* method. Solid residues antioxidant activity were estimated as reported previously analysis methods using QUENCHER method.

The fatty acid composition of lipophilic extracts were determined by using gas chromatography method. Oxidative stability of all obtained extracts was measured using Oxipress and Rancimat methods. Preliminary bioactive compounds evaluation and the qualitative and

quantitative analysis of anthocyanins were performed by ultra high performance liquid chromatography. Total anthocyanin content in polar extracts was measured using the pH differential method.

SANTRUMPOS

*AAPh	2,2'-azobio (2-amidinopropano) 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>)
AC	Bendras antocianinų kiekis
*ANOVA	Dispersijos analizė (angl. <i>Analysis of variance</i>)
AOA	Antioksidacinis aktyvumas
APM	Atsako paviršiaus metodologija
BFJK	Bendras fenolinių junginių kiekis
CKP	Centriškai kompozicinis planas
CO₂	Anglies dioksido dujos
EtOH	Etanolis
FE	Fermentinė ekstrakcija
F	Fišerio kriterijus
GRE	Galo rūgšties ekvivalentai
HE	Heksanas
*HPLC	Efektyvioji skysčių chromatografija (angl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
IP	Indukcinis periodas
JAV	Jungtinės Amerikos Valstijos
Mac–EtOH/H₂O	Maceravimo ekstrakcija etanolio ir vandens mišiniu
MeOH	Metanolis
*ORAC	Degunies radikalų surišimo geba (angl. <i>oxygen radical absorption capacity</i>)
*PBS	Fosfatinis buferinis tirpalas (angl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PET	Pagretinta ekstrakcija tirpikliu (padidintame slėgyje)
PET–EtOH	Pagretinta ekstrakcija etanolio
PET–H₂O	Pagretinta ekstrakcija subkritiniu vandeniu
PS	Peroksidų skaičius
RR	Riebalų rūgštys
SKE–CO₂	Superkrizinė ekstrakcija CO ₂ dujomis
SM	Sausa medžiaga

SN	Standartinis nuokrypis
SOK-HE	Soksleto ekstrakcija heksanu
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 efektyvioji skysčių chromatografija (angl. ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight)
*QUENCHER	Antioksidacinio aktyvumo nustatymo sausoje medžiagoje metodika (angl. QUick, Easy, New, CHEap, Reproducible)

*- Santrumpų atitikmuo anglų kalboje, kurios yra gerai suprantamos.

IŽANGA

Daržovių, vaisių ir uogų perdirbimas į norimą produktą sukuria iki 50 % šalutinių produktų, kurie dažniausiai pašalinami kaip atliekos arba panaudojami gyvūnų pašarams ir kompostavimui. Toks gamybos atliekų tvarkymas sukelia neigiamą poveikį aplinkai bei papildomas išlaidas. Nors uogų išspaudas sudarančiose odelėse, sėklose ir pulpos likučiuose gausu maistinių skaidulų bei įvairių bioaktyvių junginių, kuriuos būtų galima panaudoti kaip funkcinius maisto ingredientus ar maisto produktų mitybinės vertės padidinimui. Todėl, būtina didinti gamintojų supratimą apie žaliavas, kurios iki šiol laikomos atliekomis ir sukurti sistemingas jų panaudojimo strategijas. Be to, atsižvelgiant į didėjančią siekį užkirsti kelią maisto švaistymui ir didinti maisto sistemos tvarumą bei besiformuojantį vartotojų suvokimą apie funkcinius ir sveikus maisto produktus, itin svarbu, net būtina plėtoti esamus ir naujus pridėtinę vertę sukuriančius biorafinavimo procesus, kuriais būtų efektyviai panaudojamos uogų išspaudos susidarantios maisto sektoriuje [1, 2].

Uogose gausu antioksidantų, fenolio rūgščių, flavonoidų, polifenolių, maistinių skaidulų, kurių didelė dalis lieka išspaudose. O mokslininkai įrodė, kad šie bioaktyvūs uogų junginiai pasižymi stipriomis antioksidacinėmis, priešvėžinėmis, antimikrobinėmis, priešūždegiminėmis savybėmis, taip pat mažina cholesterolio kiekį kraujyje, o tuo pačiu sumažina širdies ir kraujagyslių ligų riziką. Todėl, bioaktyvių junginių, gautų iš uogų išspaudų, pridėjimas į maisto produktus gali padidinti žmogaus organizmui reikalingų vertingų medžiagų aprūpinimą. Be to, šie išskiriami natūralūs ingredientai vis plačiau naudojami ne tik maisto, bet ir kosmetikos, farmacijos pramonėje ir yra geriau vertinami negu sintetiniai junginiai [3, 4].

Šalutinių maisto produktų perdirbimui į aukštesnės vertės funkcinius ingredientus gali būti naudojamos tiek tradicinės, tiek naujos technologijos. Naujausiuose tyrimuose ypač daug dėmesio skiriama pažangioms, energiją tausojančioms ekstrahavimo technologijoms, tokioms kaip pagreitinta ekstrakcija tirpikliais, superkryzinė ekstrakcija, ekstrakcija ultragarso ar mikrobangų pagalba. Be to, šių metodų pritaikymas yra efektyvesnis ekstrakcijos išėigos atžvilgiu lyginant su tradiciniais metodais. Kadangi šalutinių produktų žaliavos yra itin sudėtingos medžiagos, sudarytos iš įvairių bioaktyvių komponentų pasižyminčių skirtingomis savybėmis, todėl svarbu sukurti optimalias biorafinavimo schemas individualiai kiekvienoms uogų išspaudoms neprarandant išekstrahuojamų junginių funkcionalumo [5].

Darbo tikslas – išskirti funkcionaliuosius ingredientus iš bruknių išspaudų (*Vaccinium vitis-idaea*), taikant aukšto slėgio ir fermentinio apdorojimo biorafinavimo procesus bei palyginti su tradiciniais ekstrakcijos metodais.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti bruknių išspaudų pagrindinius cheminės sudėties rodiklius.

2. Sudaryti bruknių išspaudų superkryzinės ekstrakcijos anglies dioksidu optimizavimo planą ir nustatyti optimalias parametrų vertes, kuriomis būtų gauta didžiausia ekstrakto išeiga.
3. Nustatyti optimalias pagreitintos ekstrakcijos etanoliu sąlygas, kuriomis būtų gauta didžiausia ekstrakto išeiga bei atlikti pagreitintos ekstrakcijos subkritiniu vandeniu ekstrakciją.
4. Atlikti tradicines soksleto ir maceravimo ekstrakcijas bei panaudojant fermentinę hidrolizę iš bruknių išspaudų, po maceravimo ekstrakcijos, išskirti bioaktyvius junginius ir gautas šių ekstrakcijų išeigas palyginti su aukšto slėgio metodais.
5. Įvertinti bruknių išspaudų bei gautų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą, taikant įvairius antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodus.
6. Nustatyti lipofilinių ekstraktų riebalų rūgščių sudėtį ir pradinį peroksidų skaičių SKE–CO₂ ekstrakto.
7. Nustatyti gautų ekstraktų oksidacinį stabilumą Oksipres ir Rancimat metodais.
8. Nustatyti bendrą antocianinų kiekį gautiems poliniams ekstraktams bei atlikti kokybinę ir kiekybinę antocianinų analizę bruknių išspaudose.
9. Preliminariai identifikuoti bioaktyvius komponentus bruknių išspaudų ekstraktuose taikant chromatografinius metodus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Bruknių morfologiniai požymiai, paplitimas ir panaudojimas pramonėje

Bruknė yra daugiametis, tamsiai visžalis, 10–30 cm aukščio krūmas (**1 pav.**) su šliaužiančiais požeminiais ūgliais, kurios vaisius yra 5–10 mm skersmens raudona uoga. Oficialus lotyniškas šio augalo pavadinimas yra *Vaccinium Vitis-idaea*. Bruknė priklauso erikinių (*Ericaceae*) šeimai, tai pačiai kaip ir mėlynės bei spanguolės. Bruknės egzistuoja dviejų porūšių: vienos priskiriamos laukinėms arba dar kitaip vadinamos Amerikos tipo bruknėmis (*Vaccinium vitis-idaea* var. *minus* Lodd), kurių krūmai yra žemi, ne aukštesni nei 18 cm ir žydi tik vieną kartą per metus. Kita rūšis vadinama Europos arba kultivuojamomis bruknėmis (*Vaccinium vitis-idaea* var. *vitis-idaea* L.), būdingi aukštesni krūmai (10–30 cm) su didesniais lapais bei žydi du kartus per metus [6, 7].



1 pav. Bruknė (*Vaccinium Vitis-idaea*)

Bruknių auga sausuose pušynuose, aukštapelkių ir tarpinio tipo pelkių pakraščiuose. Bruknynai labiausiai paplitę Rusijos borealiniuose miškuose, Skandinavijoje, Aliaskoje, JAV ir Kanadoje. Be to, tai yra nacionalinė Švedijos uoga. Lietuvoje bruknių labiausiai paplitusios pietinėje, pietrytinėje ir rytinėje dalyse, o kitur galima rasti tik pavienius krūmokšnius. Bruknėms reikia drėgmės, geriau auga rūgščiame dirvožemyje ir esant daliniam šešėliui, augimui tinkamesnis vėsesnis klimatas [7, 8].

Krūmokšniams būdingi stori, elipsiški, odiški, tamsiai žali lapai, kurių apatinė dalis blyškiai žalia ir gausiai taškuota, lapų ilgis siekia apie 5–30 mm. Bruknei būdingi balti arba švelniai rožiniai varpelio formos žiedai. Daugelis Europoje augančių bruknių veislių dažniausiai žydi du kartus, dėl

to užaugina du derlius: vienas subręsta rugpjūčio pradžioje, kitas - nuo spalio pabaigos iki lapkričio pradžios. Antrasis derlius paprastai yra didesnis ir dažniausiai naudojamas komercinei gamybai. Tačiau svarbu paminėti, kad laukinė bruknių veislė žydi tik vieną kartą ir uogas sunokina nuo rugpjūčio iki rugsėjo mėnesio [6, 8].

Uogos yra valgomos, sultingos, daugiasėklės, skirtingo dydžio, apvalios formos, vidutiniškai viena uoga sveria apie 0,3 g. Uogų spalva kinta nokstant nuo žalios pereinant į baltą, o prinokusios yra įvairių raudonos spalvos atspalvių. Bruknių uogose esančios sėklos smulkios, rusvai rudos, blizgios. Jų skaičius vienoje uogoje svyruoja nuo 5 iki 50 vienetų, kuris priklauso nuo apdulkinimo tipo. Šviežiai surinktos uogos yra labai rūgščios ir gana karčios, bet turi ir šiek tiek saldumo. Skoniui bei išvaizda labai panašios į spanguoles [7, 9].

Bruknių uogos naudojamos šviežios arba užšaldytos. Giliai užšaldytos bruknės išsaugo maistinių medžiagų kiekį ir skonį. Daugumai žmonių nepatinka šios šviežios uogos, todėl perdirbant beveik visada yra saldinamos. Daugiausiai bruknių uogos naudojamos padažų, sirupų, uogienių, džemų, sulčių koncentratų gamyboje, pyragų ir kitų kepinų gardinimui bei gėrimų (vynų, likerių) gamyboje [10]. Taip pat, bruknių uogos ir lapai naudojami maisto papildų ir vaistų gamyboje, kurie skirti diabetu, peršalimo ir kvėpavimo takų ligomis sergantiems žmonėms. Be to, vis dažniau iš šių uogų yra išskiriami natūralūs, vandenyje tirpūs augaliniai pigmentai, kurie naudojami kaip maisto dažikliai [11].

Šiuo metu bruknių produktai yra labiausiai paplitę Skandinavijoje. Šiose šalyse didelį susidomėjimą bruknėmis lemia ilgametės tradicijos, be to, šias uogas skatinama vartoti dėl didelio kiekio vitaminų naudingų vartotojų sveikatai ir kaip liaudies vaistą. Švedijoje didelė derliaus dalis panaudojama džemų ir padažų gamyboje. O Suomijos perdirbėjai didžiausią dėmesį skiria sulčių koncentratų bei arbatų gamybai iš bruknių uogų ir lapų. Taip pat, bruknės mėgstamos Kanadoje ir jos apylinkėse. Čia daugiausiai pagaminama džemų, sirupų bei kepinų su bruknių uogomis [10].

1.2 Bruknių uogų maistinė ir cheminė sudėtis

Bruknių cheminę sudėtį pirmasis pradėjo nagrinėti mokslininkas Griebelas dar XX a. pradžioje, vėliau jas analizavo ir kiti mokslininkai. Cheminė bruknių sudėtis, kaip ir kitų *Vaccinium* genties augalų, buvo tiriama siekiant nustatyti juose esančių maistinių bei bioaktyvių junginių sudėtį ir kiekį [7]. Metaboliniai tyrimai parodė, kad bruknėse yra tūkstančiai unikalių junginių, įskaitant angliavandenius, amino rūgštis, vitaminus, organines rūgštis, riebalų rūgštis, augalinius hormonus ir žinoma, polifenolius [6, 9].

Bruknių uogos yra sveikas maisto pasirinkimas, nes jose yra mažai cukrų ir riebalų, daug skaidulinių medžiagų, o svarbiausia jose gausu vitaminų ir mineralų. Pavyzdžiui, 100 g bruknių uogų yra tik 54 kalorijos bei 0,5 g riebalų, 2,5 g skaidulų ir 11 mg vitamino C [12]. Be to, bruknėse

yra įvairių bioaktyvių fitocheminių medžiagų, kurios naudingos žmogaus sveikatai. Labiausiai ištirti bioaktyvūs junginiai bruknėse yra polifenoliai [13].

Vandens kiekis bruknių uogose svyruoja apie 82–89 %. Bruknių sėklose yra apie 23,32 % baltymų, o uogose azoto kiekis yra apie 0,57–0,89 %. Skaidulos, kurios susikaupia sėklose ir iš dalies uogų luobelėje, sudaro apie 0,93–1,40 %. Pelenų kiekis sudaro apie 0,26 % šviežių uogų arba apie 1,58 % visiškai sausos medžiagos, o sėklose – 2,11 % pelenų [7].

Gausu mineralinių elementų tokių kaip Zn, Cu, As, P, Mn, K, Na, Ca, Fe, Mg ir kitų. Mineralinės medžiagos būtinos žmogaus organizmui, nes yra itin svarbios gyvybinėms funkcijoms. Jos atlieka svarbų vaidmenį kaulų ir dantų vystymuisi, dalyvauja susitraukiant raumenims bei palaiko šarmų – rūgščių pusiausvyrą. Labiausiai vyraujantys elementai yra kalis, kurio randama apie 74 mg %, fosforas – 38 mg %, kalcis – 12 mg %, manganas – 115 mg/kg, cinkas – 26 mg/kg [3, 7].

Uogoms skonį suteikia daugybė komponentų, įskaitant cukrus ir organines rūgštis, kurios yra pagrindinės tirpios uogų sudedamosios dalys. Organinių rūgščių ir cukrų sudėtis bei kiekis yra svarbūs veiksniai, darantys įtaką uogų skoninėms savybėms bei lemiantys jų sunokimo laipsnį. Skonį itin sąlygoja bendras cukrų ir rūgščių kiekio santykis [14].

Cukrų kiekis bruknių uogose svyruoja, jis priklauso nuo augimo vietos, klimato sąlygų bei uogų sunokimo laipsnio. Kuo labiau sunokusios uogos, tuo cukraus kiekis didesnis. Paprastai, subrendusiose bruknių uogose daugiausiai yra fruktozės ir gliukozės, o mažiausiai sacharozės [14]. Vyraujančių angliavandenių kiekis bruknėse pateikiamas **1 lentelėje**. Lietuvoje augančiose prinokusiose bruknių uogose bendras cukraus kiekis svyruoja apie 7,2 %. Bruknėse taip pat randama pektinų, kurie yra svarbūs sulčių klampai ir gelio sudarymui, o tai lemia uogų produktų kokybę. Nustatytas bendras pektinų kiekis bruknių uogose yra apie 0,2–0,32 %. Pentozanų kiekis, kurių daugiausiai yra luobelėje, sudaro apie 0,59 % [7].

1 lentelė. Angliavandenių kiekiai bruknių uogose [7, 14]

Angliavandenis	Kiekis, %	
Gliukozė	3,63–3,95	3,79
Sacharozė	0,49–0,53	0,41
Fruktozė	4,31–4,58	2,92

Lietuvos sąlygomis prinokusiose bruknių uogose organinių rūgščių nustatoma apie 2,3–2,9 %. Šiose uogose labiausiai vyrauja citrinų rūgštis, kuri sudaro apie 80 % bendro rūgščių kiekio. Kitų organinių rūgščių randama gerokai mažiau, jų kiekis pateikiamas **2 lentelėje**. O chinono, salicilo bei oksalo rūgščių randami tik pėdsakai [7]. Nors benzenkarboksirūgštis nustatomas itin nedidelis kiekis, tačiau ji yra itin svarbi. Maisto pramonėje benzenkarboksirūgštis

dažniausiai pridedama kaip daugelio kitų vaisių ir uogų produktų konservantas. Todėl, ši rūgštis lemia natūraliai ilgesnį galiojimo laiką daugeliui bruknių produktų [10].

Askorbo rūgšties kiekis itin kinta priklausomai nuo geografinių bei klimato sąlygų, vyrauja nuo 1 iki 30 mg %. Pavyzdžiui, literatūroje pateikiama, kad Ukrainoje surinktose uogose randama apie 15 mg %, o Rusijoje iki 28 mg % askorbo rūgšties. Lietuvoje bruknių uogose nustatyta nuo 11,2 iki 21 mg % askorbo rūgšties. Taigi, daugiausiai askorbo rūgšties bruknėse randama ten kur šiam krūmui yra palankiausios sąlygos augti, taip pat kiekis priklauso nuo sunokimo laipsnio bei fermentų aktyvumo [7].

2 lentelė. Organinės rūgštys bruknių uogose [7, 14, 15]

Organinė rūgštis	Kiekis	Organinė rūgštis	Kiekis
Askorbo rūgštis	0,8–30,0 mg %	Boro rūgštis	0,026 %
Citrinų rūgštis	2,0–2,2 %	Benzenkarboksirūgštis	0,089–0,206 %
Vyno rūgštis	0,34 %	Šikimiko rūgštis	0,004 %
Obuolių rūgštis	0,23 %	Fumaro rūgštis	0,003 %

Lipidus galima klasifikuoti pagal jų fizines savybes, molekulių poliškumą ir pagal jų funkcijas organizme į neutralius lipidus (trigliceridus), polinius lipidus (fosfolipidus), glikolipidus, taip pat į riebalų rūgštis, riebalų alkoholius, vaškus, sterolius, terpenoidus ir kitas medžiagas. Dauguma uogų riebalų grupių (nesočiosios riebalų rūgštys, steroliai, terpenoidai ir kt.) turi didelį biologinį aktyvumą. Kadangi jie skiriasi nuo gyvūninės kilmės lipidų, jų vartojimas atlieka svarbų vaidmenį žmogaus metabolizme. Pavyzdžiui, buvo įrodyta, kad uogų steroliai (fitosteroliai) mažina cholesterolio kiekį [16].

Uogose lipidų yra gana mažai, bruknėse yra apie 0,32 g polinesočiųjų riebalų rūgščių 100 g uogų, mononesočiųjų riebalų rūgščių identifikuojama apie 0,06 g/100 g, o sočiųjų – 0,02 g/100 g. Svarbu paminėti tai, kad bruknėse yra omega-6 ir omega-3 riebalų rūgščių, kurios turi būti gaunamos su maistu ir yra būtinos normaliam žmogaus organizmo funkcionavimui. Bruknių uogose omega-3 riebalų rūgščių nustatoma apie 0,18 g/100 g, o omega-6 – 0,14 g/100 g [17].

Uogose daugiausiai lipidų yra sėklose, kuriose yra daug polinesočiųjų riebalų rūgščių ir fitosterolių. Sėklose riebalų nustatoma apie 12,1–30,12 %. Pagrindinės riebalų rūgštys ir jų kiekiai, randami bruknių uogose ir jų sėklų aliejuje, pateikiami **3 lentelėje**. Vaškai esantys uogų kutikulėje turi didelę įtaką apsaugant jas nuo išorinių, pavyzdžiui, patogenų ir kitų aplinkos poveikių. Uogose vaškinių medžiagų nustatoma apie 10,23 %. Taip pat bruknėse yra augalinių sterolių, kurių nustatoma nuo 3 iki 160 mg/100 g sausos masės [7, 18].

3 lentelė. Riebalų rūgščių sudėtis ir kiekiai bruknių sėklų aliejuje ir uogose [7, 16, 18]

Riebalų rūgštis	Kiekis, %		
	Sėklų aliejus		Uogos
Lauro rūgštis	0,14	–	0,00019
Miristo rūgštis	0,24	–	0,00017
Palmitino rūgštis	1,43	–	0,0024
Palmitoleino rūgštis	0,25	–	–
Stearino rūgštis	0,38	–	0,00065
Oleino rūgštis	19,53	17,85	0,0063
Linolo rūgštis	32,62	51,49	0,0014
Linoleno rūgštis	39,62	26,33	0,00080
Eikozano rūgštis	0,29	–	0,0013
Eikozeno rūgštis	0,22	–	0,00004
Eikozadieno rūgštis	0,08	–	0,000024
Beheno rūgštis	0,46	–	0,00027
Tetrakozano rūgštis	0,48	–	0,00025

Broknėse identifikuojama ir triterpenoidų, tokių kaip α -amirinas, β -amirinas, betulinas, kampesterolis, sitosterolis ir jo esteriai, stigmasterolio esteriai, taraksasterolis. Labiausiai paplitusios yra oleanolinė ir ursolinė rūgštys, kurios sudaro apie 70 % visų triterpenoidų. Oleanolinės rūgšties nustatoma apie 204–215 mg/100 g sausos medžiagos, o ursolinės rūgšties – 604–676 mg/100 g SM [19].

Augaluose taip pat sintetunami tokoferoliai. Tokoferoliai yra riebaluose tirpūs junginiai, pasižymintys stipriomis antioksidacinėmis savybėmis. Šie junginiai yra sudaryti iš chromanolio žiedo, prie kurio antrojo anglies atomo yra prisijungusi 15 anglies atomų grandinė. Tokoferoliai skirstomi į keturias izomerines formas (α , β , γ , δ), kurios viena nuo kitos skiriasi metilo grupių išsidėstymu chromanolio žiede. Šios keturios tokoferolių formos sintetamos ir saugomos augalų lapuose ir sėklose [20, 21]. Tokoferolių kiekis bruknių uogose yra itin mažai tyrinėtas, viename literatūros šaltinyje pateikiama, kad γ -tokoferolio yra 0,23 μ g/g ir α -tokoferolio identifikuota 2,22 μ g/g uogų [16].

Broknių uogose yra laisvųjų aminorūgščių, kurių bendras kiekis yra apie 26–44 mg/100 g. Arginino nustatoma apie 6 mg/100 g, asparagino – 12,5 mg/100 g, glutamino – 3,7 mg/100 g, hidroksiprolino – 3,1 mg/100 g, o kitų amino rūgščių randami tik pėdsakai [15]. Be to, broknėse randama glikozido arbutino, kuris naudojamas farmacijoje. Uogose arbutino randama apie 0,93 %. Taip pat uogose yra maistinių skaidulų, vitaminų E – 1 mg %, provitamino A – 0,05–0,1 mg % ir B grupės vitaminų, iš kurių vyraujantis yra B₂ vitaminas – 0,03–129 mg % [7].

Taigi, svarbiausi veiksniai, turintys įtakos bruknių uogų cheminei sudėčiai yra aplinka, kurioje bruknės auginamos, dirvožemio drėgmė bei sudėtis, karšti ir šalti orai bei derliaus nuėmimo laikotarpis, kuris nulemia uogų sunokimo laipsnį [7].

1.3 Fenoliniai junginiai bruknių uogose

Uogose yra daug įvairių fenolinių junginių, kurie laikomi antriniais metabolitais. Polifenoliai yra cheminių junginių grupė, konjuguota su cukrumi ar organinėmis rūgštimis, kurie randami daugelyje uogų, vaisių, daržovių, kitų augalų. Chemiškai polifenoliai apibūdinami kaip junginiai, kuriuose yra fenolio grupė, arba aromatiniai žiedai, turintys fenolio hidroksilo grupių, kurios leidžia jiems veikti kaip antioksidantams. Šie junginiai susiformuoja augaluose, siekiant gauti uogų pigmentaciją, kvapą, skonį, kartumą, atbaidyti kenkėjus ar kovoti su mikrobinėmis infekcijomis. Svarbiausi fenolio junginiai bruknių uogose yra proantocianidiniai, kurie sudaro 63–71 % visų fenolinių junginių, taip pat vyrauja: antocianinai apie 15 %, hidroksicinamono rūgšties aptinkama apie 5 % ir 0,5 % hidroksibenzoinės rūgšties, nedideli kiekiai flavanolių, fenolio rūgščių, stilbenų, lignanų bei ligninų. Bruknėse identifikuojami fenoliniai junginiai ir jų kiekiai pateikti **4 lentelėje**. Bendras flavonolių kiekis yra nepastovus dėl aplinkos veiksnių, uogų dydžio, augimo ir laikymo sąlygų [22, 23].

Uogų išspaudose, kurios sudarytos iš odelių, sėklų, pulpos ir kitų priemaišų likučių, taip pat lieka nemažas kiekis fenolinių junginių, kurie susideda iš įvairių antocianinų, flavonolių, fenolio rūgščių bei pasižymi dideliu antioksidaciniu pajėgumu. Šios savybės lemia didelį uogų išspaudų panaudojimo potencialą. Todėl, išskirti uogų išspaudų ekstraktai, kurių sudėtyje yra polifenolinių medžiagų, yra itin svarbūs ingredientai maisto produktų mitybinės vertės praturtinimui, taip pat gali būti panaudojami vaistų ir kosmetikos gamyboje [5, 24].

4 lentelė. Dažniausiai bruknėse identifikuojami fenoliniai junginiai [15, 22, 25, 26, 27]

Junginys	Kiekis, mg/100 g	Junginys	Kiekis, mg/100 g
Katechinas	0,3–13,0	Hidroksicinamono rūgštis	78,0
Epikatechinas	0,4–10,7	Kvercetino ramnozidas	0,06–2,5
Galo rūgštis	2,8	Kvercetino-3-galaktozido	0,25–1,6
Kumaro rūgštis	6,7–8,3	Bendras flavonolių ir flav-3-olių kiekis	1,4
Elago rūgštis	1,4	Bendras fenolinių rūgščių kiekis	26,0
Kofeino rūgštis	4,0	Bendras proantocianidinų kiekis	253,0
Chlorogeno rūgštis	18,3	Bendras taninų kiekis	517,0

Uogose esantys fenoliniai junginiai pasižymi naudingomis savybėmis. Manoma, kad fenolio rūgštys gali veikti kaip priešuždegiminės, antikarcinogeninės, antimikrobinės ar kaip antioksidacinės medžiagos. Be to, farmakologiniai ir klinikiniai tyrimai parodė, kad uogose

esantys flavonoidai yra veikliosios medžiagos, atsakingos už priešūždegiminį poveikį. Augaluose šie flavonoidai paprastai yra gliukozidai. Eksperimentuose *in vivo* su graužikais įrodyta, kad bruknių ekstraktas, kuriame yra polifenolių, geba sumažinti oksidacinio streso pasireiškimą vėžiniams susirgimams [23, 28].

Antocianinai priklauso flavonoidinei klasei, kurie pasižymi stipriomis hidrofilinėmis savybėmis. Jie yra atsakingi už raudoną ir mėlyną vaisių, daržovių ar žiedų spalvą. Antocianinai yra labiausiai lokalizuoti uogų epidermio sluoksnyje, bet taip pat jų randama ir vaisių ar uogų minkštyme. Be natūralių pigmentinių savybių, antocianinai taip pat yra stiprūs antioksidantai, jie gali užkirsti kelią lipidų oksidacijai. Labiausiai paplitę antocianidinai yra delfinidinas, cianidas, peonidinas, petunidinas ir malvidinas, visi jie yra radami *Vaccinium* genties uogose. O bruknėse dažniausiai yra identifikuojami cianidino glikozidai, kur cianidin-3-galaktozidas sudaro apie 80 %, cianidin-3-gliukozido nustatoma apie 5 % bei cianidin-3-arabinozidas sudaro apie 11 % visų antocianinų, o kitų antocianinų grupių aptinkami tik pėdsakai. Antocianinų kiekis ir santykis kinta priklausomai nuo veislės, augalo brandos, geografinės padėties ir nuo agroklimatinių sąlygų. Taigi, nustatomų antocianinų kiekį bruknėse lemia kilmės vieta, jos reikšmė pateikiama **5 lentelėje** [11, 29].

5 lentelė. Bruknėse nustatomų pagrindinių antocianinų kiekiai [15, 22, 25, 30]

Junginys	Kiekis mg/100 g	Uogų kilmės vieta	Nustatymo metodas
Cianidin-3-arabinozidas	95	Nunavikas, Kanada	HPLC
	82	Aliaska, JAV	
	4,2	Oregonas, JAV	
Cianidin-3-galaktozidas	122	Nunavikas, Kanada	
	107	Aliaska, JAV	
	30,2	Oregonas, JAV	
Cianidin-3-gliukozidas	6,55	Nunavikas, Kanada	
	6,2	Aliaska, JAV	
	3,8	Oregonas, JAV	
Bendras antocianinų kiekis	194,6	Aliaska, JAV	pH diferenciniu metodu
	24	Oregonas, JAV	
	223	Nunavikas, Kanada	HPLC
	38,2	Oregonas, JAV	
	257	Suomija	UHPLC

1.4 Lipidų peroksidacijos procesas

Lipidai yra vienas svarbiausių maisto bei organizmo ląstelių membranų komponentas, turintis platų panaudojimą pramonėje. Tačiau ši medžiagų grupė yra linkusi į oksidaciją įvairiais būdais. Jų oksidacinis stabilumas priklauso nuo daugybės vidinių ir išorinių veiksnių, kurie apima nesočiųjų riebalų rūgščių kiekį, šalutinių komponentų sudėtį, aplinkos sąlygas, antioksidantų

buvimą bei kitus veiksnius. Lipidų oksidacija yra pagrindinė maisto kokybės pablogėjimo priežastis ir neigiamai veikia biologinių sistemų vientisumą. Oksidaciniai maisto pokyčiai sukelia kvapo ir skonio pakitimus maisto produktuose, maistinių ir bioaktyvių medžiagų praradimą ir potencialiai toksiškų junginių susidarymą, todėl tokių maisto produktų vartojimas yra netinkamas. Oksidacijos mechanizmas vyksta keliomis stadijomis – tai pirminė (peroksidacija) ir antrinė oksidacija. Pirminiai oksidacijos produktai yra peroksidai ir hidroperoksidai, o antriniai – lakiosios medžiagos Taigi, lipidų oksidacija turi neigiamą poveikį tiek maisto kokybei, tiek žmonių sveikatai, todėl reikia stengtis sumažinti oksidaciją ir pagerinti lipidinių produktų oksidacinį stabilumą [31].

Lipidai yra linkę į oksidaciją dalyvaujant katalizinėms sistemoms, tokioms kaip šviesa, šiluma, fermentai, metalai ir mikroorganizmai. Todėl susiduriama su sudėtingais autooksidacijos, fotooksidacijos, terminės arba fermentinės oksidacijos procesais, iš kurių dauguma inicijuojami laisvųjų radikalų ar kitų reaktyvių junginių, tokių kaip tarpiniai produktai. Autooksidacija yra labiausiai paplitęs procesas, kuris apibūdinamas kaip spontaniškas lipidų reakcija su atmosferos deguonimi per laisvųjų radikalų grandinę. Laisvieji radikalai yra nestabilios bei reaktyvios molekulės, kurios turi nesuporuotą elektroną išorinėje orbitalėje ir pasižymi labai dideliu cheminiu aktyvumu. Dažniausiai sutinkami laisvieji deguonies radikalai (ROS), sudaryti iš molekulinio deguonies. Svarbiausi išskiriami laisvieji deguonies radikalai, pasižymintys pavojingiausiomis savybėmis, yra: hidroksilo ($\text{OH}\cdot$), superoksido anijonas ($\text{O}_2^{\cdot-}$), alkoksilo ($\text{RO}\cdot$), peroksilo ($\text{ROO}\cdot$), hidroperoksilo ($\text{HOO}\cdot$) [31, 32].

Autooksidacija susijusi su laisvųjų radikalų susidarymu ir skilimu. Šį procesą sudaro trys etapai: iniciacija, sklidimas (išplitimas), reakcijos nutraukimas. Iniciaciją sudaro vandenilio atomo pašalinimas iš molekulės grandinės. Šiame etape didelę reikšmę turi iniciatoriai, tokie kaip temperatūra, metalų jonai (Cu, Fe, Ni, Sn), saulės šviesa. Aplinkoje esant deguonies formuojasi peroksilo radikalai, šiems reaguojant toliau, susidaro hidroperoksidai. Peroksilo radikalai gali atakuoti naują lipidų molekulę keletą tūkstančių kartų tol, kol nėra vandenilio šaltinio arba kol grandinė yra nutraukiama, pavyzdžiui, antioksidantų. Iniciacija vyksta lėtai, o hidroperoksidų koncentracija didėja intervale, kuris vadinamas indukcijos periodu [33, 34].

Sklidimo metu gauti pirminiai oksidacijos produktai lipidų hidroperoksidai yra nestabilūs ir skyla į daugelį antrinių oksidacijos produktų, įskaitant aldehidus, ketonus, alkoholius, angliavandenilius, lakias organines rūgštis ir epoksidinius junginius, kai kurie iš jų turi nepageidaujamą kvapą. Oksidacijos pabaigoje, vykstant polikondensacijai, formuojasi didelės molekulinės masės produktai. Reakcija pasibaigia susijungus dviems laisviems radikalams ir susidarius stabiliems produktams [31, 32, 35].

1.5 Antioksidantai

Antioksidantai gali būti apibūdinami kaip medžiagos, kurios slopina oksidaciją ir apsaugo ląstelę nuo žalingo poveikio, kurį sukelia oksidacinis stresas. Antioksidantai gali būti klasifikuojami kaip pirminiai arba antriniai, priklausomai nuo jų veikimo mechanizmo [29].

Pirminiai antioksidantai yra medžiagos, kurios gali reaguoti su lipidų radikalais ir paversti jas stabilesne forma. Tokie antioksidantai perneša vandenilio atomą į lipidų radikalą ir taip jį neutralizuoja. Lipidų radikalo produktas, priimdamas vandenilio atomą, nebesudaro naujos grandininės reakcijos ir taip ši grandinė gali būti nutraukta. Pirminiems antioksidantams priskiriami fenoliniai junginiai, askorbo rūgštis, galo rūgštis, flavanoidai, tokoferoliai, sintetiniai antioksidantai BHA, BHT, THBP, TBHQ. Antriniai antioksidantai yra junginiai, kurie deaktivuoja reaktyviųjų deguonies rūšių pirmtakus. Jie susilpnina arba stabdo oksidaciją keliais mechanizmais: gali veikti kaip metalo chelatoriai ir kai matricoje yra kitų antioksidantų. Todėl, jiems būdingas sinergistinis veikimas, tai yra jie sustiprina arba atnaujiną pirminių antioksidantų poveikį. Antriniais antioksidantais yra laikomi sieros dioksidas, sulfitai ir lecitinas [29, 31, 36].

Antioksidantai plačiai paplitę augalinėse žaliavose, gyvūnų audiniuose ir mikroorganizmuose. Jie aprūpina žmogaus organizmą natūraliais antioksidantais ir apsaugo organizmus nuo oksidacinio streso. Antioksidantai gali būti izoliuoti kaip gryni junginiai iš natūralių šaltinių ir naudojami maisto konservavimui, maisto papildams bei vaistų gamyboje. Augalo sistemos turi didelius apsauginius mechanizmus, kad kovotų su žalingais laisvų radikalų padariniais. Todėl, augalų ląstelės ypač turtingos antioksidantais, įskaitant metabolitų ir fermentų įvairovę. Taigi, vaisiai, uogos, daržovės, prieskoniniai, žoliniai augalai, javai, grūdai, aliejai, sėklos ir arbatos yra itin svarbūs natūralių augalinių antioksidantų šaltiniai. Augalinės kilmės antioksidaciniai metabolitai apima askorbatą, glutationą, tokoferolius, karotinoideus ir fenolinius junginius, tokius kaip flavonoidai, antocianinai, proantocianidinai ir fenolio rūgštys [29, 31].

Antioksidantų veiksmingumą lemia daugybė veiksnių, įskaitant jų struktūrinę savybę, koncentraciją, temperatūrą, oksidacijos substrato tipą, taip pat prooksidantų ir sinergiklių buvimą. Antioksidanto cheminė sudėtis nulemia jo reaktyvumą su laisvaisiais radikalais, o tuo pačiu ir jo antioksidacinį aktyvumą. Kaip jau minėta anksčiau, antioksidantų veiksmingumas priklauso nuo jų koncentracijos, todėl būtina parinkti optimalias antioksidantų koncentracijas, kad būtų pasiektas didžiausias veiksmingumas [31].

1.6 Bioaktyvių junginių išskyrimo metodai

Bioaktyvių junginių išskyrimas iš augalinės žaliavos yra vienas pirmų žingsnių, kuris naudojamas maisto papildų, specifinių maisto ingredientų, farmacijos ir kosmetikos gamyboje. Ekstrakcija yra pirmasis etapas, po kurio seka tolesni tyrimai. Bioaktyvius junginius galima išgauti iš šviežių, šaldytų arba išdžiovintų augalų. Paprastai prieš ekstrahuojant augalinius

bandinius, pirmiausia juos reikia sumalti, sutrinti, homogenizuoti ar kitaip susmulkinti. Ekstrakcijos greitis priklauso nuo susmulkintos žaliavos dalelių dydžio, naudojamo tirpiklio, žaliavos ir tirpiklio santykio bei ekstrakcijos temperatūros, slėgio ir laiko. Biologiškai aktyvūs junginiai gali būti išskiriami iš įvairių augalo dalių: lapų, žiedų, stiebų, sėklų, vaisių ar uogų. Tinkamai parinkta ekstrakcijos metodika leidžia išgauti didžiausią biologiškai aktyvių junginių kiekį ir objektyviai įvertinti augalinės žaliavos kokybinę ir kiekybinę sudėtį. Dažniausiai naudojami ekstrakcijų būdai yra ekstrakcija tirpikliu (maceravimas), Soksleto ekstrakcija, superkrizinė ekstrakcija, pagreitinta ekstrakcija tirpikliais [37, 38].

Tradiciniais ekstrakcijos metodais yra laikoma: ekstrakcija vandens garais, Soksleto ekstrakcija ir maceravimas. Atliekant šiuos metodus naudojami skirtingi ekstrahentai, tokie kaip etanolis, acetonas arba metanolis bei jų mišiniai su vandeniu. Be to, šie metodai gali būti kombinuojami panaudojant šilumą ir/arba maišymą. Netradiciniai (šiuolaikiniai) ekstrakcijos metodai paprastai yra saugesni aplinkai, nes yra mažiau sunaudojama cheminių medžiagų, trumpesnis ekstrakcijos laikas, pasiekama didesnė išeiga, išgaunamas didesnis bioaktyvių junginių selektyvumas ir geresnės kokybės ekstraktas. Netradiciniams ekstrakcijoms metodams yra priskiriami: ultragarsas, ekstruzija, mikrobanginis šildymas, impulsinis elektrinis laukas, fermentinė hidrolizė, ekstrakcija superkriziniais skysčiais bei ekstrakcija padidintame slėgyje, naudojant įvairius tirpiklius [38, 39]

1.6.1 Maceravimas – ekstrakcija tirpikliu

Ekstrakcija tirpikliu dažniausiai naudojama augalų ekstraktų paruošimo procedūrose, nes tai yra paprastas, efektyvus ir plačiai pritaikomas metodas. Ekstrakto išeiga priklauso nuo tirpiklių tipo, ekstrahavimo laiko, temperatūros ir/ar maišymo intensyvumo, mėginio ir tirpiklio santykio, taip pat nuo bandinio cheminės sudėties ir fizikinių savybių. Fenolių tirpumą lemia cheminis augalo mėginio pobūdis, taip pat naudojamų tirpiklių poliškumas. Augalinėse medžiagose gali būti skirtingų fenolinių medžiagų nuo paprastų, pavyzdžiui antocianinų, iki labai polimerizuotų medžiagų, tokių kaip taninai, be to gali būti nefenolinių medžiagų, tokių kaip cukrus, organinės rūgštys ir riebalai, kurios gali apsunkinti fenolių ekstrakciją. Taigi, norint pašalinti nepageidaujamus komponentus gali tekti atlikti papildomus veiksmus. Todėl nėra pastovių ekstrakcijos sąlygų, tinkamų visiems augalų fenoliams išgauti [37].

Kokių fenolių mišinys bus išgaunamas iš augalinės medžiagos, priklauso nuo ekstrakcijos metu naudojamos tirpiklio sistemos, priklausomybė nuo tirpiklio pateikta **6 lentelėje**. Ekstrahuojant antocianinus iš augalinės medžiagos naudojamas parūgštintas organinis tirpiklis, dažniausiai metanolis arba etanolis. Ši tirpiklio sudėtis denatūruoja ląstelių membranas, tuo pačiu ištirpina antocianinus ir juos stabilizuoja. Norint gauti geriausią antocianinų ekstrakto išeigą,

silpnų organinių rūgščių (skruzdžių rūgštis, acto rūgštis, citrinų rūgštis, vyno rūgštis) pridedama apie 0,5–3,0 %, o druskos rūgštis rekomenduojama <1,0 %. Įprastai, antocianinų ekstrahavimas vykdomas esant 20–50 °C temperatūrai, nes nustatyta, kad aukštesnė nei 70 °C temperatūra gali sukelti greitą antocianinų skilimą [37].

6 lentelė. Tirpiklių įtaka biologiškai aktyvių junginių išskyrimui [39]

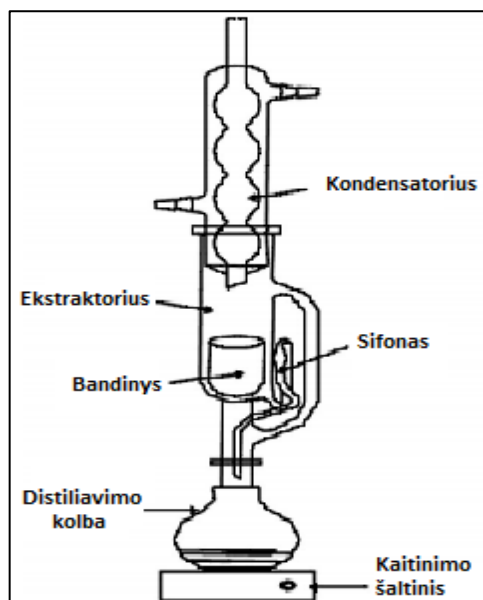
Tirpiklis	Vanduo	Etanolis	Metanolis	Acetonas
Tirpstantys junginiai	Antocianinai Taninai Saponinai Terpenoidai	Taninai Polifenoliai Flavanoliai Terpenoidai Alkaloidai	Antocianinai Terpenoidai Saponinai Taninai Flavonai Polifenoliai	Flavanoidai

Taigi, ekstrahavimas turi būti atliekamas tinkamiausiu tirpikliu ir idealiai iš anksto nustatytomis analitinėmis temperatūros ir pH sąlygomis. Taip pat, būtina atsižvelgti į polifenolinę struktūrą, nes šie junginiai gali turėti kelias hidroksilo grupes, kurios gali būti konjuguotos su cukrumi, rūgštimis arba alkilo grupėmis. Be to, fenolio junginių poliarumai labai skiriasi ir sudėtinga sukurti vieną metodą optimaliam visų fenolio junginių ekstrahavimui. Todėl, ekstrahavimo procedūros optimizavimas reikalingas tiksliam fenolio junginių išskyrimui iš įvairių medžiagų matricių ir jų tyrimams [38].

1.6.2 Soksleto ekstrakcija

Tradicinė Soksleto ekstrakcija yra naudojama jau daugybę metų, pirmasis 1879 metais ją pasiūlė Vokiečių chemikas Soksletas. Šis metodas buvo sukurtas lipidų ekstrakcijai. Tačiau, šiandien Soksleto ekstrakcija plačiai naudojama išgaunant įvairius vertingus bioaktyvius junginius iš natūralių šaltinių. Be to, šis metodas naudojamas kaip naujų ekstrahavimo alternatyvų palyginimo modelis [39].

Nepertraukiamai kietų medžiagų ekstrakcijai yra naudojami soksleto aparatai (**2 pav.**). Pirmiausia, ekstrahuojama medžiaga, kuri suvyniojama į filtro popierių, patalpinama į ekstraktorių. Tada, ekstraktorių užpildomas tirpikliu, kuris kondensuojasi kondensatoriuje iš kaitinamos distiliavimo kolbos. Vėliau, tirpikliui ekstraktoriuje pasiekus perpildymo lygį, jis per sifoną patenka atgal į distiliavimo kolbą. Distiliavimo kolboje išekstrahuota medžiaga nuo tirpiklio yra atskiriama distiliavimo būdu ir tirpiklis vėl kaupiasi ekstraktoriuje. Šie procesai atliekami tol, kol pasibaigia ekstrakcija. Po Soksleto ekstrakcijos, tirpiklis iš ekstrakto yra pašalinamas garinant [39, 40].



2 pav. Soksleto aparatas [40]

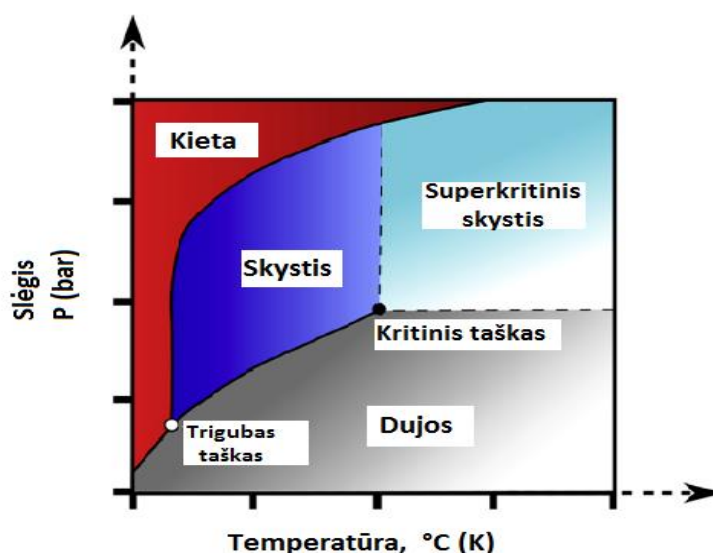
Ekstrakcijos efektyvumą nulemia mėginio dalelių dydis ir matricos savybės, ekstrakcijos laikas, tirpiklio tipas bei tūris. Dažniausiai, prieš pradedant Soksleto ekstrakciją iš mėginio turi būti visiškai pašalinta drėgmė, kad būtų pasiektas optimalus nepolinių organinių junginių išekstrahavimo efektyvumas. Drėgmės buvimas gali sumažinti tirpiklio ekstrahavimo efektyvumą. Be to svarbu, kad naudojamo tirpiklio poliškumas būtų panašus į ekstrahuojamos medžiagos. Soksleto ekstrakcijai naudojami įvairūs tirpikliai ar jų mišiniai, bet įprastai dažniausiai naudojamas tirpiklis yra heksanas, kuris gerai tirpina lipofiliškas medžiagas iš augalinių mėginių. Nuo pasirinkto tirpiklio priklauso ekstrakto išeiga ir bioaktyvių junginių sudėtis. Tačiau šiandien vis dažniau naudojami tokie tirpikliai, kaip etanolis ar vanduo, norint išvengti aplinkos taršos bei sveikatos sutrikimų. Tačiau, naudojant šiuos tirpiklius gaunama mažesnė ekstrakto išeiga, nes sumažėja molekulinis giminingumas tarp tirpiklio ir tirpinamos medžiagos. Taigi, pagrindinis Soksleto ekstrakcijos privalumas yra tai, kad šis metodas yra paprastas ir pigus. O pagrindiniais trūkumais yra laikoma ilga ekstrakcijos trukmė (iki 48 ar net 72 val), sunaudojamas nemažas kiekis tirpiklio bei galimas kai kurių junginių terminis skilimas, nes ilgą laiką ekstrakcija vyksta tirpiklio virimo taške [39, 41].

1.6.3 Superkazinė ekstrakcija

Superkazinė skysčių ekstrakcija (SKE) leidžia perdirbti augalinę medžiagą esant žemai temperatūrai, taip sumažinamas galimas išgaunamų junginių terminis skilimas bei išvengiama kenksmingų toksiškų tirpiklių. Vykiant SKE kai tirpiklio slėgis ir temperatūra yra virš jo kritinio taško, jis tampa superkritiniu skysčiu (**3 pav.**), kritinis taškas yra skirtingas kiekvienai konkrečiai medžiagai. Vyraujant šioms sąlygoms superkritinis skystis turi mišrias savybes tarp dujų ir skysčių. Jo klampa yra panaši į dujas, tankis yra artimas skysčiui, o skvarba kelis kartus didesnė

nei įprastų skysčių. Taigi, superkritiniuose skysčiuose daug didesni ištirpusių medžiagų difuzijos koeficientai. Šios priežastys lemia daug greitesnę ir efektyvesnę ekstrakciją lyginant su tradiciniais tirpikliais [42, 43].

Daugiau kaip 90 % SKE yra vykdoma su anglies dioksidu, kaip superkritiniu tirpikliu, nes jis pasižymi mažomis kritinėmis konstantomis ($T_c=31,1\text{ }^\circ\text{C}$, $P_c=7,38\text{ MPa}$) ir inertiškumu. Be to, CO_2 dujos yra netoksiškos, nebrangios, lengvai prieinamos ir lengvai pašalinamos iš produkto. CO_2 dujos pripažįstamos saugiu tirpikliu, todėl produktai, išgauti superkritine CO_2 ekstrakcija yra nekenksmingi žmonių sveikatai. Superkritinis CO_2 yra nepolinis tirpiklis, jis poliškumu panašus į pentaną, ir yra naudojamas mažos molekulinės masės silpnai poliškų junginių, tokių kaip karotinoidų, trigliceridų, riebalų rūgščių, aromato junginių ekstrahavimui. Tačiau, papildymas modifikatoriais tokiais, kaip etanolis ar metanolis suteikia galimybę išekstrahuoti ir labiau poliškus junginius [42].

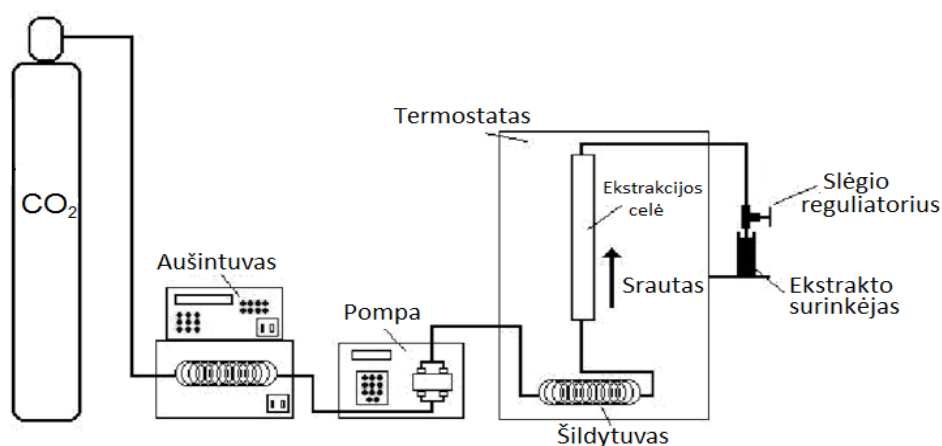


3 pav. Anglies dioksido slėgio ir temperatūros fazinė diagrama [44]

Pagrindiniai SKE įrenginio elementai pavaizduoti **4 paveiksle**, kurį sudaro superkritinio skysčio rezervuaras, ekstrakcijos celė su kaitinimo įrenginiu, slėgio reguliavimo įtaisas, pompa bei ekstrakto surinkimo talpa. Ekstraktoriuose dar gali būti modifikatorių talpa ir pompa jiems paduoti į sistemą. Ekstrakcijos celė gaminama iš nerūdijančio plieno ar kitos medžiagos, kuri gali išlaikyti didelį slėgį. Slėgio regulatoriumi reguliuojamas superkritinio skysčio slėgis. Slėgio regulatorius dažniausiai yra šildomas tam, kad neužsikimštų, nes kondensuojantis drėgmei jis gali užšalti išgaruojant CO_2 dujoms [39, 45].

Prieš superkritinės ekstrakcijos vykdymą žaliava yra patalpinama į ekstrakcijos celę, kurioje yra įtaisytas temperatūros daviklis ir slėgio įėjimo bei išėjimo vožtuvai, tam kad būtų palaikomos reikalingos ekstrakcijos sąlygos. Ekstrakcija gali būti atliekama statiniu būdu ir/arba dinaminio būdu (superkritinį skystį nuolat leidžiant per mėginį). Statinis būdas sudaro sąlygas superkritiniam

skysčiui geriau prasiskverbti į medžiagos matricą, o dinaminis būdas padeda išvengti superkritinio skysčio prisotinio analite, pagreitina ekstrakciją bei padidina ekstrakto išeią. Dažniausiai abu šie būdai yra kombinuojami, pirmiausiai trumpą laiką atliekama statinė ekstrakcija, o vėliau dinaminė. Pradedant ekstrakciją, CO₂ dujos suslegiamos iki superkritinio skysčio būklės bei pakaitinamos, kad pasiekti darbinę temperatūrą. Tada tam tikru slėgiu superkritinis skystis kartu su modifikatoriumi ar be jo tiekiamas per ekstraktoriaus celę. Iš ekstrakcijos celės superkritinis skystis su ištirpusiais komponentais teka į surinkimo indą, kuriame didinant temperatūrą ar sumažinant slėgį CO₂ vėl paverčiamas į dujas, o ekstraktas kondensuojamas ir surenkamas specialiaame inde. Toliau, dažniausiai anglies dioksidas regeneruojamas, kondensuojamas ir sugražinamas atgal į darbinį ciklą pakartotiniam naudojimui [45].



4 pav. Superkritinio ekstraktoriaus schema [45]

Siekiant gauti geriausias ekstrakcijos rezultatus reikia teisingai pasirinkti ekstrakcijos temperatūrą, slėgį, laiką, dalelių dydį ir jose esantį drėgmės kiekį, CO₂ srauto greitį bei tirpiklį–modifikatorių. Norimo išekstrahuoti junginio poliškumas yra pats svarbiausias tirpiklio pasirinkimo veiksnys. Anglies dioksido dujos pasižymi selektyvumu, keičiant slėgį ir temperatūrą galima pakeisti tirpiklio gebėjimą tirpinti skirtingo poliškumo ekstrahuojamos medžiagos junginius. O norint padidinti polinių medžiagų kiekį ekstrakto, pridedami maži kiekiai polinių organinių tirpiklių. Ekstrakcijos slėgis yra vienas iš pagrindinių parametrų reikšmingų jos efektyvumui. Paprastai norimo junginio tirpumas didėja didėjant ekstrahavimo slėgiui, kuris yra tiesiogiai susijęs su didėjančiu tirpiklio tankiu. Dėl to, kuo didesnis ekstrakcijos slėgis, tuo mažesnis skysčių kiekis reikalingas ekstrakcijai. Tačiau kai kurių junginių (eterinių aliejų) ekstrakcijai aukštas slėgis nerekomenduojamas, nes išekstrahuojama daug komponentų ir ekstraktas pasidaro labai sudėtingas. Antra vertus, esant pastoviam slėgiui, tačiau didėjant temperatūrai superkritinio skysčio tankis mažėja, todėl junginių tirpumas turėtų mažėti. Be to, temperatūra veikia tirpinamos medžiagos lakumą. Vis dėlto, temperatūros įtaką sunku įvertinti, ji priklauso nuo mėginio prigimtinių savybių [42, 46].

Išėigą lemia ir žaliavos paruošimas, ji prieš ekstrakciją turi būti susmulkinta. Dalelių dydis turėtų būti apie 0,4–0,8 mm, bet gali būti ir smulkesnės, nes tuomet greičiau vyks masės mainai. Tik svarbu, kad dalelių dydis neužkimštų filtro. Kitas reikšmingas veiksnys yra žaliavos drėgmė. Drėgmė gali suformuoti ledo kamščius sistemoje. Galiausiai, ekstrakcijos efektyvumas taip pat priklauso nuo superkritinio skysčio tekėjimo greičio. Kuo lėčiau teka skystis, tuo jis labiau prasiskverbia į matricą [42, 46].

Taigi, anglies dioksidas yra dažniausiai naudojamas kaip superkritinis tirpiklis dėl trijų pagrindinių priežasčių: pirma, jis nekenkia žmonių sveikatai ir aplinkai; antra, jo vidutinė kritiška temperatūra (31,2 °C) yra esminis veiksnys bioaktyviųjų junginių išsaugojimui ekstraktuose; trečia, ekstraktas yra apsaugotas nuo kontakto su oru, kuriame gali įvykti oksidacijos reakcijos. Didžiausiais superkritinės ekstrakcijos trūkumais laikomi: aukštas slėgis, brangi įranga, todėl šių metodų kaina pramonėje yra itin didelė, selektyvumas – netirpina tokių polinių medžiagų kaip cukrūs, amino rūgštys, neorganinės druskos, baltymai [42, 43].

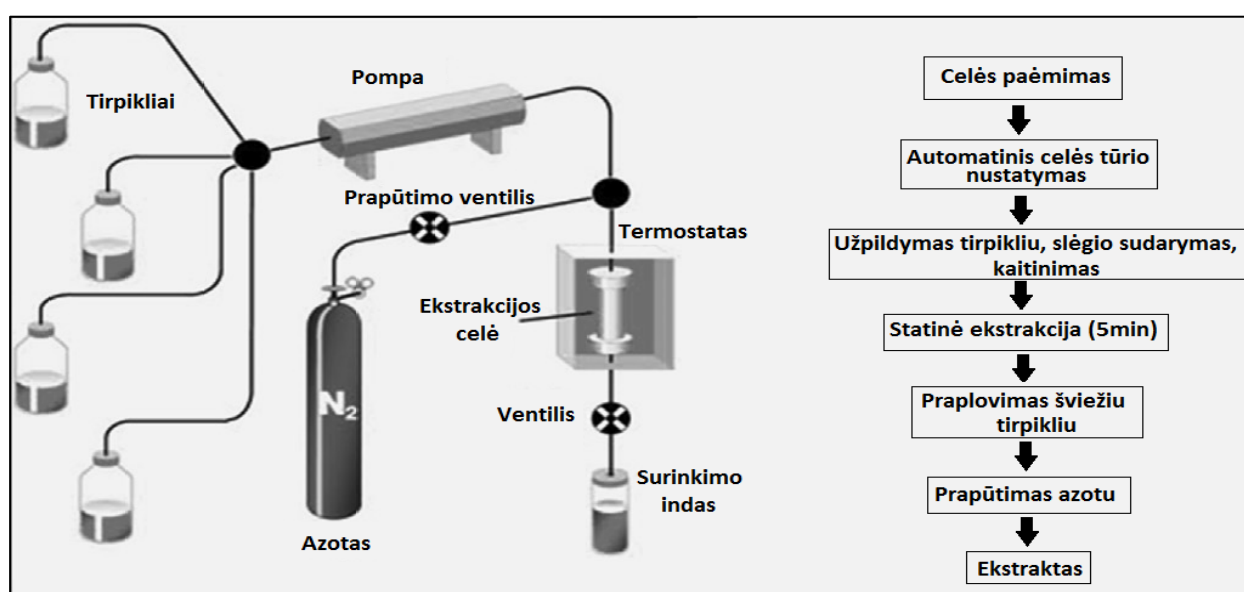
1.6.4 Pagreitinta ekstrakcija tirpikliais

Pagreitinta ekstrakcija tirpikliu (PET) yra palyginti nauja technologija, skirta ekstrahuoti fitochemines medžiagas esant aukštai temperatūrai ir slėgiui, kurios metu tirpiklis yra skystoje būsenoje (žemiau kritinio taško). Ši ekstrakcija gali būti vykdoma tiek statinėmis, tiek dinaminėmis sąlygomis, kai tirpiklis nuolat teka per mėginį arba abiejų jų deriniu. PET sistemoje palaikomas pastovus aukštas slėgis, kuris leidžia naudoti ekstrakcijos tirpiklius esant didesnei nei įprastai virimo temperatūrai. Šios aukšto slėgio (10–15 MPa) ir temperatūros (50–200 °C) kombinacijos panaudojimas užtikrina greitesnius ekstrahavimo procesus, be to šiai ekstrakcijai reikalingas nedidelis tirpiklio kiekis [37, 40].

Padidintas slėgis bei temperatūra paveikia tirpiklio, mėginio ir jų tarpusavio sąveiką. Aukštas slėgis padidina tirpiklio virimo temperatūrą, todėl ekstrakciją galima atlikti aukštesnėje temperatūroje. Tai svarbu, nes ekstrakcijos tirpikliai, įskaitant ir vandenį, kurie neefektyvūs esant žemai ekstrakcijos temperatūrai, gali būti daug efektyvesni padidėjusios temperatūros sąlygomis. Svarbu, kad tirpiklis gerai tirpintų analitę ir blogai tirpintų matricą. Be to, esant aukštai temperatūrai ir slėgiui greičiau vyksta masės perdavimas bei padidėja analičių tirpumas, taip pat sumažėja tirpiklio paviršiaus įtempimas, bei klampa. Tai sudaro sąlygas tirpikliui giliau ir lengviau prasiskverbti į ekstrahuojamos medžiagos matricą. Temperatūros padidėjimas skatina bandinio matricos tarp molekulinį jėgų susilpnėjimą (t. y. van der Valso jėgų, vandenilio jungčių ir dipolio sąveiką). Taigi, visos šios išvardintos priežastys pagreitina ekstrakciją ir padidina ekstrakcijos išėigą [40, 44].

Pagreitintos ekstrakcijos tirpikliu aparatūrą, kuri pateikta **5 paveiksle**, sudaro: (1) tirpiklių talpyklos; (2) siurblys, kuris tiekia tirpiklį į sistemą ir padeda palaikyti reikiamą slėgį; (3) ekstrakcijos celė, atspari aukštam slėgiui; (4) kaitinimo elementas, kuris palaiko reikiamą ekstrakcijos temperatūrą; (5) surinkimo indas. Tačiau, tokio tipo įrenginiai gali būti daugiau ar mažiau sudėtingesni, priklausomai nuo proceso reikalavimų [44].

Pagrindiniai šio metodo privalumai yra mažas sunaudojamo tirpiklio kiekis ir palyginti trumpas ekstrakcijos laikas. Panaudoto tirpiklio tūris priklauso nuo celės tūrio, ir sudaro apie 0,5–1,4 celės tūrio. Be to, šis metodas pilnai automatizuotas ir gana paprastas. Šios ekstrakcijos trūkumas yra tai, kad ekstrakcijai yra naudojama aukštesnė temperatūra, dėl ko gali būti prarasta dalis karščiui neatsparių junginių [40, 44].



5 pav. Pagreitintos ekstrakcijos tirpikliais principinė schema [44]

1.6.5 Fermentinė ekstrakcija

Augaluose dalis fitocheminių medžiagų yra dispergavusios jų citoplazmoje, o kai kurie kiti junginiai yra sujungti vandeniline ar hidrofobine sąveika su polisacharidu ligninu. Tokie junginiai įprastu maceravimo proceso metu sunkiai arba išvis nėra išekstrahuojami. Be to, tradicinis ekstrahavimas tirpikliais gali pakenkti fenolinių junginių veiklosiems savybėms, nes šie junginiai gali būti jautrūs specifiniams tirpikliams ar aukštai temperatūrai, o taip pat gautuose ekstraktuose neišvengiama organinių tirpiklių pėdsakų. Būtent, tokie neigiami veiksniai motyvuoja ieškoti lanksčių ekstrakcijos būdų, kurie nesumažintų bioaktyvių junginių teigiamo antioksidacinio poveikio [39, 47].

Fermentinis ekstrahavimas iš augalų yra potenciali alternatyva tradiciniams metodams. Fermentai yra idealūs katalizatoriai, padedantys išgauti, modifikuoti arba sintetinti sudėtingus biologiškai aktyvius natūralios kilmės junginius bei padidinti jų išeigą. O maisto pramonėje

fermentai dažniausiai naudojami siekiant pagerinti maisto produktų kokybę ir saugą. Būtent, fermentai gali pakeisti chemines medžiagas ar procesus, dėl kurių išskyla daugybė aplinkosaugos problemų. Fermentinėms reakcijoms dažniausiai naudojami fermentai, tokie kaip gliukozidazės, pektinazės, amilazės, gliukoamilazės, proteazės, lipazės ir oksidazės [47, 48].

Fermentai naudojami mažomis koncentracijomis bei yra laikomi nekenksmingais aplinkai. Jie paprastai gaunami iš mikroorganizmų kultūrų, augalų ir žinduolių audinių. Beveik 75 % visų pramoninių fermentų yra hidroliziniai fermentai, kurie veikia augalinių medžiagų ląstelių sienelių struktūrą. Fermentinis ekstrahavimas yra pagrįstas fermentų savybe, leidžiančia katalizuoti reakcijas su išskirtiniu specifiškumu ir gebėjimu veikti esant lengvoms perdirbimo sąlygoms vandeniniuose tirpaluose, taip išlaikant biologiškai aktyvių junginių potencialą. Vykdamas fermentinę hidrolizę gali būti išskiriami tokie junginiai, kaip polisacharidai, aliejai, natūralūs pigmentai, kvapiosios ir skoninės medžiagos bei kiti junginiai pasižymintys medicininio poveikiu [47, 49].

Fermentinio ekstrahavimo efektyvumas priklauso nuo inkubacijos temperatūros ir trukmės, pasirinkto fermento koncentracijos ir jo veikimo būdo, pH ir substrato prieinamumo. Dažnai ekstrakcijoms naudojami fermentų mišiniai, siekiant labiau optimizuoti procesą. Pavyzdžiui, hidrolizuojančių fermentų, tokių kaip celiulazė, hemiceliulazė ir pektinazė, mišinys gali suteikti geresnę galimybę tinkamai suardyti ląstelių sienelės struktūrą, suskaidyti sudėtingas vidines medžiagas bei taip palengvinti polifenolių išskyrimą [50].

Fermentinės reakcijos paprastai vyksta esant žemai temperatūrai (nuo 15 °C iki 45 °C), kuri gali būti svarbi termolabilių junginių ekstrahavimui. Didesnė nei 60 °C temperatūra keičia fermento molekulę negrįžtamai, palaiapsniui mažina fermentų aktyvumą, kartu su baltymų ir kitų bioaktyviųjų junginių inaktyvacija [50]. Optimalus fermentinės hidrolizės pH yra skirtingas kiekvienam fermentui. Daugelio fermentų optimalus pH vyrauja baltymų izoelektrinio taško pH diapazone. Kadangi šame pH intervale baltymai yra labai netirpūs, biomolekulių išskyrimas gali tapti sudėtingesnis. Todėl pH turi būti parinktas taip, kad jis netrukdytų fermentų veikimui, bet taip pat nebūtų baltymų izoelektriniame taške [49].

Apibendrinant, fermentų taikymas bioaktyviųjų medžiagų išskyrimui be organinių tirpiklių yra patrauklus pasiūlymas. Žaliavų apdorojimas fermentais paprastai sumažina ekstrakcijos laiką, sumažėja tirpiklių naudojimas, padidėja išeiga bei produkto kokybė. O fermentų derinys su šiuolaikinėmis technologijomis (ultragarsu, mikrobangomis, superkritiniais, joniniais skysčiais) yra puiki perspektyva siekiant išnaudoti abiejų metodų gavybos būdų privalumus. Taigi, fermentų naudojimas maisto ir biotechnologijų pramonėje yra ekonomiškai efektyvus ir rodo pažangą šiuolaikiniuose technologiniuose procesuose [49].

2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

2.1 Tyrimo objektas, jo apdirbimas

Tyrimams atlikti buvo naudojamos 2016 m. derliaus bruknių uogų išspaudos. Bruknių uogos (*Vaccinium vitis-idaea*) buvo gautos sušaldytos (-18 °C), kurias padovanojo UAB „Fudo“ (Kaunas, Lietuva). Pirmiausia, uogos atšildytos kambario temperatūroje ir atliktas uogų sulčių išskyrimas. Šiam procesui atlikti naudota lėtaeigė sulčiaspaudė „GREENIS F-9010“ (Kinija). Gautos uogų išspaudos buvo išdžiovintos „SFD 1205WH“ (SENCOR, Čekija) vaisių-uogų džiovyklėje 35–40 °C temperatūroje, o gautos sultys liofilizuotos. Toliau, išdžiovintos bruknių išspaudos sumaltos rotoriniu smulkintuvu „ZM 200“ (Retch, Haan, Vokietija), naudojant 0,2 mm akučių dydžio sietelį bei esant 8000 aps/min. Gauti išspaudų milteliai laikomi sandariai uždaryti stikliniuose induose tamsioje, vėsioje bei sausoje vietoje.

2.2 Tyrimo metodai

2.2.1 Cheminiai reagentai ir medžiagos

Tyrimams atlikti naudoti tirpikliai: heksanas (C₆H₁₄), metanolis (CH₃OH), druskos rūgštis (HCl) buvo gauti iš Chempur (Lenkija), etanolis 96,3 % (C₂H₅OH) (UAB „Stumbras“, Lietuva), CO₂ dujos (99,9 %, UAB „Gaschema“, Jonava, Lietuva), N₂ dujos (UAB „Gaschema“, Jonava, Lietuva), distiliuotas vanduo (vandens gryninimo sistema Milipore, Bedford MA, JAV), ESCh grynumo acetonitrilas ir metanolis (Sigma-Aldrich, Steinheim, Vokietija), ultra švarus vanduo ruošiamas Milipore vandens gryninimo sistema (Bedford MA, JAV).

Naudoti reagentai: natrio chloridas (NaCl) (Lach–Ner, Brno, Čekija), dihidrofosfatas (KH₂PO₄) (Panreac, Barselona, Ispanija), dinatrio fosfatas (Na₂HPO₄) (Merck KGaA, Darmstadt, Vokietija), kalio chloridas (KCl) (Lach–Ner, Brno, Čekija), natrio karbonatas (Na₂CO₃) (Sigma–Aldrich, Tokijas, Japonija), *Folin–Ciocalteu* ((2M), Sigma–Aldrich, Buchs, Šveicarija), kalio persulfatas (K₂S₂O₈) (Lach–Ner, Brno, Čekija), 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis (ABTS⁺) (Sigma–Aldrich, Steinheim, Vokietija), 3',6'-dihidroksispiro(izobenzofuran-1(3H),9-(9H)ksanten)-3-onas (fluoresceinas, Sigma–Aldrich, Steinheim, Vokietija), 2'-azobio (2-amidinpropano) dihidrochloridas (AAPH) (Sigma–Aldrich, Steinheim, Vokietija), 3,4,5 trihidroksibenzenkarboksirūgštis (galo rūgštis, 99 %, Sigma–Aldrich, Steinheim, Vokietija), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis (Trolox, 97 %, Sigma–Aldrich, Steinheim, Vokietija), boro trifluoridas (24 % metanolinis tirpalas, Acros organics, Belgija), citrinų rūgštis (Sigma-Aldrich, Steinheim, Vokietija), Viscozyme L (Novozymes, Bagsverdas, Danija).

Kitos medžiagos: mikrokristalinė celiuliozė (Sigma–Aldrich, Sent Luisas, JAV), diatomitinė žemė (100 % SiO₂, Dionex, Saniveilis, JAV), filtrinis popierius, PET filtrai (Dionex, Saniveilis, JAV), plastikinės kiuvetės (10×10×45 mm) (Fluka, Lenkija).

2.2.2 Cheminės sudėties nustatymas

2.2.2.1 Drėgmės kiekio nustatymas

Drėgmės kiekis bruknių išspaudose nustatytas remiantis modifikuotu LST ISO 1442:2000 standartu [51]. Į iš anksto iki pastovaus svorio iškaitintus džiovinimo indelius – biuksus 0,0002 g tikslumu pasveriami 3–5 g sumaltų 0,2 mm bruknių uogų išspaudų (svėrimui naudotos analitinės svarstyklės „Scaltec SPB31“, Hassas Terazi, Vokietija). Pasverti bandiniai džiovinami džiovinimo krosnelėje, esant 100–105 °C temperatūrai. Pirmą kartą bandiniai pasveriami po 3 valandų, po to svėrimai kartoti kas pusvalandį, kol dviejų pakartotinių svėrimų rezultatai skyrėsi 0,001–0,005 g. Prieš sveriant biuksai 30 min aušinami eksikatoriuje. Drėgmei nustatyti atlikti trys pakartojimai. Bandinio drėgmės kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal 1 formulę:

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100 \text{ (\%)} \quad (1)$$

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 [52]. Tiriama išdžiovinta bruknių išspaudų medžiaga iš biukso (nustačius drėgmės kiekį) be nuostolių pernešama ant filtrinio popieriaus. Viskas kruopščiai suvyniojama į paketėlį, kuris perrišamas siūlu ir pasveriamas 0,0002 g tikslumu. Paruoštas paketėlis sudedamas į Soksleto aparatą EZ100H (Behr, Diuseldorfas, Vokietija). Ekstrahuojama heksanu 6 valandas, tirpikliui pratekant pro bandinį penkis ar šešis kartus per valandą. Pasibaigus ekstrakcijai, bandiniai išimami iš ekstraktoriaus ir laikomi traukos spintoje, kol išgaruoja tirpiklio likučiai iš tiriamos žaliavos, po to 30 min džiovinami esant 100–105 °C temperatūrai, galiausiai aušinami ir pasveriami 0,0002 g tikslumu. Riebalų kiekiui nustatyti atlikti trys pakartojimai. Riebalų kiekis apskaičiuotas pagal tai, kiek po ekstrakcijos sumažėjo paketėlio su tiriamu bandiniu masė. Bandinio riebalų kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal 2 formulę:

$$X = \frac{a - b}{m} \times 100 \text{ (\%)} \quad (2)$$

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 Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas

Mineralinių medžiagų kiekis bruknių išspaudose nustatytas remiantis LST ISO 936:2000 [53]. Porcelianinis tигlis iškaitinamas džiovinimo krosnelėje iki pastovaus svorio. Į iškaitintą tигlį 0,0002 g tikslumu pasveriamas nuo 2 iki 5 g tiriamų sumaltų 0,2 mm bruknių uogų išspaudų. Tигlis su bandiniu apanglinamas ant elektrinės plytelės, kol iš tигlio nustoja rūkti dūmai. Po to tигlis perkeliamas į elektrinę krosnį – mufelį „SNOL 8,2/1100“, kurio vidaus temperatūra siekia 600–650 °C, galutinis deginimas trunka 15–16 valandų. Galiausiai, tигlis su pelenais atvėsinaamas eksikatoriuje 30–40 min ir pasveriamas. Mineralinių medžiagų kiekiui nustatyti atlikti trys pakartojimai. Pelenų (mineralinių medžiagų) kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal 3 formulę:

$$X = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100 \text{ (\%)} \quad (3)$$

čia: m – tигlio svoris, g; m_1 – tигlio svoris su bandiniu, g; m_2 – tигlio svoris su pelenais, g.

2.2.2.4 Baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu

Baltymų kiekiui nustatyti taikomas Kjeldalio metodas remiantis modifikuotu LST EN ISO 20483:2014 metodu [54] ir apskaičiuojamas naudojant bendrą azoto kiekį (X) $\times 6,25$. Pasveriamas $1\pm 0,002$ g sumaltų 0,2 mm bruknių uogų išspaudų į Kjeldalio kolbą, į kurią įpilama 20 ml koncentruotos 98 % H_2SO_4 , įdedama katalizatoriaus tabletė (3,5 g K_2SO_4 ; 0,4 g $CuSO_4$). Bandinys mineralizuotas „Behr InKjel 625 P“ įrenginiu, kolbas uždengus išmetamų dujų kolektoriumi, nustačius parankius kaitinimo intensyvumo ir trukmės parametrus, kol tirpalas kolboje tampa skaidrus (kaitinimo intensyvumas 60 %, trukmė 90 min). Gautas mineralizato tirpalas distiliuojamas vandens garais automatine distiliavimo įranga „Behr distillation unit S4“. Pagal numatytą 1 programą distiliuojamas visas mineralizato kiekis, pasirenkant 40 s NaOH ir 3 s H_3BO_4 padavimo parametrus ir distiliavimo trukmę. Išsiskyre amoniako garai kondensuojami grįžtamajame šaldytuve ir surenkami distiliato surinkimo kolbutėje. Distiliatas surinkimo kolbutėje, įlašinus Taširo indikatorių titruojamas 0,1 N HCl, kol žalsva kolbutės turinio spalva pakinta į pilkai violetinę. Lygiagrečiai atliekamas kontrolinis bandinys, į distiliacijos kolbą vietoje mineralizato pilant 20 ml konc. 98 % H_2SO_4 . Eksperimentas kartojamas du kartus. Azoto kiekis (X), išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal 4 formulę:

$$X = \frac{0,0014 \times (V - V_0)}{m} \times 100 \text{ (\%)} \quad (4)$$

čia: V – 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas titruojant bandinio distiliatą, ml; V_0 – 0,1 N HCl, sunaudotas tuščiajam mėginiui nutitruoti, ml; m – bandinio svoris, g; 0,0014 – azoto kiekis, ekvivalentiškas 1 ml 0,1 N HCl.

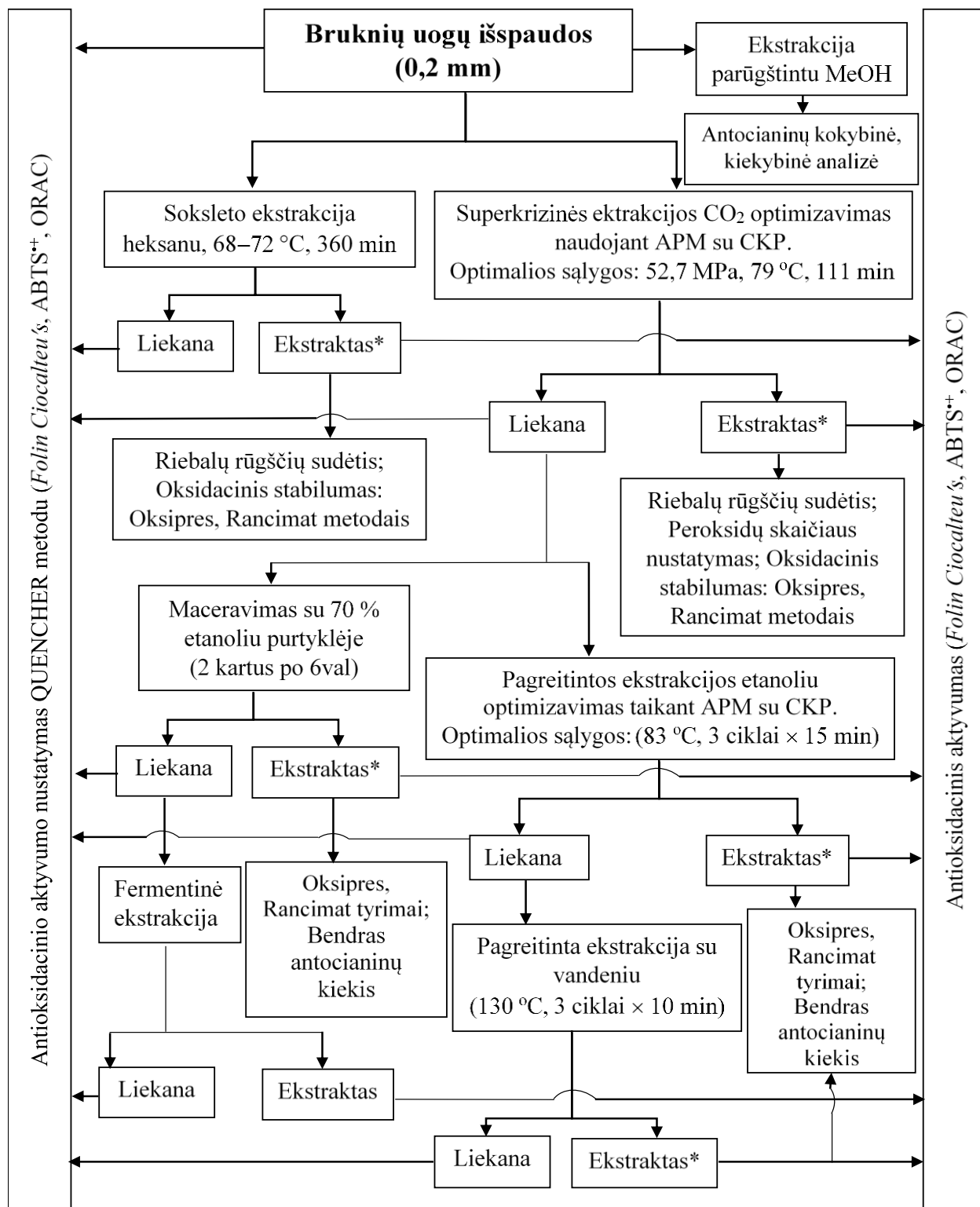
2.2.3 Tyrimų eiga

Siekiant išgauti funkcionaliuosius ingredientus iš bruknių išspaudų, taikyti įvairūs ekstrakcijų metodai. **6 paveiksle** pateikiama tyrimų plano schema. Tyrimams naudoti sumalti 0,2 mm bruknių (*Vaccinium vitis-idaea*) uogų išspaudų milteliai. Buvo atliktos dvi tradicinės ekstrakcijos (soksleto ir maceravimo) pagal standartinius AOAC metodus. Šie metodai atlikti siekiant palyginti ekstrakcijos metodų efektyvumą su eksperimentais, atliktais padidinto slėgio aplinkoje. Soksleto ekstrakcija atlikta naudojant tirpiklį heksaną, o maceravimo ekstrakcija etanolio ir vandens (70:30 t/t) mišiniu, ekstrahuojamą mišinį nuolat purtant. Maceravimo metodui naudota bruknių išspaudų liekana po CO₂ ekstrakcijos optimaliomis sąlygomis. Gauta kietoji liekana po maceravimo ekstrakcijos toliau buvo apdorojama atliekant fermentinę hidrolizę su fermentiniu preparatu *Viscozyme L*. Be to, iš pradinės bruknių išspaudų žaliavos atlikta ekstrakcija parūgštintu metanoliumi, šis ekstraktas reikalingas norint identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti bruknių išspaudose esančius antocianinus.

Optimizuotas biorafinavimo procesas (pakopinės ekstrakcijos aukšto slėgio metodais taikant skirtingus tirpiklius) buvo pritaikytas bruknių išspaudų ekstrakcijai. SKE–CO₂ ekstrakcijos procesas buvo optimizuotas siekiant išgauti didžiausią lipofiliškos frakcijos kiekį. Pasirinktos optimalios sąlygos: 52,7 MPa, 79 °C, 111 min. Po SKE–CO₂ likusi bruknių išspaudų liekana buvo toliau ekstrahuojama taikant pakopinę pagreitintą ekstrakciją organiniais tirpikliais (PET). Pirmiausia, vykdytas ekstrakcijos etanoliumi optimizavimas. Nustatytos optimalios sąlygos (83 °C, 3 ciklai × 15 min), kurioms esant gaunama didžiausia ekstrakto išeiga. Visos PET ekstrakcijos vykdytos trimis ciklais (t.y. tris kartus buvo tiekiamas šviežias tirpiklis). Toliau, po optimaliomis sąlygomis atliktos ekstrakcijos etanoliumi likusi liekana ekstrahuota subkritiniu vandeniu (130 °C, 3 ciklai × 10 min).

Po visų ekstrakcijų atlikta gautų ekstraktų cheminė analizė. Nustatytos ekstraktų antioksidacinės savybės spektrofotometriškai naudojant *Folin-Ciocalteu's*, ABTS^{•+} ir ORAC metodus, įvertintas ekstraktų oksidacinis stabilumas Oksipres ir Rancimat metodais, poliniams ekstraktams nustatytas bendras antocianinų kiekis. Taip pat atlikta ekstraktų bioaktyviųjų junginių preliminari identifikavimo analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos metodu, o parūgštintame metanoliniame bruknių ekstrakto atlikta kiekybinė ir kokybinė antocianinų analizė. Lipofiliniuose ekstraktuose nustatyta riebalų rūgščių sudėtis taikant dujų chromatografiją su liepsnos jonizacijos detektoriumi, o SKE–CO₂ optimaliomis sąlygomis gautam ekstraktui papildomai nustatytas peroksidų skaičius jodometriniu metodu. Bandinių kietosios frakcijos liekanoms nustatytos antioksidacinės savybės taikant QUENCHER procedūrą šiais metodais: *Folin-Ciocalteu's*, ABTS^{•+} ir ORAC.

Visi eksperimentiniai matavimai atlikti bent po du kartus, o prie rezultatų pateikiamas šių matavimų vidurkis kartu su standartiniu nuokrypiu (\pm SN). Tyrimų duomenys apdoroti naudojant duomenų analizės paketą *MS Excel*, reikšmingi skirtumai tarp vidurkių įvertinti statistine programa *Statgraphics*. O optimizavimo eksperimentai apdoroti statistine programa *Stat-Ease Design Expert 7.0*.



* – atliktas bioaktyviųjų junginių identifikavimas

6 pav. Eksperimentinio darbo schema

2.2.3.1 Soksleto ekstrakcija

Soksleto ekstrakcija vykdyta remiantis standartine AOAC metodika [55] naudojant automatinę Soksleto ekstraktorių (Behr Labor-Technik, Diuseldorfas, Vokietija). 20 g susmulkintų 0,2 mm bruknių uogų išspaudų susukama į filtrinį popierių ir perišami siūlu. Prieš ekstrakciją paruošti paketėliai yra pasveriami analitinėmis svarstyklėmis. Ekstrakcijai atliekama naudojant tirpiklį heksaną. Ekstrakcija vykdoma 6 val, palaikant 68–72 °C temperatūrą. Po ekstrakcijos gautas ekstraktas garinamas rotaciniu garintuvu „Biuchi V–850 Rotavapor R–210“ (Flavilas, Šveicarija) ir prapučiamas azoto dujomis, kad kuo labiau būtų pašalintas heksano likutis. Gautas ekstraktas sveriamas ($\pm 0,001$ g tikslumu) analitinėmis svarstyklėmis ir apskaičiuojama išeiga g/100 g. Ekstraktas saugomas rudo stiklo buteliukuose šaldiklyje iki kitų tyrimų. Po ekstrakcijos likusi liekana džiovinama 24 val 40 °C temperatūroje iki pastovios masės. Gauta sausa liekana saugoma sandariuose maišeliuose, tamsioje bei sausoje vietoje.

2.2.3.2 Superkazinės ekstrakcija CO₂ ir jos planavimas

SKE–CO₂ optimizavimo procesas buvo pasirinktas siekiant išgauti didžiausią lipofiliškos frakcijos kiekį. Optimizavimas vykdytas taikant centrišką kompozicinį planą (CKP) kartu su atsako paviršiaus metodu (APM), naudojant statistinę programą Design Expert 7.0 („Stat–Ease Inc“, Mineapolis, MN, JAV). Buvo optimizuoti trys svarbiausi nepriklausomi kintamieji (**7 lentelė**): ekstrakcijos slėgis (x_1), dinaminės ekstrakcijos trukmė (x_2) ir temperatūra (x_3), kurie užkoduoti trimis lygiais (–1, 0, +1). Slėgio intervalas keistas nuo 25 MPa iki 55 MPa, temperatūros nuo 50 iki 80 °C, o laiko – nuo 60 min iki 180 min. Iš viso atlikta 20 eksperimentų (8 eksperimentiniai bandymai, 6 žvaigždiniuose taškuose ir 6 plano centre) skirtingomis sąlygomis su dviem pakartojimais.

Pagal gautus ekstrakcijų rezultatus sudarytas matematinis modelis, įvertintas jo adekvatumas bei nustatyti optimalūs proceso parametrai ir jų sąveikos reikšmė tiriamajam atsakui. Tyrimų duomenys išanalizuoti dispersinės ir koreliacinės–regresinės analizės metodais.

7 lentelė. Patikrinti faktoriai ir lygiai projektuojant SKE–CO₂ eksperimentą

Simboliai	Nepriklausomi kintamieji	Užkoduoti lygiai		
		–1	0	+1
x_1	P (MPa)	25	40	55
x_2	t (min)	60	120	180
x_3	C (°C)	50	65	80

Modelio adekvatumas nustatytas įvertinant koeficientų reikšmingumą, regresijos koeficientą (R^2) ir Fišerio vertę (F), adekvatumo preciziškumą 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 kiti dviejų kintamųjų lygiai eksperimento svyravimo metu keičiami. Ekstrakcijos išeiga (Y , g/100 g SM) apskaičiuojama pagal pilną antro laipsnio statistinį modelį, kuris užrašytas 5 formulėje:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j>1}^3 b_{ij} x_i x_j \quad (5)$$

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, $i \neq j$.

Ekstrakcija ir jos optimizavimas atliktas remiantis Kraujalio ir Venskutonio metodika [56], naudojant „Helix“ ekstrakcijos sistemą (Applied Separation, Alentaunas, PA, JAV) su 99,9 % grynumo CO₂ dujomis. 20 g sumaltų 0,2 mm bruknių išspaudų sudedama į 50 ml ekstrakcijos celę (14 mm vidinio skersmens ir 320 mm ilgio), kurios abu galai užkemšami absorbuojančia vata. Ekstrakcija vykdoma palaikant 2 l/min (įprastomis sąlygomis: P_{CO₂}=100 kPa, T_{CO₂}=20 °C, ρ_{CO₂}=0,0018 g/ml) CO₂ srautą, kuris reguliuojamas rankiniu būdu. Ekstrakcijai reikalingas slėgis bei temperatūra yra nustatomi automatinio būdu, o laikas kontroliuojamas rankiniu būdu. Statinė ekstrakcija vykdoma 10 min, o jai pasibaigus atliekama dinaminė. Taip pat nustatytos optimalios sąlygos (52,7 MPa, 79 °C, 111 min) buvo pakartotos naudojant pusiau pramoninį ekstrakcijos įrenginį su didesne ekstrakcijos cele (10 l) bei didesniu tiriamosios medžiagos kiekiu (1284,95 g). Statinė ekstrakcija didesniu ekstraktoriumi prailginta iki 30 min, siekiant gauti kuo efektyvesnį procesą. Ekstrakcijos metu išsiskirtas ekstraktas surenkamas į iš anksto pasvertus stiklo buteliukus. Po ekstrakcijos buteliukas su gautu ekstraktu paliekamas kambario temperatūroje, kad nugaruotų ekstrakte likęs CO₂. Buteliukas yra sveriamas (±0,001 g tikslumu) ir apskaičiuojama išeiga g/100 g SM. Gautas lipofiliškas ekstraktas saugomas rudo stiklo buteliukuose ir užšaldomas iki sekančių tyrimų. Likusi kieta liekana po ekstrakcijos saugoma sandariuose maišeliuose, tamsioje sausoje vietoje.

2.2.3.3 Maceravimas panaudojant mechaninį purtymą

50 g susmulkintų 0,2 mm bruknių uogų išspaudų po SKE–CO₂ pasveriami į kūginę kolbą ir užpilama 300 ml etanolio ir vandens mišinio (70:30 t/t). Ekstrahuojamos medžiagos ir tirpiklio santykis 1:6. Ekstrakcija vykdoma naudojant purtyklę „BioSan PSU-20“ (Latvija) 6 valandas. Tada, gautas ekstrakcijos mišinys filtruojamas per popierinį filtrą. Po filtracijos likusi liekana dar kartą 6 valandas ekstrahuojama etanolio ir vandens mišiniu, medžiagos ir mišinio santykis 1:3. Toliau, vėl vykdoma analogiška mišinio filtracija. Gautas ekstraktas, pirmiausia, nugarinamas rotaciniu garintuvu „Biuchi V–850 Rotavapor R–210“ (Flavilas, Šveicarija), o vėliau

liofilizuojamas „Maxi Dry Lyo“ (Danija) liofilizatoriumi siekiant pašalinti ekstrakte likusį vandenį. Galiausiai, ekstraktas sveriamas ($\pm 0,001$ g tikslumu) analitinėmis svarstyklėmis ir apskaičiuojama išeiga g/100 g. Ekstraktas saugomas rudo stiklo buteliukuose šaldiklyje iki kitų tyrimų. Po ekstrakcijos likusi liekana džiovinama 40 °C iki pastovios masės. Gauta sausa liekana saugoma sandariuose maišeliuose, tamsioje bei sausoje vietoje iki kitų tyrimų.

2.2.3.4 Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais ir jos planavimas

Po SKE-CO₂ likusi bruknių išspaudų liekana toliau ekstrahuojama taikant pagreitinotą ekstrakcijos tirpikliais (PET) metodą. Ekstrakcija atlikta su pagreitinotą ekstrakcijos tirpikliais sistema „Dionex ASE 350“ (Dionex Corporation, Saniveilis, JAV) remiantis Kryževičiūtės ir kt. (2016) bei Povilaičio ir kt. (2017) straipsniais [57, 58]. 3 g susmulkintų bruknių išspaudų buvo patalpintos į nerūdijančio plieno celę (10 ml), kurios galuose įdėta 1 g diatominės žemės. Paruošta celė užfiksuojama celiuliozės filtrais ir nerūdijančio plieno fritais, tokiu būdu siekiant išvengti kietųjų dalelių patekimo į surinkimo indą. Celės pašildymo laikas (5 min), praplovimo tūris (100 %) ir prapūtimas azotu (120 s) visų ekstrakcijų metu buvo vienodas.

Pirmiausia, vykdytas ekstrakcijos etanolio optimizavimas. Kadangi, vykdant šią ekstrakciją slėgis išlieka pastovus 10,3 MPa, todėl svarbiausi parametrai atliekant šią ekstrakciją yra ekstrakcijos trukmė ir temperatūra (**8 lentelė**). Šie du parametrai optimizuoti taikant CKP ir APM. Temperatūros intervalas keistas nuo 50 iki 90 °C, o laiko – nuo 15 min iki 45 min. Iš viso atlikta 13 eksperimentų. Visos PET ekstrakcijos vykdytos trimis ciklais (t.y. tris kartus buvo tiekiamas šviežias tirpiklis). Gauti rezultatai įvertinti analogiškai kaip aprašyta 2.2.3.2 skyrelyje.

Toliau, po ekstrakcijos etanolio optimaliomis sąlygomis likusi liekana ekstrahuota subkritiniu vandeniu (130 °C, 3 ciklai × 10 min). Organiniai tirpikliai buvo pašalinti rotaciniu garintuvu „Biuchi V–850 Rotavapor R–210“ (Flavilas, Šveicarija), o vandeniniai ekstraktai išdžiovinami liofilizatoriumi „Maxi Dry Lyo“ (Danija). Gauti ekstraktai laikomi šaldytuve (-18 °C) tamsiuose rudo stiklo buteliukuose.

8 lentelė. Patikrinti faktoriai ir lygiai suprojektuojant PET etanolio eksperimentą

Simboliai	Nepriklausomi kintamieji	Užkoduoti lygiai		
		-1	0	+1
x ₁	t (min)	15	30	45
x ₂	C (°C)	50	70	90

2.2.3.5 Fermentinė hidrolizė

Į kūginius užsukamus mėgintuvėlius pasveriami 5 g ($\pm 0,001$ g tikslumu) bruknių išspaudų, gautų po maceravimo ekstrakcijos purtyklėje su etanolio ir vandens mišiniu. Šios išspaudos užpilamos 50 ml vandeninio tirpalo (citratinis buferis pH 4,8) bei automatine pipete įpilama 197 µl

fermentinio preparato. Naudojamas komercinis fermentų mišinys *Viscozyme L* sudarytas iš skirtingų karbohidrazių: arabinazės, celiulazės, β -gliukanazės, hemiceliulazės ir ksilanazės. Fermento specifikacijoje pateikiamas aktyvumas ≥ 100 FBGU/g (betaglukanazės vienetai/g), laboratorinėmis sąlygomis nustatytas aktyvumas buvo 0,09 IU/ml. Fermentinė hidrolizė vykdyta 360 min pastoviai purtant ir palaikant 50 °C temperatūrą. Fermentinė hidrolizė inaktyvuojama bandinius laikant 10 min 100 °C temperatūros vandenyje, o po to atšaldant 10 min lediniame vandenyje. Lygiagrečiai yra padaromas kontrolinis mėginys nenaudojant fermentinio preparato.

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

2.2.4 Ekstraktų ir kietosios frakcijos antioksidacinių savybių įvertinimas

Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas įvertintas taikant tradicinę tyrimų procedūrą. Antioksidacinio aktyvumo matavimams buvo paruošti pradiniai koncentruoti ekstraktų tirpalai, kurie tirpinti vandenyje arba metanolyje, priklausomai nuo jų tirpumo. Vėliau šie koncentruoti tirpalai buvo skiedžiami įvairiais tirpalais priklausomai nuo tyrimams pasirinktos modelinės sistemos.

Tiriant kietosios frakcijos antioksidacinį aktyvumą taikyta QUENCHER procedūra. Kai bandiniai pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu kietoji frakcija yra maišoma su mikrokristaline celiulioze. Ši procedūra atliekama pagal modifikuotą Gokmeno ir kt. (2009) metodiką [59]. Kaip anksčiau apibūdino Kitrytė ir kt. (2015) [60] bandiniai buvo paruošti sumaišant 0,2 mm frakcijos bruknių išspaudas su mikrokristaline celiulioze, esant pradinei 500 μ g/mg koncentracijai. Galutiniams tyrimams atlikti buvo ruošiami skirtingų koncentracijų mišiniai priklausomai nuo tiramosios sistemos. Absorbcijos matuotos „Halo RB-10“ (Dynamica, Šveicarija) UV-VIS spektrofotometru. Antioksidacinio aktyvumo matavimai kartoti 4–6 kartus.

2.2.4.1 Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK)

Bendras fenolinių junginių kiekis yra nustatomas pagal modifikuotą Singletono, Orthoferio ir Lamueal-Raventos (1999) metodiką [61]. Šis metodas pagrįstas fenolinių junginių bei *Folin-Ciocalteu's* reagento spalvine reakcija ir susidariusios spalvos intensyvumo matavimu spektrofotometru nustatant bendrą fenolinių junginių kiekį, kuris išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentais (GRE, mg galo rūgšties/g bandinio).

Atliekant šią tradicinę tyrimų analizę 150 μ l paruošto bandinio arba distiliuoto H₂O (kontrolinis bandinys) sumaišoma su 750 μ l *Folin-Ciocalteu's* reagentu (2 M), prieš tai komercinis *Folin-Ciocalteu's* reagentas praskiedžiamas distiliuotu vandeniu santykiu 1:9. Toliau, po 3 min

reakcijos įpilama 600 µl Na₂CO₃ tirpalo (75 g/l). Paruošti bandiniai laikomi tamsoje 120 min. Absorbicija matuojama spektrofotometru esant 760 nm bangos ilgiui. Naudojant etaloninį galo rūgšties tirpalą sudaroma kalibracinė kreivė, kurios koncentracijų ribos: 0–80 µg/ml. Pagal gautus rezultatus buvo apskaičiuota kalibracinė tiesinės priklausomybės lygtis. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=0,0104x + 0,0185$; $R^2=0,9987$. Bendras fenolinių junginių kiekis išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentais (mg galo rūgšties/g bandinio).

Atliekant QUENCHER procedūrą į mėgintuvėlius sveriam 10 mg pradinio mišinio skiedinio arba 10 mg mikrokristalinės celiuliozės (kontrolinis bandinys), įpilama 150 µl dist. H₂O ir 750 µl *Folin-Ciocalteu's* tirpalo (2 M), ir po 3 min reakcijos įpilama 600 µl Na₂CO₃ (75 g/l). Galo rūgšties kalibracinei kreivei sudaryti, pasveriam 10 mg mikrokristalinės celiuliozės, kuri sumaišoma su 150 µl galo rūgšties tirpalo (0–80 µg/ml) arba dist. H₂O (kontroliniam bandiniui), 750 µl *Folin-Ciocalteu's* tirpalo ir 600 µl Na₂CO₃ (75 g/l). Bandiniai purtomi 2 valandas, centrifuguojami (14000 aps/min, 5 min). Absorbicija matuojama esant 760 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=0,012x + 0,0329$; $R^2=0,9958$. Rezultatai apskaičiuojami ir išreiškiami analogiškai, kaip ir ekstraktams (mg galo rūgšties/g bandinio).

2.2.4.2 ABTS^{•+} laisvųjų radikalų sujungimo metodas

ABTS^{•+} laisvųjų radikalų sujungimo geba išmatuojama spektrofotometriškai, tyrimas atliktas pagal Re ir kt. (1999) metodiką su nedideliais pakeitimais [62].

Pradžioje paruošiamas fosfatinis buferinis tirpalas PBS, kurį ruošiant 1 l matavimo kolboje ištirpinama 8,18 g NaCl, 0,27 g KH₂PO₄, 1,42 g Na₂HPO₄ ir 0,15 g KCl distiliuotame vandenyje. Gautu tirpalo pH reikšmė 7,4. Toliau, pasveriam 0,0549 g ABTS^{•+} radikalo, kuris ištirpinamas 50 ml PBS tirpale bei pasveriam 0,0038 g K₂S₂O₈ druskos, kuri ištirpinama 200 µl distiliuoto H₂O. Šie du tirpalai sumaišomi ir laikomi kambario temperatūroje tamsoje 15–16 val, gaunamas pradinis ABTS^{•+} tirpalas. Darbinis ABTS^{•+} tirpalas ruošiamas praskiedžiant pradinį koncentruotą ABTS^{•+} tirpalą PBS tirpalu iki 0,700±0,005 absorbcijos vertės 734 nm bangos ilgyje.

Taikant tradicinę tyrimų analizę 25 µl bandinio arba metanolio (kontrolinis bandinys) sumaišoma su 1500 µl darbinio ABTS^{•+} tirpalo. Taip paruošti bandiniai laikomi tamsoje 120 min. Absorbicija matuojama spektrofotometru esant 734 nm bangos ilgiui. Naudojant etaloninį Trolokso (C₁₄H₁₈O₄ M_r=250,29 g/mol) tirpalą sudaroma kalibracinė kreivė, kurios koncentracijų ribos: 0–1500 µM. Pagal gautus rezultatus apskaičiuojama kalibracinė tiesinės priklausomybės lygtis. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=0,0638x - 1,3042$; $R^2=0,9977$. Rezultatai išreiškiami Trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu (mg Trolokso/g bandinio).

Atliekant QUENCHER procedūrą į mėgintuvėlius pasveriam 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 (koncentracijų ribos: 0–1500 µM) arba metanolio (kontroliniam bandiniui) ir įpilama 1500 µl darbinio ABTS^{•+} tirpalo. Bandiniai purtomi tamsoje 2 valandas, centrifuguojami (14000 aps/min, 5 min). Absorbicija matuojama esant 734 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=0,0507x - 0,3271$; $R^2=0,997$. Rezultatai apskaičiuojami ir išreiškiami analogiškai, kaip ir ekstraktams.

2.2.4.3 Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas (ORAC)

ORAC tyrimas atliktas pagal Prioro ir kt. (2003) pasiūlytą metodiką su nežymiais pakeitimais [63]. Eksperimentas pagrįstas peroksido radikalų surišimu, kurį generuoja azobis (AAPH). Taip užkertamas kelias fluoresceino skilimui. Pirmiausiai yra ruošiami fluoresceino tirpalai:

1. Ruošiamas S₁ tirpalas, į 100 ml matavimo kolbą pasveriami 0,045 g fluoresceino miltelių ir užpilama dalimi PBS tirpalo. Tirpinama ultragarso vonelėje „Sonorex“ (Bandelin, Vokietija), kol fluoresceino milteliai ištirpsta ir tada tirpalas praskiedžiamas PBS tirpalu iki žymės.

2. Tirpalo S₂ paruošimui, paimama 0,25 ml S₁ ir 50 ml matavimo kolboje praskiedžiama PBS tirpalu iki žymės.

3. S₃ ruošiamas paimant 0,8 ml S₂ tirpalo ir 50 ml matavimo kolboje praskiedžiant iki PBS tirpalu iki žymės.

Taikant tradicinę tyrimų analizę juodą nepermatomą 96 šulinėlių lėkštelę supilama 25 µl tiriamo bandinio arba metanolio (tuščiam bandiniui) ir 150 µl S₃ fluoresceino tirpalo. Tada lėkštelė įdedama į spektrofotometrą (FLUOstar Omega reader BMG Labtech, Ofenburgas, Vokietija) inkubuojama 15 min 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos su daugiakanale pipete įpilama 25 µl AAPH. Lėkštelė vėl gražinama į spektrofotometrą, kuri automatiškai supurtoma prieš nuskaitymą ir fluorescencija išmatuojama kas 1,1 min. Iš viso matuojama 120 ciklų 37 °C temperatūroje, o matavimai atlikti esant sužadimui 485 nm ir emisijai 510 nm. Kalibracinei kreivei imamos nuo 0 iki 500 µM Trolokso koncentracijos. Po kalibracine kreive esantis plotas (AUC) kiekvienam bandiniui apskaičiuojamas integruojant santykinę fluoresceino kreivę. AUC apskaičiuojamas pagal 6 formulę. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=0,1394x - 0,7395$; $R^2=0,9926$. Rezultatai išreiškiami Trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu (mg Trolokso/g bandinio).

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=120} \frac{f_i}{f_0} \quad (6)$$

čia: f₀ – pradinė fluoresceino vertė 0 min; f_i – fluoresceino vertė tam tikrą laiką (i–tąją min).

Atliekant QUENCHER procedūrą į mėgintuvėlius pasveriami 10 mg pradinio mišinio skiedinio arba 10 mg mikrokristalinės celiuliozės (kontroliniam bandiniui) sumaišoma su 150 µl

PBS tirpalu ir 900 µl fluoresceinu S₃ tirpalu. Maišoma 15 s, purtoma 250 aps/min 60 min tamsoje ir centrifuguojama 4500 aps/min 5 min. Optiškai skaidrus skystis (175 µl) pipete supilamas į juodą nepermatomą 96 šulinėlių lėkštelę. Matavimai atliekami analogiškai kaip ir ekstraktams, tik fluorescencija matuojama 150 ciklų (ciklo trukmė 1,1 min). Kalibracinei kreivei imamos nuo 0 iki 500 µM Trolokso koncentracijos. Kalibracinės kreivės lygtis: $y=0,1302x + 2,7856$; $R^2=0,987$. Rezultatai apskaičiuojami ir išreiškiami analogiškai, kaip ir ekstraktams.

2.2.5 Peroksidų skaičiaus nustatymas jodometriniu metodu

Peroksidų skaičius (PS) parodo, kiek tiriamuose riebaluose yra junginių (peroksidų ar į juos panašių riebalų oksidacijos produktų), kuriuos atliekant analizę oksiduoja jodidas. Tai svarbus riebalų kokybės rodiklis, iš jo sprendžiama apie riebalų sugedimo laipsnį. Matavimo vienetas – mekv/1000 g. Metodo esmė: bandinys, veikiamas rūgščioje aplinkoje KJ, iš kurio išsiskiria laisvas jodas ir yra nutitruojamas Na₂S₂O₃. Titravimo metu sunaudoto Na₂S₂O₃ kiekio pagalba paskaičiuojamas aliejaus PS. Peroksidų kiekis bruknių išspaudų lipofiliniuose ekstraktuose nustatytas remiantis LST EN ISO 3960:2017 [64].

Tyrimo eiga: analitinėmis svarstyklėmis pasveriami 5±0,05 g riebalų bandinio, kuris ištirpinamas chloroformo ir ledinės acto rūgšties (2:3) tirpale ir įpilama 0,5 ml šviežiai paruošto sotaus KJ. Gautas tirpalas plakamas 1 min, praskiedžiamas 30 ml distiliuotu vandeniu ir titruojamas 0,01 N natrio tiosulfato tirpalu. Kaip indikatorius naudojamas 1 % krakmolo kleisteris, kurio į titruojamą mišinį įlašinami keli lašai, titruojama, kol pranyksta mėlyna spalva. Lygiagrečiai atliekamas kontrolinis bandinys, tik be riebalų. Peroksidų kiekis išreiškiamas mekv aktyvaus deguonies/1000 g aliejaus ir apskaičiuojamas pagal 7 formulę:

$$PS = \frac{(V - V_1) \cdot N \cdot 1000}{m} \quad (7)$$

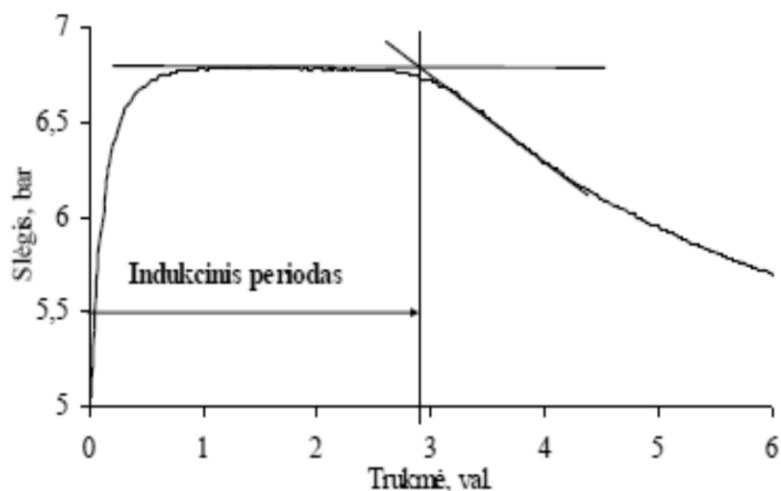
čia: V, V₁ – natrio tiosulfato tirpalo kiekiai sunaudoti nutitruoti tiriamajam ir kontroliniam bandiniams, ml; N – natrio tiosulfato tirpalo koncentracija; m – bandinio masė, g.

2.2.6 Ekstraktų oksidacinio stabilumo nustatymas Oksipreso metodu

Instrumentiniu Oksipreso metodu nustatant aliejingų produktų indukcinį periodą valandomis (toliau IP, val), tiriamas aliejaus stabilumas oksidacijai aukštoje temperatūroje (100–150 °C), esant deguonies slėgiui [65].

Analitinėmis svarstyklėmis pasveriami 5±0,001 g SKE–CO₂ ekstrakto, o majoneziniai bandiniai sveriami po 6 g. Bandinys patalpinamas į reakcijos celę. Prieš tai paruošiami majoneziniai bandiniai: į majonežą („Be konservantų“, Kėdainių konservų fabrikas, Lietuva) įmaišoma 0,5 %, 1 %, 2 % ekstrakto (heksaninis, etanoliniai ir vandeninis). Oksidacinis stabilumas tiriamas esant 5 bar deguonies slėgiui 110 °C temperatūroje SKE–CO₂ bandinių, o majoneziniai

bandiniai tiriama 120 °C temperatūroje. Prietaisas automatiškai brėžia deguonies slėgio kitimo kreivę ir apskaičiuoja IP (**7 pav.**). Oksipreso bandymas atliktas naudojant „ML Oxipres“ (Mikrolab Aarhus A/S, Danija) prietaisą.

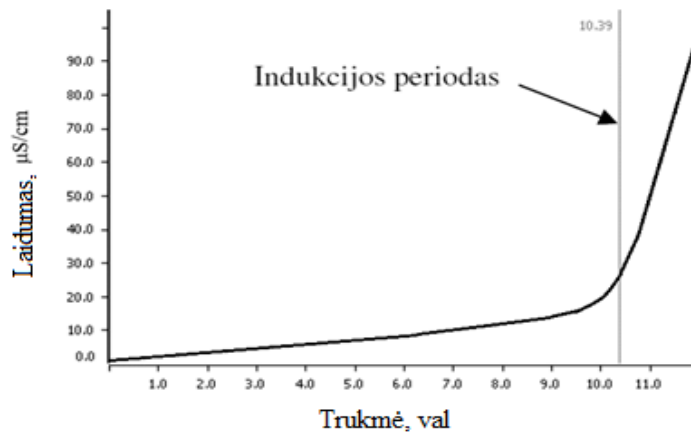


7 pav. Oksipresu užrašyta oksidacijos kinetinė kreivė [65]

2.2.7 Ekstraktų oksidacinio stabilumo nustatymas Rancimato metodu

Rancimato metodas taip pat skirtas nustatyti aliejingų produktų oksidacinį stabilumą, pagreitinant jo oksidacijos procesą. Tyrimams buvo naudojami analogiški bandiniai kaip ir Oksipreso metode. Rancimato bandymas atliktas naudojant „Rancimat 679“ (Metrohm AG, Šveicarija) prietaisą, remiantis Laublio, Brutelo (1986) ir Mendezo ir kt. (1997) metodais [66, 67]. Šis tyrimas parodo peroksidacijos proceso pabaigą. Oras leidžiamas per mėginį kylant temperatūrai (110–120 °C), o tuo metu bandinyje esančios RR oksiduojasi. Procesui pasibaigus susiformuoja antriniai reakcijos produktai, kurie oro srautu nešami į matavimo indą ir absorbuojami dejonizuotame vandenyje. Tyrimo metu nuolat fiksuojamas tiriamo mėginio elektrinis laidumas, kuris didėja dėl reakcijos produktų absorbcijos. Laikas, per kurį aptinkami reakcijos antriniai produktai, vadinamas indukcijos periodu (IP, val). Prietaiso automatiškai brėžiama kitimo kreivė ir IP pavaizduoti **8 pav.**

Analitinėmis svarstyklėmis tiesiai į reakcijos mėgintuvėlį pasveriami $5 \pm 0,001$ g SKE–CO₂ bruknių ekstrakto, o majonezinių bandinių 6 g. Mėgintuvėliai su bandiniu uždaromi dangteliais, kurie sujungti su oro padavimo žarnelėmis ir įstatomi į Rancimato įrangą. Naudoti reakcijos parametrai buvo tokie: temperatūra – 110 °C (120 °C majoneziniams bandiniams), dujų srautas – 20 l/h, slėgis – 0,5 MPa. Prietaisas automatiškai nubrėžia deguonies slėgio kitimo kreivę ir apskaičiuoja indukcinį laiką.



8 pav. Rancimato nubrėžta oksidacijos kinetikos kreivė

2.2.8 Riebalų rūgščių kompozicijos nustatymas dujų chromatografijos metodu

Riebalų rūgščių kompozicijos tyrimas atliktas remiantis W. Moreda ir kt. (2001) metodika su nežymiais pakeitimais bei LST EN ISO 12966-1:2015 standartu [13, 68]. Šiuo metodu nustatomi riebalų rūgščių metilo esteriai, turintys nuo 8 iki 24 anglies atomų grandinę.

Trigliceridų esterinimui ir laisvų rūgščių apmuilinimui 0,5 g aliejaus ir 4 ml metanolinio NaOH (0,5 N) supilama į 50 ml apvaliadugnę kolbą ir kaitinama su grįžtamuju šaldytuvu, kol išnyksta riebalų fazė (apie 5–10 min). 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 (sočiu), gerai suplakama. Paliekama, kol nusistovi sluoksniai. Viršutinė heksano fazė atskiriama pastero pipete ir laikoma 4 °C temperatūroje iki analizės. Analizei imama 100 μl heksano fazės ir praskiedžiama 900 μl heksano.

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 užprogramuota nuo 80 °C ir didėja iki 240 °C kas 4 °C/min. Inžektoriaus (bandinio įleidimo kameros) temperatūra 220 °C, o detektoriaus – 240 °C. Įleisto bandinio kiekis – 1 μl. Junginiams identifikuoti naudotas etaloninis 37 riebalų rūgščių mišinys (Supelco™). Rūgščių metilo esteriai identifikuojami pagal išlaikymo laikus, o procentinė riebalų rūgščių sudėtis apskaičiuojama smailių plotus lyginant su etaloniniais smailių plotais.

2.2.9 Bendro antocianinų kiekio nustatymas

Bendras antocianinų kiekis (AC) nustatytas remiantis standartine AOAC metodika [69]. Bendras antocianinų kiekis buvo nustatinėjamas bruknių sultims ir bruknių išspaudų poliniams ekstraktams. Antocianinų kiekis tirtuose bandiniuose nustatytas pH diferenciniu metodu. Metodo esmė: antocianinų pigmentų struktūra grįžtamai transformuojama, pakitus aplinkos pH vertei, o

šie struktūros pakitimai lemia skirtingus absorbcijos spektro maksimumus. Absorbcija matuota „Halo RB-10“ (Dynamica, Šveicarija) UV-VIS spektrofotometru.

Pasidaromi, palyginamieji tirpalai pagal AOAC metodiką, kurie yra atitinkamai pH 1,0 (0,025 M kalio chlorido) ir pH 4,5 (0,4 M natrio acetato) buferiniai tirpalai. Tada tiriami bandiniai buvo skiedžiami pH 1,0 buferiniu tirpalu iki absorbcija bus intervale 0,2–1,0 esant 520 nm bangos ilgiui. Paruoštų bandinių absorbcija išmatuojama po 20–50 min, 520 nm ir 700 nm bangos ilgiuose. Tokie patys veiksmi kartojami ir matavimai atliekami bandinius praskiedus pH 4,5 buferiniu tirpalu. Sulčių galutiniai rezultatai išreiškiami kaip cianidin-3-gliukozido ekvivalentai mg/l, o ekstraktai perskaičiuojami į mg/1 g ekstrakto bei mg/100 g SM. Antocianinų koncentracija apskaičiuota įvertinus praskiedimo koeficientą pagal 8 formulę:

$$AC = \frac{A \cdot MW \cdot DF \cdot 10^3}{\varepsilon \cdot L} \quad (8)$$

čia: A – diferencinė absorbcija, $A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1,0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4,5}$; MW – molekulinė masė cianidin-3-gliukozido MW=449,2 g/mol; DF – praskiedimo koeficientas; $\varepsilon = 26900$ moliarinė absorbcija (moliarinis ekstinkcijos koeficientas) cianidin-3-gliukozido, $L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$; L=1, matuojamo tirpalo sluoksnio storis (cm); $10^3 =$ koeficientas g perskaičiavimui į mg.

2.2.10 Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė

Pirmiausia, vykdyta antocianų ekstrakcija: 2±0,001 g susmulkintų 0,2 mm bruknių išspaudų sudedami į kūginę kolbą, įpilama 20 ml CH₃OH/H₂O (50:50 t/t) ir parūgštinama 0,1 M HCl (norint stabilizuoti antocianinus, paprastai įpilama nedidelis kiekis rūgšties). Gauta mišinio ekstrakcija vykdoma 5 min ultragarsinėje vonelėje „Sonorex“ (Bandelin, Vokietija) ir 30 min intensyviai purtant purtyklėje „BioSan PSU-20“ (Latvija). Gauta ištrauka filtruojama per popierinį filtrą ir centrifuguota esant 4 °C temperatūrai, 2200 aps/min. greičiu, 5 min. Liekana analogiškai tuo pačiu būdu buvo ekstrahuojama 2 kartus. Filtratas surenkamas ir garinamas rotaciniame garintuve palaikant 25 °C temperatūrą, vėliau praskiedžiamas 25 ml matavimo kolbutėje iki žymės 0,1 M metanoliu parūgštintu HCl. Iki kitų tyrimų kolbutės laikomos tamsioje, šaltoje vietoje. Prieš chromatografinę analizę 1 ml gauto koncentrato išgarinamas iki sausumo azoto dujomis. Gautas turinys praskiedžiamas ESCh grynumo metanoliu ir filtruojamas per 15 mm šviršksto filtrą.

Kokybinė ir kiekybinė analizė buvo atlikta Waters Acquity sistema (Waters, Milfordas, JAV). Analčių skirstymas atliktas atvirkščią fazių analitine kolonėle Acquity BEH C18, Amide 2,1×100 mm, sorbento dalelių dydis - 1,7 μm (Waters, Milford, JAV), kuria buvo palaikoma 40 °C temperatūra. Eliuentų sistema: A – 1 % skruzdžių rūgštis (t/t), B – 100 % acetonitrilas. Eliucijos trukmė – 17 min. Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min., įleidžiamas tūris – 2 μl. Detekcija

buvo atlikta esant 220–550 nm bangos ilgiui. Taikytas šis gradiento kitimas: 0 min – 1 % B; 7 min 15 % B; 8 min – 100 % B; 10 min – 50 % B; 12 min – 1 % B. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas teigiamos elektrinės jonizacijos režimu. Masių spektrai užrašyti pilno skenavimo režime, intervale m/z 100–800. Chromatografinių smailių identifikavimas buvo atliktas remiantis literatūros duomenimis bei MS/MS režimu gautų junginių fragmentais.

Kiekybinė analizė atlikta naudojant išorinius standartus. Kalibracinė kreivė sudaryta pagal cianidin-3-gliukozidą ($y=0,0069x + 518,6045$; $R^2=0,9957$) skirtingų koncentracijų (5–200 $\mu\text{g/ml}$) tirpalus. Junginių koncentracijos paskaičiuotos pagal tiesinę plotų regresiją (koreliaciją) sudarytą QuantAnalysis kompiuterine programa ir išreikštos $\text{mg}/100 \text{ g SM}$.

2.2.11 Ekstraktų analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

Preliminari ekstraktų analizė naudojant ultra efektyviają skysčių chromatografiją atlikta su nežymiais pakeitimais pagal V. Kraujalytės (2013) pasiūlytą metodiką [70]. Ekstraktų chromatografinė analizė buvo atlikta Waters Acquity sistema (Waters, Milfordas, JAV), kuri buvo sujungta su hibridiniu kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru (angl. Q-TOF) (Bruker Daltonic, Brėmenas, Vokietija). Analičių skirstymas atliktas atvirkščių fazių analitine kolonėle Acquity BEH C18, Amide $2,1 \times 100 \text{ mm}$, sorbento dalelių dydis – $1,7 \mu\text{m}$ (Waters, Milfordas, JAV), kuria buvo palaikoma $40 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūra. Eliuentų sistema: A – 0,4 % skruzdžių rūgštis (t/t), B – 100 % acetonitrilas. Judrios fazės tėkmės greitis – $0,4 \text{ ml/min.}$, įleidžiamas tūris – $1 \mu\text{l}$. 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. Chromatografinių smailių preliminarus identifikavimas atliktas pagal gautas tikslias junginių mases, kurios lygintos su literatūros duomenimis ir duomenų bazėse esančia informacija (Metlin, Chempider).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Sulčių iš bruknių uogų išskyrimas, išspaudų išeiga ir jų cheminė sudėtis

Broknių išspaudos iki šiol vis dar nėra nuodugnai ištyrinėtos. Paprastai, tyrimams naudojamos pačios bruknių uogos, kurios nėra labai plačiai paplitusios, todėl šios žaliavos tyrimų atlikta nedaug. Kita vertus, bruknių uogų išspaudoms pritaikę modernius biorafinavimo procesus galime gauti įvairių specifinės sudėties produktų ar ingredientų, kurie gali padidinti šių šalutinių žaliavų perdirbimo efektyvumą ir naudą.

Mechaniniu būdu spaudžiant prinokusias bruknių uogas gauta sulčių išeiga buvo apie 83,27 %, o išspaudos sudarė ~15,33 %. Toliau, po sulčių spaudimo gautos išspaudos džiovintos vaisių–uogų džiovyklėje 35–40 °C temperatūroje iki sausumo (36–48 val). Šiose išspaudose drėgmė sudarė 67,75 %, o galutinis išdžiovintų išspaudų kiekis – 4,94 % uogų masės. Mokslinėse publikacijose pateikiama, kad drėgmė bruknių uogose sudaro apie 84 %, o po sulčių išskyrimo uogų išspaudose drėgmės yra apie 73–81 % priklausomai nuo uogų rūšies [5, 71]. Taigi, vertės gautos eksperimento metu yra panašios į pateiktus teorinius rezultatus.

Toliau, tyrimo metu buvo nustatyta pagrindinė išdžiovintų bruknių išspaudų cheminė sudėtis: drėgmės, riebalų, baltymų ir mineralinių medžiagų kiekiai, kurie pateikiami **9 lentelėje**. Literatūroje nepavyko rasti bruknių išspaudų cheminės sudėties, todėl gautų rezultatų palyginimui pasirinktos bruknių uogos bei spanguolių išspaudos, kurios priklauso tai pačiai *Ericaceae* šeimai kaip ir bruknės.

9 lentelė. Bruknių išspaudų cheminė sudėtis[7, 12, 72]

Cheminė sudėtis	Nustatyta, %	Literatūroje nurodyti kiekiai	
		Broknių uogų, %	Spanguolių išspaudų, %
Drėgmės kiekis	3,96 ± 0,24	82–89	4,5
Baltymai	9,47 ± 0,02	0,5–0,9	2,2
Riebalai	11,09 ± 0,38	0,5–0,8	12
Pelenai	1,29 ± 0,07	0,26–0,3	1,1

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN.

Iš gautų rezultatų matoma, kad tyrimuose naudojamų bruknių išspaudų drėgmės (3,96 %), riebalų (11,09 %) ir pelenų kiekiai (1,29 %) yra labai panašūs į spanguolių išspaudose nustatytas vertes, tačiau baltymų kiekis (9,47 %) daugiau nei keturiais kartais didesnis negu spanguolių išspaudose. Be to, Bandzaitienė ir kt. (2007) knygoje pateikiamas absoliučiai sausų bruknių uogų pelenų kiekis yra 1,58 %, kuris yra labai panašus į eksperimento metu nustatytą vertę [7]. Teorinė bruknių uogų cheminė sudėtis yra pateikiama ribų intervale, nes jų kiekiai priklauso nuo daugybės

faktorių, tokių kaip bruknių augimo ir klimato sąlygos, dirvožemio sudėtis, uogų sunokimo laipsnis. Taigi, šie faktoriai taip pat gali lemti skirtingą bruknių išspaudų cheminę sudėtį.

3.2 Superkrizinė ekstrakcija anglies dioksidu ir jos optimizavimas

Funkcionalijų ingredientų išgavimui buvo atlikta padidinto slėgio sąlygomis vykstanti ekstrakcija, kuri vadinama superkrizine ekstrakcija anglies dioksidu (SKE–CO₂). Šiuo, aplinkai saugiu, metodu iš bruknių išspaudų išskiriami lipofiliniai junginiai. SKE–CO₂ vykdyta su <0,2 mm išspaudų frakcija. Pirmiausia, bruknių išspaudų ekstrakcijai nuspręsta pasirinkti Kryževičiūtės ir kt. (2015) nustatytas SKE–CO₂ optimalias sąlygas pritaikytas aviečių išspaudoms (temperatūra – 60 °C, slėgis – 45 MPa, laikas – 120 min) [57]. Šiomis sąlygomis atlikus SKE–CO₂ ekstrakciją gauta išeiga 11,54±0,24 g/100 g SM. Tačiau, atlikus literatūros apžvalgą ir įvertinus tai, kad naudojant SKE sistemą iki šiol niekada nebuvo atlikti optimizavimo eksperimentai, kurie būtų taikyti bruknių išspaudų ekstrakcijai ir analizei, nuspręsta atlikti šių išspaudų SKE–CO₂ optimizavimą.

Ekstrakcijos parametrams optimizuoti buvo pritaikyti APM ir CKP, siekiant gauti maksimalią lipofiliškos frakcijos išeigą iš bruknių išspaudų, be to šių sistemų pritaikymas leidžia padidinti proceso efektyvumą. Matematinis eksperimentų planavimo paviršiaus atsako metodas buvo sumodeliuotas, naudojant statistinę programą Design–expert 7.0 (Stat–Ease Inc., Minneapolis, MN). Paviršiaus atsako metodas ir kontūrų plotas sukurtas naudojant kvadratinį daugianarį. Optimizuojant SKE–CO₂ metodą, buvo keičiami šie parametrai: slėgis, temperatūra ir dinaminės ekstrakcijos trukmė. Įvykdyta 20 SKE–CO₂ optimizavimo ekstrakcijų, kurių parametrai ir gauti rezultatai pateikiami **10 lentelėje**.

Taikant skirtingus nepriklausomų kintamųjų variantus gautos ekstrakcijų išeigos kito nuo 3,05 iki 13,10 g/100 g SM. Išeigų skirtumas pakankamai didelis, todėl tinkamas parametru parinkimas yra itin reikšmingas. Modelio adekvatumas nustatytas įvertinant koeficientų reikšmingumą, regresijos koeficientą (R) ir Fišerio kriterijų (F) gautą dispersinėje analizėje (ANOVA), kuri pateikiama **11 lentelėje**.

Atlikus bruknių išspaudų kvadratinio modelio regresinių lygčių analizę nustatyta, kad sudarytas matematinis modelis pagal ekstraktų išeigų kitimą atitinka eksperimentais nustatytus rezultatus: determinacijos koeficientas $R^2=0,96$. O tai patvirtina teorinį SKE–CO₂ išspaudų ekstrakcijų modelio adekvatumą gautiems eksperimentinio tyrimo rezultatams. Prognozuojamas (teorinis) determinacijos koeficientas $R^2=0,78$ ir eksperimentinis (gautas) determinacijos koeficientas $R^2=0,92$ taip pat parodo, kad vyrauja ryšys tarp kintamųjų parametru verčių ir išeigos kiekio. Apskaičiuota palyginamojo tikslumo (adekvatumo preciziškumo) santykinė reikšmė 17,67 (ši reikšmė turi būti > 4), kurioje prognozuojamų verčių diapazonas palyginamas su vidutine

prognozavimo paklaida eksperimentinio plano taškuose rodo, kad signalas yra tinkamas ir modelis gali būti naudojamas toliau modeliuojant plano erdvę.

10 lentelė. CKP parametrų vertės ir bruknių išspaudų SKE–CO₂ ekstrakcijų rezultatai: 1–8 eksperimentiniai bandymai, 9–14 bandymai žvaigždiniuose taškuose ir 14–20 bandymai plano centre

Eil. nr.	Ekstrakcijos slėgis, MPa	Dinaminės ekstrakcijos trukmė, min	Ekstrakcijos temperatūra, °C	Išeiga, g/100 g SM	
				Eksperimentinė	Prognozuojama
1.	25,00	60,00	50,00	6,57±0,04	6,15
2.	55,00	60,00	50,00	10,14±0,03	9,87
3.	25,00	180,00	50,00	10,87±0,04	10,56
4.	55,00	180,00	50,00	12,78±0,04	12,49
5.	25,00	60,00	80,00	3,05±0,06	3,27
6.	55,00	60,00	80,00	11,81±0,04	12,06
7.	25,00	180,00	80,00	6,04±0,03	6,26
8.	55,00	180,00	80,00	12,86±0,01	13,26
9.	25,00	120,00	65,00	7,44±0,04	7,66
10.	55,00	120,00	65,00	13,10±0,06	13,02
11.	40,00	60,00	65,00	9,87±0,08	10,08
12.	40,00	180,00	65,00	12,96±0,05	12,89
13.	40,00	120,00	50,00	10,90±0,04	12,20
14.	40,00	120,00	80,00	12,28±0,08	11,14
15.	40,00	120,00	65,00	12,81±0,05	12,13
16.	40,00	120,00	65,00	12,94±0,05	12,13
17.	40,00	120,00	65,00	11,10±0,06	12,13
18.	40,00	120,00	65,00	11,61±0,05	12,13
19.	40,00	120,00	65,00	12,36±0,06	12,13
20.	40,00	120,00	65,00	12,32±0,08	12,13

Nurodytos vidutinės dviejų pakartojimų vertės ±SN.

Be to, SKE–CO₂ kvadratinės regresijos modelio analizė (**11 lentelė**) parodė, kad modelis yra reikšmingas pagal Stjudento kriterijų ($p < 0,0001$), apskaičiuotą F vertę (24,7182), o trūkumai nėra reikšmingi ($p > 0,3274$) ir jis gali būti naudojamas viso modelio erdvėje. Gauti rezultatai taip pat parodė, kad yra 4 reikšmingi veiksniai SKE–CO₂ bruknių išspaudų išeigai: P, t, PT, P². Analizuoti nepriklausomieji kintamieji pagal jų įtaką bruknių išspaudų ekstrakto išeigai gali būti išdėstyti tokia tvarka: P ($p < 0,0001$) > t ($p = 0,0002$) > PT ($p = 0,0012$) > P² (0,0041). Toliau, pagal programos regresijos koeficientus sudaromas polinominis modelis, apibūdinantis santykį tarp priklausomų ir nepriklausomų kintamųjų (P, T, t), kuris užrašomas 9 lygtimi. Prognozuojamos

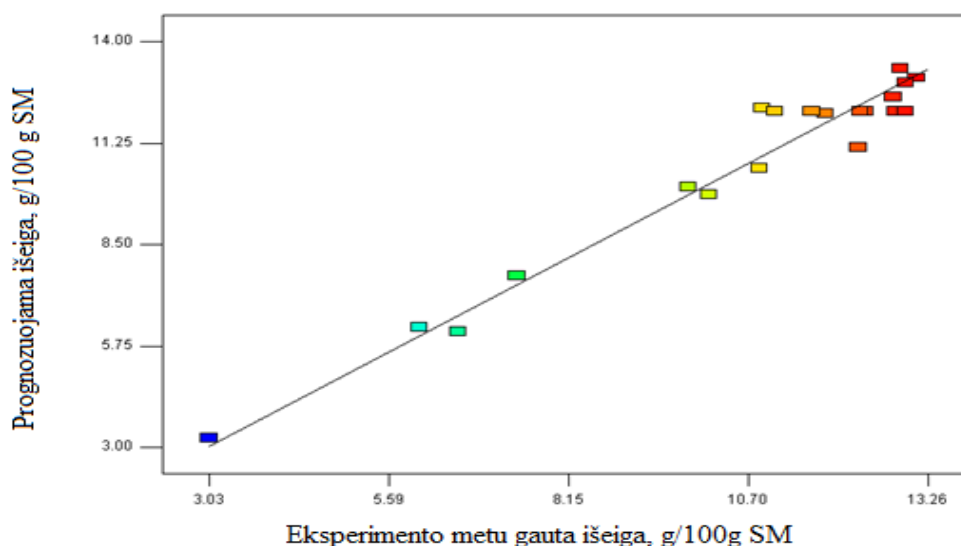
išeigų reikšmės buvo apskaičiuotos pagal polinomę lygtį ir palygintos su gautomis eksperimentinėmis vertėmis, palyginimas pateiktas **9 paveiksle**.

$$\begin{aligned} \text{Išeiga} = & 12,13 + 2,68 \cdot P + 1,40 \cdot t - 0,53 \cdot T - 0,45 \cdot P \cdot t + 1,27 \cdot P \cdot T - 0,35 \cdot t \cdot T - 1,79 \\ & \cdot P^2 - 0,65 \cdot T^2 - 0,46 \cdot t^2 \end{aligned} \quad (9)$$

11 lentelė. Bruknių išspaudų SKE–CO₂ ekstrakcijos išeigų regresijos parametų dispersinė analizė

Kintamieji	Kvadratų suma	Laisvės laipsnis (df)	Kvadratų vidurkis	F – kriterijus	p-reikšmė
Modelis	142,3677	9	15,8186	24,7182	< 0,0001*
Slėgis (P)	71,7704	1	71,7704	112,1485	< 0,0001*
Laikas (t)	19,7402	1	19,7403	30,8461	0,0002*
Temperatūra (T)	2,7772	1	2,7773	4,3398	0,0639**
Pt	1,6020	1	1,6021	2,5034	0,1447**
PT	12,8524	1	12,8525	20,0832	0,0012*
tT	1,0082	1	1,0082	1,5754	0,2380**
P ²	8,7665	1	8,7666	13,6986	0,0041*
t ²	1,1456	1	1,1457	1,7902	0,2105**
T ²	0,5704	1	0,5705	0,8914	0,3674**
Liekana	6,3995	10	0,6400		
Klaidos tikimybė	3,8645	5	0,7729	1,5245	0,3274**
Klaida	2,5350	5	0,5070		
Bendra suma	148,7673	19			

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



9 pav. Prognozuojamų ir gautų ekstrakcijos išeigų palyginimas

Gauto matematinio modelio atsako paviršiaus kreivės pateikiamos **10 paveiksle**. Trimačiai grafikai (3D) vaizduoja, kaip tiriami kintamieji ir jų sąranka veikia lipofiliškos frakcijos išeigą. Grafikai gaunami vieną nepriklausomąjį kintamąjį fiksuojant eksperimentinio plano centre kaip

konstantą, o kitus du kintamus parametrus keičiant plano erdvėje. Tokiu būdu numatoma galima ekstrakcijos išeiga ir galima aiškiai matyti, kaip kinta tiriamasis atsakas keičiant nepriklausomus kintamuosius.

Pirmame grafike (**10 pav., a**) galima matyti, kaip kinta ekstrakto išeiga, esant pastoviam ekstrakcijos slėgiui (40 MPa), o likę temperatūros ir trukmės parametrai keičiasi. Dinaminės trukmės pokytis turi žymiai didesnę reikšmę nei ekstrakcijos temperatūra. Ekstrakcijos trukmės prailginimas nuo 60 iki 180 min leidžia padidinti ekstrakcijos kiekį apie 4 %, o temperatūros didėjimas nuo 52 iki 80 °C reikšmingos įtakos ekstrakcijos išeigai neturi. Panaši priklausomybė pastebima ir antrame 3D grafike (**10 pav., b**), kai fiksuotas parametras yra dinaminės ekstrakcijos laikas (120 min). Ekstrakcijos temperatūros padidėjimas nuo 50 iki 65 °C sukelia itin nežymų išeigos padidėjimą (0,1 %), o tolesnis temperatūros didinimas šiomis sąlygomis nebuvo reikšmingas. Tačiau, ekstrakcijos slėgio padidinimas nuo 25 iki 55 MPa ekstrakto išeigą padidina beveik 7 %. Atlikus dispersinę gautų duomenų analizę nustatyta, kad ekstrakcijos slėgis ir laikas yra reikšmingi bruknių išspaudų ekstrakcijos išeigos optimizavimo nepriklausomi kintamieji, o šių šių parametrų tarpusavio sąveiką galime stebėti paskutiniame grafike (**10 pav., c**). Kai temperatūra yra konstanta (65 °C) matome, kad abiejų tiek slėgio, tiek trukmės parametrų kitimas padidina ekstrakcijos išeigą. Vertinant šių nepriklausomų kintamųjų tarpusavio sąveiką matyti, kad ekstrakcijos slėgis turi didesnę įtaką nei dinaminės ekstrakcijos trukmė. Ekstrakcijos slėgio padidėjimas nuo 25 iki 55 MPa išeigą padidina apie 9 %. O ekstrakcijos trukmės prailginimas nuo 60 iki 180 min išeigą padidina ~5 %, tačiau nuo 120 min poveikis ekstrakcijos išeigai mažėja. Taigi, akivaizdus abiejų kintamųjų parametrų padidėjimas ekstrakcijos metu leidžia išgauti maksimalų ekstrakto kiekį.

Pasinaudojus gautu matematiniu modeliu nustatytos optimalios sąlygos, kuriomis galima gauti didžiausią bruknių išspaudų lipofiliškos frakcijos išeigą. Optimalios sąlygos buvo pasirinktos dvejoms pagal: mažiausią ir didžiausią temperatūrą bei trumpiausią siūlomą ekstrakcijos laiką:

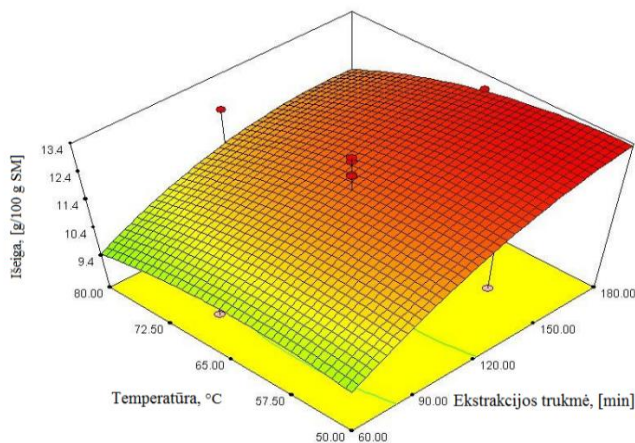
1. 47,1 MPa, 156 min, 53°C (teorinė išeiga: 13,28 %);

2. 52,7 MPa, 111 min, 79°C (teorinė išeiga: 13,46 %).

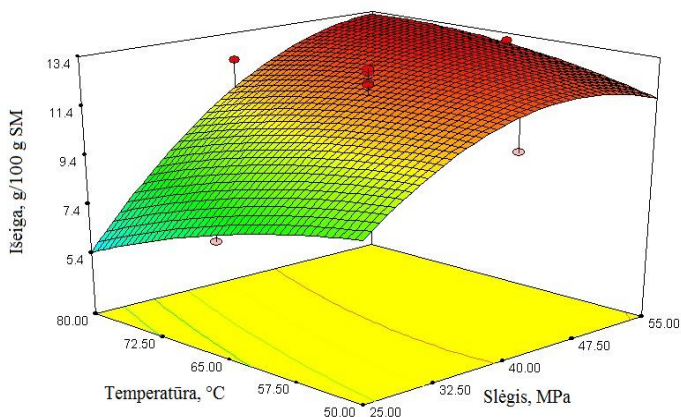
Pirmiausia, taikant šias optimalias sąlygas sudarytos ekstrakcijos kinetinės kreivės (**11 pav.**), kurios suteikia svarbios informacijos apie ekstrakcijos metu vykstančius termodinaminius procesus. Iš grafiko matyti, kad taikant didesnę slėgį (52,7 MPa) ekstraktas išskiriamas greičiau, o termodinaminę pusiausvyrą pasiekia apie 110 min. O esant maženam ekstrakcijos slėgiui (47,1 MPa) didžioji ekstrakto dalis išskiriama per 45 min, tačiau toliau išeigos didėjimas ženkliai sulėtėja kol pasiekiamą termodinaminę pusiausvyrą. Gautos išeigos 11,82±0,07 g/100 g SM (47,1 MPa, 156 min, 53°C) ir 12,07±0,18 g/100 g SM (52,7 MPa, 111 min, 79°C). Toliau, nuspręsta dirbti su efektyvesnėmis 52,7 MPa, 111 min, 79°C ekstrakcijos sąlygomis. Šios sąlygos

pakartotos su didesniu medžiagos kiekiu, ekstrakciją atliekant pusiau pramoniniu SKE ekstraktoriumi, gauta išeiga 10,8 g/100 g SM.

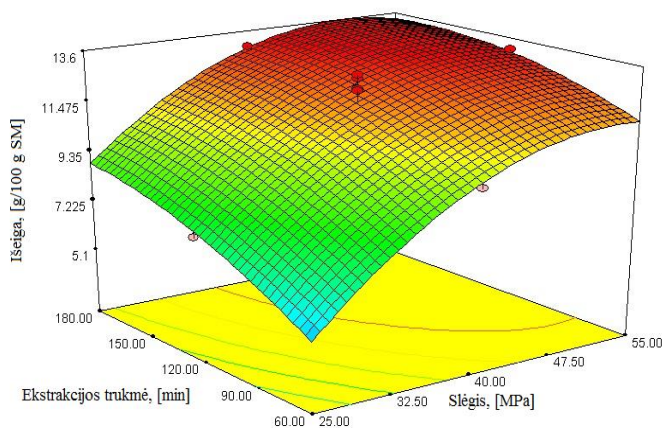
a) Pastovus ekstrakcijos slėgis, 40 MPa
Ekstrakcijos temperatūros ir dinaminės trukmės įtaka



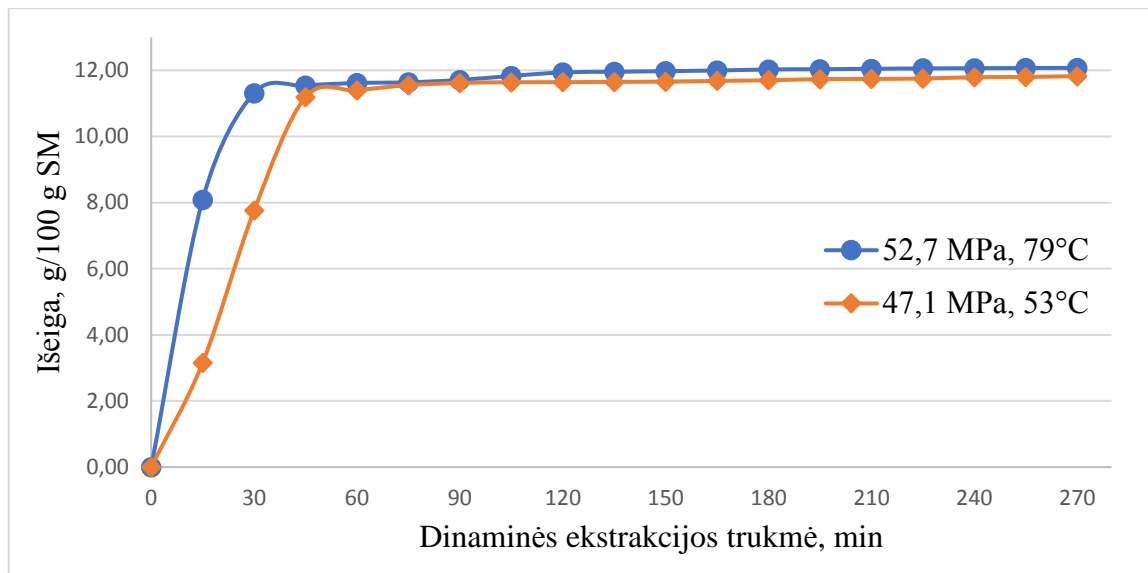
b) Pastovus dinaminės ekstrakcijos laikas, 120 min
Ekstrakcijos slėgio ir temperatūros įtaka



c) Pastovi ekstrakcijos temperatūra, 65 °C
Ekstrakcijos slėgio ir dinaminės trukmės įtaka



10 pav. Bruknių išspaudų SKE atsako paviršiaus kreivės, vaizduojančios ekstrakto išeigos priklausomybę nuo optimizuojamų parametrų



11 pav. Ekstrakcijos išeigos priklausomybė nuo dinaminės ekstrakcijos trukmės

3.3 Pagreitinota ekstrakcija etanolio optimizavimas iš bruknių išspaudų liekanos

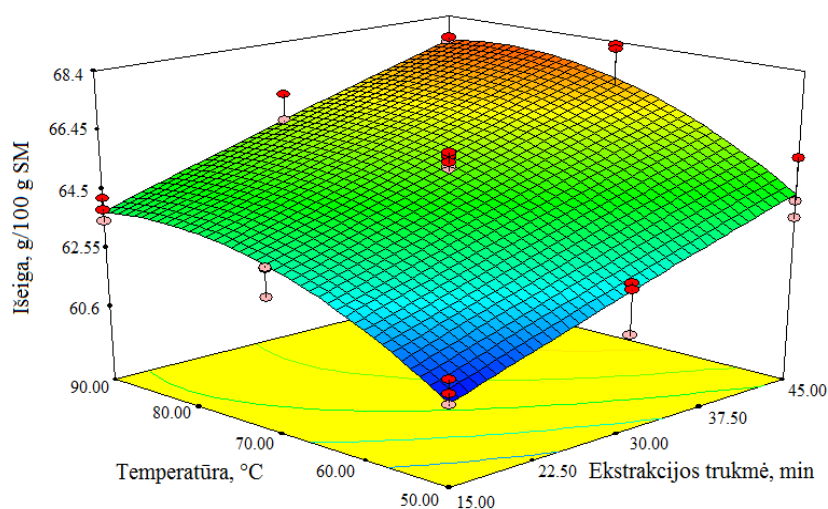
CO₂ yra nepolinis tirpiklis, kuris tirpina nepolines ir mažai polines (lipofilines) medžiagas, todėl atlikus SKE–CO₂ optimaliomis sąlygomis išekstrahuojama tik lipofiliška bruknių uogų išspaudų dalis. O liekanoje lieka įvairių polinių (hidrofilinių) naudingų bioaktyvių junginių, kuriuos galime išgauti taikant pagreitinota ekstrakcijos metodiką organiniais tirpikliais padidintame slėgyje. PET ekstrakcijos efektyvumas labiausiai priklauso nuo ekstrakcijos temperatūros ir trukmės. Nutarta šiuos du parametrus optimizuoti taikant APM ir CKP, siekiant gauti didžiausią ekstrakcijos išeigą. Optimizavimas vykdytas analogiškai kaip ir SKE–CO₂ sistemos.

Taikant PET sistemą etanolinių ekstraktų išeiga svyravo nuo 60,99±0,39 iki 67,36±1,5 g/100 g SM (**12 lentelė**). Didžiausia išeiga 67,36±1,5 g/100 g SM buvo pasiekta taikant maksimalų ekstrakcijos laiką 45 min (15 min × 3 ciklai) ir 70 °C temperatūrą. Pagal sudarytą CKP nubraižyta atsako paviršiaus kreivė (**12 pav.**). Iš šio 3D grafiko matyti, kad abu tiriamieji parametrai turi reikšmingą įtaką ekstrakcijos išeigai. Didinant tiek temperatūrą, tiek ir ekstrakcijos trukmę galime pasiekti didesnę išeigą. Esant 15 min ekstrakcijos trukmei, temperatūros padidinimas nuo 50 iki 90 °C, leidžia ekstrakcijos išeigą padidinti apie 3,2 %. O esant ilgiausiai ekstrakcijos trukmei (45 min) ir ekstrakcijos temperatūrą padidinus nuo 50 iki 90 °C pastebimas 2,9 g/100 g SM ekstrakto prieaugis. Kai ekstrakcijos temperatūra yra 50 °C, o trukmė ilginama nuo 15 iki 45 min ekstrakto padidėja apie 3,46 g/100 g SM. Panaši ekstrakto išeigos padidėjimo tendencija pastebima ekstrakciją vykdant 90 °C temperatūroje ir trukmę ilginant iki 45 min.

12 lentelė. Bruknių išspaudų liekanos parametrai pagal CKP bei gautos ir prognozuojamos išėigos

Eil. nr.	Ekstrakcijos trukmė, min× ciklai	Temperatūra, °C	Išėiga, g/100 g SM	
			Eksperimentinė	Prognozuojama
1.	5×3 ciklai (15 min)	50	60,99±0,39 ^a	60,66
2.	15×3 ciklai (45 min)	50	64,45±1,03 ^a	64,41
3.	5×3 ciklai (15 min)	90	63,88±0,38 ^b	63,81
4.	15×3 ciklai (45 min)	90	67,34±0,39 ^b	67,57
5.	5×3 ciklai (45 min)	70	63,02±0,53 ^b	63,43
6.	15×3 ciklai (45 min)	70	67,36±1,50 ^b	67,19
7.	10×3 ciklai (30 min)	50	62,21±0,93 ^a	62,60
8.	10×3 ciklai (30 min)	90	65,91±0,64 ^b	65,76
9.	10×3 ciklai (30 min)	70	65,56±0,28 ^b	65,37
10.	10×3 ciklai (30 min)	70	65,69±0,09 ^b	65,37
11.	10×3 ciklai (30 min)	70	65,46±0,42 ^b	65,37
12.	10×3 ciklai (30 min)	70	65,70±0,07 ^b	65,37
13.	10×3 ciklai (30 min)	70	65,59±0,23 ^b	65,37

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ±SN. Mažosios raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus verčių skirtumus.



12 pav. Bruknių išspaudų PET ekstrakcijos su etanoliu atsako paviršiaus kreivė

Modelio analizė (ANOVA) pateikiama **13 lentelėje**. Abu pasirinkti nepriklausomieji kintamieji yra reikšmingi visame tirtame modelyje. Dispersinė duomenų analizė parodė, kad sudarytas modelis yra reikšmingas, o determinacijos koeficientas taip pat tenkina reikalavimus ($R^2=0,90$). O tai patvirtina teorinį modelio adekvatumą gautiems eksperimentinio tyrimo rezultatams. Prognozuojamas (teorinis) determinacijos koeficientas $R^2=0,85$ yra beveik lygus eksperimentiniam (gautam) determinacijos koeficientui $R^2=0,88$. Apskaičiuotas adekvatumo preciziškumas, kuris išmatuoja signalo santykį su pašaliniais trikdžiais, kurie iškreipia rezultatus,

yra tinkamas ir lygus 21,31 (ši reikšmė turi būti > 4). Taigi, signalas yra adekvatus, o modelis gali būti naudojamas visoje sudaryto plano erdvėje. Be to, PET ekstrakcijos iš bruknių išspaudų liekanos kvadratinės regresijos modelio analizė parodė, kad modelis yra reikšmingas pagal Stjudento kriterijų ($p < 0,0001$), apskaičiuotą F vertę (45,1442), o trūkumai nėra reikšmingi ($p > 0,3752$), todėl jis gali būti naudojamas viso modelio erdvėje.

13 lentelė. Bruknių išspaudų pagreitinotos ekstrakcijos etanoliu išėigų regresijos parametrų dispersinė analizė

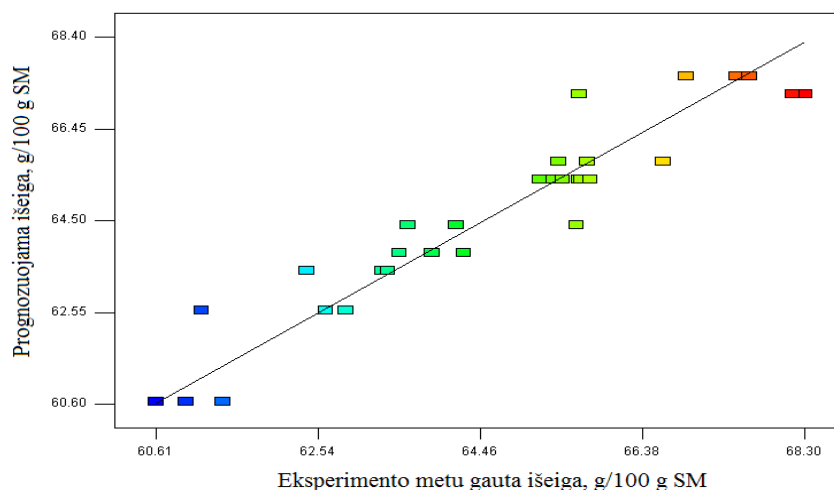
Kintamieji	Kvadratų suma	Laisvės laipsnis (df)	Kvadratų vidurkis	F – kriterijus	p – reikšmė
Modelis	118,8831	5	23,77661	45,14418	< 0,0001*
Laikas (t)	63,51771	1	63,51771	120,5998	< 0,0001*
Temperatūra (T)	44,85868	1	44,85868	85,17228	< 0,0001*
tT	0,0000309	1	0,000031	0,000059	0,9940**
t ²	0,031224	1	0,031224	0,059284	0,8097**
T ²	9,997329	1	9,997329	18,98173	0,0002*
Liekana	12,64036	24	0,526682		
Klaidos tikimybė	1,702597	3	0,567532	1,089636	0,3752**
Klaida	10,93776	21	0,520846		
Bendra suma	131,5234	29			

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

Paviršiaus atsako metodas taikytas tam, kad būtų nustatomos optimalios kintamųjų parametrų vertės, kurios užtikrintų didžiausią ekstrakto išėigą taikant PET sistemą. Toliau sudaroma antro laipsnio polinominė regresinė lygtis, apibūdinanti ryšį tarp kintamųjų (T, t), kuri užrašoma 10 lygtimi. Prognozuojamos išėigų reikšmės apskaičiuojamos pagal polinomę regresijos lygtį ir palygintos su gautomis eksperimentinėmis vertėmis (**13 pav.**).

$$\text{Išeiga (g/100 g SM)} = 65,37 + 1,88 \cdot t + 1,58 \cdot T + 0,0016 \cdot T \cdot t - 0,0668 \cdot t^2 - 1,1951 \cdot T^2 \quad (10)$$







Pagal sudarytą polinominį modelį, nustatomos optimalios pagreitinotos ekstrakcijos etanoliu sąlygos: temperatūra 83 °C, ekstrakcijos trukmė 45 min (15 min × 3 ciklai). Optimaliomis sąlygomis gauta išėiga 63,36±0,62 g/100 g SM buvo artima programos nustatytai teorinei išėigai 67,71 g/100 g SM.



13 pav. Etanolinių ekstraktų faktinių išeių palyginimas su prognozuojamomis vertėmis

3.4 Tradicinių, aukšto slėgio ir fermentinės hidrolizės ekstraktų iš bruknių išspaudų išeių palyginimas

Bruknių išspaudų frakcionavimui į funkcionaliąsias maistines medžiagas atlikti du tradiciniai ekstraktacijos metodai, trys ekstraktacijos taikant aukšto slėgio metodus, bei vienas fermentinės ekstraktacijos metodas, gautos ekstraktų išeišos pateikiamos **14 lentelėje**. Pirmiausia, iš bruknių išspaudų išekstrahuojamas lipofilinis ekstraktas, kuris išskirtas dviem metodais: tradiciniu soksleto ir SKE–CO₂ procesu aukštame slėgyje. Optimaliomis sąlygomis SKE–CO₂ proceso išeiga gauta ~3 % mažesnė nei soksleto ekstraktacijos heksanu. Mažesnę superkrizinės ekstraktacijos išeią lemia didesnis SKE metodo selektyvumas. Literatūroje pateikiama, kad atliekant SKE–CO₂ ekstraktaciją iš įvairių uogų išspaudų galima išskirti apie 12–18% aliejingo ekstrakto [73]. Taigi, optimaliomis eksperimento sąlygomis gauta SKE–CO₂ lipofiliško ekstrakto išeiga (12 %) patenka į literatūroje pateikiamas vertes. Šis lipofinis ekstraktas gaunamas gelsvai žalios spalvos (**14 pav.**), o liekana po SKE–CO₂ proceso optimaliomis sąlygomis lieka sodriai raudonos spalvos. Išspaudų spalva parodo, kad šioje liekanoje vis dar yra likusių natūralių augalinių pigmentų, todėl toliau taikomi kiti biorafinavimo būdai poliniams junginiams išgauti.

SKE–CO ₂ ekstraktas	Bruknių išspaudos				
	Neapdorotos	Po SKE–CO ₂	Po Mac–EtOH/H ₂ O	Po PET–EtOH	Po PET–H ₂ O
					

14 pav. Bruknių SKE–CO₂ ekstraktas ir liekanos po įvairių atliktų ekstraktacijų

Iš SKE–CO₂ liekanos atliktas tradicinis maceravimo metodas, naudojant tirpiklių EtOH/H₂O (70:30 t/t) mišinį bei mechaninį purtymą ir antrasis ekstrakcijos procesas PET su etanolium aukštame slėgyje. Tradiciniu maceravimo metodu gauta išeiga (36,67±1,04 g/100 g SM) buvo apie 1,5 karto mažesnė negu PET–EtOH ekstrakcijos išeiga. Be to, PET ekstrakcija vyksta 16 kartų greičiau, nei tradicinė ekstrakcija. Liekana po PET–EtOH optimaliomis sąlygomis gauta rusvai rausvos spalvos, todėl likusiems junginiams išskirti atlikta pagreitinta ekstrakcija subkritiniu vandeniu. Šios ekstrakcijos išeiga 3,21±0,67 g/100 g SM, o po jos gauta liekana buvo rudos spalvos. Deja, bet mokslinėse publikacijose nepavyko surasti panašių atliktų ekstrakcijų su bruknių išspaudomis. Taigi, įvertinant bruknių išspaudų spalvos pokytį galima teigti, kad dauguma bioaktyvių junginių gali būti išgaunami taikant trijų pakopų ekstrakciją (SKE–CO₂, PET–EtOH, PET–H₂O).

14 lentelė. Ekstraktų išeišos gautos taikant skirtingus ekstrakcijos metodus

Ekstrakcijos metodas	Ekstrakcijos parametrai				Išeiga	
	Ekstrakcijos žaliava	Slėgis, MPa	Temperatūra, °C	Laikas, min	g/ 100 g	g/ 100 g SM
Tradiciniai metodai						
SOK–HE	Broknių išspaudos	–	60	360	15,20±0,80	
Mac–EtOH/H ₂ O	SKE–CO ₂ liekana	–	20	2×360	39,06±1,42	36,67±1,04
Aukšto slėgio ekstrakcijos metodai						
SKE–CO ₂	Broknių išspaudos	52,7	79	111	12,07±0,18	
PET–EtOH	SKE–CO ₂ liekana	10,3	83	45	63,36±0,62	55,72±0,55
PET–H ₂ O	PET–EtOH liekana	10,3	130	30	8,25±0,75	3,21±0,67
Inovatyvus ekstrakcijos metodas						
FE _{pH=4,8}	Mac–EtOH/H ₂ O liekana	–	50	360	20,34±0,35*	13,28±0,24

Nurodytos vidutinės dviejų pakartojimų vertės ±SN;*- išeiga apskaičiuota iš liofilizuoto filtrato atėmus kontrolinio mėginio masę.

Atliekant tradicinius ir aukšto slėgio ekstrakcijos metodus iš bruknių išspaudų galime išgauti iki 70 % tirpiųjų junginių. O siekiant dar labiau padidinti išekstrahuojamų junginių kiekį atlikta fermentinė ekstrakcija. Fermentinei hidrolizei buvo naudojamas *Viscozyme L* fermentas bei palaikomos specifinės ekstrakcijos sąlygos: pH – 4,8, temperatūra – 50 °C, ekstrakcijos laikas – 360 min. Ekstrakcija vykdyta su liekana po maceravimo EtOH/H₂O mišiniu, gauta ekstrakto išeiga 13,28±0,24 g/ 100 g SM. Šioje ekstrakcijoje fermentų pridėjimas padeda išskirti bruknių išspaudų

ląstelių sienelėse esančius sujungtus vandenyje tirpius junginius, nes sienelės suardymas fermentais leidžia tirpikliams lengviau pasiekti ekstrahuojamus junginius. Be to, fermentai hidrolizuoja didelės molekulinės masės junginius į mažesnius. Taigi, fermentų pridėjimas ekstrakcijų metu gali ženkliai padidinti ekstrahuojamų junginių išėigas.

3.5 Ekstraktų ir kietosios frakcijos antioksidacinis aktyvumas

Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas išmatuotas naudojant ABTS^{•+} radikalo blukinimo metodą, bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas *Folin-Ciocalteu's* metodu, o deguonies radikalų absorbcijos pajėgumas įvertintas ORAC metodu. Gauti rezultatai pateikiami **15 lentelėje**, kurioje antioksidacinis aktyvumas pateikiamas g ekstrakto bei g SM.

Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas itin priklauso nuo jų fitocheminės sudėties ir junginių kiekio. BFJK kiekis gautuose ekstraktuose kinta intervale nuo 4,8 iki 87,08 mg GRE/g ekstrakto. Didžiausias BFJK kiekis nustatytas PET–H₂O ekstrakto taikant ekstrakciją subkritiniu vandeniu. Šiek tiek mažesnės reikšmės nustatytos soksleto, superkritinių ekstrakcijų ir maceravimo metodais gautuose ekstraktuose. O mažiausias fenolinių junginių kiekis gautas kontroliniame fermentinės hidrolizės ekstrakto, kuriame naudotas tik buferis. Taip pat, palyginimui atliktas BFJK kiekis nustatytas bruknių sultyse, kuriose nustatyta apie 1,92 mg GRE/g sulčių, o mokslinėse publikacijose pateikiamas nustatytas BFJK bruknių uogose yra 6,21 mg GRE/g bei ABTS^{•+} 69,3 μM TE/g uogų [30]. Taigi, lyginat ekstraktuose ir sultyse ir uogose aptinkamas BFJK vertes matome, kad ekstraktuose jų vertės yra ženkliai didesnės, todėl šie ekstraktai galėtų būti geri natūralių antioksidantų šaltiniai.

Panaši ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tendencija išliko nustatant radikalų surišimo gebą ABTS^{•+} bei ORAC metodais. ABTS^{•+} metodu AOA bruknių išspaudų ekstraktuose nustatytas nuo 10,06 iki 307,67 mg TE/g ekstrakto, o bruknių sultyse – 6,69 mg TE/g sulčių. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu atliekant ABTS^{•+} metodą pasižymėjo poliniai tradiciniu maceravimo su EtOH/H₂O mišiniu ir PET–H₂O būdais išskirti ekstraktai, tačiau dvigubai mažesnė vertė nustatyta etanoliniame PET ekstrakto. O mažiausia vertė gauta lipofiliniame SKE–CO₂ (47,1 MPa, 53 °C) ekstrakto. Didžiausia deguonies radikalo surišimo geba (ORAC) buvo gauta vandeniniame PET ekstrakto (334,31 mg TE/g ekstrakto). O ekstraktuose, kurie gauti nepoliniais tirpikliais (CO₂ bei heksanu) nustatytos ORAC metodu AOA vertės buvo mažiausios (8,50–41,11 mg TE/g ekstrakto). Taigi, mažiausiu AOA aktyvumu pasižymi nepoliniai ekstraktai, o didėjant ekstrakcijose naudojamų tirpiklių poliškumui AOA vertės ženkliai padidėja.

Antioksidaciniai tyrimai pritaikius QUENCHER procedūrą buvo atlikti pradinei bruknių išspaudų žaliavai bei po kiekvienos ekstrakcijos gautai kietos frakcijos liekanai. Dalis AOA pasižyminčių junginių gali būti sujungti stipriais ryšiais su kitais žaliavoje esančiais komponentais,

todėl atliekant skirtingų parametrų ekstrakcijas šie junginiai išekstrahuojami nevienodais kiekiais. Dėl šios priežasties, tikslinga atlikti QUENCHER tyrimus, kuriais galime sužinoti vykdytų ekstrakcijų efektyvumą išekstrahuoti antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčius junginius palyginant kietos frakcijos AOA prieš ir po ekstrakcijos. Tiriamų bandinių AOA išmatuotas naudojant radikalų surišimo gebą ABTS⁺⁺ ir ORAC metodais bei *Folin-Ciocalteu's* metodu nustatytas bendras fenolinių junginių kiekis, gauti rezultatai pateikiami **15 lentelėje**.

Išanalizavus QUENCHER metodu prieš ekstrakciją ir po skirtingų ekstrakcijos metodų gautos kietos frakcijos AOA nustatyta, kad taikant pakopinę išspaudų ekstrakciją galime ženkliai sumažinti AOA bruknių išspaudose. Priklausomai nuo naudojamo ekstrakcijos tipo, jos parametrų bei tirpiklio BFJK kiekis svyravo nuo 3,75 iki 30,37 mg GRE/g SM, ABTS⁺⁺ metode svyravo nuo 30,16–187,63 mg TE/g SM, ORAC sistemoje kito nuo 11,71 iki 85,26 mg TE/g SM.

Atlikus SKE–CO₂ ekstrakciją, kurios metu iš žaliavos pašalinta lipofiliška frakcija, matyti, kad antioksidacinis aktyvumas BFJK metode neženkliai sumažėja lyginant su pradine bruknių išspaudų žaliava. Tačiau, panaudojus poliškesnius tirpiklius pastebime, kad BFJK metodu nustatytos liekanos AOA sumažėja daugiau nei tris kartus lyginant su liekana po SKE–CO₂ ekstrakcijos. Didžiausias šių antioksidacinių junginių kiekio sumažėjimas nustatytas liekanoje po pakopinės PET sistemos pritaikymo su etanoliumi ir vandeniu. Taip pat, AOA itin sumažėjo po maceravimo ekstrakcijos EtOH/H₂O mišiniu. Tačiau, lyginant PET–EtOH ir Mac–EtOH/H₂O (70:30 t/t) ekstrakcijų efektyvumus pastebime, kad Mac–EtOH/H₂O liekanoje nustatytas beveik 1,5 karto mažesnis antioksidacinis aktyvumas, todėl galime daryti prielaidą, kad vanduo yra geresnis tirpiklis norint išskirti bruknių išspaudose esančius fenolinius junginius. Panaši tendencija pastebima ABTS⁺⁺ ir ORAC metoduose. Taigi, pakopinės PET ekstrakcijos su etanoliumi ir vandeniu bei maceravimo ekstrakcijos yra daug efektyvesnės antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių junginių išgavimui, o mažos antioksidacinių junginių vertės kietosios frakcijos liekanoje parodo, kad toks pakopinis ekstrakcijų taikymas yra itin tinkamas norint išskirti bioaktyvius junginius iš tiriamosios žaliavos.

Tačiau ir po šių ekstrakcijų išspaudose vis dar lieka dalis antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių junginių. Šiems junginiams išskirti panaudota fermentinė ekstrakcija. FE_{pH=4,8} liekanoje naudojant tik buferinį tirpalą BFJK metodu nustatytas AOA nedaug pasikeitė lyginant su pradine Mac–EtOH/H₂O žaliavos liekana. Tačiau, ekstrakcijai panaudojus fermentą *Viscozyme L* iš gautų duomenų matyti, kad Mac–EtOH/H₂O liekanoje po apdorojimo fermentine hidrolize aktyviųjų medžiagų padidėja apie du kartus. Taigi, fermentų panaudojimas gerina antioksidacinių junginių išgavimą ir padidina tirpių medžiagų kiekį iš bruknių išspaudų, todėl papildomas šios žaliavos apdorojimas PET–H₂O sistema galėtų sumažinti šių junginių kiekį iki minimalaus.

15 lentelė. Antioksidacinis aktyvumas bruknių išspaudų ekstraktuose ir kietosiose liekanų frakcijose

Ekstraktas	BFJK, mg GRE/g		ABTS ⁺ , mg TE/g		ORAC, mg TE/g	
	Ekstrakto	SM	Ekstrakto	SM	Ekstrakto	SM
SOK-HE	83,01±2,40 ^h	12,62±0,37 ^f	–	–	8,50±0,61 ^a	1,29±0,09 ^a
SKE-CO ₂ (45 MPa, 60 °C,)	72,02±1,06 ^g	8,31±0,12 ^e	–	–	–	–
SKE-CO ₂ (52,7 MPa, 79 °C)	58,93±1,02 ^f	7,11±0,12 ^d	15,81±0,04 ^c	1,91±0,01 ^b	41,11±3,64 ^c	5,12±0,38 ^b
SKE-CO ₂ (47,1 MPa, 53 °C)	45,29±0,22 ^d	5,35±0,03 ^c	10,06±0,13 ^b	1,19±0,02 ^{ab}	35,16±1,33 ^b	4,15±0,19 ^{ab}
PET-EtOH	39,58±0,17 ^c	22,06±0,09 ^h	130,88±0,77 ^e	72,93±0,43 ^e	122,48±4,34 ^d	68,24±2,42 ^d
PET-H ₂ O	87,08±0,19 ⁱ	2,80±0,01 ^b	255,76±0,35 ^f	8,21±0,01 ^d	334,31±3,79 ^f	10,73±0,12 ^c
Mac-EtOH/H ₂ O (70:30)	54,78±0,96 ^e	18,99±0,33 ^g	307,67±1,99 ^g	106,67±0,69 ^f	244,02±4,11 ^e	85,20±0,44 ^e
FE _{pH=4,8} (fermentas + buferis)	7,33±0,19 ^b	0,97±0,03 ^a	33,70±1,48 ^d	4,47±0,20 ^c	–	–
FE _{pH=4,8} (buferis)	4,80±0,49 ^b	0,49±0,05 ^a	11,29±0,02 ^b	1,15±0,01 ^a	–	–
Broknių sultys	1,92±0,03 ^a	–	6,69±0,14 ^a	–	7,65±0,27 ^a	–
Uoėų išspaudos ir liekanos po ekstrakcijų (QUENCHER metodu)						
Išspaudos	BFJK, mg GRE/g		ABTS ⁺ , mg TE/g		ORAC, mg TE/g	
	Bandinio	SM	Bandinio	SM	Bandinio	SM
Broknių išspaudos (0,2 mm)	36,17±1,04 ^f	36,17±1,04 ^g	166,53±2,69 ^e	166,53±2,69 ^e	79,49±0,78 ^c	79,49±0,78 ^c
Po SOK-HE	19,28±0,94 ^d	16,35±0,79 ^d	84,90±1,44 ^c	72,00±1,22 ^c	100,54±2,67 ^d	85,26±2,27 ^d
Po SKE-CO ₂ (45 MPa, 60 °C,)	34,33±0,58 ^f	30,37±0,51 ^f	212,11±2,44 ^g	187,63±2,16 ^f	87,30±7,24 ^c	77,23±6,41 ^c
Po SKE-CO ₂ (52,7 MPa, 79 °C)	30,04±1,12 ^e	26,42±0,99 ^e	188,43±9,98 ^f	165,69±8,77 ^e	83,83±7,12 ^c	73,71±6,26 ^c
Po SKE-CO ₂ (47,1 MPa, 53 °C)	30,62±2,37 ^e	27,00±2,09 ^e	193,57±9,07 ^e	170,51±7,31 ^d	83,25±1,55 ^c	73,41±1,37 ^c
Po PET-EtOH	17,61±0,43 ^d	7,80±0,19 ^b	143,98±5,95 ^d	63,76±2,64 ^c	25,74±1,89 ^b	11,71±1,08 ^a
Po PET-H ₂ O	5,00±0,49 ^a	4,84±0,47 ^a	39,16±3,59 ^a	37,91±3,48 ^{ab}	17,13±0,93 ^a	16,86±1,00 ^{ab}
Po Mac-EtOH/H ₂ O	8,21±0,71 ^b	5,36±0,46 ^{ab}	71,27±1,94 ^b	46,56±1,27 ^b	28,32±1,17 ^b	18,69±0,82 ^b
Po FE _{pH=4,8} (fermentas + buferis)	13,80±0,89 ^c	11,97±0,44 ^c	71,26±0,86 ^b	61,80±0,75 ^c	–	–
Po FE _{pH=4,8} (buferis)	4,17±0,27 ^a	3,75±0,24 ^a	33,59±3,73 ^a	30,16±3,35 ^a	–	–

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

3.6 Lipofilinių ekstraktų tyrimai

3.6.1 Lipofilinių ekstraktų riebalų rūgščių sudėties nustatymas

Kai ekstrahuojamoje žaliavoje vyrauja sėklos ar jų dalelės, tuomet iš jų galima išgauti aliejingus ekstraktus. Vienas iš svarbiausių veiksnių, lemiančių aliejingų ekstraktų maistinę vertę yra jų riebalų rūgščių sudėtis. RR sudėtis buvo nustatyta bruknių išspaudų ekstraktuose, gautuose dvejomis optimaliomis sąlygomis (52,7 MPa, 79 °C ir 47,1 MPa, 53 °C) SKE–CO₂ sistemoje ir ekstrakte gautame po soksleto ekstrakcijos su HE. Bruknių išspaudų lipofilinių ekstraktų RR kompozicijos sudėtis pateikiama **16 lentelėje**. Tyrimo metu nustatyta, kad skirtingais būdais išgautų aliejingų ekstraktų RR kompozicija tarpusavyje skiriasi nežymiai, todėl galima daryti išvadą, kad skirtingi išgavimo metodai didelės įtakos sudėčiai neturi. SOK–HE ekstrakte nenustatyta lauro rūgšties, o SKE–CO₂ ekstraktuose neaptikta elaido ir nervono rūgščių.

16 lentelė. Bruknių išspaudų lipofilinių ekstraktų riebalų rūgščių kompozicija

Riebalų rūgštis	Kiekis, %		
	SOK–HE	SKE–CO ₂ (52,7 MPa, 79 °C)	SKE–CO ₂ (47,1 MPa, 53 °C)
Lauro r. (C12:0)	–	1,91±0,10 ^a	1,73±0,63 ^a
Palmitino r. (C16:0)	3,96±0,32 ^a	2,27±0,33 ^a	1,87±0,56 ^a
Stearino r. (C18:0)	0,57±0,01 ^a	0,48±0,11 ^a	0,27±0,01 ^a
Oleino r. (C18:1n9c)	17,65±0,85 ^b	14,8±0,17 ^{ab}	14,79±0,77 ^{ab}
Elaido r. (C18:1n9t)	0,87±0,03 ^a	–	–
Linolo (C18:2n6c)	34,84±0,62 ^c	37,51±0,94 ^{bc}	37,39±1,07 ^b
Linoleno (C18:3n3)	39,85±0,35 ^c	42,38±1,09 ^c	43,27±0,67 ^b
Beheno (C22:0)	0,55±0,08 ^a	0,25±0,17 ^a	0,28±0,21 ^a
Lignocero (C24:0)	0,86±0,17 ^a	0,40±0,05 ^a	0,40±0,33 ^a
Nervono r. (C24:1)	0,85±0,13 ^a	–	–

Nurodytos vidutinės dviejų pakartojimų vertės ± SN; raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp apskaičiuotų verčių.

Literatūroje pateikiama, kad bruknių sėklų aliejuje vyrauja linoleno, kurios yra nuo 25,2 iki 44,80 %, linolo (32,62–51,49 %) ir oleino (15,1–20,7 %) rūgštys [7, 18, 74, 75]. Tirtuose ekstraktuose didžiausias kiekis nustatytas polinesočiosios linoleno rūgšties (39,85–43,27 %), linolo (34,84–37,51 %) ir oleino (14,79–17,65 %) rūgščių. Taigi, gautus rezultatus palyginus su literatūroje pateiktais duomenimis matome, kad nustatytas RR kiekis patenka į intervalus. Kitų RR kiekiai nustatyti bruknių išspaudų lipofiliškuose ekstraktuose buvo daug mažesni (0,25–3,96 %). Bendras polinesočiųjų RR kiekis sudarė apie 75–81 %, visų nustatytų RR kiekio. O sočiųjų ir nesočiųjų RR nustatytas santykis lygus 0,04–0,06. Taigi, išgautuose lipofiliniuose ekstraktuose yra itin didelis kiekis nesočiųjų RR, kurios padeda palaikyti normalų kraujospūdį bei cholesterolio

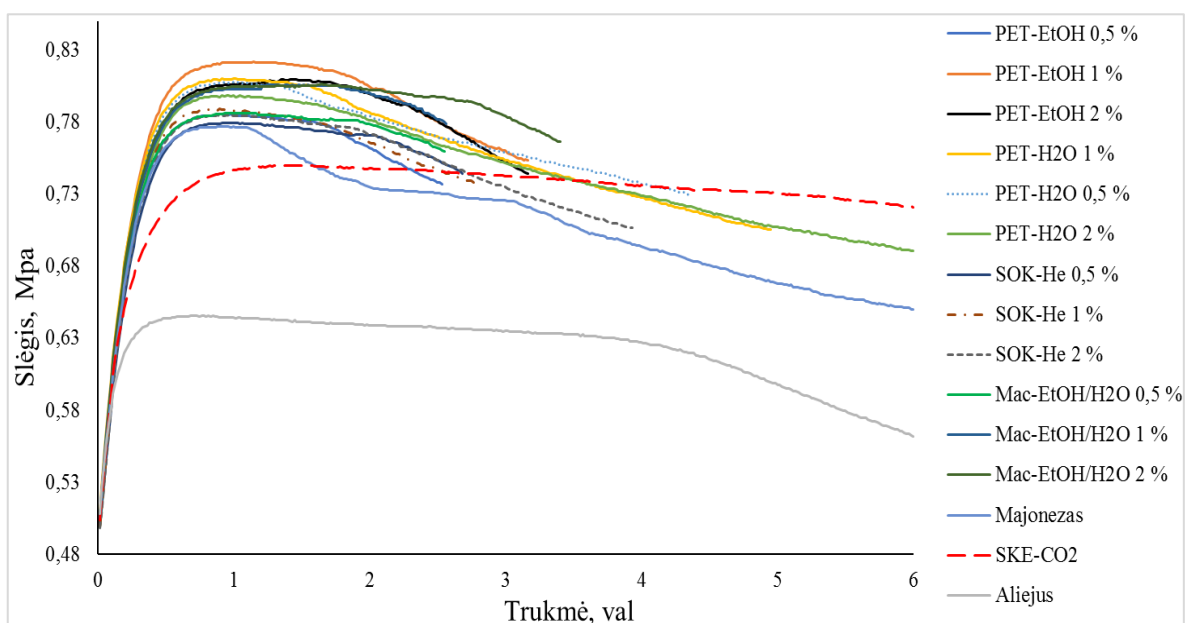
kiekį. Todėl šiuos ekstraktus būtų galima panaudoti gaminant funkcinius produktus ar maisto papildus siekiant praturtinant mūsų mitybą.

3.6.2 Pradinio ekstrakto, gauto po superkritinės ekstrakcijos anglies dioksidu, peroksidų skaičiaus nustatymas

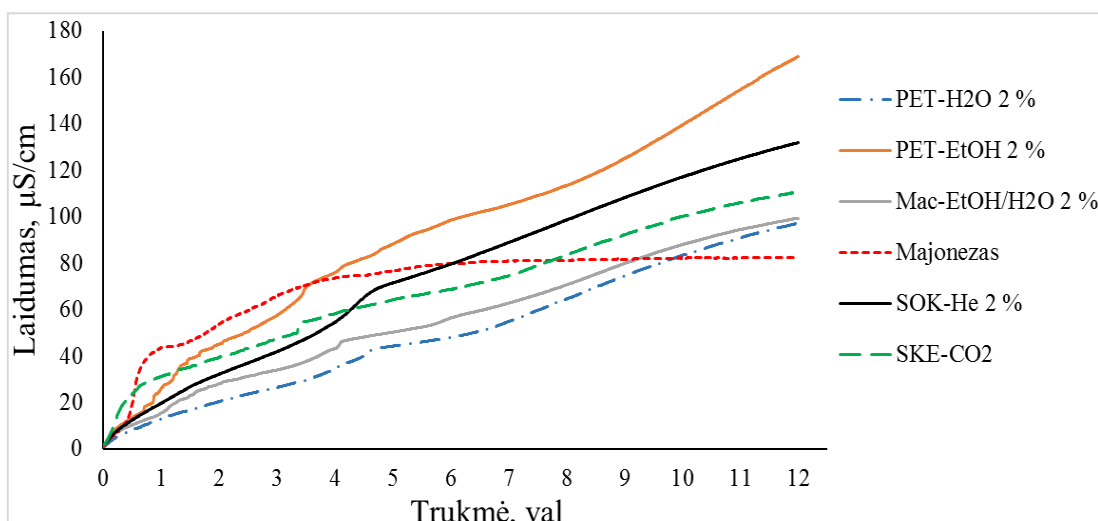
Titruojamasis peroksidų kiekis nustatytas SKE–CO₂ ekstrakto, kuris gautas optimaliomis sąlygomis (52,7 MPa, 79 °C). Šis metodas nustato hidroperoksidų koncentraciją analizuojamame bandinyje ir parodo pradinių oksidacijos produktų kiekį. PS šiame ekstrakto buvo lygus 5,83±0,14 mekv O₂/kg. Pagal CODEX STAN 210 reikalavimus, šio lipofilinio ekstrakto PS vertė patenka į standarte nurodytą šalto arba pirmo spaudimo aliejaus vertę: PS<15 mekv O₂/kg [76]. Taigi, tiriamas SKE–CO₂ ekstraktas gali būti toliau naudojamas tyrimuose.

3.7 Oksidacinio stabilumo įvertinimas Oksipres ir Rancimat metodais

Lipofilinių bandinių stabilumui įvertinti naudojami Oksipres ir Rancimat metodai. Šie metodai leidžia pagreitinti oksidacijos stabilumo stebėjimą. Oksipres metodu nustatomi pirminiai oksidacijos produktai (peroksidai ir hidroperoksidai), o Rancimat – antriniai (aldehidai, alkoholiai, ketonai, poliniai ir polimeriniai junginiai). Oksidacinis stabilumas buvo nustatytas gryname SKE–CO₂ (52,7 MPa, 79 °C) ekstrakto, o kiti bandiniai ruošti su majonezu į kurį įmaišomas tam tikras kiekis bruknių išspaudų ekstrakto (heksaninio, etanolinio ar vandeninio). Majoneziniai bandiniai tirti siekiant įvertinti ekstraktų antioksidacinį poveikį majonezo oksidaciniam stabilumui. Taip pat, palyginimui atlikti nerafinuoto rapsų aliejaus „Tyras“ (Obelių Aliejus, Lietuva) ir majonezo „Be konservantų“ (Kėdainių konservai, Lietuva) tyrimai. Gauti rezultatai pateikiami 15, 16 paveiksluose ir 17 lentelėje.



15 pav. Oksidacinis stabilumas Oksipres metodu



16 pav. Oksidacinis stabilumas Rancimat metodu

Tiriant gryną bruknių išspaudų SKE–CO₂ ekstraktą IP buvo nustatytas 2,75 val Oksipres ir 3,37 val Rancimat testuose. O komercinio aliejaus IP buvo kiek didesnis 4,08 val Oksipres teste. Bruknių išspaudų SKE–CO₂ ekstrakto mažesnę oksidacinę stabilumą galima paaiškinti tuo, kad jame nustatytas itin didelis kiekis polinesočiųjų RR (~80 %), kurios greitai oksiduojasi. Todėl, tokį aliejinę ekstraktą reikia stengtis apsaugoti nuo tiesioginio šviesos ir deguonies kontakto bei laikyti žemoje temperatūroje.

17 lentelė. Tirtų ekstraktų indukciniai periodai valandomis

Bandinys	IP Oksipres metodu, val	IP Rancimat metodu, val
Majonezas su 0,5 % Mac–EtOH/H ₂ O	1,57±0,04 ^{ab}	–
Majonezas su 1 % Mac–EtOH/H ₂ O	1,66±0,15 ^{ab}	–
Majonezas su 2 % Mac–EtOH/H ₂ O	2,50±0,13 ^c	4,04±0,08 ^{bcd}
Majonezas su 0,5 % PET–EtOH	1,59±0,07 ^{ab}	–
Majonezas su 1 % PET–EtOH	1,77±0,06 ^b	–
Majonezas su 2 % PET–EtOH	1,80±0,09 ^b	3,54±0,34 ^{bc}
Majonezas su 0,5 % PET–H ₂ O	1,36±0,05 ^{ab}	–
Majonezas su 1 % PET–H ₂ O	1,58±0,01 ^{ab}	–
Majonezas su 2 % PET–H ₂ O	1,63±0,05 ^{ab}	4,45±0,37 ^d
Majonezas su 0,5 % SOK–HE	1,46±0,21 ^{ab}	–
Majonezas su 1 % SOK–HE	1,52±0,08 ^{ab}	–
Majonezas su 2 % SOK–HE	1,73±0,04 ^b	4,2±0,16 ^{cd}
Majonezas	1,19±0,06 ^a	1,38±0,04 ^a
Aliejus	4,08±0,03 ^d	–
SKE–CO ₂ (52,7 MPa, 79 °C) ekstraktas	2,75±0,35 ^c	3,37±0,5 ^b

Nurodytos vidutinės dviejų pakartojimų vertės ± SN; raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp apskaičiuotų verčių.

Ekstraktų poveikis majonezo oksidaciniam stabilumui, pirmiausia, buvo nustatytas Oksipres metodu. Šių bandinių IP vertės pasiskirsčiusios plačiame intervale nuo 1,36 iki 2,5 val. Geriausiomis savybėmis (IP=2,5 val) pasižymėjo majonezas, kuriame buvo 2 % Mac–EtOH/H₂O ekstrakto. O majonezui, kuriame buvo 0,5 % PET–H₂O ekstrakto nustatytas mažiausias oksidacinis stabilumas (1,36 val). Lyginant ekstrakto kiekio įtaką majonezo oksidaciniam stabilumui galima teigti, kad visais atvejais geresnėmis savybėmis pasižymėjo majoneziniai bandiniai, kuriuose buvo įterptas didžiausias kiekis (2 %) ekstrakto. Todėl, Rancimat metodo testai atlikti tik su majonezu, kuriame buvo įmaišyta 2 % tiriamų ekstraktų. Rancimat metodu didžiausias stabilumas (IP=4,45 val) nustatytas majoneze su PET–H₂O ekstraktu, o mažiausias (IP=3,54 val) su PET–EtOH ekstraktu. Bendrai, lyginant abiejų metodų ekstraktų poveikį majonezui, galima teigti, kad ekstraktų pridėjimas į majonezą pagerina jo oksidacinį stabilumą. Gryno majonezo IP buvo nustatytas 1,19 val Oksipres ir 1,38 val Rancimat testuose, o bandiniuose su ekstraktais šios vertės buvo gerokai aukštesnės.

Mokslinėje literatūroje nepavyko rasti bruknių išspaudų ekstraktų oksidacinio stabilumo tyrimų Oksipres ir Rancimat metodais. Todėl buvo ieškoma informacijos apie kitus panašius bandinius, kuriems pritaikyti šie tyrimo metodai. Basegmezgas ir kt. (2017) oksidacinį stabilumą nustatė juodųjų serbentų išspaudų SKE–CO₂ ekstrakto, kuriame yra apie 74 % nesočiųjų riebalų rūgščių. Šio aliejaus IP buvo lygus 2,39 val Oksipres ir 2,46 val Rancimat testuose [58]. Palyginus šiuos rezultatus su bruknių išspaudų SKE–CO₂ ekstrakto IP rezultatais matome, kad vertės yra panašios. Trumpą oksidacinį stabilumą abiems šiems ekstraktams lemia itin didelis nestabilių polinesočiųjų RR kiekis.

3.8 Antocianinų tyrimai bruknių išspaudose ir jų ekstraktuose

3.8.1 Bendras antocianinų kiekis poliniuose ekstraktuose

Uogų išspaudos, kurios laikomos maisto pramonės atliekomis, gali būti panaudojamos biologiškai aktyvių junginių ekstrakcijai, todėl svarbu nustatyti antocianinų kiekį bruknių išspaudų ekstraktuose. Bendras antocianinų (AC) kiekis bruknių vandeniniame ir etanoliniuose ekstraktuose (**17 pav.**) nustatytas pH diferenciniu metodu. Ekstraktai buvo skiedžiami buferiais, kurių pH 1,0 ir 4,5. Mac–EtOH/H₂O ekstraktas buvo praskiestas iki 1 mg/ml, o PET–EtOH ir PET–H₂O ekstraktai iki 1,25 mg/ml. Gauti bandiniai palaikyti 20–30 min tamsoje ir išmatuota jų absorbcija. Palyginimui atliktas bendras antocianinų kiekio nustatymas bruknių sultyse. Gauti ekstraktų rezultatai pateikiami **18 lentelėje**.

Mažiausias bendras antocianinų kiekis (4,48±0,09 mg/1 g ekstrakto) nustatytas vandeniniame ekstrakto gautame po PET ekstrakcijos subkritiniu vandeniu iš liekanos po PET–EtOH ekstrakcijos. O Mac–EtOH/H₂O ekstrakto, paruoštame iš uogų išspaudų liekanos po

SKE–CO₂, nustatyta daugiausiai antocianinų (4,48±0,09 mg/1 g ekstrakto). Nors Mac–EtOH/H₂O ir PET–EtOH ekstrakcijai naudota ta pati žaliava (SKE–CO₂ liekana po optimalių sąlygų), tačiau nustatytas bendras antocianinų kiekis 1,5 karto didesnis Mac–EtOH ekstrakto. Perskaičius ekstrakto AC kiekį į sausą medžiagą matome, kad kiekiai yra labai panašūs. Taigi, PET–EtOH ekstrakcijos metu gaunama ženkliai (~1,6 karto) didesnė ekstrakto išeiga lemia, kad 1 g ekstrakto yra daugiau įvairių bioaktyvių junginių, o Mac–EtOH/H₂O ekstrakcija tinkamesnė bei selektyvesnė antocianinų ekstrahavimui.



17 pav. Poliniai bruknių išspaudų ekstraktai

Palyginimui atliktas AC kiekio nustatymas natūraliose bruknių sultyse. Sultyse nustatytas AC kiekis buvo 443,26±0,80 mg/l arba 45,12 mg/100 g sulčių (perskaičiuota žinant, kad 1 litras sulčių sveria 982,41 g). Lyginant ekstraktus su sultimis galime daryti išvadą, kad vandeniniame ekstrakto yra panašus kiekis antocianinų kaip ir sultyse. O etanoliniuose ekstraktuose jų kiekis nuo 6,5 iki 10 kartų didesnis nei sultyse. Taigi, etanolinius ekstraktus, kaip antocianiniais turtingą žaliavą, būtų galima tikslingai panaudoti maisto papildų ar vaistinių preparatų gamyboje.

18 lentelė. Bendras antocianinų kiekis bruknių išspaudų ekstraktuose

Bandinys	AC, mg/1 g ekstrakto	AC, mg/ 100 g SM
Mac–EtOH/H ₂ O ekstraktas	4,48±0,09 ^c	155,15±2,95 ^b
PET–EtOH ekstraktas	2,94±0,08 ^b	163,98±4,18 ^c
PET–H ₂ O ekstraktas	0,51±0,08 ^a	3,24±0,51 ^a

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

Mokslinėse publikacijose pateikiamas Vango ir kt. (2005) bruknių sulčių antocianinų kiekio tyrimas, kai bruknės auginamos skirtingose vietose ir surinktos skirtingu laiku, AC kiekis šiame tyrime nustatytas nuo 0,5 iki 65,2 mg/ 100 g, o uogų acetoniniame ekstrakto (parūgštintame 0,2 % skruzdžių rūgšties) AC kiekis buvo 1,5–95,5 mg/100 g [77]. Matome, kad literatūroje pateiktas ir eksperimento metu nustatytas AC kiekis sultyse patenka į pateiktą intervalą. Bendras antocianinų kiekis bruknių išspaudose nustatytas mokslininko Klavino ir kt. (2018) buvo

275,8 mg/100 g SM [24], šis kiekis yra labai panašus į eksperimento metu nustatytą AC kiekį SKE–CO₂ liekanoje. Be to, mokslinėse publikacijose pateikiama Isaako ir kt. (2015) atlikta ekstrakcija iš liofilizuotų bruknių uogų su metanolio parūgštintu 2 % skruzdžių rūgšties, nustatytas AC kiekis buvo 575 mg/100 g SM [78]. Taip pat literatūroje pateikiamas bendras antocianinų kiekis esantis bruknių uogose, kuris svyruoja nuo 27,4 iki 94,34 mg/100 g uogų priklausomai nuo uogų užauginimo vietos bei surinkimo laiko [15, 18]. Literatūros duomenų apie bendrą antocianinų kiekį etanoliniuose ir vandeniniuose ekstraktuose iš uogų išspaudų neaptikta. Apibendrinant, literatūroje pateikiamus ir eksperimento metu gautus rezultatus galima teigti, kad bendras antocianinų kiekis bruknių uogose bei išspaudose itin priklauso nuo uogų rūšies, užaugimo vietos ir sunokimo laipsnio, o AC kiekis uogų išspaudų ekstraktuose priklauso nuo ekstrakcijos sąlygų, tokių kaip tirpiklis, temperatūra ir kita.

3.8.2 Kokybinis ir kiekybinis antocianinų nustatymas bruknių išspaudose

Kokybinis ir kiekybinis antocianinų tyrimas atliktas ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodu su kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių detektoriumi. Junginiai buvo identifikuojami pagal tikslias jų mases, molekulinės formules, UV spektro duomenis bei sulaikymo trukmes lyginant su gautais standarto duomenimis ir literatūra. Gauti duomenys pateikiami **19 lentelėje**.

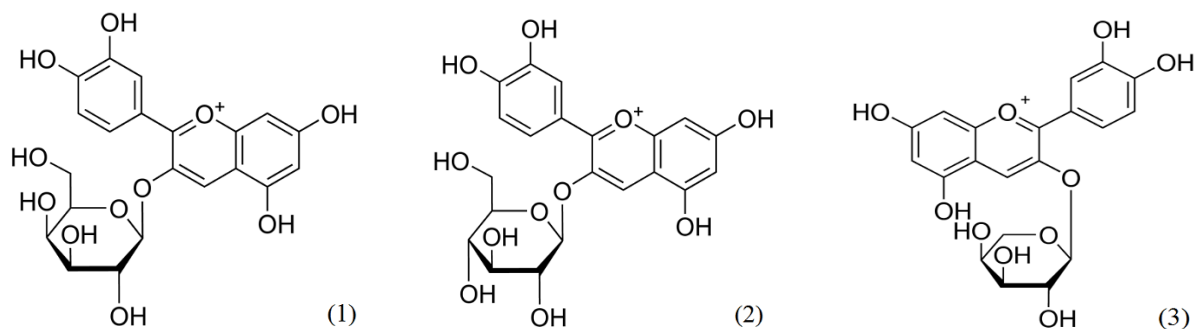
19 lentelė. Bruknių išspaudose identifikuotų antocianinų spektrinės charakteristikos

Smilės Nr.	Junginys	Formulė [M-H] ⁻	Sulaikymo trukmė, min	MS [M-H] ⁻ m/z	mg/100 g SM
1	Cianidin-3-galaktozidas	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	5,02	449,1080	11,33±0,03
2	Cianidin-3-gliukozidas	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	5,4	449,1070	1,40±0,01
3	Cianidin-3-arabinozidas	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	5,6	419,0973	3,08±0,02

Smilės (1) molekulinis jonas [M-H]⁻ m/z=449,1080 atitiko molekulinę formulę C₂₁H₂₁O₁₁. Šis junginys buvo identifikuotas kaip cianidin-3-galaktozidas. Smilės (2) molekuliniam jonui [M-H]⁻ m/z=449,1070 buvo priskirta molekulinė formulė C₂₁H₂₁O₁₁, o šis junginys identifikuotas kaip cianidin-3-gliukozidas. Smilės (3) molekulinis jonas [M-H]⁻ m/z=419,0973 atitiko molekulinę formulę C₂₀H₁₉O₁₀. Šis junginys identifikuotas kaip cianidin-3-arabinozidas.

Tyrimo metu nustatyta, kad bruknių uogų išspaudose vyrauja trijų tipų antocianinai (**19 lentelė**). Daugiausiai bruknių išspaudose identifikuota cianidin-3-galaktozido, kuris sudarė 71,66 % visų kiekybiškai nustatytų antocianinų kiekio. Beveik 4 kartais mažiau identifikuota cianidin-3-arabinozido (19,48 %), o mažiausiai 8,86 % nustatyta cianidin-3-gliukozido. Identifikuotų antocianinų formulės pateikiamos **18 paveiksle**. Literatūros apžvalgoje pateikiama, kad bruknėse yra apie 74,2 % cianidin-3-galaktozido, 23,9 % cianidin-3-arabinozido ir 1,9 %

cianidin-3-gliukozido [79]. Kitose mokslinėse publikacijose pateikiama, kad bruknių uogose taip pat vyrauja šie trys pagrindiniai antocianinai: cianidin-3-galaktozidas, kurio nustatoma nuo 30 iki 122 mg/100 g, cianidin-3-arabinozidas 4–95 mg/100 g ir cianidin-3-gliukozidas 4–6,6 mg/100 g uogų [15, 25, 30]. Be to manoma, kad literatūroje pateikiami itin skirtingi rezultatai gali būti gaunami dėl nevienodo žaliavos paruošimo, skirtingų ekstrakcijos ir tyrimų parametrų, taip pat antocianinų kiekiui įtakos turi klimatinė zona bei dirvožemis, kuriame bruknės buvo užaugintos. Taigi, lyginant eksperimento metu gautas vertes su literatūroje pateikiamomis matome, kad gauti rezultatai yra gana panašūs ir patenka į nurodytas vertes.



18 pav. Bruknių išspaudose identifikuoti antocianinai: (1) cianidin-3-galaktozidas; (2) cianidin-3-gliukozidas; (3) cianidin-3-arabinozidas

3.9 Preliminarus bioaktyvių junginių identifikavimas taikant ultraefektyviają skysčių chromatografiją

Bruknių išspaudų ekstraktai buvo tirti ultraefektyviosios skysčių chromatografijos (UHPLC-Q-TOF) sistema. MS analizė atlikta su neigiamu jonizacijos režimu, nes jame geriau jonizuojasi flavonoidai bei fenolinės rūgštys. Tirtuose ekstraktuose (lipofiliniuose, etanoliniuose ir vandeniniuose) esantys junginiai preliminariai identifikuoti gautų junginių tikslines molekulinės mases ir jų formules lyginant su internetinėse duomenų bazėse (ChemSpider, Metlin) pateiktais duomenimis. Iš viso tirtuose ekstraktuose aptikta 17 junginių, kurie pateikiami **20 lentelėje**, taip pat pateikiamos junginių formulės, junginių sulaikymo laikai, molinės masės.

Junginio (1) molekulinis jonas $[M-H]^-$ $m/z=179,0561$ atitiko $C_6H_{11}O_6$ formulę, kuri remiantis ChemSpider duomenų baze buvo preliminariai identifikuotas kaip gliukozė. Fragmentacijos metu susidaręs jonas $[M-H]^-$ $m/z=191,0561$, kuriam priskiriama $C_7H_{11}O_6$ formulė, preliminariai identifikuotas kaip chino rūgštis (2). Junginiui (3), kurio molekulinis jonas $[M-H]^-$ $m/z=371,1195$, priskirta formulė $C_{13}H_{23}O_{12}$, jis preliminariai nustatytas kaip 6-O-heptapiranozilgliukopiranozė. Jonas $[M-H]^-$ $m/z=383,1195$ atitiko formulę $C_{14}H_{23}O_{12}$. Junginys preliminariai identifikuotas kaip acetilmaltozė (4). Identifikuojant junginius (5), (6) ir (7) atitinkamai priskirti susidarę jonai $[M-H]^-$ $m/z=111,0088$, $m/z=353,0725$ ir $m/z=191,0197$, kuriems priskiriamos formulės $C_5H_3O_3$, $C_{12}H_{17}O_{12}$ ir $C_6H_7O_7$. Šie junginiai preliminariai

identifikuoti kaip 2-furankarboksirūgštis, 6-O-(β-D-gliukopiranoziloksi)-L-askorbo rūgštis ir citrinų rūgštis. Junginio (**8**) formulė $C_8H_{11}O_7$ atitiko molekulinį joną $[M-H]^-$ $m/z=219,0510$, kuris preliminariai identifikuotas kaip etilo citratas. Junginių (**9**) ir (**10**) molekuliniai jonai $[M-H]^-$ $m/z=289,0718$ ir $m/z=447,0933$ atitiko molekulinės formules $C_{15}H_{13}O_6$ ir $C_{21}H_{19}O_{11}$ bei preliminariai identifikuoti kaip katechinas ir kvercitrinas. Fragmentacijos metu susidaręs jonas $[M-H]^-$ $m/z=137,0244$ atitiko formulę $C_7H_5O_3$. Junginys preliminariai nustatytas kaip hidroksibenzoinė rūgštis (**11**). Junginio (**12**) molekulinis jonas $[MH]^-$ $m/z=329,0878$ atitiko $C_{14}H_{17}O_9$ molekulinę formulę, o junginio (**13**) atitiko $m/z=461,1301$ ir $C_{19}H_{25}O_{13}$ formulę, tačiau šių junginių nepavyko identifikuoti. Junginių (**14**), (**15**), (**16**) ir (**17**) molekuliniai jonai $[M-H]^-$ atitinkamai yra lygūs: $m/z=173,0819$, $m/z=355,1035$, $m/z=187,0976$ ir $m/z=193,0506$, kurie atitiko molekulinės formules $C_8H_{13}O_4$, $C_{16}H_{19}O_9$, $C_9H_{15}O_4$ bei $C_{10}H_9O_4$ ir buvo preliminariai identifikuoti kaip subero rūgštis, 2-gliukoziloksi-4-metokscinamono rūgštis, azelaino rūgštis ir ferulino rūgštis.

Daugiausiai 13 junginių preliminariai identifikuota etanoliniame ekstrakte, gautame po pagreitintos ekstrakcijos. Po 10 junginių identifikuota po PET ekstrakcijos gautame vandeniniame ekstrakte bei po maceravimo etanolio ir vandens mišiniu gautame etanoliniame ekstrakte. Taip pat, buvo tirti lipofiliški ekstraktai, tačiau juose fenolinių junginių neaptikta. Mokslinėse publikacijose pateikiama, kad bruknėse yra identifikuojami tokie junginiai kaip chino, citrinų, askorbo, cinamono, hidroksibenzoinė, ferulino rūgštys ir jų dariniai, taip pat gliukozė, katechinas, kvercitrinas ir jų dariniai, kurie buvo preliminariai identifikuoti ir šio eksperimento ekstraktuose [16, 22, 80]. Tačiau, norint tiksliai identifikuoti junginius, esančius bruknių išspaudų ekstraktuose, turi būti atlikti detalesni tyrimai.

20 lentelė. Identifikuotų junginių charakteristikos bruknių išspaudų ekstraktuose

Eil. Nr.	Junginys	Formulė [M-H] ⁻	Sulaikymo trukmė, min	MS [M-H] ⁻ , m/z	PET-EtOH	PET-H ₂ O	Mac-EtOH/H ₂ O
1.	Gliukozė	C ₆ H ₁₁ O ₆	0,3	179,0561	+	+	+
2.	Chino rūgštis	C ₇ H ₁₁ O ₆	0,3	191,0561	+	+	+
3.	6-O-heptapiranozilgliukopiranozė	C ₁₃ H ₂₃ O ₁₂	0,35	371,1195	+	-	-
4.	Acetilmaltozė	C ₁₄ H ₂₃ O ₁₂	0,4	383,1195	+	+	+
5.	2-furankarboksirūgštis	C ₅ H ₃ O ₃	0,7	111,0088	-	-	+
6.	6-O-(β-D-gliukopiranoziloksi)-L-askorbo rūgštis	C ₁₂ H ₁₇ O ₁₂	0,7	353,0725	+	+	+
7.	Citrinų rūgštis	C ₆ H ₇ O ₇	0,9	191,0197	+	+	+
8.	Etilo citratas	C ₈ H ₁₁ O ₇	1,5	219,0510	-	+	-
9.	Katechinas	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	1,7	289,0718	+	+	+
10.	Kvercitrinas	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	1,7	447,0933	+	-	+
11.	Hidroksibenzoinė rūgštis	C ₇ H ₅ O ₃	1,7	137,0244	-	+	-
12.	Nežinomas junginys	C ₁₄ H ₁₇ O ₉	1,9	329,0878	+	-	+
13.	Nežinomas junginys	C ₁₉ H ₂₅ O ₁₃	1,9	461,1301	-	-	+
14.	Subero rūgštis	C ₈ H ₁₃ O ₄	2,3	173,0819	+	+	-
15.	2-gliukoziloksi-4-metoksicinamono rūgštis	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	2,3	355,1035	+	-	-
16.	Azelaino rūgštis	C ₉ H ₁₅ O ₄	2,8	187,0976	+	+	-
17.	Ferulino rūgštis	C ₁₀ H ₉ O ₄	2,9	193,0506	+	-	-

+ aptikta; - neaptikta.

IŠVADOS

1. Atlikus bruknių išspaudų cheminės sudėties tyrimus nustatyta, kad išspaudose drėgmės yra 3,96 g/100 g, baltymų – 9,47 g/100 g, riebalų – 11,09 g/100 g, pelenų kiekis – 1,29 g/100 g.
2. Nustatytos optimalios superkrizinės ekstrakcijos anglies dioksidu parametrų vertės: slėgis 52,7 MPa, 79 °C temperatūra ir laikas 111 min, kurioms esant gaunama didžiausia ekstrakcijos išeiga 12,07 g/100 g SM. Nustatyti reikšmingi proceso parametrai, kurie pagal svarbumą gali būti išdėstomi šia tvarka: slėgis > dinaminės ekstrakcijos trukmė > temperatūra.
3. Nustatytos optimalios pagreitintos ekstrakcijos etanoliu parametrų vertės didžiausiai ekstrakto išeigai (63,36 g/100 g SM) iš bruknių išspaudų liekanos po SKE–CO₂ gauti: temperatūra 83 °C, laikas 45 min (15 min × 3 ciklai). Pagreitintos ekstrakcijos etanoliu liekaną paveikus subkritiniu vandeniu (130 °C temperatūra, 30 min ekstrakcijos trukmė) gauta išeiga buvo 3,21 g/100 g SM.
4. Soksleto ekstrakcijos metu iš bruknių išspaudų išskirta 15,20 g/100 g ekstrakto, kurio kiekis buvo 3 % didesnis, nei taikant superkrizinę CO₂ ekstrakciją. Maceravimo ekstrakcijos etanolio ir vandens mišiniu (70:30 t/t) gauta išeiga (36,67 g/100 g SM) buvo 1,5 karto mažesnė už išeigą gautą pagreitintos ekstrakcijos etanoliu metu. Atlikus fermentinę hidrolizę su kietu likučiu po maceravimo ekstrakcijos gauta išeiga 13,28 g/100 g SM.
5. Įvertinus ekstraktų antioksidacinį aktyvumą nustatyta, kad ABTS⁺⁺ radikalo surišimo efektyvumas bruknių išspaudų ekstraktuose mažėjo nuo 106,67 iki 1,15 mg TE/g SM, o išmatuota deguonies radikalų surišimo geba ORAC metodu kito nuo 1,29 iki 85,20 mg TE/g SM. Taip pat nustatytas bendras fenolinių junginių kiekis buvo 0,49–22,06 mg GRE/g SM. Didžiausiu aktyvumu pasižymėjo poliniais tirpikliais išgauti ekstraktai: pagreitintoje ekstrakcijoje etanoliu ir maceravimo ekstrakcijoje etanolio–vandens mišiniu. Pritaikius QUENCHER procedūrą nustatytas kietos frakcijos prieš ekstrakciją ir po skirtingų ekstrakcijų bendras fenolinių junginių kiekis (3,75–30,37 mg GRE/g SM), atliktas radikalo blukinimo metodas ABTS⁺⁺ (30,16–187,63 mg TE/g SM) bei išmatuota deguonies radikalų surišimo geba (11,71–85,26 mg TE/g SM). Bruknių išspaudose esantys bioaktyvieji junginiai efektyviausiai išskiriami taikant pagreitintos ekstrakcijos sistemą su etanoliu ir vandeniu bei vykdant maceravimo ekstrakciją, kadangi po šių ekstrakcijų liekanoje lieka tik nedidelis kiekis bioaktyvių junginių.
6. Lipofiliniuose ekstraktuose dujų chromatografijos metodu nustatyta riebalų rūgščių kompozicija. Soksleto ekstraktoje nustatytos 9, o superkrizinės ekstrakcijos anglies dioksidu

ekstraktuose 8 riebalų rūgštys, iš kurių daugiausiai yra oleino (14,79–17,65 %), linolo (34,84–37,51 %), linoleno (39,85–43,27 %) rūgščių. Superkryzinės ekstrakcijos anglies dioksidu optimaliomis sąlygomis gautame ekstrakte nustatytas peroksidų skaičius buvo 5,83 mekv O₂/kg.

7. Nustatytas bruknių išspaudų superkryzinės ekstrakcijos anglies dioksidu (optimaliomis sąlygomis) gauto lipofilinio ekstrakto oksidacinis stabilumas deguonies, slėgio ir temperatūros poveikyje Oksipres metodu buvo 2,75 val, o Rancimat metodu – 3,37 val. Išmatavus ekstraktų įtaką majonezo oksidaciniam stabilumui Oksipres ir Rancimat metodais, gautos indukcinio periodo vertės kinta nuo 1,36 iki 2,50 val Oksipres metode ir nuo 3,54 iki 4,45 val Rancimat metode. Stabiliausi majonezo bandiniai gauti kuriuose buvo įterpta 2 % ekstrakto. Be to, ilgesnis stabilumas nustatytas bandiniuose, kuriuose buvo įterpti 2 % etanolinio ir vandeninio ekstrakto.
8. Nustatytas bendras antocianinų kiekis poliniuose ekstraktuose buvo nuo 0,51 iki 4,48 mg/1 g ekstrakto. Taip pat, nustatyta, kad pagrindiniai antocianai bruknių išspaudose yra cianidin-3-galaktozidas ir cianidin-3-arabinozidas, atitinkamai sudarantys 71,66 % ir 19,48 % šių junginių grupės, o cianidin-3-gliukozidas sudaro 8,86 % visų kiekybiškai nustatytų antocianų.
9. Gautuose ekstraktuose ultra efektyviosios skysčių chromatografijos metodu buvo preliminariai identifikuoti bioaktyvūs junginiai, bendrai ekstraktuose aptikta 17 junginių. Visuose ekstraktuose preliminariai identifikuoti šie junginiai: gliukozė, chino rūgštis, acetilmaltozė, 6-O-(β-D-gliukopiranoziloksi)-L-askorbo rūgštis, citrinų rūgštis ir katechinas.
10. Atlikti tyrimai parodė, kad vykdydami aukšto slėgio bei fermentinio apdorojimo biorafinavimo procesus iš bruknių išspaudų galime gauti vertingus funkcionaliuosius ingredientus. Superkryzinis ekstraktas galėtų būti panaudojamas polinesočiųjų riebalų, kurių yra apie 80 g/100 g ekstrakto, maisto papildų gamybai. Likusią kietą frakciją, po superkryzinės ekstrakcijos anglies dioksidu, apdoroję pagreitintos ekstrakcijos sistemoje su poliniais tirpikliais – etanoliu (39,58 mg GRE/g ekstrakto) ir vandeniu (87,08 mg GRE/g ekstrakto) galime gauti vertingus fenolinius junginius, o papildomas žaliavos apdorojimas fermentais dar labiau padidina bioaktyviųjų junginių išėigą iš bruknių išspaudų. Be to, bruknių išspaudose nustatyta antocianinų, kurie gali būti panaudojami kaip natūralūs maisto dažikliai.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. GÓMEZ, M., MARTINEZ, M.M. Fruit and vegetable by-products as novel ingredients to improve the nutritional quality of baked goods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017. pp. 1-17. Prieiga per: doi: [10.1080/10408398.2017.1305946](https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1305946)
2. DAVIS, L. Quality and consumer acceptance of berry fruit pomace-fortified specialty mustard, 2017.
3. NILE, S.H., and S.W. PARK. Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 2014, 30(2), 134-144. ISSN 1873-1244.
4. KRENN, L., et al. Anthocyanin-and proanthocyanidin-rich extracts of berries in food supplements—analysis with problems. *Die Pharmazie-an International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007, 62(11), pp. 803-812.
5. STRUCK, S., et al. Berry pomace—a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *International Journal of Food Science & Technology*. 2016, 51(6), pp. 1305-1318.
6. APODACA, W. *All about climate plants*. United States: World Technologies, 2016. ISBN 9781283487856.
7. BANDZAITIENĖ, Z., R. DAUBARAS, and J. LABOKAS. *Bruknė. Vaccinium vitis-idaea L.* Vilnius: Botanikos instituto leidykla, 2007 ISBN 9789986662334.
8. HEIDENREICH, C. The Lowdown on lingonberries. *New York Berry News*, 2010, 9(6), pp. 7- 8.
9. LI, J., et al. Phenology and yield of native fruits cloudberry/bakeapple (*Rubus chamaemorus L.*) and lingonberry/partridgeberry (*Vaccinium vitis-idaea L.*) Grown in Southern Labrador, Canada. *Canadian Journal of Plant Science*, 2016, 96(3), pp. 329-338. ISSN 1918-1833.
10. PENHALLEGON, R. and BURT, L.A. *Economic evaluation of lingonberry production in Oregon*. Corvallis, Or.: Extension Service, Oregon State University, 2003.
11. SU, Z. Anthocyanins and flavonoids of *Vaccinium L.*, 2012. *Faculty Publications*. 3. Prieiga per: https://scholarworks.sfasu.edu/agriculture_facultypubs/3
12. Prieiga per: <https://frida.fooddata.dk/ShowFood.php?foodid=769&2>, [žiūrėta 2018 03 20].
13. *LST EN ISO 12966-1:2015. Gyvūniniai ir augaliniai riebalai ir aliejus. Riebalų rūgščių metilesterių dujų chromatografija. 1 Dalis. Riebalų rūgščių metilesterių modernios dujų chromatografijos gairės (ISO 12966-1:2014) (Elektroninis Išteklius)*. 2015-04-17. ed. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2015.
14. MIKULIC-PETKOVSEK, M., et al. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *Journal of Food Science*, 2012, 77(10). Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02896.x>

15. LEE, J. and C.E. FINN. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) grown in the Pacific Northwest of North America: Anthocyanin and free amino acid composition. *Journal of functional foods*. 2012, 4(1), 213-218. ISBN 1756-4646. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.10.007>.
16. KLAVINS, L., KLAVINA, L., HUNA, A. and KLAVINS, M. Polyphenols, Carbohydrates and lipids in berries of *Vaccinium* species. *Environmental and Experimental Biology*. 2015, vol. 13. pp. 147-158. ISSN 2255-9582.
17. BERE, E. Wild berries: a good source of omega-3. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2007, 61(3), pp. 431-433. ISSN 1476-5640.
18. BAKOWSKA-BARCZAK, A.M., et al. Survey of bioactive components in Western Canadian berries. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2007, 85(11), pp. 1139-1152. Prieiga per: doi: [10.1139/Y07-102](https://doi.org/10.1139/Y07-102)
19. SZAKIEL, A., PĄCZKOWSKI, C., KOIVUNIEMI, H. and HUTTUNEN, S. Comparison of the triterpenoid content of berries and leaves of lingonberry *Vaccinium vitis-idaea* from Finland and Poland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, 60(19), pp. 4994-5002.
20. AZZI, A. Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*, 2017. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.004>.
21. PALOZZA, P., et al. RETRACTED: Design, synthesis, and antioxidant potency of novel α -tocopherol analogues in isolated membranes and intact cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008, 44(7), pp. 1452–1464. ISBN 0891-5849.
22. KYLLI, P., et al. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) and European cranberry (*Vaccinium microcarpon*) Proanthocyanidins: isolation, identification, and bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 59(7), pp. 3373-3384. Prieiga per: doi: [10.1021/jf104621e](https://doi.org/10.1021/jf104621e)
23. PANDEY, K.B. and RIZVI, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009, 2(5), pp. 270-278. ISSN 1942-0994.
24. KLAVINS, L., KVIESIS, J., NAKURTE, I. and KLAVINS, M. Berry press residues as a valuable source of polyphenolics: extraction optimisation and analysis. *LWT - Food Science and Technology*. 2018, 93, pp. 583-591. Prieiga per: doi: [10.1016/j.lwt.2018.04.021](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.021)
25. DUDONNÉ, S., et al. Comprehensive analysis of phenolic compounds and abscisic acid profiles of twelve native Canadian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015, 44, pp. 214-224. Prieiga per: doi: [10.1016/j.jfca.2015.09.003](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.09.003)
26. JUNGFER, E., et al. Comparing procyanidins in selected *Vaccinium* species by UHPLC-MS2 with regard to authenticity and health effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, 60(38), pp. 9688-9696. Prieiga per: doi: [10.1021/jf303100q](https://doi.org/10.1021/jf303100q)

27. MIKULIC-PETKOVSEK, M., et al. HPLC–MSn identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chemistry*. 2012, 135(4), pp. 2138-2146. ISBN 0308-8146. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodchem.2012.06.115](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.115)
28. KYLLI, P. Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties. *Department of Food and Environmental Sciences, University of Helsinki*. 2010. ISBN:9789521071157.
29. VYAS, P. Antioxidant properties of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) plants. *Memorial University of Newfoundland*. 2014.
30. GRACE, M.H., et al. Comparative analysis of phenolic content and profile, antioxidant capacity, and anti-inflammatory bioactivity in wild Alaskan and commercial *Vaccinium* berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 62(18), pp. 4007-4017. Prieiga per: doi: [10.1021/jf403810y](https://doi.org/10.1021/jf403810y)
31. SHAHIDI, F. and Y. ZHONG. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*. 2010, 39(11), pp. 4067-4079. Prieiga per: doi: [10.1039/b922183m](https://doi.org/10.1039/b922183m)
32. YIN, H., XU, L. and PORTER, N.A. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*. 2011, 111(10), pp. 5944-5972. Prieiga per: doi: [10.1021/cr200084z](https://doi.org/10.1021/cr200084z)
33. SALDAÑA, M. and MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S. Oxidative stability of fats and oils measured by differential scanning calorimetry for food and industrial applications. In: *Applications of Calorimetry in a Wide Context-Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*. InTech, 2013. ISBN 9789535109471.
34. COLAKOGLU, A.S. Oxidation kinetics of soybean oil in the presence of monoolein, stearic acid and iron. *Food Chemistry*. 2007, 101(2), 724-728. ISBN 0308-8146. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodchem.2006.01.049](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.049)
35. LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A. and CHANDRA, N. Free Radicals, Antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 2010, 4(8), pp. 118-126. ISSN 0976-2787.
36. BUTNARIU, M. and GROZEA, I. Antioxidant (Antiradical) compounds. j bioequiv availab 4: *Molecules Involved in Recovery and in De Novo Mechanisms*. 2012, 4(6), xvii-xix. ISSN: 0975-0851.
37. DAI, J. and MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010, 15(10), pp. 7313-7352. ISSN 1420-3049.
38. GARCIA-SALAS, P., et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*. 2010, 15(12), pp. 8813-8826. ISSN 1420-304.

39. AZMIR, J., et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a Review. *Journal of Food Engineering*. 2013, 117(4), pp. 426-436. ISBN 0260-8774. Prieiga per: doi: [10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014)
40. LUQUE DE CASTRO, M.D. and PRIEGO-CAPOTE, F. Comprehensive sampling and sample preparation J. PAWLISZYN ed., Oxford: Academic Press, 2.05 - *Soxhlet Extraction Versus Accelerated Solvent Extraction*. 2012, pp. 83-103. ISBN 9780123813749.
41. DASO, A.P. and OKONKWO, O.J. Conventional extraction techniques: Soxhlet and liquid-liquid extractions and evaporation. *Analytical Separation Science*. 2015. Prieiga per: doi:[10.1002/9783527678129.assep053](https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep053)
42. CVJETKO BUBALO, M., et al. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing*, 2018. ISBN 0960-3085. Prieiga per: doi: [10.1016/j.fbp.2018.03.001](https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001)
43. CVJETKO BUBALO, M., VIDOVIĆ, S., RADOJČIĆ REDOVNIKOVIĆ, I. and JOKIĆ, S. Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2015, 90(9), pp. 1631-1639. Prieiga per: doi:[10.1002/jctb.4668](https://doi.org/10.1002/jctb.4668)
44. DEL PILAR SÁNCHEZ-CAMARGO, Andrea, et al. Bioactives obtained from plants, seaweeds, microalgae and food by-products using Pressurized liquid extraction and Supercritical fluid extraction. *Green Extraction Techniques: Principles, Advances and Applications*. 2017, 76(27). ISBN 0166-526X. Prieiga per: doi: [10.1016/bs.coac.2017.01.001](https://doi.org/10.1016/bs.coac.2017.01.001)
45. BHUSNURE, O., et al. Importance of supercritical fluid extraction techniques in pharmaceutical industry: A Review. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 2015, 5(12). ISSN 2231-6876.
46. DE MELO, M.M.R., SILVESTRE, A.J.D. and SILVA, C.M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2014, 92, pp. 115-176. ISBN 0896-8446. Prieiga per: doi: [10.1016/j.supflu.2014.04.007](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007)
47. SOTO-MALDONADO, C. and ZÚÑIGA-HANSEN, M.E. Water extraction of bioactive compounds H.D. GONZÁLEZ and M.J.G. MUÑOZ eds., Elsevier. *Chapter 14 - Enzyme-Assisted Extraction of Phenolic Compounds*. 2017, pp. 369-384. ISBN 9780128093801.
48. PURI, M., SHARMA, D. and BARROW, C.J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in biotechnology*. 2012, 30(1), pp. 37-44. ISBN 0167-7799. Prieiga per: doi: [10.1016/j.tibtech.2011.06.014](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014).
49. NADAR, S.S., RAO, P. and RATHOD, V.K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A Review. *Food Research International*, 2018. ISBN 0963-9969. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodres.2018.03.006](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006)

50. SOWBHAGYA, H.B. and CHITRA, V.N. Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010, 50(2), pp. 146-161. ISSN 1040-8398.
51. LST ISO 1442:2000. Mėsa ir mėsos produktai. Drėgmės kiekio nustatymas(Pamatinis metodas)(Tapatus ISO 1442:1997(E)). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2000.
52. LST ISO 1443:2000. Mėsa ir mėsos produktai. Bendrojo riebalų kiekio nustatymas(Tapatus ISO 1443:1973(E)). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2000.
53. LST ISO 936:2000. Mėsa ir mėsos produktai. Bendrojo pelenų kiekio nustatymas(Tapatus ISO 936:1978)(E)). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2000.
54. Varpinių ir ankštinių javų grūdai. Azoto kiekio nustatymas Ir žalių baltymų kiekio skaičiavimas. *Kjeldalio Metodas (ISO 20483:2013) (Elektroninis Išteklius)*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2014.
55. Cunniff, Patricia., Association of Official Analytical Chemists.,. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1995 /z-wcorg/. ISBN 0935584544 9780935584547.
56. KRAUJALIS, P. and 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, 73, pp. 80-86. ISBN 0896-8446. Prieiga per: doi: [10.1016/j.supflu.2012.11.009](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.11.009)
57. KRYŽEVIČIŪTĖ, N., KRAUJALIS, P. and VENSKUTONIS, P.R. Optimization of high pressure extraction processes for the separation of raspberry pomace into lipophilic and hydrophilic fractions. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2016, 108, pp. 61-68. ISBN 0896-8446. Prieiga per: doi: [10.1016/j.supflu.2015.10.025](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.10.025)
58. BASEGMEZ, H.I.O., et al. Biorefining of blackcurrant pomace into high value functional ingredients using Supercritical CO₂, Pressurized liquid and enzyme assisted extractions. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2017, 124, pp. 10-19. ISBN 0896-8446. Prieiga per: doi: [10.1016/j.supflu.2017.01.003](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.01.003).
59. GÖKMEN, V., SERPEN, A. and FOGLIANO, V. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: The 'QUENCHER' Approach. *Trends in Food Science & Technology*. 2009, 20(6-7), pp. 278-288. ISBN 0924-2244. Prieiga per: doi: [10.1016/j.tifs.2009.03.010](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.03.010)
60. KITRYTĖ, V., ŠADUIKIS, A. and VENSKUTONIS, P.R. Assessment of antioxidant capacity of Brewer's spent grain and its Supercritical carbon dioxide extract as sources of valuable dietary ingredients. *Journal of Food Engineering*. 2015, 167, pp. 18-24. ISBN 0260-8774. Prieiga per: doi: [10.1016/j.jfoodeng.2014.12.005](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.12.005)

61. SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R. and LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: *Methods in enzymology*. Academic press, 1999, pp. 152-178. ISBN 0076-6879. Prieiga per: doi: [10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
62. RE, R., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 1999, 26(9-10), pp. 1231-1237. ISBN 0891-5849. Prieiga per: doi: [10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
63. PRIOR, R.L., et al. Assays for Hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51(11), pp. 3273-3279.
64. LST EN ISO 3960:2017. Gyvūniniai ir augaliniai riebalai ir aliejus. Peroksidų skaičiaus nustatymas. Jodometrinis (Vizualus) nustatymas pagal ekvivalentinį tašką (ISO 3960:2017) [Elektroninis Išteklius]. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2017.
65. TROJAKOVA, L., REBLOVA, Z. and POKORNY, J. Determination of the oxidative stability of fats and oils using the Oxipres apparatus. *Czech Journal of Food Sciences-UZPI (Czech Republic)*, 1999.
66. MÉNDEZ, E., SANHUEZA, J., SPEISKY, H. and VALENZUELA, A. Comparison of Rancimat evaluation modes to assess oxidative stability of fish oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1997, 74(3), pp. 331-332.
67. LÄUBLI, M.W. and BRUTTEL, P.A. Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the Rancimat method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1986, 63(6), pp. 792-795.
68. MOREDA, W., PEREZ-CAMINO, M. and CERT, A. Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils. *Journal of Chromatography A*. 2001, 936 (1-2), pp. 159-171.
69. PRINCIPLE, A. AOAC official method total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines. 2005.
70. KRAUJALYTĖ, V., et al. Antioxidant properties and polyphenolic compositions of fruits from different European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes. *Food chemistry*. 2013, 141(4), pp. 3695-3702. ISBN 0308-8146. Prieiga per: doi: [10.1016/j.foodchem.2013.06.054](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.054)
71. MÄÄTTÄ-RIIHINEN, K.R., et al. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52(14), pp. 4477-4486. Prieiga per: doi: [10.1021/jf049595y](https://doi.org/10.1021/jf049595y)

72. WHITE, B.L., HOWARD, L.R. and PRIOR, R.L. Proximate and polyphenolic characterization of cranberry pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 58(7), pp. 4030-4036. Prieiga per: [doi:10.1021/jf902829g](https://doi.org/10.1021/jf902829g)
73. KLAVINS, M., KUKELA, A., KVIESIS, J. and KLAVINS, L. Valorisation of berry pomace: from waste to bioactive compounds. In: *Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration*. Springer, Cham, 2017. p. 1145-1146. ISBN 9783319705484.
74. YANG, B., KOPONEN, J., TAHVONEN, R. and KALLIO, H. Plant sterols in seeds of two species of *Vaccinium* (*V. myrtillus* and *V. vitis-idaea*) naturally distributed in Finland. *European Food Research and Technology*. 2003, 216(1), pp. 34-38. ISSN1438-2385.
75. YANG, B., AHOTUPA, M., MÄÄTTÄ, P. and KALLIO, H. Composition and antioxidative activities of Supercritical CO₂-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Research International*. 2011, 44(7), pp. 2009-2017. ISBN 0963-9969.
76. ALIMENTARIUS, C. Codex standard for named vegetable oils. *Codex Stan*, 1999, vol. 210. pp. 1-13.
77. WANG, S.Y., et al. Antioxidant activity in lingonberries (*Vaccinium vitis-idaea* L.) and its inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor-kb, and mitogen-activated protein kinases activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53(8), pp. 3156-3166. Prieiga per: [doi: 10.1021/jf048379m](https://doi.org/10.1021/jf048379m)
78. ISAAK, C.K., et al. Manitoba lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) bioactivities in Ischemia-reperfusion injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, 63(23), pp. 5660-5669. Prieiga per: [doi: 10.1021/acs.jafc.5b00797](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00797)
79. HEINONEN, M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics—a Finnish perspective. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007, 51(6), pp. 684-691. Prieiga per: [doi:10.1002/mnfr.200700006](https://doi.org/10.1002/mnfr.200700006)
80. EK, S., KARTIMO, H., MATTILA, S. and TOLONEN, A. Characterization of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54(26), pp. 9834-9842. Prieiga per: [doi: 10.1021/jf0623687](https://doi.org/10.1021/jf0623687)

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovui prof. dr. Petrui Rimantui Venskutoniui už temos idėją, naudingas mokslines konsultacijas, pastabas, pasitikėjimą bei skatinimą tobulėti. Dėkoju KTU maisto mokslo ir technologijos katedros darbuotojams bei doktorantams už pagalbą atliekant mokslinius tyrimus bei nuolatinį palaikymą. Kolegoms – už draugišką darbinę atmosferą ir gerą nuotaiką. Nuoširdžiai dėkoju tėvams ir draugams už moralinį palaikymą, supratingumą ir kantrybę. Ačiū visiems prisidėjusiems prie šio darbo įgyvendinimo.