



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Aistė Narkevičiūtė**

**Funkcionaliųjų ingredientų sukūrimas iš gervuogių  
(*Rubus subgen. Rubus*) išspaudų taikant aukšto slėgio ir  
fermentinio biorafinavimo procesus**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovas**

Prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis

**KAUNAS, 2018**

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**Funkcionaliųjų ingredientų sukūrimas iš gervuogių (*Rubus subgen. Rubus*) išspaudų taikant aukšto slėgio ir fermentinio biorafinavimo procesus**

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

**Vadovas**

Prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis

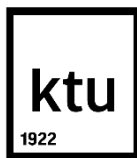
**Recenzentė**

Lekt. dr. Milda Pukalskienė

**Projekto autorė**

Aistė Narkevičiūtė

**KAUNAS, 2018**



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Aistė Narkevičiūtė

**Maisto mokslas ir sauga (kodas 621E40001)**

„Funkcionaliujų ingredientų sukūrimas iš gervuogių (*Rubus subgen. Rubus*) išspaudų taikant aukšto slėgio ir fermentinio biorafinavimo procesus“

**AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

2018 m. birželio 4 d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Aistės Narkevičiūtės**, baigiamasis projektas tema „**Funkcionaliujų ingredientų sukūrimas iš gervuogių (*Rubus subgen. Rubus*) išspaudų taikant aukšto slėgio ir fermentinio 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.

---

(vardas ir pavardė)

---

(parašas)

## TURINYS

IŽANGA.....	14
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	16
1.1. Gervuogių apibūdinimas ir paplitimas .....	16
1.2. Gervuogių biocheminė sudėtis ir maistinė vertė .....	17
1.2.1. Taninai .....	18
1.2.2. Antocianinai .....	18
1.2.3. Fenolinės rūgštys .....	20
1.2.4. Elago rūgštis .....	20
1.2.5. Tokoferoliai .....	20
1.2.6. Fitosteroliai .....	21
1.2.7. Riebalų rūgštys .....	21
1.3. Lipidų oksidacijos procesas .....	22
1.4. Antioksidantai ir jų poveikis .....	24
1.4.1. Natūralūs antioksidantai .....	25
1.4.2. Sintetiniai antioksidantai .....	25
1.5. Bioaktyviųjų junginių išskyrimo metodai .....	25
1.5.1. Soksleto ekstrakcija .....	26
1.5.2. Superkritinė ekstrakcija CO <sub>2</sub> .....	27
1.5.3. Ekstrakcija padidintame slėgyje tirpikliais (EPS) .....	29
1.5.4. Ekstrakcija naudojant fermentus .....	30
1.6. Procesų optimizavimas .....	31
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI .....	33
2.1. Tiriamasis objektas ir jo apdirbimas .....	33
2.2. Medžiagos ir cheminiai reagentai .....	33
2.3. Gervuogių išspaudų cheminės sudėties nustatymas .....	33
2.3.1. Drėgmės kiekio nustatymas .....	33
2.3.2. Baltymų kiekio nustatymas .....	34
2.3.3. Riebalų kiekio nustatymas .....	34
2.3.4. Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas .....	35
2.4. Eksperimentinio plano sudarymas .....	35
2.5. Soksleto ekstrakcija .....	38
2.6. Superkritinė ekstrakcija CO <sub>2</sub> (SKE–CO <sub>2</sub> ) .....	38
2.7. Ekstrakcija padidintame slėgyje (EPS) .....	38
2.8. SKE–CO <sub>2</sub> ir EPS ekstrakcijų optimizavimas .....	39
2.9. Maceravimas ir purtymas purtyklėje .....	40
2.10. Fermentinė hidrolizė .....	40
2.10.1. Fermento aktyvumo nustatymas .....	40

2.11. Ekstraktų bei kietos frakcijos antioksidacinių savybių tyrimai .....	41
2.11.1. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK).....	41
2.11.2. ABTS <sup>++</sup> laisvųjų radikalų sujungimo metodas .....	42
2.11.3. Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas (ORAC).....	42
2.12. Riebalų oksidacinio stabilumo nustatymo tyrimai.....	43
2.12.1. Peroksidų skaičiaus nustatymas jodometriniu metodu.....	43
2.12.2. Riebalų oksidacinio stabilumo nustatymas Oksipres metodu .....	44
2.12.3. Riebalų oksidacinio stabilumo nustatymas Rancimat metodu .....	45
2.13. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas dujų chromatografijos metodu .....	45
2.14. Preliminari ekstraktų analizė ultraefektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UESCh-Q-TOF) .....	46
2.15. Antocianinų analizė.....	46
2.15.1. Bendras antocianinų kiekis.....	46
2.15.2. Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė.....	47
2.16. Rezultatų statistinė analizė.....	48
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	49
3.1. Gervuogių išspaudų cheminė sudėtis .....	49
3.2. Gervuogių išspaudų superkritinės ekstrakcijos CO <sub>2</sub> optimizavimas .....	49
3.3. Gervuogių išspaudų ekstrakcijos padidintame slėgyje optimizavimas.....	55
3.4. Gervuogių išspaudų ekstrakcija taikant tradicinius, aukšto slėgio ir fermentinius metodus, bei išėigų palyginimas .....	58
3.5. Gervuogių išspaudų antioksidacinių savybių įvertinimas.....	60
3.5.1. Gervuogių sulčių ir ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas .....	60
3.5.2. Išspaudų ir kietos frakcijos antioksidacinių savybių įvertinimas .....	62
3.6. Gervuogių išspaudų ekstraktų oksidacinis stabilumas.....	65
3.6.1. Peroksidų skaičiaus nustatymas .....	65
3.6.2. Ekstraktų oksidacinis stabilumas, vertinant Oksipres ir Rancimat metodais .....	65
3.7. Riebalų rūgščių sudėtis .....	68
3.8. Preliminarus bioaktyvių junginių identifikavimas taikant ultraefektyviają skysčių chromatografiją .....	70
3.9. Gervuogių išspaudų ir ekstraktų antocianinų analizė .....	73
3.9.1. Bendras antocianinų kiekis gervuogių išspaudų ekstraktuose ir gervuogių sultyse... 73	
3.9.2. Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė.....	74
IŠVADOS.....	77
BIBLIOGRAFINIŲ NUORODŲ SĄRAŠAS .....	79

## LENTELIŲ SĄRAŠAS

<b>1 lentelė.</b> Gervuogių sudėtis, pateikta literatūroje (g/100 g šviežių uogų) [24].....	17
<b>2 lentelė.</b> Mineralinių medžiagų kiekis gervuogių uogose (mg/100 g uogų) [25, 26].....	18
<b>3 lentelė.</b> Tokoferolių kiekis gervuogių išspaudų ekstraktuose (mg/100 g) [11] .....	21
<b>4 lentelė.</b> Riebalų rūgštys gervuogių ekstraktuose, % [11, 36].....	22
<b>5 lentelė.</b> SKE–CO <sub>2</sub> ir EPS pasirinkti nepriklausomi kintamieji optimizavimui .....	39
<b>6 lentelė.</b> Gervuogių uogų ir išspaudų cheminė sudėtis, g/100 g .....	49
<b>7 lentelė.</b> SKE–CO <sub>2</sub> centriškai kompozicinio plano parametrų vertės ir gautos išėigos .....	50
<b>8 lentelė.</b> SKE–CO <sub>2</sub> kvadratinio modelio dispersinė analizė .....	51
<b>9 lentelė.</b> SKE–CO <sub>2</sub> ekstrakcijos metu gautos išėigos.....	54
<b>10 lentelė.</b> Eksperimentinis EPS <sub>EiOH</sub> planas ir gautos bei prognozuojamos išėigos.....	55
<b>11 lentelė.</b> EPS <sub>EiOH</sub> modelio dispersinė analizė .....	56
<b>12 lentelė.</b> Ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas.....	61
<b>13 lentelė.</b> Kietos frakcijos antioksidacinių savybių įvertinimas .....	64
<b>14 lentelė.</b> Majonezo su gervuogių išspaudų ekstraktais indukciniai periodai.....	66
<b>15 lentelė.</b> Riebalų rūgštys ir jų kiekiai gervuogių išspaudų ekstraktuose, %.....	69
<b>16 lentelė.</b> Gervuogių išspaudų ekstraktuose nustatyti junginiai.....	72
<b>17 lentelė.</b> Bendras antocianinų kiekis gervuogių išspaudų ekstraktuose .....	73
<b>18 lentelė.</b> Gervuogių išspaudose ir ekstraktuose nustatyti antocianinai.....	74

## PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

<b>1 pav.</b> Gervuogė ( <i>Rubus subgen. Rubus</i> ).....	16
<b>2 pav.</b> Pagrindinių antocianinų gervuogėse cheminės formulės.....	19
<b>3 pav.</b> $\gamma$ – tokoferolio cheminė formulė.....	21
<b>4 pav.</b> $\beta$ – sitosterolio cheminė formulė.....	21
<b>5 pav.</b> Soksleto aparatas [53].....	26
<b>6 pav.</b> Diagrama, parodanti superkritinį tašką [57].....	27
<b>7 pav.</b> CO <sub>2</sub> ekstraktoriaus schema [53].....	28
<b>8 pav.</b> Ekstrakcijos padidintame slėgyje ekstraktoriaus schema [53].....	30
<b>9 pav.</b> Centriškai kompozicinis eksperimentų planavimas, skirtas (a) dviejų ir (b) trijų kintamųjų optimizavimui.....	32
<b>10 pav.</b> Tyrimų eigos schema.....	37
<b>11 pav.</b> Oksipresu užrašyta oksidacijos kinetinė kreivė ir nustatytas indukcinis periodas.....	44
<b>12 pav.</b> Rancimatu užrašyta oksidacijos kinetinė kreivė ir nustatytas indukcinis periodas.....	45
<b>13 pav.</b> Gervuogių išspaudų SKE–CO <sub>2</sub> ekstraktų išeigų, gautų apskaičiavus pagal matematinį modelį ir išeigų, gautų eksperimento metu, palyginimas.....	52
<b>14 pav.</b> Gervuogių išspaudų superkritinės ekstrakcijos CO <sub>2</sub> atsako paviršiaus grafikai, parodantys ekstrakto išeigos priklausomybę nuo optimizuojamų kintamųjų parametrų.....	53
<b>15 pav.</b> Gervuogių ekstrakto kinetinė kreivė SKE–CO <sub>2</sub> optimaliomis sąlygomis.....	54
<b>16 pav.</b> Gervuogių išspaudų EPS <sub>EtOH</sub> ekstraktų išeigų, gautų apskaičiavus pagal matematinį modelį ir išeigų, gautų eksperimento metu, palyginimas.....	56
<b>17 pav.</b> EPS <sub>EtOH</sub> atsako paviršiaus grafikas, rodantis išeigos priklausomybę nuo temperatūros ir laiko.....	57
<b>18 pav.</b> Skirtingų ekstrakcijų metu gautos išeigos (g/100 g SM).....	58
<b>19 pav.</b> Emulsijų oksidacinis stabilumas Oksipres metodu.....	67
<b>20 pav.</b> Emulsijų oksidacinis stabilumas Rancimat metodu.....	68
<b>21 pav.</b> Gervuogių išspaudų ekstraktuose esančios pagrindinės riebalų rūgštys: a) Linolo r.; b) Oleino r.; c) Linoleno r.....	70
<b>22 pav.</b> Gervuogių išspaudų ir ekstraktų chromatogramos.....	75

Narkevičiūtė, Aistė. Funkcionaliujų ingredientų sukūrimas iš gervuogių (*Rubus subgen. Rubus*) išspaudų taikant aukšto slėgio ir fermentinio biorafinavimo procesus. Magistro baigiamasis projektas/ vadovas prof. dr. R. P. Venskutonis; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Technologijos mokslai, Maisto technologijos

Reikšminiai žodžiai: gervuogių išspaudos; oksidacinis stabilumas; antioksidacinis aktyvumas; ekstraktai; riebalų rūgštys.

Kaunas, 2018. 90 psl.

## SANTRAUKA

Dėl vis labiau augančio žmonių skaičiaus pasaulyje, didėja gaminamų maisto produktų, pavyzdžiui: sulčių, kiekis, o tai lemia didesnę šalutinių produktų (išspaudų) susidarymą. Dėl šios priežasties vis labiau auga susidomėjimas šalutinių produktų perdirbimu ir jų panaudojimo galimybėmis. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad gervuogių išspaudose lieka nemažas kiekis biologiškai aktyvių junginių, todėl jos galėtų būti panaudojamos kaip ingredientas produktuose, turinčiuose pridėtinę vertę.

Magistro projekto tikslas – iš gervuogių (*Rubus subgen. Rubus*) išspaudų išskirti bioaktyvius junginius, taikant skirtingus aukšto slėgio ir fermentinio biorafinavimo procesus. Gautus ekstraktus iširti nustatant antioksidacinį aktyvumą, oksidacinį stabilumą bei fitocheminę sudėtį.

Gervuogių išspaudos ekstrahuotos taikant Soksleto ekstrakciją, superkritinę ekstrakciją CO<sub>2</sub>, ekstrakciją padidintame slėgyje, maceravimą bei purtymą purtyklėje ir fermentinę hidrolizę. Siekiant gauti didžiausią ekstrakto išėigą, atliktas superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos ir ekstrakcijos padidintame slėgyje parametrų optimizavimas, naudojant paviršiaus atsako metodiką. Superkritinės ekstrakcijos CO<sub>2</sub> optimizuoti parametrai – laikas, slėgis ir temperatūra, o ekstrakcijos padidintame slėgyje – temperatūra ir laikas. Lyginant skirtingus ekstrakcijos metodus nustatyta, kad didžiausia išėiga gauta atliekant ekstrakciją padidintame slėgyje su etanolium (29,24 %).

Antioksidacinis aktyvumas nustatytas pasinaudojus ABTS<sup>+</sup> radikalo sujungimo metodu, o pritaikius ORAC metodą – nustatyta deguonies radikalų absorbcijos geba. Bendram fenolinių junginių kiekiui nustatyti naudotas *Folin Ciocalteu's* metodas. Ekstraktų tyrimams taikyta tradicinė, o kietai frakcijai – QUENCHER procedūra. Įvertinus ekstraktų antioksidacines savybes nustatyta, kad didesniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo ekstraktai, gauti po ekstrakcijų, vykdytų su poliniais tirpikliais. O įvertinus išspaudų antioksidacines savybes prieš



ekstrakcijas ir po jų, nustatyta, kad atlikus bioaktyviųjų junginių išskyrimą, kietoje frakcijoje dar lieka nemažas kiekis junginių.

Iš gervuogių išspaudų gautų ekstraktų oksidacinis stabilumas įvertintas Oksipres ir Rancimat metodais. Oksidacinio stabilumo tyrimo rezultatai parodė, kad visi gervuogių išspaudų ekstraktai pasižymi stabilizuojančiomis savybėmis, tačiau stabiliausi ekstraktai – gauti po ekstrakcijos padidintame slėgyje su vandeniu. Taip pat nustatytas lipofilinio ekstrakto peroksidų skaičius. Pritaikius ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodą įvertinti bioaktyvūs junginiai ir atlikta kiekybinė bei kokybinė antocianinų analizė gervuogių išspaudų ekstraktuose, o pasinaudojus dujų chromatografijos metodu – nustatyta riebalų rūgščių kompozicija. Lipofiliniuose ekstraktuose nustatytos trys pagrindinės riebalų rūgštys – tai linolo, oleino ir linoleno. Šios rūgštys sudaro ~92 % bendro visų riebalų rūgščių kiekio.

Taigi, gauti rezultatai parodė, kad gervuogių išspaudos yra puikus bioaktyviųjų junginių šaltinis. Tad pačios uogų išspaudos ar jų ekstraktai galėtų būti naudojami praturtinant maisto produktus funkcionaliaisiais maisto komponentais ar prailginant realizacijos terminą (dėl antioksidacinio aktyvumo).

Narkevičiūtė, Aistė. Development of functional ingredients from blackberry (*Rubus subgen. Rubus*) pomace by using high pressure and enzymatic biorefining processes. Master's thesis in Food Science and Safety/ supervisor prof. dr. R. P. Venskutonis. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Technological Sciences, Food Technology.

Key words: blackberry pomace; oxidative stability; antioxidation activity; extracts; fatty acids.

Kaunas, 2018. 90 p.

## SUMMARY

Due to the growing number of people in the world, the amount of food produced, such as juice, is increasing, which results in a higher production of by-products (pomace). For this reason, there is a growing interest in recycling of by-products and their utilization. Scientific research has shown that blackberry pomace retains a significant amount of bioactive compounds, and they can be used as an ingredient in products containing added value.

The aim of Master's project is to extract bioactive compounds from blackberry (*Rubus subgen. Rubus*) pomace, by applying different processes of high pressure and enzymatic biorefining. Examine forthcoming extracts for antioxidant activity, oxidative stability and phytochemical composition.

Blackberry pomace were extracted by using Soxhlet extraction, supercritical extraction of CO<sub>2</sub>, accelerated solvent extraction, maceration and shaking, and enzymatic hydrolysis. In order to obtain the maximum yield of extract, the optimization of supercritical CO<sub>2</sub> extraction and accelerated solvent extraction was performed using the Response Surface Methodology. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction optimization parameters – time, pressure and temperature, and accelerated solvent extraction – temperature and time. Comparison of different extraction methods showed that the maximum yield was obtained by accelerated solvent extraction with ethanol (29,24 %).

Antioxidant activity was determined by using the ABTS<sup>+</sup> radical fading method and by applying ORAC method – oxygen radical absorbance capacity was determined. The *Folin Ciocalteu's* method was used to measure the total phenolic compounds. The extracts were subjected to the traditional procedure and to solid fraction – QUENCHER procedure. After evaluating the antioxidant properties of the extracts, it was found that the extracts extracted with polar solvents showed higher antioxidant activity. After evaluating the antioxidant properties of the pomace before and after the extraction, it was found that after the isolation of bioactive compounds, a considerable amount of compounds remain in the solid fraction.

The oxidative stability of extracts extracted from blackberry pomace was estimated by Oxipres and Rancimat methods. The results of the oxidative stability showed that all blackberry pomace extracts have stabilizing properties, but the most stable extracts are obtained after accelerated solvent extraction with water. The value of lipophilic extract peroxides also has been determined. After application of ultra – high performance liquid chromatography method the bioactive compounds were evaluated, quantitative and qualitative analysis of anthocyanins in blackberry pomace extracts was carried out and, by means of gas chromatography – determined fatty acid composition. The lipophilic extracts have shown to have three main fatty acids – linoleic, olein and linolenic. These acids make up about 92 % of the total all fatty acids.

So, the results showed that blackberry pomace is a great source of bioactive compounds. Thus the berries pomace or their extracts could be used to enrich food with functional food components or the extension of the realization time (due to its antioxidant activity).

## SANTRUMPOS

SOK	Soksleto ekstrakcija
MAC	Maceravimas ir purtymas purtyklėje
I SKE–CO <sub>2</sub>	Superkritinė ekstrakcija CO <sub>2</sub> , esant 60 °C, 45 MPa, 120 min
II SKE–CO <sub>2</sub>	Superkritinė ekstrakcija CO <sub>2</sub> , esant 64 °C, 54,8 MPa, 171 min
III SKE–CO <sub>2</sub>	Superkritinė ekstrakcija CO <sub>2</sub> , esant 75 °C, 54,7 MPa, 126 min
CO <sub>2</sub>	Anglies dioksido dujos
EPS <sub>EtOH</sub>	Ekstrakcija padidintame slėgyje su etanolium, 90 °C, 3×15 min
EPS <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	Ekstrakcija padidintame slėgyje su vandeniu, 130 °C, 3×10 min
FERM	Ekstrakcija, naudojant fermentus
ANOVA	Dispersijos analizė
APM	Atsako paviršiaus metodika
CKP	Centriškai kompozicinis planas
BFJK	Bendras fenolinių junginių kiekis
GRE	Galo rūgšties ekvivalentai
ABTS <sup>•+</sup>	2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis
ORAC	Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumas
TE	Trolokso ekvivalentai
PBS	Fosfatinis buferinis tirpalas
QUENCHER	Antioksidacinio aktyvumo nustatymo sausoje medžiagoje metodika
SM	Sausos medžiagos
ROS	Reaktyvieji deguonies dariniai
KMC	Karboksimetilceliuliozė
RR	Riebalų rūgštys

SRR	Sočiosios riebalų rūgštys
MNRR	Mononesočiosios riebalų rūgštys
PNRR	Polinesočiosios riebalų rūgštys
PS	Peroksidų skaičius
IP <sub>0,5</sub>	Indukcinis periodas, esant 0,5 % ekstrakto koncentracijai
IP <sub>1</sub>	Indukcinis periodas, esant 1,0 % ekstrakto koncentracijai
IP <sub>2</sub>	Indukcinis periodas, esant 2,0 % ekstrakto koncentracijai
UESCh-Q-TOF	Ultra efektyvioji skysčių chromatografija su kvadrupoliniu skriejimo laiko masių detektoriumi
SN	Standartinis nuokrypis

## IŽANGA

Maisto pramonė kiekvienais metais vis dažniau susiduria su lūkesčiais, kad maisto produktai atitiktų vartotojų poreikius, susijusius su sveiko gyvenimo būdu. Maisto vaidmuo yra ne tik patenkinti alkį ir suteikti reikalingų maistinių medžiagų, bet ir pagerinti fiziologinę bei psichologinę gerovę, ir užkirsti kelią ligoms, susijusioms su mityba [1]. Didelis dėmesys skiriamas natūralioms medžiagoms, kurios pasižymi antioksidaciniu aktyvumu. Mityboje antioksidantų vartojimas yra labai svarbus kovojant su lėtinėmis ligomis, kurias sukelia oksidacinis stresas.

Uogos – vienas iš svarbiausių šaltinių, turinčios didelį kiekį antioksidantų bei kitų biologiškai aktyvių sveikatai naudingų junginių [2]. Gervuogėse, lyginant su kitomis uogomis, yra didelis kiekis antioksidantų [3]. Šios uogos auginamos daugiau nei 30 pasaulio šalių, tačiau tik 10 % visų užauginamų uogų suvartojamos šviežios, kadangi jos greitai genda taip prarasdamos kokybę ir naudą sveikatai. Taigi, daug uogų yra perdirbama į sirupus, sultis, vynus, džemus, želė, jogurtus bei įvairių maisto produktų sudedamąsias dalis [4]. Pramoninės gamybos metu gaunami dideli kiekiai išspaudų. Pastaruoju metu yra didelis susidomėjimas šiais šalutiniais produktais, kadangi jie yra ne tik kaip problema, atsirandanti dėl jų šalinimo, tačiau taip pat yra perspektyvūs bioaktyvių junginių šaltiniai, kuriuos galima panaudoti pridėtinės vertės produktams gaminti [5].

Gervuogės jau nuo senų laikų yra vartojamos kaip vaistinė augalinė žaliava. Šios uogos savo sudėtyje turi skaidulinių medžiagų, kurios padeda gerinti virškinamojo trakto veiklą. Kadangi jos yra geras vitamino C šaltinis, tai žmonės uogas gali vartoti norėdami pagerinti imuninės sistemos veiklą [6]. Dėl uogose esančių įvairių bioaktyvių junginių ir fiziologiškai aktyvių komponentų kiekio, uogos daro teigiamą įtaką žmonių sveikatai [7]. O uogų išspaudose esantys fenoliai ir karotinoidai gali būti naudojami kaip natūralūs maisto ar gėrimų konservantai, nes jie prailgina produkto galiojimo trukmę [8].

Naudojant šiuolaikines perdirbimo technologijas, galima iš išspaudų išskirti bioaktyvius junginius, kurie būtų panaudojami gaminant įvairius maisto priedus, papildus ar kaip funkcionaliojo maisto sudedamoji dalis. Siekiant išgauti biologiškai aktyvius junginius, buvo taikomi skirtingi ekstrakcijų metodai ir skirtingo poliškumo tirpikliai.

Darbo tikslas – iš gervuogių (*Rubus subgen. Rubus*) išspaudų išskirti bioaktyvius junginius, taikant skirtingus aukšto slėgio ir fermentinio biorafinavimo procesus. Gautus ekstraktus iširti nustatant antioksidacinį aktyvumą, oksidacinį stabilumą bei fitocheminę sudėtį.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti gervuogių išspaudų cheminę sudėtį.
2. Atlikti superkritinės ekstrakcijos CO<sub>2</sub> parametrų (laiko, slėgio, temperatūros) optimizavimą ir nustatyti optimalias sąlygas, kad būtų gauta didžiausia ekstrakto išeiga.
3. Atlikti ekstrakcijos padidintame slėgyje su etanoliu parametrų (temperatūros, laiko) optimizavimą ir nustatyti optimalias ekstrakcijos parametrų vertes, kad būtų gaunama didžiausia ekstrakto išeiga.
4. Palyginti ekstraktų išeigas, gautas atlikus tradicinės, aukšto slėgio ir inovatyvios ekstrakcijos metodus.
5. Nustatyti kietos frakcijos bei ekstraktų, gautų po skirtingų ekstrakcijos metodų, antioksidacinį aktyvumą.
6. Nustatyti gautų ekstraktų oksidacinį stabilumą.
7. Identifikuoti gervuogių išspaudų lipofiliniuose ekstraktuose esančias riebalų rūgštis.
8. Įvertinti gervuogių išspaudų ekstraktų funkcionaliųjų komponentų sudėtį.
9. Atlikti gervuogių išspaudų ir ekstraktų antocianinų analizę.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. Gervuogių apibūdinimas ir paplitimas

Gervuogės (*Rubus subgen. Rubus*) (žr. 1 pav.) priklauso erškėtinių (*Rosaceae*) pogentei, kuri priklauso gervuogių (*Rubus*) genčiai. Taip pat šiai genčiai priklauso avietės, tekšės ir katuogės. Gervuogė yra daugiametis augalas, užaugantis net iki 1,5 metro aukščio ir užmezga vaisius, kurie sudaryti iš daug smulkių bei sultingų kaulavaisių. Vaisiai nokimo pradžioje būna rausvos spalvos, o vėliau patamsėja ir tampa juodi, tamsiai purpuriniai. Šie augalai daugiausia auga miškuose, pamiškėse, palei upes, ežerus ar ant skardžių.

Gervuogių uogas geriausia rinkti vasaros pabaigoje arba rudens pradžioje, nes šiuo laikotarpiu jos turi saldžiausią skonį ir yra skaniausios. Gervuogių vaisiai sveria nuo 4 g iki 7 g ir pasižymi saldžiai rūgščiu skoniu [9]. Norint išsaugoti šias uogas ilgesnį laikotarpį, galima jas sušaldyti.

Gervuogių augalai plačiai paplitę šiauriniame pusrutulyje. Šie augalai daugiausia auginami Europoje ir Šiaurės Amerikoje. Jau nuo XVI amžiaus gervuogės Europoje buvo žinomos kaip vaistinis preparatas, skirtas gydyti akių ir burnos infekcijoms [10].

Pagrindiniai gamintojai Europoje yra Serbija, kurioje auginama nuo 8000 iki 10000 tonų per metus ir Vengrija [11, 12].



1 pav. Gervuogė (*Rubus subgen. Rubus*)



Nors yra daug atliktų tyrimų ir įrodymų apie gervuogių naudą sveikatai, tačiau jos nėra naudojamos kaip vaistų sudedamoji dalis. Šios uogos ar uogų išspaudų ekstraktai dažniau dedami į maisto papildų sudėtį.

## 1.2. Gervuogių biocheminė sudėtis ir maistinė vertė

Atsiradus vis daugiau įrodymų apie uogų naudą sveikatai, jų suvartojimas padidėjo visame pasaulyje. Uogos naudingos sveikatai dėl mažo kalorijų, riebalų kiekio ir didesnio vitaminų, mineralų, skaidulų kiekio bei įvairių biologiškai aktyvių sudedamųjų dalių [13]. Bioaktyvūs junginiai pasireiškia nedideliais kiekiais maisto produktuose ir yra laikomi ne maistinėmis, bet gyvybiškai svarbiomis žmonių sveikatos priežiūros priemonėmis [14].

Uogų cheminė sudėtis priklauso nuo daugelio veiksnių: įvairovės, aplinkos veiksnių, brandinimo etapo, derliaus nuėmimo laiko ir metodo, laikymo sąlygų bei trukmės. Šie ir kiti veiksniai daro įtaką uogų kokybei ir vartotojų pasirinkimui [15, 16, 17]. Ypač sunku nustatyti konkrečius veiksnius, kurie lemia uogų kokybę. Daug cheminių medžiagų gali būti skirtingų koncentracijų subrendusiose uogose ir jos gali skirtingai reaguoti [18]. Dėl šių priežasčių gali būti gana sudėtinga palyginti skirtingų tyrėjų gautus rezultatus [16].

Tiek gervuogėms, tiek jų išspaudoms turėtų būti skiriamas didelis dėmesys, kadangi jos turi daug sveikatai naudingų medžiagų, tokių kaip vitaminai A, B grupės vitaminai, C, E, mineralai, pektininės medžiagos, organinės rūgštys, sacharidai, fenolinės medžiagos. Dėl tokios junginių įvairovės uogose, gervuogės įgauna daug svarbesnę reikšmę, nes jų vartojimas padeda sustiprinti kraujagyslių sienelės, išvalyti organizmą, slopina alergines reakcijas, palankiai veikia endokrininę sistemą [6, 19, 20, 21]. Uogų vaisiuose yra apie 15 % tirpių kietųjų dalelių (daugiausiai cukraus) ir didelis fruktozės kiekis, o tai yra vertinga diabetu sergantiems asmenims [22, 23].

Pagrindinė šviežių uogų mitybinė sudėtis pateikta 1 lentelėje.

**1 lentelė.** Gervuogių sudėtis, pateikta literatūroje (g/100 g šviežių uogų) [24]

Sudėties rodiklis	Kiekis	Sudėties rodiklis	Kiekis
Drėgmė	88,15	Sacharozė	0,07
Baltymai	1,39	Gliukozė	2,31
Riebalai	0,49	Fruktozė	2,40
Angliavandeniai	9,61	Maltozė	0,07
Maistinės skaidulos	5,30	Galaktozė	0,03
Energinė vertė (kcal)	43,00		

Uogose yra daug makro ir mikroelementų. Svarbiausi gervuogėse esantys mineralai yra fosforas, kalis, kalcis, magnis, geležis, manganas, varis, natriis. Mineralinės medžiagos svarbios žmogaus sveikatai, nes jos atlieka svarbų vaidmenį augant kaulams, dantims bei tuo metu, kai vystosi raumenys. Mineralinių medžiagų kiekiai pateikti 2 lentelėje.

**2 lentelė.** Mineralinių medžiagų kiekis gervuogių uogose (mg/100 g uogų) [25, 26]

Elementas	Ca	Mg	Fe	P	K	Na	Zn	Mn	Cu
Kiekis	6,0 – 30,0	17,0 – 44,0	0,3 – 2,0	12,0 – 30,0	77,0 – 162,0	1,0 – 4,0	0,3 – 0,5	1,2 – 2,6	0,02 – 0,17

Gervuogės iš kitų uogų išsiskiria tuo, kad turi labai didelį antioksidacinį aktyvumą ir didelius kiekius fenolinių junginių, tokių kaip taninai, antocianinai, elagitaninai, galo rūgštis, elago rūgštis [25, 27].

### **1.2.1. Taninai**

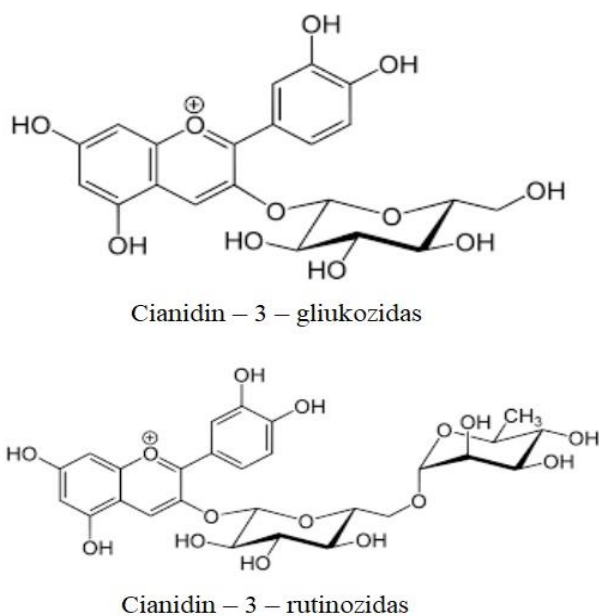
Taninai – polifenolinių junginių grupė, svarbi uogų vaisių sudedamoji dalis. Gervuogėse taninų yra nedidelis kiekis. Jie vaidina esminį vaidmenį formuojant vaisių ir vaisių produktų juslines savybes. Taninai atsakingi už rūgštų skonį ir už spalvos pasikeitimą vaisiuose bei vaisių sultyse. Rūgštus skonis atsiranda dėl taninų, gleivinių baltymų ir skonio receptorių sąveikos [26]. Taip pat jie žinomi kaip junginiai, neleidžiantys įsisavinti maistinių medžiagų, kadangi jungiasi prie peptidų NH grupės, juos nusodina ir neleidžia vykti hidrolizei skrandyje [10]. Kaip fermentų inhibitoriai, taninai mažina kai kurių augalinių produktų maistinę vertę. Vaisiuose, kuriuose gausu antocianinų, taninai stabilizuoja antocianinus, prisijungiant prie jų, kad susidarytų kopolimerai. Gervuogėse randami hidrolizuojami taninai (galo ir elago rūgščių dariniai), kurie vaisiuose pasitaiko rečiau [26].

### **1.2.2. Antocianinai**

Aukšto antioksidacinio pajėgumo junginiai – antocianinai, natūraliai randami gervuogėse. Tai – flavonoidų pogrupis, kuris taip pat yra ir polifenolių pogrupis [28]. Antocianinai yra atsakingi už uogų, vaisių, daržovių, gėlių violetinę, raudoną ir mėlyną spalvas. Tačiau antocianinai lengvai pasiverčia į bespalvius junginius ir gali pasidaryti kaip netirpūs rudi pigmentai. Šio flavonoidų pogrupio stabilumą sąlygoja daugelis veiksnių: šviesa, fermentai, deguonis, metalo jonai, sieros dioksidas ar sulfito druskos, cukrus bei dažnai naudojamas terminis apdorojimas. Šie junginiai darosi vis svarbesni kaip antioksidantai [29]. Pastaraisiais metais paskelbiama daug informacijos apie tai, kad antocianinai apsaugo nuo lėtinių ligų, nuo

širdies ir kraujagyslių ligų, slopina uždegiminius procesus, sustiprina kraujagyslių sienelės, turi antimutageninį ir priešvėžinį poveikį [20, 21, 30]. Tačiau jie populiarūs ne tik dėl to, kad gali būti naudojami kaip antioksidantai, bet ir kaip natūralus dažiklis maisto produktuose [31]. Taip pat yra vis daugiau įrodymų, kad antocianinai veikia angliavandenių ir lipidų metabolizmą. Junginiai gali sąveikauti su  $\alpha$ -amilazėmis. Be to, antocianinai ir jų aglikonai yra svarbūs skatinant insulino sekreciją [32].

Gervuogės – puikus antocianinų šaltinis [33]. Tyrėjai nustatė, kad gervuogėse randama įvairių antocianinų: cianidino gliukozidų (cianidin-3-gliukozidas, cianidin-3-rutinozidas, cianidin-3-arabinozidas), pelargonidino gliukozidų (pelargonidin-3-gliukozidas) ir peonidino gliukozidų (peonidin-3-gliukozidas) [12]. Tačiau pagrindiniai antocianinai yra cianidin-3-gliukozidas ir cianidin-3-rutinozidas (jų formulės žr. 2 pav) [22, 28]. Cianidin-3-gliukozidas yra dominuojantis ir sudaro apie 80 % suminio antocianinų kiekio gervuogėse [19]. Nemažai tyrimų parodė, kad cianidinas ir pelargonidinas yra vieninteliai antocianino aglikonai *Rubus* genties uogose. Mokslininkų nustatytas gervuogėse antocianinų kiekis yra 82–326 mg/g šviežių uogų [26, 28, 34].



**2 pav.** Pagrindinių antocianinų gervuogėse cheminės formulės

Antocianinų ir kitų fenolinių junginių efektyvumą ir stabilumą gervuogėse gali paveikti daug veiksnių, tokių kaip šviesos buvimas, fermentai (tokie kaip polifenolio oksidazė ir peroksidazė), askorbo rūgštis, drėgmė ir deguonis. Atsižvelgiant į tai, antocianinų mikrokapsuliacija gali būti puiki alternatyva norint išlaikyti šių biologiškai aktyvių junginių stabilumą, kai jie gaunami iš maisto produktų [19].

### **1.2.3. Fenolinės rūgštys**

Fenolinių rūgščių kiekis gervuogėse svyruoja 7–64 mg/100 g šviežių uogų ir dažniausiai tai yra hidroksibenzoinė ir hidroksicinamono rūgštys. Šios rūgštys pasitaiko esterių ir glikozidų konjuguotosios formos, bet retai kaip laisvosios rūgštys. Esteriai sudaro ~53 % visų fenolinių rūgščių, glikozidai – ~44 %, o laisvosios rūgštys tik ~3 %. Gervuogių hidroksibenzoinė rūgštis apima p–hidroksibenzoinę, protokatechino, galo, vanilino ir salicilo rūgštis. Salicilo rūgšties glikozido ir esterio formos yra labiausiai paplitusios [10]. Kofeino, m–kumaro, p–kumaro ir ferulinė rūgštys yra hidroksicinamono rūgštys randamos gervuogėse laisvos, esterių bei glikozidų formomis.

Galo rūgštis yra stiprus antioksidantas, randamas uogose, juodoje arbatoje ir raudoname vyne. Ši rūgštis turi didžiulį antioksidacinį aktyvumą, kuris 3 kartus didesnis nei vitamino C ar E ir tai rodo, kad jos 3 hidroksilo grupės gali nepriklausomai veikti kaip elektronų akceptorai. Todėl galo rūgšties dariniai yra galingi antioksidantai, kuriuose laisvos hidroksilo grupės gali pašalinti radikalus [26].

### **1.2.4. Elago rūgštis**

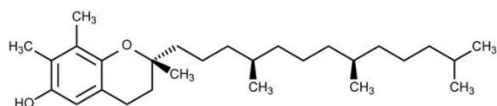
Dar vienas svarbus bioaktyvus junginys gervuogėse yra elago rūgštis, kuri randama gervuogių minkštyme bei sėklose. Šios rūgšties kiekis šviežiose uogose kinta nuo 21 iki 150 mg/100 g šviežių uogų, priklausomai nuo tiriamos rūšies. Atliekant mokslinius tyrimus buvo nustatyta, kad elago rūgštis sumažina vėžinių ląstelių augimą, sukelia apoptozę [35] ir turi įvairių priešuždegiminių efektų [32].

Elago rūgštis sudaro 51 % bendrą fenolinių junginių kiekį. Ji yra svarbi mitybiniu požiūriu, nes turi antivirusinių, antioksidacinių savybių ir gali apsaugoti nuo storosios žarnos, plaučių ir stemplės vėžių formų [26].

### **1.2.5. Tokoferoliai**

Tokoferoliai yra dažni lipofiliniai antioksidantai, kurių gausu kai kuriuose aliejuose ir riešutuose, tačiau jų buvimas gervuogių sėklose gali suteikti vitamino E aktyvumą ir antioksidacines galimybes. Šie junginiai pasižymi svarbia maisto produktams savybe – stabdo lipidų oksidaciją [11].

Keletas mokslininkų ištyrė tokoferolių kiekį gervuogėse ir kiekis skyrėsi pagal tai, kur gervuogės buvo auginamos, kokiuose pasaulio regionuose. Nustatymo metodai taip pat skiriasi. 3 lentelėje pateikti tokoferolių kiekiai, publikuoti ankstesniuose straipsniuose. Bendras tokoferolių kiekis gervuogių ekstraktuose svyruoja nuo 1739 mg iki 2363 mg/100 g ekstrakto. Mokslinėje literatūroje pabrėžiama, kad pagrindinis yra  $\gamma$ -tokoferolis (žr. 3 pav) [26, 36].



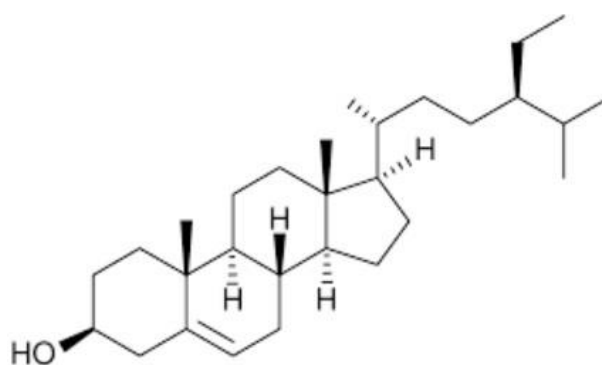
**3 pav.**  $\gamma$  – tokoferolio cheminė formulė

**3 lentelė.** Tokoferolių kiekis gervuogių išspaudų ekstraktuose (mg/100 g) [11]

Tokoferolis	Po CO <sub>2</sub> ekstrakcijos	Po ekstrakcijos su etanolium	Po ekstrakcijos su heksanu
$\alpha$ –	71,9	51,3	69,9
$\beta$ –	–	–	–
$\gamma$ –	1620,9	2261,5	2251,7
$\delta$ –	45,8	30,8	41,9
Suma	1738,6	2343,6	2363,5

### 1.2.6. Fitosteroliai

Dar viena biologiškai aktyvių junginių grupė randama gervuogėse ir jų išspaudose yra fitosteroliai. Daugiausiai ištirti ekstraktai yra po ekstrakcijos su etanolium, heksanu ir CO<sub>2</sub>. Visuose ekstraktuose pagrindinis sterolis yra  $\beta$ –sitosterolis (žr. 4 pav). Jo kiekis gali būti nuo 1026 iki 1383 mg/100 g ekstrakto. Stigmasterolis ir kampesterolis taip pat buvo aptikti, tačiau daug mažesniais kiekiais – atitinkamai 70–119 mg/100 g ekstrakto ir 50–80 mg/100 g ekstrakto [11].



**4 pav.**  $\beta$  – sitosterolio cheminė formulė

### 1.2.7. Riebalų rūgštys

Keli mokslininkai nustatė gervuogių išspaudose esančias riebalų rūgštis, gauti rezultatai palyginti 4 lentelėje. Skirtingiems kiekiams įtakos turėjo skirtingai paruošti pradiniai mėginiai

[36] bei atliekamų ekstraktų būdai [11]. Tarp identifikuotų riebalų rūgščių, dominuojančios buvo polinesočiosios ir mononesočiosios riebalų rūgštys. Pagrindinė iš jų buvo linolo rūgštis, kuri atitiko didžiausią kiekį. Skirtingi autoriai teigia, kad linolo rūgštis sudaro 55–58 % gervuogių išspaudų aliejaus. Oleino ir  $\alpha$ -linoleno rūgščių kiekiai nežymiai skyrėsi [34]. Naudojant vienodai paruoštas išspaudas, tik skirtingus ekstraktacijos metodus – gautas didesnis kiekis  $\alpha$ -linoleno rūgšties [11], o vykdant vienodą ekstraktacijos metodą su skirtingai paruoštomis išspaudomis, didesnis kiekis buvo randamas linolo rūgšties [36].

Gervuogių išspaudų aliejuje gausu polinesočiųjų riebalų rūgščių – omega-3 ( $\alpha$ -linoleno r.) ir omega-6 (linolo r.). Šios rūgštys svarbios imuninei sistemai, smegenų vystymuisi bei veiklai, tačiau jos nesintetinos organizme, todėl turi būti gaunamos su maistu, o gervuogių išspaudos yra puikus jų šaltinis.

**4 lentelė.** Riebalų rūgštys gervuogių ekstraktuose, % [11, 36]

Ekstraktas	Miristiko (C14:0)	Palmitino (C16:0)	Margarino (C17:0)	Stearino (C18:0)	Oleino (C18:1)	Linolo (C18:2)	$\alpha$ – linoleno (C18:3)	Arachidino (C20:0)	11 – eikozano (C20:1)	11,14 – eikozandieno (C20:2)	Beheno (C22:0)
G1	–	3,7	0,1	4,7	13,9	42,3	15,4	0,5	0,2	–	0,04
G2	0,1	2,2	0,1	3,2	7,6	21,9	8,3	0,2	–	0,2	–
G3	0,05	4,6	0,08	2,8	19,24	63,61	14,98	–	0,55	–	–
G4	0,04	4,5	0,09	2,5	17,07	61,24	13,77	–	0,68	–	–

*G1 – gervuogių išspaudų ekstraktas, gautas po ekstraktacijos su heksanu; G2 – gervuogių išspaudų ekstraktas, gautas po ekstraktacijos su etanolium; G3 – ekstraktas, gautas vykdant ekstraktaciją, kur pradinė žaliava (išspaudos), buvo gauta šviežias uogas apdorojus; G4 – ekstraktas, gautas vykdant ekstraktaciją, kur pradinė žaliava (išspaudos), buvo gauta prieš tai užšaldytas uogas apdorojus.*

### 1.3. Lipidų oksidacijos procesas

Lipidai – svarbi maisto produktų ir daugelio biologinių sistemų sudedamoji dalis. Jie atlieka daug funkcijų: naudojami kaip energijos šaltinis, kaip riebaluose tirpių vitaminų šaltinis, taip pat kaip struktūrinis ląstelių membranų komponentas ir kaip maisto produktų skonio bei tekstūros dalis. Kadangi lipidai nėra tiksliai apibrėžti, tai jiems priklauso įvairios junginių grupės, įskaitant monoacilglicerolius, diacilglicerolius, triacilglicerolius, fosfolipidus, glikolipidus, riebalų rūgštis, vaškus, sterolius, riebaluose tirpius vitaminus. Visi šie junginiai gali

būti suskirstyti į skirtingas lipidų klases pagal cheminę struktūrą, poliškumą, ar fizines savybes [37]. Lipidams didelę žalą daro laisvieji radikalai.

Laisvieji radikalai gali būti apibūdinami kaip bet kuri molekulinė rūšis (atomas, molekulė ar jonas), galinti egzistuoti visiškai nepriklausomai, ir turinti atomo orbitoje nesuporuotą elektroną. Šie radikalai nuolat gaminasi gyvose ląstelėse, todėl jie yra normalios fiziologijos dalis [38, 39]. Tačiau jei laisvųjų radikalų kiekis yra per didelis, tai gali būti pažeidžiami audiniai, sunaikinami riebaluose tirpūs vitaminai, esantys organizme, sumažinama baltymų kokybė, kadangi laisvieji radikalai gali reaguoti su baltymuose esančiais sieros junginiais, taip pat gali įvykti lipidų oksidacija, dėl kurios maisto kokybė bei sauga suprastėja, ir sukeliamos įvairios ligos [40, 41, 42, 43]. Daugelyje ligų svarbiausi laisvieji radikalai yra reaktyvūs deguonies dariniai (ROS), ypač hidroksilo radikalas ( $\text{HO}\cdot$ ) ir superoksido anijonas ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) [39].

ROS susidarymą gali skatinti įvairūs veiksniai: tai vaistai, pesticidai, įvairios infekcijos, didelis fizinis krūvis, stresas, radiacija, įvairūs tirpikliai, ozonas ir dar daug kitų veiksnių [44].

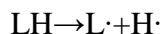
Vienas iš svarbiausių procesų, kuriuos sukelia laisvieji radikalai – lipidų oksidacija. Tai pagrindinė maisto kokybės bei saugos pablogėjimo priežastis. Lipidų oksidacija vyksta keliais skirtingai mechanizmais:

- 1) Autooksidacija – kai reaguoja lipidai su deguonimi;
- 2) Fotooksidacija – kai sužadinamas fotosensibilizatorius ir energija perkeliama į lipidų molekules ar deguonį;
- 3) Terminė oksidacija – veikiant temperatūrai;
- 4) Fermentinė oksidacija – veikiant fermentams, tokiems kaip lipoksigenazės.

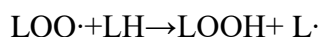
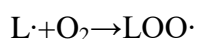
Labiausiai paplitusi autooksidacija – lipidų reakcija su deguonimi per laisvųjų radikalų grandininę reakciją.

Lipidų autooksidacija susideda iš trijų pakopų:

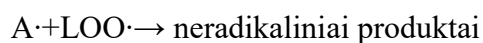
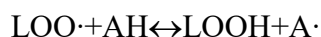
- 1) Pradžia:



- 2) Sklidimas:



- 3) Nutraukimas:



Deguonies ir nesočiųjų lipidų (LH) reakcija apima laisvųjų radikalų inicijavimo (pradžios), sklidimo ir nutraukimo procesus. Pradžia vyksta dėl vandenilio radikalo praradimo, esant šviesai,

šilumai ar tam tikriems metalams. Susidaro lipidų laisvasis radikalas ( $L\cdot$ ). Vykstant sklidimo stadijai, gautas lipidų laisvasis radikalas reaguoja su deguonimi ir susidaro peroksi radikalas ( $LOO\cdot$ ). Po to, šioje pakopoje gautas  $LOO\cdot$  reaguoja su dar daugiau LH, kad susiformuotų lipidų hidroperoksidai (LOOH), kurie yra pagrindiniai pirminiai oksidacijos produktai. Šią grandinę reakciją gali nutraukti apsauginės medžiagos – antioksidantai (AH) reaguodami su peroksi radikalais, atiduodant laisvą vandenilio radikalą ir suformuojant stabilius radikalus arba neradikalinius produktus [45].

Gauti lipidų hidroperoksidai gali toliau reaguoti su deguonimi, taip gaunant antrinius produktus, tokius kaip dihidroperoksidai, bicikliniai endoperoksidai, cikliniai peroksidai, ketohidroperoksidai ir epoksihidroperoksidai. Šie antriniai produktai gali skilti į monohidroperoksidus, suformuojant lakius skilimo produktus, kurie gali sąveikauti su biologiniais komponentais, paveikiant gyvybines ląstelių funkcijas ir sukeldami įvairias ligas [46].

#### **1.4. Antioksidantai ir jų poveikis**

Gervuogės yra puikus natūralių antioksidantų šaltinis, o tai yra viena iš pagrindinių priežasčių, dėl kurių uogos vis labiau populiarėja žmonių mityboje [47].

Antioksidantai – tai tam tikri junginiai, kurie padeda sustabdyti oksidacinius procesus, taip pat sujungti reaktyvius deguonies darinius. Kad antioksidantai veiktų, jų užtenka labai mažų koncentracijų [48]. Antioksidantų dėka laisvieji radikalai sujungiami ir taip ląstelės apsaugomos nuo oksidacinio streso. Antioksidantai dažnai naudojami maisto konservavimui, tačiau jų svarbiausia naudojimo sritis yra žmogaus organizmo saugojimas nuo ROS daromos žalos. Kai organizme sutrinka pusiausvyrą tarp ROS ir antioksidantų, padidėja ligų atsiradimo rizika, kurias gali sukelti oksidacinis stresas [49].

Antioksidantų veikimas gali būti kelių mechanizmų:

- Kai gali šalinti reaktyvius deguonies darinius;
- Kai gali sujungti pereinamųjų metalų jonus;
- Tai, kai jie dalyvauja grandinės nutraukimo reakcijoje;
- Kai stabdo reaktyvių deguonies darinių formavimąsi [49].

Reaktyviųjų deguonies darinių (ROS) (tokių kaip superoksidai, vandenilio peroksidas, hidroksilo radikalai ir laisvieji radikalai) sukeltos reakcijos gali sukelti oksidacinę žalą ląstelių struktūroms ir funkcinėms molekulėms (pavyzdžiui, DNR, baltymams, lipidams) [28]. Daugybė atliktų tyrimų rezultatų rodo, kad oksidacinis stresas yra pagrindinė daugelio ligų priežastis. Manoma, kad antioksidantai yra labai veiksmingi ROS paveiktų audinių sutrikimų gydymui [27]. Oksidacinis stresas gali sukelti įvairias ligas: astmą, lėtinį bronchitą, artritą, kataraktą, Alzheimerio ligą, Parkinsono ligą, depresiją, uždegimą bei užkrėtimą ir dar daug kitų ligų [50].



Antioksidantai pagal kilmę yra skirstomi į natūralius ir sintetinius.

#### ***1.4.1. Natūralūs antioksidantai***

Žmogaus organizmas turi keletą būdų, kad galėtų kovoti su oksidaciniu stresu. Vienas iš būdų yra toks, kad kovoja antioksidantai, kurie natūraliai susidaro organizme (endogeniniai antioksidantai), o kitas – kovoja antioksidantai, kurie gaunami iš išorės su maisto produktais (egzogeniniai antioksidantai) [51]. Kai žmogaus organizme esantys antioksidantai veikia kartu su natūraliais antioksidantais – stabdoma oksidacinio streso žala. Natūraliems antioksidantams priskiriami flavonoidai, fenolinės rūgštys, karotinoidai, antocianinai bei tokoferoliai. [50]

#### ***1.4.2. Sintetiniai antioksidantai***

Beveik visuose perdirbtuose maisto produktuose yra sintetinių antioksidantų, tačiau dėl jų galimo toksinio poveikio stengiamasi sintetinius antioksidantus keisti natūraliais, todėl ieškoma kuo daugiau natūralių antioksidantų šaltinių. Sintetiniai antioksidantai pridedami į maistą siekiant prailginti galiojimo trukmę, daugiausiai norint sustabdyti nesočiųjų riebalų rūgščių oksidaciją. Plačiausiai naudojami yra BHT (butilintas hidroksitoluenas) ir BHA (butilhidroksianizolis). Jie yra stabilūs kaitinant, todėl gali būti naudojami keptų ar gruzdintų maisto produktų gamyboje naudojamiems riebalams stabilizuoti. Taip pat populiarus sintetinis antioksidantas yra TBHQ (butilhidroksikvinonas), kadangi jis stabilizuoja ir išlaiko gyvūninių maisto produktų šviežumą, maistinę vertę, spalvą bei skonį [48, 49, 50].

### **1.5. Bioaktyviųjų junginių išskyrimo metodai**

Gervuogių uogose ir jų išspaudose gausu įvairių junginių, naudingų sveikatai, todėl vis labiau stengiamasi iš jų išgauti naudingus junginius ir šių uogų ekstraktus pritaikyti maisto produktuose. Yra didelis susidomėjimas galimu poveikiu žmonėms dėl uogų išspaudų fitocheminės sudėties ir jų teigiamo poveikio sveikatai [26].

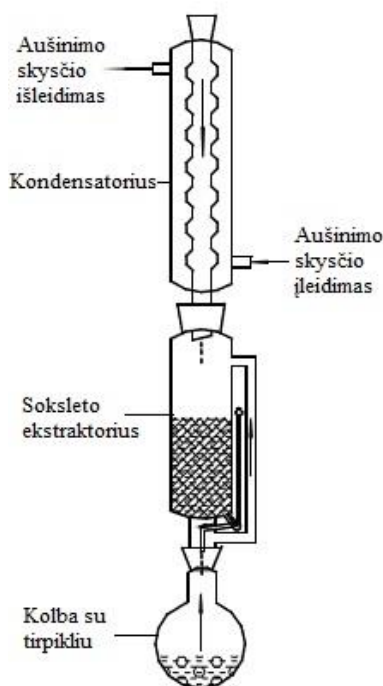
Iš uogų išspaudų ekstraktų gauta didelė maistinė vertė gali pateisinti tam tikrų ekstraktų komercializavimą ne tik kaip maisto priedus, bet ir kaip kosmetikos komponentus [11]. Norint ir siekiant, kad augalinė žaliava būtų racionaliai panaudota, būtina išskirti natūralius bioaktyvius junginius bei kitas sveikatai vertingas medžiagas.

Ekstraktai, praturtinti bioaktyviais junginiais, gali būti gaunami taikant įvairius ekstrakcijos metodus – tradicinius, aukšto slėgio ir inovatyvius. Tradiciniai ekstrakcijos metodai – tai maceravimas ir Soksleto ekstrakcija. Vykdam šiuos metodus, ekstrakcijai sunaudojamas nemažas kiekis tirpiklio ir ekstrakcija vykdoma ilgą laiko tarpą. Aukšto slėgio metodams priskiriami superkritinė ekstrakcija CO<sub>2</sub> ir ekstrakcija padidintame slėgyje tirpikliais.

Taikant šiuos metodus sunaudojamas mažesnis kiekis tirpiklio, gaunamas geresnės kokybės ekstraktas ir ekstrakcija vykdoma trumpesnę laiką. Inovatyviems metodams priskiriama ekstrakcija su fermentais. Veikiant fermentais tiriamą medžiagą, suskaldomi stambiamolekuliniai junginiai ir taip gaunamas didesnis ekstrakto kiekis.

### 1.5.1. Soksleto ekstrakcija

Soksleto ekstrakcija yra naudojama įvairių junginių išskyrimui, tačiau anksčiau ši ekstrakcija buvo naudojama tik lipidų frakcijos išskyrimui [52]. Soksleto aparatas pateiktas 5 paveiksle.



5 pav. Soksleto aparatas [53]

Soksleto ekstrakcijos naudojimas turi privalumų, jog tai yra pigus bei paprastas metodas, ir vykdant ekstrakciją, nebūtina stebėti proceso, todėl dažnai atliekamas norint išskirti junginius. Tačiau šis metodas turi ir trūkumų. Kadangi tai ilgai trunkanti ekstrakcija tirpiklio virimo temperatūroje, tai gali būti prarandami tam tikri junginiai, nes gali įvykti terminis junginių skilimas. Taip pat vienas iš pagrindinių trūkumų yra tai, kad Soksleto ekstrakcijos metu sunaudojamas didelis kiekis tirpiklio [54].

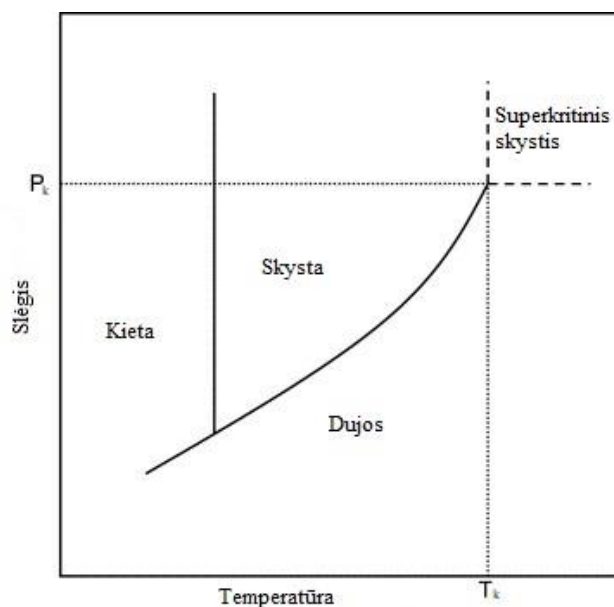
Ekstrakcijai galima naudoti įvairius tirpiklius, tačiau dažniausiai naudojamas yra heksanas. Nors šis tirpiklis didina aplinkos užteršimą, tačiau jis gerai tirpina aliejus ir taip gaunama didesnė išeiga. Pastaruoju metu vis dažniau bandoma pasirinkti tirpiklį, kuris nesukelia taršos aplinkai ir apsaugo nuo sveikatos problemų. Tai tokie tirpikliai kaip vanduo, etanolis, izopropanolis. Tačiau šių tirpiklių naudojimas sumažina ekstrakto išeigą, kadangi sumažėja tirpinamos medžiagos ir tirpiklio giminingumas [53]. Ekstrakto išeiga priklauso ne tik nuo tirpiklio, bet ir nuo žaliavos

dalelių dydžio. Kuo mažesnės dalelės, tuo didesnis paviršiaus plotas ir gaunama didesnė išeiga [55]. Po ekstrakcijos gautame ekstrakte dar būna likęs tam tikras tirpiklio kiekis, kurį reikia nugarinti su rotaciniu garintuvu.

Vykdamt ekstrakciją, pirmiausia medžiaga, kuri ekstrahuojama, dedama į ekstraktorių. Po to į ekstraktorių pilamas kondensuotas tirpiklis iki tokio lygio, kad būtų perpildyta ir tirpiklis patektų į distiliavimo kolbą, kurioje tirpiklis ir ekstraktas, vienas nuo kito, atskiriami distiliavimo būdu. Atskirtas tirpiklis susikaupia ekstraktoriuje. Toks procesas vykdomas iki tol, kol ekstrakcija galutinai baigiasi [53].

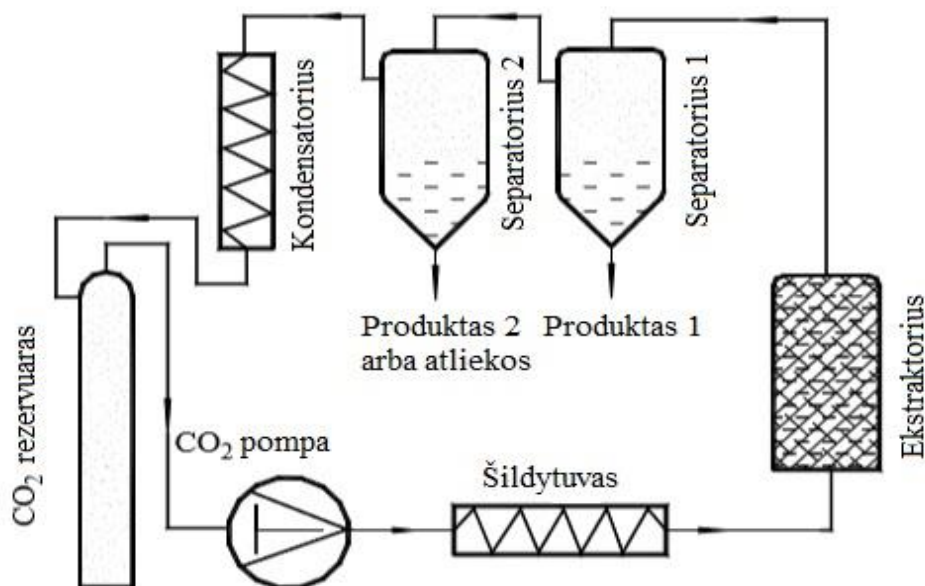
### 1.5.2. Superkritinė ekstrakcija CO<sub>2</sub>

Superkritinė ekstrakcija CO<sub>2</sub> – tai toks metodas, kurio metu CO<sub>2</sub> dujos transformuojasi į specifinę būseną, vadinamą superkritiniu skystiu. Superkritinis skystis gaunamas tada, kai temperatūra bei slėgis pasiekia kritinius taškus ir gaunamas vienas bendras taškas. Tačiau jei vienas parametras yra virš kritinio taško, o kitas – ne, skystis vadinamas subkritiniu [56]. Temperatūros kritinis taškas yra tada, kai pasiekiamą aukščiausia temperatūra, kurioje dujos pereina į skystą fazę, jei padidėja slėgis. O slėgio kritinis taškas – kai skystis pereina į dujinę fazę, jei padidėja temperatūra. 6 paveiksle pateikta kaip susidaro superkritinis skystis.



6 pav. Diagrama, parodanti superkritinį tašką [57]

Tai kietos frakcijos mėginių ekstrakcijos metodas, kuriame tirpiklis yra superkritinis skystis [58]. CO<sub>2</sub> ekstraktoriaus schema pateikta 7 paveiksle.



7 pav. CO<sub>2</sub> ekstraktoriaus schema [53]

Kad būtų gaunami CO<sub>2</sub> ekstraktai, naudojamas slėgis nuo 20 MPa iki 50 MPa ir didelio tankio dujos. Šiame metode būtina, kad dujos būtų suslėgtos [59]. Taip pat, kad ekstrakcija būtų tinkamai atlikta, reikia tinkamai pasiruošti žaliavą, pasirinkti superkritinį skystį ir tinkamus ekstrakcijai reikalingus parametrus (laikas, temperatūra, slėgis) [53].

Superkritiniai skysčiai yra tinkami tirpikliai vykdant ekstrakciją, kadangi pasižymi unikalėmis fizikocheminėmis savybėmis. Šių skysčių tankis, lyginant su įprastais skysčiais, yra daug mažesnis, todėl turi geresnes savybes skverbiantis į kietą matricą. Atliekant superkritinę ekstrakciją, dažnai pasirenkamas tirpiklis anglies dvideginis, nes jis išgaruoja ir taip netrukdo vykdant tolimesnius tyrimus.

CO<sub>2</sub> (anglies dvideginio) dujos – pigios, nedegantčios, inertiškos, nekenkiančios aplinkai ir plačiai naudojamos. Šios dujos ypač populiarios ekstrakcijoje, nes pakeitus temperatūrą bei slėgį, taip pat gali būti pakeičiamas ir tirpiklio gebėjimas tirpinti tam tikrus junginius, esančius uogose. Naudojant anglies dvideginio dujas ekstrakcijos metu, išvengiama terminė maisto degradacija, kadangi šių dujų kritinė temperatūra ir slėgis yra nedideli (temperatūra – 31,06 °C, o slėgis – 7,386 MPa) [60]. Pagrindinis CO<sub>2</sub> trūkumas toks, kad jis pasižymi mažu poliškumu, todėl ne visi reikalingi junginiai gali būti išekstrahuojami. Tačiau norint padidinti CO<sub>2</sub> poliškumą, naudojami cheminiai modifikatoriai, tokie kaip vanduo, acetonas, metanolis, etanolis, heksanas ir dichlormetanas [61]. Dažniausiai poliškumui padidinti pasirenkamas metanolis, kadangi jis geriausiai padidina poliškumą, tačiau labiausiai rekomenduojama naudoti etanolį, nes jis iš visų modifikatorių yra mažiausiai toksiškas [60].

Pradedant vykdyti SKE–CO<sub>2</sub>, tiriamoji medžiaga dedama į specialią ekstrakcijos celę. Celė uždaroma dangčiu, kuriame įtvirtintas temperatūros matavimo valdiklis bei slėgio įėjimo ir išėjimo vožtuvai, kad ekstrakcijos metu būtų palaikomos nustatytos sąlygos. Ekstrakcijos celė, pompos pagalba, užpildoma superkritiniu skysčiu. Po to skystis patenka į separatorius, kuriuose atskiriami ištirpę skystyje junginiai [62].

Superkritinių skysčių ekstrakcijos privalumai [63]:

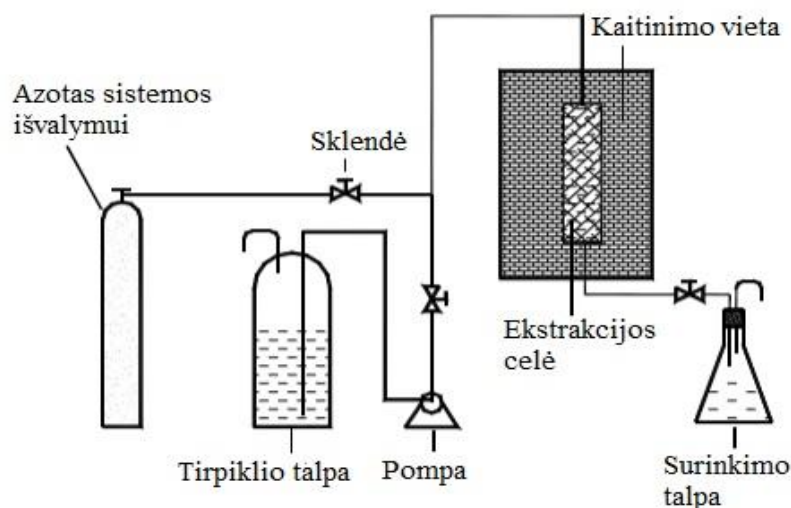
- 1) Superkritiniai skysčiai turi didelį difuzijos koeficientą ir mažą klampumą, todėl gali efektyviau prasiskverbti į tiriamą medžiagą ir greičiau atlikti masės mainus;
- 2) Keičiant slėgį bei temperatūrą, galima pasiekti didesnę superkritinių skysčių selektyvumą;
- 3) Ištirpę junginiai nuo tirpiklio lengvai atskiriami, todėl nereikia papildomo laiko ekstrakto sukonzentravimui, kurio metu gali būti prarandami tam tikri lakieji junginiai;
- 4) SKE–CO<sub>2</sub> gali būti tinkama technika termiškai labilių junginių tyrinėjimui, kadangi atliekama esant žemai temperatūrai;
- 5) Ekstrakcija vykdoma trumpesnę laiką lyginant su kitais, tradiciniais, metodais;
- 6) SKE–CO<sub>2</sub> procesuose skystis, dažniausiai CO<sub>2</sub>, panaudojamas pakartotinai arba perdirbamas, taip sumažinant atliekų susidarymą;
- 7) Ekstrakcijos metu tirpikliai naudojami nedideliais kiekiais;
- 8) Pagrindinis privalumas – tai, kad gaunamas aukštos kokybės grynas ekstraktas be likučių.

Didžiausias trūkumas superkritinių skysčių ekstrakcijos, kad naudojama speciali įranga, kuri yra labai brangi [64].

### ***1.5.3. Ekstrakcija padidintame slėgyje tirpikliais (EPS)***

Ekstrakcija padidintame slėgyje vykdoma esant 50–200 °C temperatūrai ir 10–15 MPa slėgiui. Šis metodas panašus į superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos metodą, kadangi tirpikliai veikiami slėgio [65]. Ekstrakcijos schema pateikta 8 paveiksle.

Slėgis palaikomas visos ekstrakcijos metu tam, kad aukštoje temperatūroje tirpiklis išliktų skystoje būsenoje. Taip pat dėl slėgio ekstrakcijos metu celė greit užpildoma tirpikliu. O esant aukštesnei temperatūrai, gaunama didesnė išeiga, kadangi padidinamas ekstrahuojamų junginių tirpumas bei padidėja masės mainų greitis [59].



**8 pav.** Ekstrakcijos padidintame slėgyje ekstraktoriaus schema [53]

Ekstrakcija padidintame slėgyje dažniausiai atliekama su organiniais tirpikliais arba vandeniu. EPS ekstrakcijos metu sunaudojamas nedidelis kiekis tirpiklio lyginant su Soksleto ekstrakcija. Taip pat šis ekstrakcijos būdas yra geras tuo, kad ekstrakcija vykdoma neilgai ir tai yra visiškai automatizuotas ekstrakcijos metodas [66]. Tačiau EPS ekstrakcijos metu gali būti prarandami junginiai, kurie neatsparūs aukštesnei temperatūrai.

Šiam metodui naudojama išdžiovinta bei susmulkinta žaliava. Tiriama medžiaga dedama į ekstrakcijos celę, kurios abiejuose galuose įtvirtinami specialūs filtrai ir uždedami celės dangteliai. Ekstrakcijai naudojama celė turi būti atspari aukštam slėgiui. Taip pat turi būti parinkta tokio dydžio, kad atitiktų turimos medžiagos kiekį, kadangi parinkus per didelę celę, bus sunaudojamas didelis kiekis tirpiklio. Paruošta celė su mėginiu dedama į įrengimą, kaitinama iki nustatytos temperatūros, o po to per viršų užpildoma tirpikliu. Vykdoma statinė fazė, kurios metu į tirpiklį prasiskverbia junginiai, esantys tiriamoje medžiagoje. Po tam tikro (nustatyto) laiko, celė vėl pildoma tirpikliu, taip išstumiant jau esantį tirpiklį su junginiais į specialų surinkimo indą. Ekstrakcijos pabaigoje, celėje likęs tirpiklis į surinkimo indą išstumiamas suspaustomis azoto dujomis [67]. Gautas ekstraktas garinamas rotaciniu garintuvu kol visiškai nebelieka tirpiklio.

#### ***1.5.4. Ekstrakcija naudojant fermentus***

Naudojant įprastus tirpiklius ne visi bioaktyvūs junginiai gali būti išskirti. Kai kuriose augalų ląstelėse fenoliai gali būti aptinkami kaip ląstelės sienelės fenoliai susijungę su polisacharidais, todėl panaudojus įprastus tirpiklius, bioaktyvūs junginiai nebus išekstrahuoti. Kad būtų išskirti atskiri fenoliai, reikalingas ląstelių sienelių polisacharidų skilimas, kuris gali

įvykti panaudojus fermentus [68]. Fermentinių preparatų pagalba ląstelių sienelių struktūra yra suardoma ir tokiu būdu galima išekstrahuoti didesnę kiekį bioaktyviųjų junginių [69].

Fermentai vis dažniau taikomi atliekant mokslinius tyrimus. Pagrindinė jų funkcija – augalų ląstelių sienelių suardymas [70]. Taip pat jie veikia kaip katalizatoriai fermentinėje ekstrakcijoje, atskiriantys bioaktyvius junginius iš žaliavos.

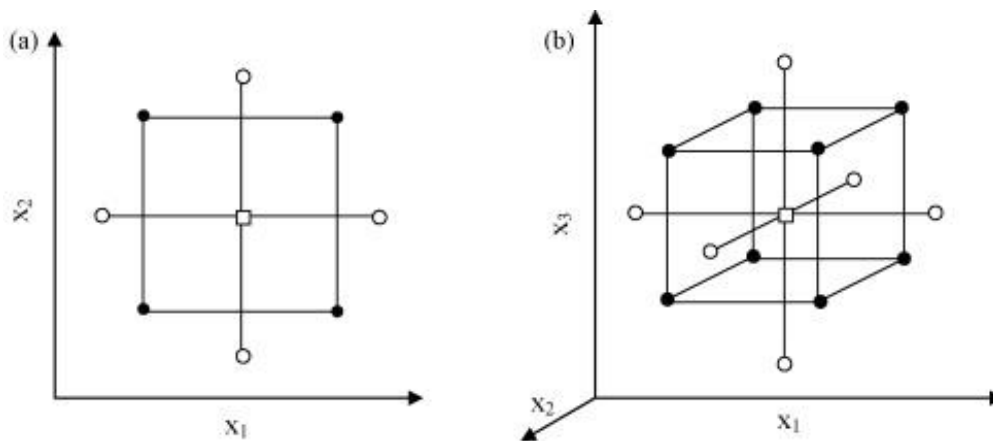
Fermentinėje ekstrakcijoje naudojamas fermentinis preparatas *Viscozyme®L* yra daugiakomponentė karbohidrazė, galinti veiksmingai hidrolizuoti augalų ląstelių sienelių polisacharidus. Tai naudinga skaidant ryšius su polisacharidų matricomis ir tokiu būdu išgaunama daugiau tarpląstelių komponentų [71].

Fermentinė ekstrakcija turi tam tikrų privalumų lyginant su kitais ekstrakcijų metodais. Vykdamas ekstrakciją su fermentais – nenaudojami organiniai tirpikliai, kurie gali būti kenksmingi aplinkai, taip pat fermentais pagrįstų procesų metu naudojamos švelnesnės veikimo sąlygos, kurios užtikrina ekstrakto kokybę [70]. Atliekant ekstrakciją su fermentais svarbūs veiksniai yra fermento koncentracija, inkubacinis laikas, temperatūra ir pH. Visi šie veiksniai gali paveikti fermentinio apdorojimo efektyvumą [71].

## **1.6. Procesų optimizavimas**

Optimizavimas atliekamas siekiant išsiaiškinti ekstrakcijai turinčių veiksnių įtaką ir nustatyti optimalias sąlygas, kurios veikia ekstrakto išeigą [72]. Eksperimentinių sąlygų optimizavimui taikoma atsako paviršiaus metodika (APM) – tai empirinė statistinė metodika, naudojama nustatyti koreliacijai tarp įvestų kintamųjų ir atsako [73]. Optimizavimas naudojant paviršiaus atsako metodiką ne tik suteikia galimybę peržiūrėti platų eksperimentų planą, bet ir parodo kokį vaidmenį atlieka kiekvienas parametras [74]. Prieš taikant APM metodiką, pirmiausia reikia pasirinkti eksperimentinį planavimą, pagal kurį bus atliekami eksperimentai. Yra kelios eksperimentinio planavimo formos: trijų lygių, Box–Behnken, centriškai kompoziciniai ir Doehlert modeliai [75]. Vienas iš populiariausių ir dažnai naudojamų atliekant tyrimų optimizavimą – centriškai kompozicinis eksperimentinis planavimas (CKP). Šis metodas yra dažnai taikomas, kadangi atliekant minimalų eksperimentų skaičių, gaunami statistiškai tikslūs rezultatai [73].

Keičiamų kintamųjų poveikis pavaizduojamas sudarant paviršiaus atsako metodikos grafiką [75]. Jei optimizavimas atliekamas keičiant du parametrus – brėžiamas kvadratas, o jei tris – kubas (žr. 9 pav.) [72].



**9 pav.** Centriškai kompozicinis eksperimentų planavimas, skirtas (a) dviejų ir (b) trijų kintamųjų optimizavimui

CKP turi šias charakteristikas:

- 1) Visi veiksniai tiriami penkiais lygiais  $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$ ;
- 2) Eksperimentų skaičius turi atitikti skaičių, apskaičiuotą pagal formulę:

$$N = k^2 + 2k + c_p \quad (1)$$

Čia:  $k$  – veiksnių kiekis;  $c_p$  – centrinio taško pasikartojimų skaičius.

- 3)  $\alpha$  vertės priklauso nuo kintamųjų skaičiaus ir gali būti apskaičiuotos pagal formulę:

$$\alpha = 2^{(k-p)/4} \quad (2)$$

Pagrindiniai paviršiaus atsako metodikos taikymo optimizavimui etapai:

- 1) Nepriklausomų kintamųjų, kurie turi didelę įtaką tyrimui, pasirinkimas;
- 2) Eksperimentinio plano pasirinkimas ir eksperimentų atlikimas;
- 3) Gautų eksperimentinių duomenų statistinis – matematinis apdorojimas, pritaikant daugianario funkciją;
- 4) Modelio tinkamumo įvertinimas;
- 5) Kiekvieno kintamojo optimalių verčių parinkimas.

Norint nustatyti kritinį tašką (minimumą, maksimumą), būtina, kad daugianarė funkcija turėtų kvadratinės reikšmes:

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

Čia:  $y$  – atsako kintamasis;  $k$  – kintamųjų skaičius;  $\beta_0$  – pastovus narys;  $\beta_i$  – kvadratiniai parametro koeficientai;  $x_i$  – nepriklausomi kintamieji;  $\varepsilon$  – eksperimentinės klaidos narys [75].



## 2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

### 2.1. Tiriamasis objektas ir jo apdirbimas

Tiriamasis objektas – gervuogės (*Rubus subgen. Rubus*). Uogos buvo gautos iš įmonės UAB „FUDO“. Gervuogės apdorotos su lėtaeige sulčiaspaude („*Hurom HH – 2G*“, Pietų Korėja) ir taip gautos išspaudos, kurios džiovinamos 35 °C temperatūroje su maisto produktų džiovykle („*SFD 1205 WH*“ *SENCOR*). Išdžiovintos išspaudos susmulkinamos su laboratoriniu cikloniniu malūnu („*Retch*“, Vokietija). Susmulkinimui naudojamas 0,2 mm dydžio akučių sietelis.

Iš uogų gautų išspaudų išeiga nustatyta 33,69 %, o sulčių – 66,31 %.

### 2.2. Medžiagos ir cheminiai reagentai

Tyrimams naudotos medžiagos: diatominė žemė (*Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, JAV*), mikrokristalinė celiuliozė (*Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, JAV*).

Tirpikliai, naudojami tyrimams atlikti: metanolis (CH<sub>3</sub>OH), etanolis (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) (*Stumbras, Kaunas, Lietuva*), heksanas (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), acetonas (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), distiliuotas vanduo, CO<sub>2</sub> dujos (99,9%, *Gaschema, Jonava, Lietuva*).

Naudoti reagentai: Folin–Ciocalteu (*Sigma–Aldrich, Buchs, Šveicarija*), ABTS<sup>+</sup> (*Sigma–Aldrich, Steinheim, Vokietija*), azobis (*Sigma–Aldrich, Steinheim, Vokietija*), fluoresceinas (*Sigma–Aldrich, Steinheim, Vokietija*), TROLOX (*Sigma–Aldrich, Steinheim, Vokietija*), natrio chloridas (NaCl) (*Lach–Ner, Brno, Čekija*), natrio karbonatas (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (*Sigma–Aldrich, Tokyo, Japonija*), kalio persulfatas (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (*Lach–Ner, Brno, Čekija*), dihidrofosfatas (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (*Panreac, Barselona, Ispanija*), kalio chloridas (KCl) (*Lach–Ner, Brno, Čekija*), natriohidrofosfato–dodekahidratas (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×12H<sub>2</sub>O) (*Merck KGaA, Darmstadt, Vokietija*), galo rūgštis (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) (*Sigma–Aldrich, Steinheim, Vokietija*), *Vyscozyme L* (*Novozymes, Bagsvaerd, Danija*).

### 2.3. Gervuogių išspaudų cheminės sudėties nustatymas

#### 2.3.1. Drėgmės kiekio nustatymas

Drėgmės kiekiui nustatyti buvo remiamasi LST ISO 712:2000 [76]. Biuksai prieš tyrimą iškaitinami iki pastovios masės. Į biuksus 0,0002 g tikslumu pasveriami 3–5 g gervuogių išspaudų ir gerai išmaišius džiovinama džiovinimo krosnelėje „VENTICELL“, esant 100–105 °C temperatūrai. Pirmą kartą bandinys pasveriamas po 3 valandų, o po to svėrimai kartojami kas 6 valandas, kol pakartotinių svėrimų rezultatai skiriasi 0,001–0,005 g. Prieš sveriant biuksai 30 minučių vėsinami eksikatoriuje.

Bandinio drėgmės kiekis, išreikštas procentais, skaičiuojamas pagal formulę:

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

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

### 2.3.2. Baltymų kiekio nustatymas

Baltymų kiekis nustatytas Kjeldalio metodu, remiantis LST ISO 20483:2006 [77]. Atliekant tyrimą šiuo metodu, analitinėmis svarstyklėmis 0,0002 g tikslumu pasveriamas 1 g gervuogių išspaudų į Kjeldalio kolbą. Pasvėrus žaliavą, į kolbą įpilama 20 ml koncentruotos  $H_2SO_4$  ir įdedama katalizatoriaus tabletė (tabletės sudėtis:  $K_2SO_4$ ;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ;  $TiO_2$ ). Kolba kaitinama elektriniu kaitintuvu (68–72 °C temperatūroje), kol tirpalas pasidaro skaidrus. Po kaitinimo kolbos atvėsinaimos.

Naudojant automatinę distiliavimo įrangą, gautas mineralizato tirpalas distiliuojamas 5 minutes vandens garais. Išsiskyre amoniako garai kondensuojami grįžtamajame šaldytuve ir surenkami distiliato surinkimo kolbutėje. Į distiliatą įlašinus Taširo indikatorių, titruojama 0,1 N HCl, kol žalsva bandinio spalva pasikeičia į violetinę.

Taip pat atliekamas kontrolinis bandinys, tik vietoje mineralizato į distiliacijos kolbą pilama 20 ml koncentruotos  $H_2SO_4$ .

Azoto kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{1,4 \cdot 0,1 \cdot (V_1 - V_0)}{m}, \% \quad (5)$$

Čia: 1,4 – azoto kiekis, kurį sujungia 1 ml 0,1 N HCl;  $V_1$  – 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas iš distiliuojamo mineralizato išsiskyrusiam amoniakui sujungti, ml;  $V_0$  – 0,1N HCl, sunaudotas tuščiajam mėginiui nutitruoti, ml;  $m$  – bandinio kiekis, g; 0,1 – druskos rūgšties, naudotos titravimui, normalingumas.

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

### 2.3.3. Riebalų kiekio nustatymas

Riebalų kiekis nustatytas Soksleto metodu, remiantis LST ISO 1443:2000 [78]. Tiriamas išdžiovintas bandinys (gautas po drėgmės kiekio nustatymo), 3–5 g gervuogių išspaudų be nuostolių pernešama ant popierinio filtro. Filtras su bandiniu kruopščiai susukamas. Paruoštas bandinys pasveriamas 0,0002 g tikslumu ir sudedamas į Soksleto aparatą. Ekstrakcija vykdoma su tirpikliu – heksanu, 6 valandas.

Pasibaigus ekstrakcijai, bandiniai išimami iš ekstraktoriaus ir laikomi traukos spintoje kol išgaruoja tirpiklio likučiai. Po to bandiniai dar džiovinami 100–105 °C temperatūroje 30 min ir

pasveriami. Riebalų kiekis apskaičiuojamas pagal tai, kiek po ekstrakcijos sumažėja filtro su tiriami medžiaga masė.

Bandinio riebalų kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{a-b}{m} \cdot 100, \% \quad (6)$$

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.

#### **2.3.4. Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas**

Mineralinių medžiagų kiekis nustatytas remiantis LST ISO 2171:2007 [79]. Porcelianinis tigris iškaitinamas džiovinimo krosnelėje iki pastovaus svorio. Į tigrį pasveriami 2–5 g gervuogių išspaudų 0,0002 g tikslumu. Tigris su bandiniu apanglinamas ant elektrinės plytelės, kol visiškai neberūksta dūmai. Po apanglinimo tigris su medžiaga perkeliamas į mufelį, kurio vidaus temperatūra siekia 600–650 °C. Deginama 15–16 valandų ir stebima, kad paskutiniai du svėrimų rezultatai skirtųsi tik 0,0001 – 0,0005 g.

Pelenų kiekis, išreikštas procentais, apskaičiuojamas pagal formulę:

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

Čia: m – tiglio svoris, g; m<sub>1</sub> – tiglio svoris su bandiniu, g; m<sub>2</sub> – tiglio svoris su pelenais, g.

### **2.4. Eksperimentinio plano sudarymas**

Funkcionaliuųjų ingredientų išgavimui iš gervuogių išspaudų buvo atlikti įvairūs ekstrakcijų metodai, kurių metu gauti ekstraktai, praturtinti junginiais. Ekstraktų gamybos bei tyrimų schema pateikta 10 paveiksle.

Pirmiausia su gervuogių išspaudomis buvo atlikta Soksleto ekstrakcija, kurios metu naudotas tirpiklis heksanas. Ekstrakcija vykdyta 68–72 °C temperatūroje 360 minučių.

Tyrimo metu atliktas superkritinės ekstrakcijos CO<sub>2</sub> ir ekstrakcijos padidintame slėgyje su etanoliu parametru optimizavimas.

Atlikta superkritinė ekstrakcija CO<sub>2</sub>, jos metu taikytos optimalios sąlygos: 64 °C temperatūra, 54,8 MPa, 171 min. Po SKE–CO<sub>2</sub> gauta liekana toliau ekstrahuojama naudojant ekstrakciją padidintame slėgyje su etanoliu. Ekstrakcija vykdyta optimaliomis sąlygomis – 90 °C temperatūroje, 3×15 min. Po ekstrakcijos gauta liekana dar ekstrahuojama tuo pačiu metodu, tik naudojant tirpiklį – vandenį, 130 °C temperatūroje, 3×10 min.

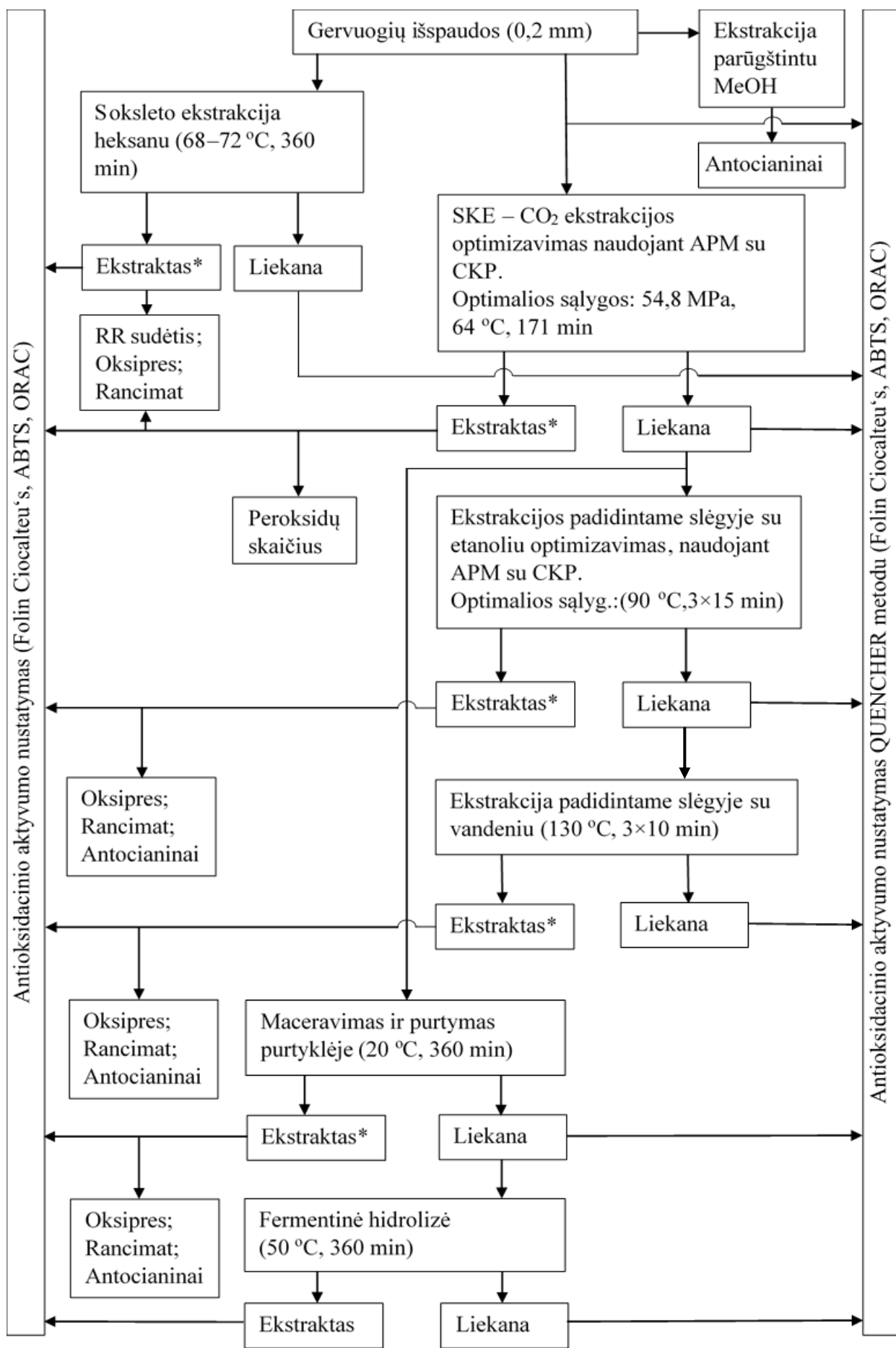
Su SKE–CO<sub>2</sub> liekana dar atliktas maceravimas ir purtymas purtyklėje su 70 % etanoliu. Po šios ekstrakcijos gauta liekana apdorojama taikant fermentinę hidrolizę, kad būtų išgaunami

bioaktyvūs junginiai, kurie nebuvo išskirti taikant kitus ekstrakcijos metodus. Fermentinės hidrolizės metu naudojamas fermentinis preparatas *Viscozyme L*.

Ekstraktų, gautų po Soksleto, SKE–CO<sub>2</sub>, ekstrakcijų padidintame slėgyje su etanoliu, vandeniu ir po maceravimo bei purtymo purtyklėje, nustatytas oksidacinis stabilumas, taikant Oksipres ir Rancimat metodus. Ekstrakto, gauto po SKE–CO<sub>2</sub>, nustatytas peroksidų skaičius.

Naudojant chromatografinius metodus, nustatyta lipofilinių ekstraktų (po SKE–CO<sub>2</sub> ir po Soksleto) riebalų rūgščių sudėtis. Visuose ekstraktuose, išskyrus ekstraktą, gautą po fermentinės hidrolizės, preliminariai identifikuoti bioaktyvūs junginiai. Taip pat atlikta antocianinų analizė gervuogių išspaudose ir jų ekstraktuose po ekstrakcijos padidintame slėgyje su etanoliu bei vandeniu.

Po įvykdytų ekstrakcijų, gautų liekanų ir ekstraktų antioksidacinis aktyvumas įvertintas *Folin Ciocalteu's*, ABTS<sup>+</sup> ir ORAC metodais. Tiriant kietą frakciją – taikyta QUENCHER procedūra, o ekstraktus – tradicinė tyrimų procedūra.



10 pav. Tyrimų eigos schema

## 2.5. Soksleto ekstrakcija

Soksleto ekstrakcija buvo atlikta remiantis Luque de Castro (1998) metodika [54] naudojant automatinį Soksleto ekstraktorių (*Behr Labor-Technik, Düsseldorf, Vokietija*). Pradedant ekstrakciją, pirmiausia pasveriami 20 g susmulkintų gervuogių išspaudų ir kruopščiai suvyniojama į filtrinį popierių. Paruošti bandiniai pasveriami ir dedami į soksleto ekstraktorių. Ekstrakcija vyksta 6 valandas, 68–72 °C temperatūroje, naudojant tirpiklį – heksaną. Pasibaigus ekstrakcijai, gautas ekstraktas garinamas rotaciniu garintuvu (*Biuchi labortechnik AG, Konztanz, Šveicarija*), o po to, kad būtų visiškai pašalintas tirpiklis, ekstraktas prapučiamas azoto dujomis. Gauti ekstraktai pasveriami, paskaičiuojamos išeigos (g/100 g) ir saugomi šaldiklyje rudo stiklo buteliukuose.

Gauta liekana išdžiovinama iki pastovios masės 40 °C temperatūroje ir saugoma sausoje vietoje, sandariai uždarytuose maišeliuose.

## 2.6. Superkritinė ekstrakcija CO<sub>2</sub> (SKE–CO<sub>2</sub>)

SKE–CO<sub>2</sub> atliekama naudojant 99,9 % grynumo CO<sub>2</sub> dujas (*Gaschema, Jonava, Lietuva*) su ekstrakcijos sistema „*Helix*“ (*Applied Separation, Allen–town, PA, JAV*).

Susmulkintų gervuogių išspaudų pasveriami 20 g ir dedama į ekstrakcijos ceļ. Ceļs galuose įtvirtinamas absorbentas – vata. Ekstrakcijos metu CO<sub>2</sub> dujų srautas 2 L/min. Superkritinė ekstrakcija CO<sub>2</sub> buvo vykdoma vienomis sąlygomis, pasirinktomis išanalizavus literatūrą [80] ir dvejomis optimizuotomis sąlygomis:

1. 60 °C temperatūra, 120 min, 45 MPa slėgis;
2. 64 °C temperatūra, 171 min, 54,8 MPa slėgis;
3. 75 °C temperatūra, 126 min, 54,7 MPa slėgis;

Ekstrakcijos metu vykdomos statinė bei dinaminė fazės. Pirmiausia vykdoma statinė – 10 min, o po to dinaminė. Gautas ekstraktas surenkamas į skaidraus stiklo buteliukus. Po ekstrakcijos buteliukas su ekstraktu paliekamas kambario temperatūroje, kad nugaruotų ekstrakte likęs CO<sub>2</sub>. Turint tuščio buteliuko svorį ir buteliuko su ekstraktu svorį, apskaičiuojama išeiga g/100 g. Ekstraktas laikomas tamsiuose stikliniuose buteliukuose šaldiklyje, o liekana – sandariuose maišeliuose tamsioje sausoje vietoje.

## 2.7. Ekstrakcija padidintame slėgyje (EPS)

Kadangi CO<sub>2</sub> tirpina tik mažai polines ir nepolines medžiagas, tai polinių medžiagų išekstrahavimui pasirinkta atlikti ekstrakciją padidintame slėgyje. EPS buvo atlikta naudojant ASE 350 (*Dionex Corporation, Sunnyvale, JAV*) įrangą.

Atliekant ekstrakciją, buvo naudota medžiaga po SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakcijos, tirpikliai – etanolis ir vanduo. Vykiant ekstrakciją su etanoliu, nustatytos optimalios sąlygos: temperatūra 90 °C ir vykdoma 3 ciklai po 15 minučių. O vykiant ekstrakciją su vandeniu, sąlygos pasirinktos iš literatūros – 130 °C temperatūra, 3 ciklai po 10 minučių [80].

Pasibaigus ekstrakcijai, organiniai tirpikliai pašalinami naudojant rotacinį garintuvą, o vandeniniai ekstraktai – liofilizuojami. Gauti ekstraktai laikomi šaldiklyje tamsiuose buteliukuose.

## 2.8. SKE–CO<sub>2</sub> ir EPS ekstrakcijų optimizavimas

Šių ekstrakcijų optimalios sąlygos nustatytos atlikus matematinį centriškai kompozicinį eksperimentų planavimą atsako paviršiaus metodu, naudojant statistinę programą Design – Expert 7.0.0 („Stat–Ease Inc“, Mineapolis, MN, JAV). Tyrimų duomenys išanalizuoti dispersinės ir koreliacinės – regresinės analizės metodais. Optimizuojant SKE–CO<sub>2</sub> atlikta dvidešimt ciklų, o EPS – trylika ciklų skirtingomis sąlygomis, su trimis pakartojimais. Visi pasirinkti nepriklausomi parametrai užkoduoti trimis lygiais (–1, 0, +1). Pasirinkti veiksniai optimizuojami, kad būtų gaunama kuo didesnė ekstrakto išeiga. SKE–CO<sub>2</sub> ir EPS optimizavimo nepriklausomi kintamieji pateikti 5 lentelėje.

**5 lentelė.** SKE–CO<sub>2</sub> ir EPS pasirinkti nepriklausomi kintamieji optimizavimui

Nepriklausomi kintamieji	Vienetai	SKE–CO <sub>2</sub>		
		–1	0	1
Slėgis (p)	MPa	25	40	55
Temperatūra (T)	°C	50	65	80
Laikas (t)	min	60	120	180
Nepriklausomi kintamieji	Vienetai	EPS		
		–1	0	1
Temperatūra (T)	°C	50	70	90
Laikas (t)	min	5	10	15

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

## 2.9. Maceravimas ir purtymas purtyklėje

Šis metodas atliktas pagal Rodriguez – Saona ir kt. (2001) metodiką su nežymiais pakeitimais [81]. Tyrimas atliekamas su liekana po II SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakcijos. Ekstrakcijos metu naudojamas tirpiklis – mišinys: 70 % etanolis ir 30 % dist. H<sub>2</sub>O.

Pradedant tyrimą, pirmiausia pasveriamą žaliavą į kūginę kolbą ir užpilama iš anksto paruoštu tirpikliu. Žaliavos ir tirpiklio santykis 1:6. Mišinys suplakamas ir dedamas į purtyklę, kurioje purtoma 6 valandas. Praėjus laikui, nufiltruojama, liekana vėl užpilama tirpikliu (santykiu 1:3) ir purtoma dar 6 val. Pasibaigus purtymosi laikui, nufiltruojama. Gauti filtratai garinami rotaciniu garintuvu kol išgaruoja etanolis, o po to liofilizuojama, kad būtų pašalintas likęs vanduo. Gautas ekstraktas laikomas šaldiklyje iki kol bus analizuojamas. Liekana po ekstrakcijos išdžiovinama ir laikoma sandariuose maišeliuose.

## 2.10. Fermentinė hidrolizė

Metodas atliktas pagal Kapasakalidis ir kt. (2009) metodiką su pakeitimais [82]. Tyrimui naudojama kieta liekana po maceravimo ir purtymo purtyklėje su 70 % etanoliumi. Pasveriamą 5 g medžiagos, sudedama į kūginius užsukamus mėgintuvėlius, užpilama vandeniniu tirpalu (buferiu, kurio pH=4,8) ir su pipete pridedama 500 µl fermentinio preparato (*Viscozyme L*). Dar tokiu pat būdu paruošiamas bandinys, tik į jį nepridedama fermento. Fermentinė hidrolizė vykdoma 6 valandas, 50 °C temperatūroje, 250 aps/min greičiu. Po to, fermentinė hidrolizė inaktyvuojama 10 min laikant 100 °C temperatūros vandenyje. Po inaktyvavimo atšaldoma.

Taip pat padaromi kontroliniai mėginiai. Vienam naudojamas tik vandeninis tirpalas (t.y. buferis, kurio pH=4,8), o kitam – vandeninis tirpalas ir fermentinis preparatas.

Po fermentinės hidrolizės mėginiai centrifuguojami 400 aps/min greičiu, 10 minučių. Gautas kieta ir vandeninė fazės atskiriamos. Vandeninė fazė liofilizuojama, o kieta fazė – išdžiovinama. Apskaičiuojamos ekstrakcijos išeigos g/100 g fermentuojamos žaliavos. Gautas ekstraktas bei likutis saugomi tamsaus stiklo buteliukuose šaldiklyje.

### 2.10.1. Fermento aktyvumo nustatymas

Fermento aktyvumas nustatytas remiantis Ghose ir kt. (1987) aprašyta metodika [83]. Metodas pagrįstas reakcijos sustabdymu. Po tam tikro nustatyto laiko reakcija sustabdoma (paveikiant karščiu) ir matuojamas susiformavusio produkto kiekis.

0,5 ml tiriamo fermento 10 kartų praskiedžiama 0,05 M natrio citrato buferiu, kurio pH=4,8 ir šildoma 50 °C temperatūros vandenyje. Į gautą tirpalą pilama 0,5 ml substrato (2 % KMC ištirpinta natrio citrato buferyje), išmaišoma ir šildoma 30 min, 50 °C temperatūroje. Pasibaigus reakcijos laikui, pilama 3 ml DNS ir dar 5 min pavirinama. Po virimo – atvėsinama.



Išmatuojama gauto tirpalo absorbcija 540 nm bangos ilgyje ir nustatoma gliukozės koncentracija tirpale. Dar paruošiami tirpalai: gliukozės standartas (0,5 ml substrato tirpalas šildomas 30 min, 50 °C temperatūroje, po to įpilama 3 ml DNS ir 1 ml gliukozės standarto, verdama 5 min), tuščias fermento bandinys (0,5 ml substrato tirpalas šildomas 30 min, 50 °C temperatūroje, įpilama 3 ml DNS ir 1 ml fermento tirpalo, verdama 5 min), tuščias bandinys (0,5 ml substrato tirpalas šildomas 30 min 50 °C, pilama 3 ml DNS ir 1 ml citrato buferio, verdama 5 min). Visų atvėsintų mėginių išmatuojama absorbcija. Vienas fermento aktyvumo vienetas lygus fermento kiekiui, kuris hidrolizuodamas KMC reakcijos metu išlaisvina 1 μmol gliukozės per 1 minutę.

Nustatytas fermento aktyvumas buvo lygus 0,09 IU/ml.

## **2.11. Ekstraktų bei kietos frakcijos antioksidacinių savybių tyrimai**

Prieš atliekant antioksidacinio aktyvumo tyrimus pasirinkta modelinė sistema, pagal kurią padaromi skiediniai su skirtingomis koncentracijomis, o ne tiriami gryni koncentruoti ekstraktai ar gryna kieta frakcija.

Koncentruotų ekstraktų skiedinių paruošimui, ekstraktai tirpinami distiliuotame vandenyje arba metanolyje, priklausomai nuo to, kur tirpsta.

Kai tiriama kieta frakcija, skiediniai daromi su mikrokristaline celiulioze. Tai atliekama pagal modifikuotą Gökmen ir kt. (2009) metodiką [84].

Absorbcijai matuoti buvo naudojamas spektrofotometras „Spectronic Genesys 8“.

### **2.11.1. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK)**

Metodas atliekamas pagal modifikuotą Singleton, Orthofer ir Lamuela-Raventos (1999) [85] metodiką. Gauti rezultatai išreiškiami galo rūgšties ekvivalentais (mg GRE/g bandinio). Metodas yra paremtas *Folin – Ciocalteu's* reagento ir fenolinių junginių spalvine reakcija bei susidariusios spalvos intensyvumo matavimu, naudojant spektrofotometrą, taip nustatant fenolinių junginių kiekį.

Prieš atliekant tyrimą, *Folin – Ciocalteu's* reagentas praskiedžiamas distiliuotu vandeniu, santykiu 1:9.

Tiriant skystus ekstraktus, su automatine pipete paimama 150 μl bandinio arba metanolio (kontrolinis bandinys) ir sumaišoma su 750 μl *Folin – Ciocalteu's* tirpalu. Po 3 min dar įpilama 600 μl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tirpalo (75 g/l). Paruošti bandiniai padedami į tamsią vietą ir laikomi 2 valandas. Praėjus laikui, matuojama absorbcija, esant 760 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės lygtis:  $y=0,0104x+0,00185$ ;  $R^2 = 0,9987$ .

Atliekant QUENCHER procedūrą, pasveriami 10 mg bandinio arba 10 mg mikrokristalinės celiuliozės (kontrolinis bandinys) ir sumaišoma su 150 μl distiliuotu H<sub>2</sub>O,

750  $\mu$ l *Folin – Ciocalteu*'s tirpalu bei 600  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tirpalu (75 g/l). Paruošti bandiniai purtomi 2 valandas tamsoje, centrifuguojami (4500 aps/min, 5 min) ir matuojama absorbcija, esant 760 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės lygtis:  $y=0,012x+0,0329$ ;  $R^2=0,9958$ .

Galo rūgšties kalibracinei kreivei paruošti pasveriami 10 mg mikrokristalinės celiuliozės, įpilama 150  $\mu$ l galo rūgšties tirpalo (0–80  $\mu$ g/ml distiliuoto  $\text{H}_2\text{O}$ ) arba distiliuoto  $\text{H}_2\text{O}$  (kontroliniam bandiniui). Po to sumaišoma su 750  $\mu$ l *Folin – Ciocalteu*'s tirpalu ir 600  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tirpalu. Bandiniai kaip ir QUENCHER procedūroje purtomi 2 valandas, centrifuguojami ir matuojama absorbcija, esant 760 nm bangos ilgiui.

### **2.11.2. ABTS<sup>•+</sup> laisvųjų radikalų sujungimo metodas**

Šis metodas atliekamas pagal pakeistą Re ir kt. (1999) metodiką [86] ir išreiškiama Trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu (mg TE/g bandinio).

Pirmiausia pasirošiamas fosfatinis buferinis tirpalas (PBS): 1 l distiliuoto  $\text{H}_2\text{O}$  ištirpinama 8,18 g NaCl, 0,27 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ir 0,15 g KCl (pH = 7,4). ABTS<sup>•+</sup> radikalas gaunamas sumaišius 50 ml ABTS<sup>•+</sup> tirpalo (2 mmol/l PBS) su 200  $\mu$ l  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  tirpalu (70 mmol/l dist.  $\text{H}_2\text{O}$ ) ir gautą mišinį laikant kambario temperatūroje tamsioje vietoje 15–16 val. Darbinis ABTS<sup>•+</sup> tirpalas ruošiamas sumaišant koncentruotą mišinį su PBS buferiniu tirpalu iki  $0,700\pm 0,003$  absorbcijos vertės, esant 734 nm bangos ilgiui.

Tiriant skystus ekstraktus, paimama 25  $\mu$ l bandinio arba metanolio (kontrolinis bandinys) ir sumaišoma su 1500  $\mu$ l darbinio ABTS<sup>•+</sup> tirpalu. Sumaišyti bandiniai laikomi 2 val tamsoje ir po to matuojama jų absorbcija, esant 734 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės lygtis:  $y=0,0638x-1,3042$ ;  $R^2 = 0,9977$ .

Atliekant QUENCHER procedūrą, pasveriami 10 mg bandinio arba 10 mg mikrokristalinės celiuliozės (kontroliniam bandiniui), maišoma su 25  $\mu$ l metanolio ir 1500  $\mu$ l darbinio ABTS<sup>•+</sup> tirpalo. Paruošti bandiniai purtomi tamsoje 2 val, centrifuguojami (4500 aps/min, 5 min) ir matuojama absorbcija, esant 734 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės lygtis:  $y=0,0507x-0,3271$ ;  $R^2 = 0,9970$ .

Kalibracinei kreivei paruošti pasveriami 10 mg mikrokristalinės celiuliozės, sumaišoma su 25  $\mu$ l Trolokso tirpalo (0–1000  $\mu$ mol/l metanolio) arba metanolio (kontroliniam bandiniui) ir dar įpilama 1500  $\mu$ l darbinio ABTS<sup>•+</sup> tirpalo. Viską sumaišius, bandiniai purtomi 2 val tamsoje, centrifuguojami ir matuojama absorbcija prie 734 nm bangos ilgio.

### **2.11.3. Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas (ORAC)**

ORAC metodas atliekamas pagal Prior ir kt. (2003) metodiką [87] su nedideliais pakeitimais ir išreiškiama Trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu (mg TE/g bandinio).

Eksperimentas pagrįstas peroksido radikalų sujungimu, kurį generuoja azobis (AAPH). Analizei ruošiami skirtingų koncentracijų fluoresceino tirpalai:

1. S<sub>1</sub> tirpalas: 0,045 g fluoresceino miltelių tirpinama 100 ml PBS. Tirpinama ultragarso vonelėje, kol visiškai nelieka fluoresceino miltelių.

2. S<sub>2</sub> tirpalas: paimama 0,5 ml S<sub>1</sub> tirpalo ir 100 ml matavimo kolboje užpilama iki žymės PBS tirpalu.

3. S<sub>3</sub> tirpalas: paimama 0,8 ml S<sub>2</sub> tirpalo ir 50 ml matavimo kolbutėje užpilama iki žymės PBS tirpalu.

Tiriant skystus ekstraktus, 25 µl bandinio arba metanolio (tuščias bandinys) ir 150 µl fluoresceino tirpalo S<sub>3</sub> supilama į 96 šulinėlių juodą nepermatomą lėkštelę. Inkubuojama 37 °C temperatūroje 15 min. Po inkubacijos, su daugiakanale pipete į šulinėlius pripilama po 25 µl AAPH tirpalo (240 mmol/l). Tada lėkštelė dedama į spektrofotometrą (*FLUOstar Omega reader BMG Labtech, Offenburg, Vokietija*). Fluorescencija matuojama 120 ciklų (vienas ciklas trunka 1,1 min). Plotas, esantis po kalibracine kreive (AUC) kiekvienam bandiniui apskaičiuojamas integruojant santykinę fluoresceino kreivę. Kalibracinės kreivės lygtis:  $y=0,1394x-0,7395$ ;  $R^2 = 0,9926$ .

AUC apskaičiuojamas pagal formulę:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=120} \frac{f_i}{f_0} \quad (8)$$

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

Atliekant QUENCHER procedūrą, pasveriami 10 mg bandinio arba 10 mg mikrokristalinės celiuliozės (kontrolinis bandinys), įpilama 150 µl PBS tirpalo ir 900 µl fluoresceino tirpalo S<sub>3</sub>. Sumaišyti bandiniai, purtomi 1 val tamsoje, centrifuguojama (4500 aps/min, 5 min). Bandiniai atsargiai išimami iš centrifugos, kad nesusimaišytų. Su pipete kruopščiai paimamas optiškai skaidrus skystis (175 µl) ir supilamas į 96 šulinėlių juodą nepermatomą lėkštelę. Inkubuojama 37 °C temperatūroje 15 min. Po to supilama AAPH tirpalas (25 µl). Fluorescencija matuojama 150 ciklų (ciklo trukmė 1,1 min). Kalibracinės kreivės lygtis:  $y=0,1302x+2,7856$ ;  $R^2 = 0,9870$ .

Kalibracinės kreivės sudarymui buvo naudoti įvairių koncentracijų trolokso tirpalai (0–500 µmol/l PBS).

## 2.12. Riebalų oksidacinio stabilumo nustatymo tyrimai

### 2.12.1. Peroksidų skaičiaus nustatymas jodometriniu metodu

Metodas atliekamas remiantis LST EN ISO 3960:2010 [88]. Nustačius peroksidų skaičių, galima sužinoti, kiek tiriamuose riebaluose yra junginių (peroksidų ar į juos panašių riebalų

oksidacijos produktų), kuriuos oksiduoja jodidas, kai atliekama analizė. Šis rodiklis parodo riebalų sugedimo laipsnį, todėl laikomas svarbiu kokybės rodikliu.

Riebalų bandinys pasveriamas  $5 \pm 0,005$  g ir tirpinamas chloroformo bei ledinės acto rūgšties tirpale (2:3), ir dar įpilama 0,5 ml sotaus KJ tirpalo. Gautas mišinys maišomas 1 min, po to praskiedžiamas 30 ml dist.  $H_2O$  ir titruojamas 0,01 N natrio tiosulfato tirpalu. Titravimui naudojamas indikatorius – 1% krakmolo kleisteris. Titruojama iki kol visiškai išnyksta mėlyna spalva.

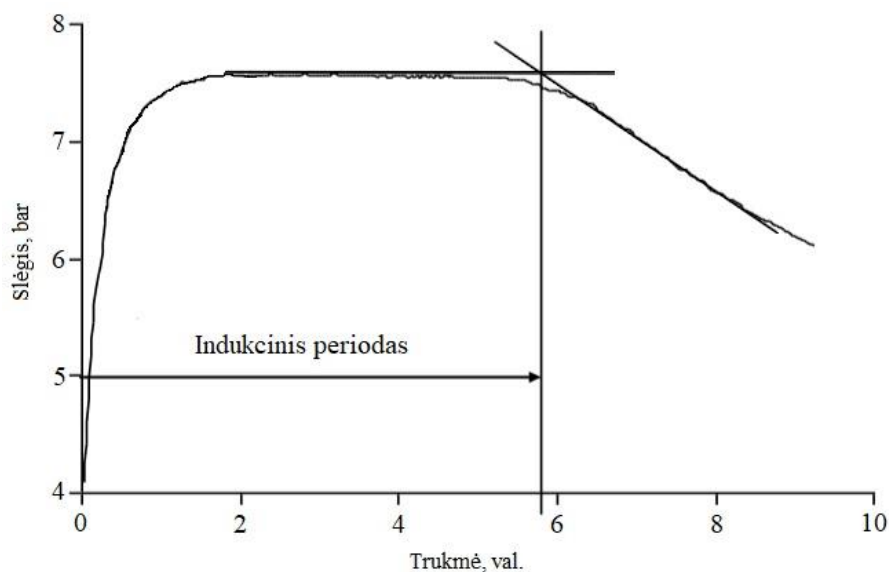
Lygiagrečiai atliekama kontrolinė analizė, tik jau nereikia riebalų. Peroksidų kiekis išreiškiamas mekv aktyvaus deguonies/kg aliejaus ir apskaičiuojamas pagal formulę:

$$PS = \frac{(V - V_1) \cdot N \cdot 1000}{m} \quad (9)$$

Čia:  $V$ ,  $V_1$  – natrio tiosulfato tirpalo kiekiai, sunaudoti nutitruoti tiriamajam ir kontroliniam mėginiams, ml;  $N$  – natrio tiosulfato koncentracija;  $m$  – riebalų masė naudota tyrimui, g.

### 2.12.2. Riebalų oksidacinio stabilumo nustatymas Oksipres metodu

Gervuogių išspaudų ekstraktų poveikis majonezo ir aliejaus oksidaciniam stabilumui buvo išbandytas instrumentiniu metodu Oksipres. Šis metodas atliekamas naudojant „ML Oxipres“ (*Mikrolab Aarhus, Højbjerg, Denmark*) prietaisą pagal Trojakova ir kt. (1999) metodiką [89]. Pasveriamas 0,001 g tikslumu 6 g (majonezui), 5 g (aliejiui) bandinio ir patalpinama į reakcijos celę. Tiriamas aliejaus stabilumas oksidacijai esant aukštai temperatūrai ir deguonies slėgiui. Oksidacinio stabilumo tyrimui naudota temperatūra 120 °C (majonezui) ir 110 °C (aliejiui), o deguonies slėgis – 0,5 MPa (5 bar). „ML Oxipres“ prietaisas automatiškai nubrėžia deguonies slėgio kitimo kreivę bei nustato indukcinį periodą (IP), kuris parodo riebalų patvarumą oksidacijai, valandomis (11 pav.).

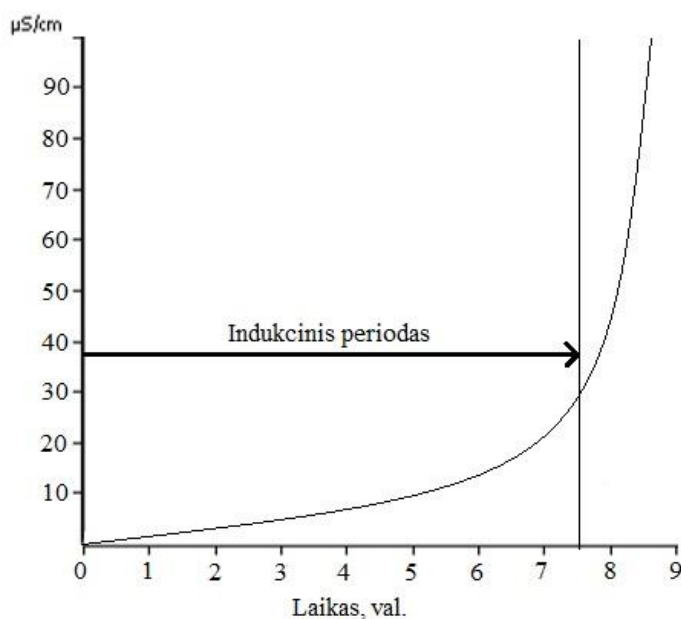


**11 pav.** Oksipresu užrašyta oksidacijos kinetinė kreivė ir nustatytas indukcinis periodas

### 2.12.3. Riebalų oksidacinio stabilumo nustatymas Rancimat metodu

Metodas atliekamas naudojant *Metrohm 873 Biodiesel Rancimat* (*Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland*) prietaisą pagal Jain ir kt. (2010) metodiką [90]. Atlikus šį metodą, galima pamatyti peroksidacijos proceso pabaigą.

Tiriami bandiniai su skirtingais gervuogių išspaudų ekstraktais majoneze ir grynas aliejus. Į reakcijos mėgintuvėlį pasveriamas bandinys  $6\pm 0,001$  g (majonezui),  $5\pm 0,001$  g (alieju). Mėgintuvėliai uždaromi specialiais dangteliais, kurie sujungti su oro padavimo žarnelėmis ir jau uždaryti mėgintuvėliai sudedami į Rancimat įrengimą. Lakieji junginiai, išsiskiriantys skilimo proceso metu, surenkami stiklinėlėse, pripildytose 60 ml distiliuoto vandens ir užfiksuojamas vandens laidumas. Reakcijai vykstant, prietaisas automatiškai nubrėžia kreivę bei nustato indukcinį periodą (12 pav.), kuris nustatomas kaip laiko intervalas, kai laidumas nepadidėja [91]. Reakcijai atlikti buvo naudojama 120 °C (majonezui), 110 °C (alieju) temperatūra, 0,5 MPa slėgis ir 20 L/val dujų srautas.



12 pav. Rancimatu užrašyta oksidacijos kinetinė kreivė ir nustatytas indukcinis periodas

### 2.13. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas dujų chromatografijos metodu

Metodas atliktas remiantis Moreda ir kt. (2001) metodika [92]. Atliekant tyrimą nustatomi riebalų rūgščių metilo esteriai, kurie turi nuo 8 iki 24 anglies atomų grandinę.

Trigliceridų esterinimui ir laisvų rūgščių apmuilininimui į 50 ml apvaliadugnę kolbą pilama 0,5 g aliejaus ir 4 ml metanolinio NaOH (0,5 N), po to kaitinama su grįžtamuju šaldytuvu, kol visiškai nebesimato riebalų fazės.

Po riebalų esterifikavimo, per grįžtamojo šaldytuvo viršų įpilama 5 ml 24% boro trifluorido/ metanolio komplekso ir verdama 2 min, po to atvėsinama iki kambario temperatūros.

Į atvėsintą bandinį įpilama 5 ml n-heksano ir 5 ml NaCl. Viskas gerai sumaišoma. Paliekama stovėti, kol susidaro sluoksniai. Viršutinė heksano fazė atskiriama ir laikoma iki kol bus analizuojama. Analizei imama 100 µl heksano fazės ir praskiedžiama 900 µl heksanu.

Tyrimas atliekamas dujiniu chromatografu HRGC 5300 (*Mega Series, Carlo Erba, Milan, Italija*) naudojant liepsnos jonizacinį detektorių su poline SPTM–2560 kolonėle (*Supelco, Bellefonte, PA, JAV*). Inžektoriaus (bandinio įleidimo kameros) temperatūra 220 °C, o detektoriaus – 240 °C. Įleisto bandinio kiekis – 1 µl. Junginiams identifikuoti naudotas etaloninis 37 riebalų rūgščių mišinys (*SupelcoTM*). Rūgščių metilo esteriai identifikuojami pagal išlaikymo laikus, o procentinė riebalų rūgščių sudėtis apskaičiuojama smailių plotus lyginant su etaloniniais smailių plotais.

#### **2.14. Preliminari ekstraktų analizė ultraefektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UESCh-Q-TOF)**

Ekstraktų analizė naudojant ultraefektyviosios skysčių chromatografiją atlikta pagal V. Kraujalytės (2013) pasiūlytą metodiką [93] su nežymiais pakeitimais. Ekstraktų analizė atlikta naudojant *Waters Acuity* sistemą (*Waters, Milford, JAV*), kuri buvo sujungta su hibridiniu kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru (angl. Q-TOF) (*Bruker Daltonic, Brėmenas, Vokietija*). Su atvirkščių fazių analitine kolonėle Acuity BEH C18 atliktas analičių skirstymas, Amide 2,1×100 mm, sorbento dalelių dydis – 1,7 µm (*Waters, Milford, JAV*), kuria buvo palaikoma 40 °C temperatūra. Eliuentų sistema: A – 0,4 % skruzdžių rūgštis (v/v), B – 100 % acetonitrilas. Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min, įleidžiamas tūris – 1 µl. Ekstraktų koncentracija 1 mg/ml. Iš kolonėlės išeinantys junginiai aptikti diodų matricos detektoriumi (DMD) esant 100–500 nm bangos ilgiui. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas neigiamos elektrinės jonizacijos režimu, kurio parametrai buvo kontroliuojami HyStar programine įranga. Chromatografinių smailių preliminarus identifikavimas atliktas lyginant su literatūros duomenimis ir duomenų bazėse esančia informacija (ChemSpider, Metlin).

#### **2.15. Antocianinų analizė**

##### **2.15.1. Bendras antocianinų kiekis**

Metodas atliktas remiantis Giusti ir kt. (2001) metodika [94]. Pradedant tyrimą pirmiausia paruošiami buferiniai tirpalai. Buferinis tirpalas, kurio pH=1 (kalio chloridas, 0,025 M) – į 1 l matavimo kolbą pasveriamas 1,86 g KCl ir įpilama distiliuoto H<sub>2</sub>O iki maždaug 980 ml, matuojamas pH, kurio paklaida gali būti 0,05, reguliuojama su HCl. Nustačius tinkamą pH, distiliuotu H<sub>2</sub>O praskiedžiama iki žymės. Buferinis tirpalas, kurio pH=4,5 (natrio acetatas, 0,4

M) – į 1 l matavimo kolbą pasveriamas 54,43 g  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ir įpilama distiliuoto  $\text{H}_2\text{O}$  iki maždaug 960 ml. Matuojamas pH ir po to iki žymės praskiedžiama su vandeniu.

Atitinkamų nustatytų koncentracijų bandiniai užpilami buferiniais tirpalais: tiek pH=1, tiek pH=4,5 ir matuojama absorbcija, esant 520 nm ir 700 nm bangos ilgiams. Apskaičiuojama antocianino pigmento (AP) koncentracija:

$$AP = \frac{A \cdot MW \cdot DF \cdot 10^3}{\epsilon \cdot l}, \text{ mg/l} \quad (10)$$

Čia:  $A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}$ ; MW (molekulinis svoris)=449,2 g/mol; DF – praskiedimo faktorius; l – kiuvetės ilgis;  $\epsilon=26900$  (moliarinė absorbcija).

### **2.15.2. Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė**

Antocianinų analizė atlikta remiantis Grunovaitės ir kt. (2016) pateikta metodika [95]. Antocianinų ekstrakcija: 2 g gervuogių išspaudų supilama į plačiadugnę kolbą, užpilama 20 ml  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (50:50), kuriame yra 0,1 M HCl. Mišinio ekstrakcija vykdoma 5 min ultragarso vonelėje ir 30 min intensyviai maišant magnetine maišykle (90 aps/min). Gauta ištrauka buvo filtruota per popierinį filtrą ir centrifuguota 2200 aps/min greičiu 5 min, 4 °C temperatūroje. Liekana pakartotinai tuo pačiu būdu buvo ekstrahuota 2 kartus. Supernatantas surenkamas ir koncentruojamas rotaciniame garintuve 25 °C temperatūroje, vėliau praskiedžiamas 25 ml matavimo kolbutėje iki žymės  $\text{CH}_3\text{OH}$ , kuriame yra 0,1 M HCl. Mišinys filtruojamas per 15 mm švirkšto filtrą ir saugomas gintaro spalvos buteliukuose –18 °C temperatūroje. Prieš atliekant chromatografinę analizę 1 ml gauto koncentrato buvo išgarinta iki sausumo azoto dujomis. Gautas turinys (arba tiriamasis ekstraktas) buvo praskiestas ESCh grynumo metanoliu ir nufiltruotas.

Kiekybinė analizė buvo atlikta Waters Acuity sistema. Analičių skirstymas atliktas atvirkščių fazių analitine kolonėle Acuity BEH C18, 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 (v/v), B – 100 % acetonitrilas. Eliucijos trukmė – 17 min. 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.

Kalibracinė kreivė sudaryta pagal cianidin-3-gliukozido standarto ( $y = 0,006876x + 518,6046$ ;  $R^2 = 0,996$ ) skirtingų koncentracijų (20–100 μg/ml) tirpalus. Junginių koncentracijos

paskaičiuotos pagal tiesinę plotų regresiją (koreliaciją) sudarytą QuantAnalysis kompiuterine programa ir išreikštos mg/100 g SM.

### **2.16. Rezultatų statistinė analizė**

Ekperimentiniai duomenys apdoroti naudojant statistinius duomenų analizės paketus ANOVA ir Microsoft Office Excel. Visi eksperimentai kartoti po kelis kartus, o duomenys išreikšti vidurkiais  $\pm$  SN.



### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Gervuogių išspaudų cheminė sudėtis

Nustatyti pagrindiniai gervuogių išspaudų cheminiai komponentai: drėgmės kiekis – 3,62 g/100 g, baltymų kiekis – 12,83 g/100 g, riebalų kiekis – 13,56 g/100 g ir mineralinių medžiagų kiekis – 2,41 g/100 g. Gauti rezultatai palyginti su kitų mokslininkų gautais rezultatais (žr. 6 lentelė), ištyrus išdžiovintas gervuogių išspaudas [96] bei šviežias uogas [25]. Iš pateiktų rezultatų matoma, kad išspaudų nustatytos vertės su literatūroje pateiktomis skiriasi nedaug.

Lyginant gervuogių išspaudų ir šviežių uogų cheminius komponentus, matomas daug didesnis skirtumas. Šviežiose uogose randamas didelis kiekis drėgmės (87,92 g/100 g), tačiau mažesnis kiekis baltymų (1,27 g/100 g), riebalų (0,42 g/100 g) bei mineralinių medžiagų (0,21 g/100 g).

6 lentelė. Gervuogių uogų ir išspaudų cheminė sudėtis, g/100 g

Komponentas	Nustatytas kiekis	[25, 96]	[25]
Drėgmės kiekis	3,62±0,17	5,24±0,19	87,92±0,59
Baltymų kiekis	12,83±0,32	14,31±0,36	1,27±0,06
Riebalų kiekis	13,56±0,55	11,35±0,58	0,42±0,05
Mineralinių medžiagų kiekis	2,41±0,49	1,62±0,05	0,21±0,02

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN.

Rezultatų skirtumams įtakos gali turėti ne tik atliekami procesai, kurie pakeičia žaliavos fizikines ar chemines savybes, bet ir klimatas, dirvožemis, auginimo bei kitos sąlygos.

Iš pateiktų rezultatų galima matyti, kad gervuogių išspaudos yra puikus maistinių medžiagų šaltinis, kuris gali būti panaudojamas naujų maisto produktų gamybai.

#### 3.2. Gervuogių išspaudų superkritinės ekstrakcijos CO<sub>2</sub> optimizavimas

Funkcionalių komponentų išskyrimui taikyta superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu, kurios metu išskiriami lipofiliniai junginiai. Vykdamas gervuogių SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakciją buvo taikytos sąlygos, pasirinktos iš literatūros: 60 °C, 120 min, 45 MPa. Kadangi atlikta literatūros analizė parodė, kad gervuogių išspaudos mažai ištirtos, tai buvo nuspręsta padaryti superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos optimizavimą, kad būtų gauta didžiausia ekstrakto išeiga.

Optimalių sąlygų nustatymui naudojamas paviršiaus atsako metodas kartu su centriškai kompoziciniu planu. Eksperimentiniai duomenys apdoroti pasinaudojus programa – *Design – Expert 7.0*. Buvo optimizuoti trys svarbiausi nepriklausomi kintamieji – tai slėgis, laikas ir

temperatūra. Slėgio intervalas keistas nuo 25 MPa iki 55 MPa, laikas – nuo 60 min iki 180 min, o temperatūra – nuo 50 °C iki 80 °C. Optimizavimo planas sudarytas iš 20 ciklų, pateiktas 7 lentelėje. Atlikus eksperimentą pagal sudarytą planą, nustatyta, kad ekstraktų išeiga kinta nuo 2,77 iki 9,93 g/100 g SM.

**7 lentelė.** SKE–CO<sub>2</sub> centriškai kompozicinio plano parametru vertės ir gautos išeigos

Eil. nr.	Ekstrakcijos slėgis, MPa	Ekstrakcijos laikas, min	Ekstrakcijos temperatūra, °C	Išeiga, g/100 g	
				Eksperimentinė	Prognozuojama
1	25	60	50	5,91±0,03	5,96
2	55	60	50	7,34±0,08	7,20
3	25	180	50	7,44±0,07	7,51
4	55	180	50	8,84±0,07	8,61
5	25	60	80	2,77±0,06	3,13
6	55	60	80	8,73±0,08	8,79
7	25	180	80	4,18±0,06	4,44
8	55	180	80	9,89±0,06	9,96
9	25	120	65	7,21±0,07	6,48
10	55	120	65	9,61±0,10	9,86
11	40	60	65	7,79±0,10	7,47
12	40	180	65	8,99±0,08	8,83
13	40	120	50	7,52±0,09	7,78
14	40	120	80	7,78±0,09	7,04
15	40	120	65	7,50±0,10	8,38
16	40	120	65	7,70±0,10	8,38
17	40	120	65	7,83±0,08	8,38
18	40	120	65	7,96±0,10	8,38
19	40	120	65	8,41±0,08	8,38
20	40	120	65	9,93±0,06	8,38

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN.

Pasinaudojus dispersinės analizės metodu „ANOVA“, nustatytas tiesinės, kvadratinės ir tarpusavio sąveikos koeficientų reikšmingumas. Gauti rezultatai pateikti 8 lentelėje. Pagal nustatytą Fišerio kriterijų (10,16) ir  $p$  – reikšmę (0,0006), galima teigti, kad modelis yra reikšmingas. Ekstrakto išeigos modelio analizė parodė, kad išeigai didžiausią įtaką turi slėgio tiesinis ryšys, kadangi jo  $p$  – reikšmė <0,05, taip pat svarbus kintamasis – laikas, kurio  $p$  –

reikšmė <0,05. Tuo tarpu temperatūros  $p$  – reikšmė didesnė už 0,05, tai galima teigti, kad šis kintamasis nėra reikšmingas didinant ekstrakto išeią.

**8 lentelė.** SKE–CO<sub>2</sub> kvadratinio modelio dispersinė analizė

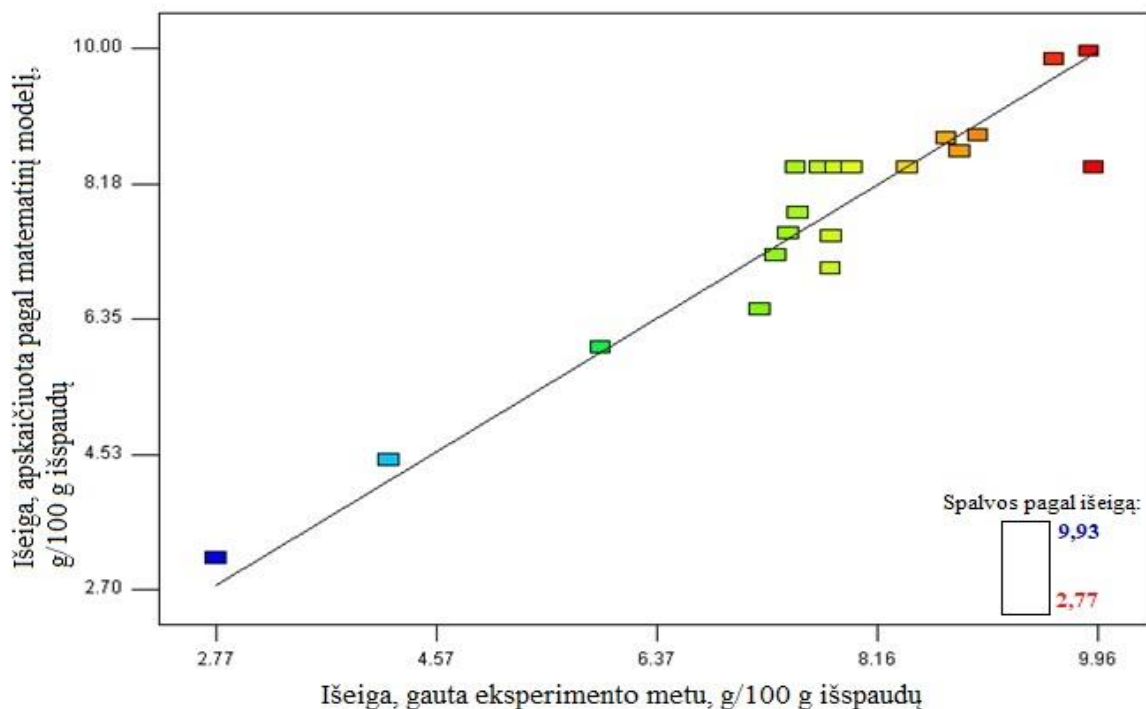
<b>Kintamieji</b>	<b>Kvadratų suma</b>	<b>Kvadratų vidurkis</b>	<b>F – kriterijus</b>	<b><math>p</math>-reikšmė</b>	
<b>Modelis</b>	52,6689	5,8521	10,1554	0,0006	reikšmingas
<b>p – slėgis</b>	28,5610	28,5610	49,5632	< 0,0001	
<b>t – laikas</b>	4,6240	4,6240	8,0242	0,0178	
<b>T – temperatūra</b>	1,3690	1,3690	2,3757	0,1543	
<b>pt</b>	0,0098	0,0098	0,0170	0,8988	
<b>pT</b>	9,7682	9,7682	16,9512	0,0021	
<b>tT</b>	0,0265	0,0265	0,0459	0,8347	
<b>p<sup>2</sup></b>	0,1315	0,1315	0,2281	0,6432	
<b>t<sup>2</sup></b>	0,1566	0,1566	0,2718	0,6135	
<b>T<sup>2</sup></b>	2,6338	2,6338	4,5705	0,0582	
<b>Liekana</b>	5,7625	0,5763			
<b>Klaidos tikimybė</b>	3,9687	0,7937			nereikšmingas

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

Iš gautų rezultatų galima matyti svarbius parametrus, dominuojančius modelyje – tai p, t, pT. Sudaryta daugianarė regresinė lygtis, parodanti ryšį tarp proceso kintamųjų ir ekstrakto išeiagos:

$$\text{Išeiaga (g/100 g SM)} = 8,38 + 1,69 \times p + 0,68 \times t - 0,37 \times T - 0,035 \times p \times t + 1,11 \times p \times T - 0,057 \times t \times T - 0,22 \times p^2 - 0,24 \times t^2 - 0,98 \times T^2 \quad (11)$$

Ekspertimentinės gervuogių išspaudų ekstraktų išeiagos buvo analizuojamos siekiant sukurti regresijos modelį. Prognozuojamos ekstrakto išeiagos apskaičiuotos pagal regresijos modelį ir palygintos su eksperimento metu gautomis išeiagomis (žr. 13 pav.).



**13 pav.** Gervuogių išspaudų SKE–CO<sub>2</sub> ekstraktų išėigų, gautų apskaičiuotus pagal matematinį modelį ir išėigų, gautų eksperimento metu, palyginimas

Optimizuojant pasirinktus kintamuosius, gauti atsako paviršiaus grafikai (žr. 14 pav.), vaizduojantys kaip skirtingi kintamieji bei tam tikra jų sąranka sąlygoja gervuogių išspaudų ekstrakto išėigą.

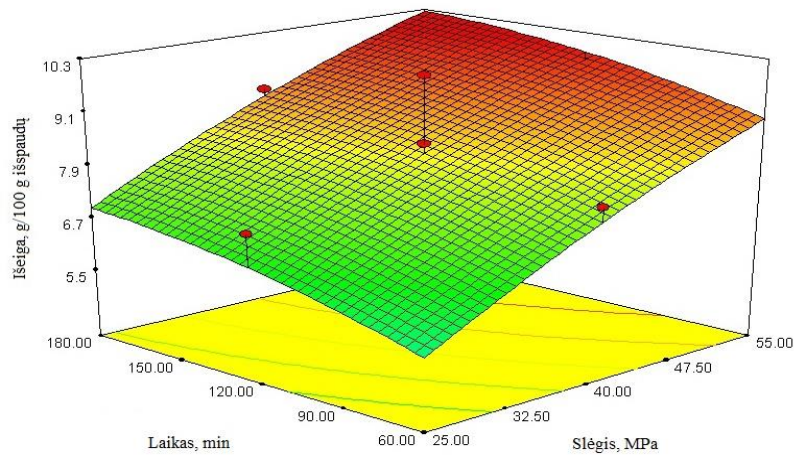
Iš gautų tridimensinių grafikų (3D) galima matyti kaip keičiant nepriklausomus kintamuosius, kinta tiriamasis atsakas. 3D grafikai nubraižomi, kai vienas kintamasis užfiksuojamas eksperimentinio plano centre, o kiti kintamieji keičiami erdvėje, taip nustatant išėigą, kuri gali būti gaunama.

Pirmame grafike matoma kaip kinta ekstrakto išėiga, kai temperatūra pastovi (65 °C), o laikas ir slėgis kinta. Didesnę įtaką ekstrakto išėigai daro slėgis, nes jį didinant nuo 25 MPa iki 55 MPa, ekstrakto išėiga padidėja ~35 %, o laiko pasikeitimas nuo 60 min iki 180 min ekstrakto kiekį padidina ~15 %. Antrajame grafike pastovus parametras – laikas (120 min), o kintamieji – temperatūra ir slėgis. Kaip ir pirmajame grafike, taip ir šiame, didesnę įtaką išėigai turi slėgis. Keičiantis temperatūrai nuo 50 °C iki 80 °C gervuogių išspaudų ekstrakto kiekis nežymiai pasikeitė – padidėjo tik ~5 %. Iš paskutinio grafiko matoma, kad esant pastoviam slėgiui, laiko ir temperatūros įtaka ekstrakto kiekiui yra nedidelė. Išanalizavus grafikus matoma, kad didžiausią įtaką ekstrakto kiekiui turi slėgis, o nedidelė įtaka dėl laiko ir temperatūros poveikio.

---

a) Pastovi temperatūra, 65 °C  
Laiko ir slėgio įtaka

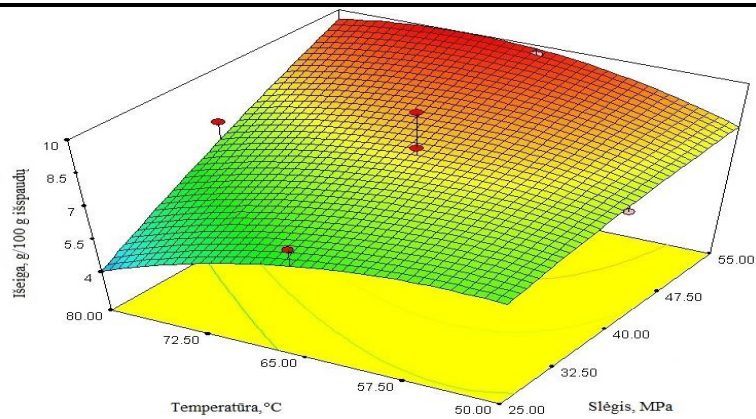
---



---

b) Pastovus laikas, 120 min  
Temperatūros ir slėgio įtaka

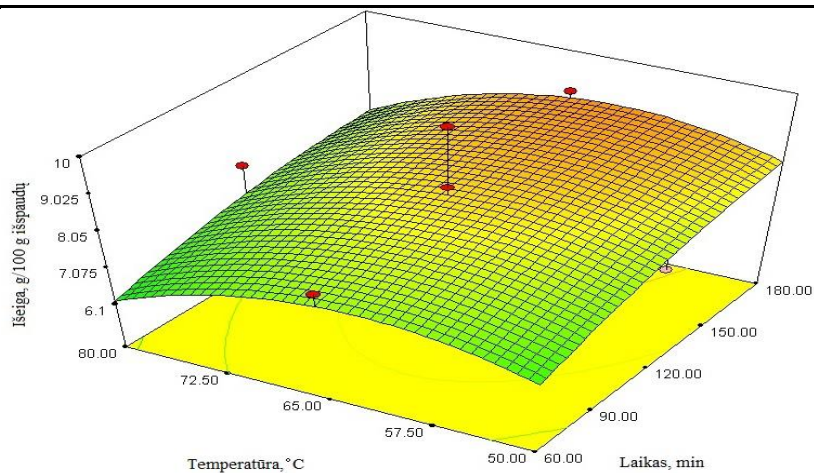
---



---

c) Pastovus slėgis, 40 MPa  
Temperatūros ir laiko įtaka

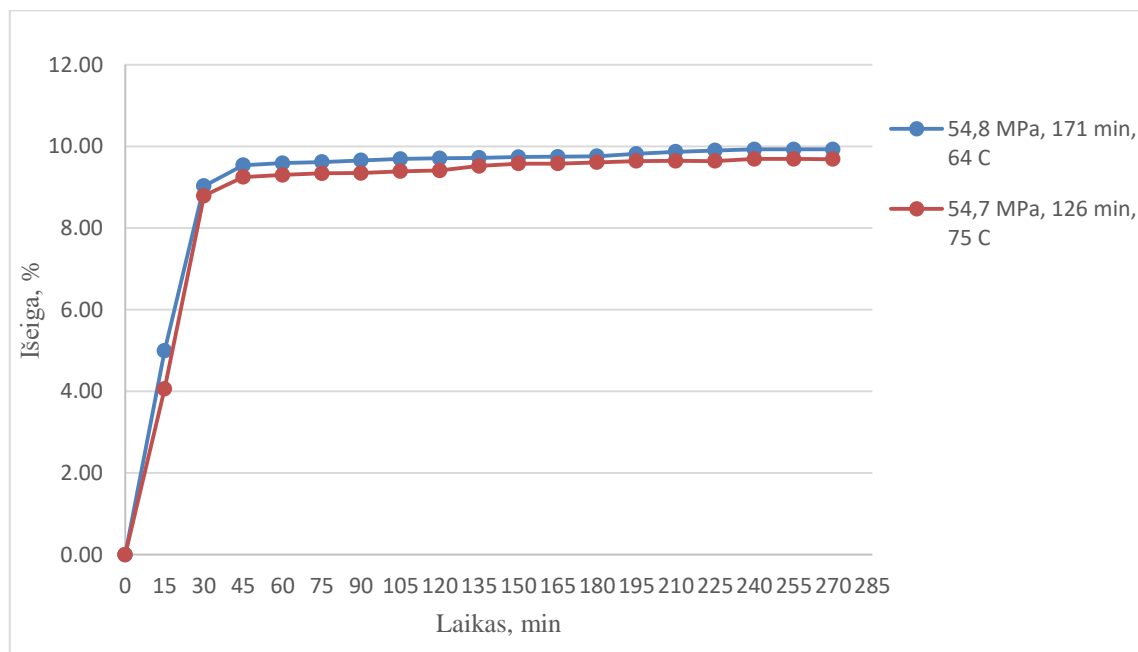
---



---

**14 pav.** Gervuogių išspaudų superkritinės ekstrakcijos CO<sub>2</sub> atsako paviršiaus grafikai, parodantys ekstrakto išėigos priklausomybę nuo optimizuojamų kintamųjų parametru

Pasinaudojus sudarytu matematiniu modeliu, buvo nustatytos dvejios optimalios sąlygos, kurių metu gaunama didžiausia išeiga: tai 54,8 MPa, 171 min, 64 °C ir 54,7 MPa, 126 min, 75 °C. 15 paveiksle pateiktos skirtingų optimalių sąlygų kinetinės kreivės, vaizduojančios ekstrakto išeigos priklausomybę nuo laiko.



15 pav. Gervuogių ekstrakto kinetinė kreivė SKE–CO<sub>2</sub> optimaliomis sąlygomis

Pagal nustatytas optimalias sąlygas atliktos ekstrakcijos su didesniu žaliavos kiekiu ir nustatytos išeigos. Taip pat nustatytų optimalių sąlygų išeigos palygintos su išeiga, kuri gauta atlikus ekstrakciją literatūroje aprašytomis sąlygomis. Rezultatai pateikti 9 lentelėje.

9 lentelė. SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakcijos metu gautos išeigos

Sąlygos	Išeiga, g/ 100 g SM
60 °C, 120 min, 45 MPa	8,21±0,12
64 °C, 171 min, 54,8 MPa	9,93±0,13
75 °C, 126 min, 54,7 MPa	9,75±0,10

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN.

Iš pateiktų rezultatų matoma, kad didžiausia išeiga (9,93 g/100 g SM) gauta atlikus ekstrakciją optimaliomis sąlygomis 64 °C, 171 min, 54,8 MPa. Kitomis optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis gauta išeiga skiriasi nedaug, tačiau yra mažesnė (9,75 g/100 g SM). Tai gali turėti įtakos šiek tiek mažesnis slėgis, kuris, kaip jau buvo minėta, daro didžiausią įtaką ekstrakto išeigai ir trumpesnis ekstrakcijos laikas. Mažiausia išeiga gauta atlikus ekstrakciją su literatūroje aprašytomis sąlygomis – 8,21 g/100 g SM.

Atlikus šį tyrimą, įrodyta, kad pasinaudojus atsako paviršiaus metodu kartu su centriškai kompoziciniu planu, galima gauti didesnę ekstrakto išėigą.

### 3.3. Gervuogių išspaudų ekstrakcijos padidintame slėgyje optimizavimas

Po atlikto SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakcijos optimizavimo, atlikus antioksidacinio aktyvumo tyrimus (žr. 3.5 skyrių), buvo matoma, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo liekana po II SKE–CO<sub>2</sub>. Todėl pasirinkta šią liekaną apdoroti taikant ekstrakciją padidintame slėgyje tirpikliais, naudojant didesnio poliškumo tirpiklius – etanolį ir vandenį, kad būtų išekstrahuoti likę medžiagoje junginiai.

Kadangi ekstrakcijos efektyvumą sąlygoja ekstrakcijos trukmė ir temperatūra, tai buvo atliktas šių parametru optimizavimas, naudojant tirpiklį – etanolį. EPS optimizavimui kaip ir SKE–CO<sub>2</sub> naudota APM su CKP. Optimizavimo tikslas – gauti kuo didesnę ekstrakto išėigą. Planas, pagal kurį atliktas optimizavimas ir gautos išėigos pateiktos 10 lentelėje.

**10 lentelė.** Eksperimentinis EPS<sub>EtOH</sub> planas ir gautos bei prognozuojamos išėigos

Eil. Nr.	Ekstrakcijos temperatūra, °C	Ekstrakcijos laikas, min (po 3 ciklus)	Išėiga, g/100 g išspaudų	
			Eksperimentinė	Prognozuojama
1	50	5	25,21±0,19 <sup>a</sup>	25,43
2	50	15	27,02±0,67 <sup>a</sup>	26,86
3	90	5	27,28±0,27 <sup>b</sup>	27,56
4	90	15	29,09±0,96 <sup>b</sup>	29,00
5	70	5	27,07±0,29 <sup>b</sup>	26,50
6	70	15	27,84±0,37 <sup>ab</sup>	27,93
7	50	10	25,82±0,41 <sup>a</sup>	26,15
8	90	10	27,99±0,27 <sup>b</sup>	28,28
9	70	10	27,25±0,13 <sup>b</sup>	27,21
10	70	10	27,41±0,37 <sup>b</sup>	27,21
11	70	10	27,1±0,07 <sup>b</sup>	27,21
12	70	10	27,22±0,09 <sup>b</sup>	27,21
13	70	10	27,37±0,31 <sup>b</sup>	27,21

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

Atlikus modelio dispersinę analizę (11 lentelė), gautas F – kriterijus (63,71) ir p – reikšmė (<0,0001) parodė, kad modelis yra reikšmingas. Taip pat nustatyta, kad ekstrakto išėigai turi įtakos abu optimizuojami kintamieji.

11 lentelė. EPS<sub>EiOH</sub> modelio dispersinė analizė

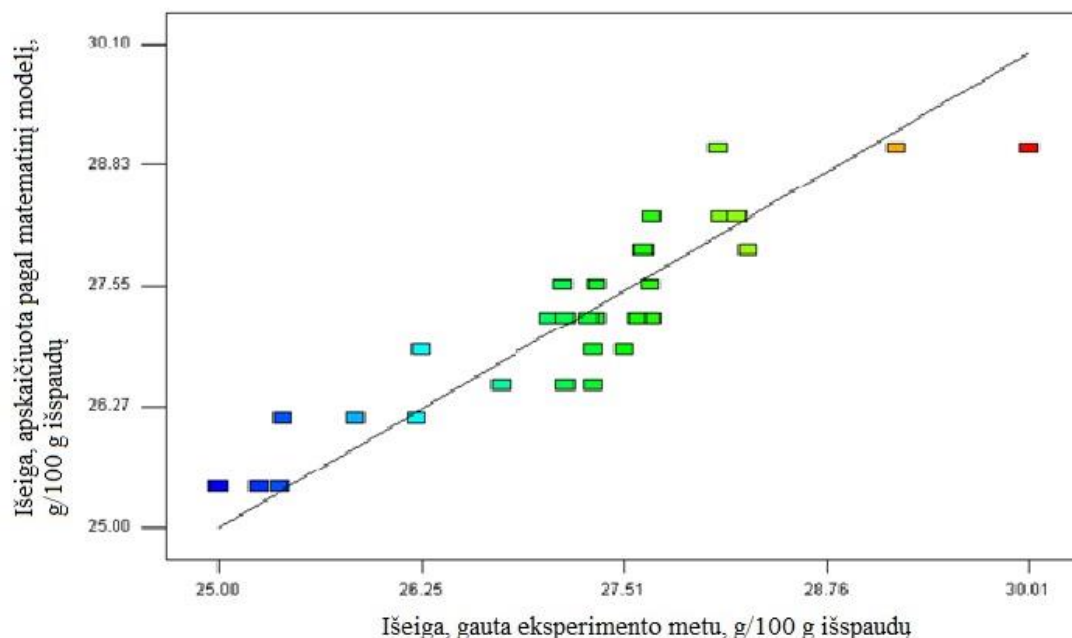
Kintamieji	Kvadratų suma	Kvadratų vidurkis	F – kriterijus	p- reikšmė	
Modelis	29,73	14,87	63,71	< 0,0001	reikšmingas
t – laikas	9,23	9,23	39,56	< 0,0001	
T – temperatūra	20,50	20,50	87,86	< 0,0001	
Liekana	6,30	0,23	–	–	
Klaidos tikimybė	2,03	0,34	1,67	0,1779	nereikšmingas

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

Pagal turimus dispersinės analizės rezultatus, sudaryta daugianarė regresinė lygtis:

$$\text{Išeiga (g/100 g SM)} = 27,21 + 0,72 \times t + 1,07 \times T \quad (12)$$

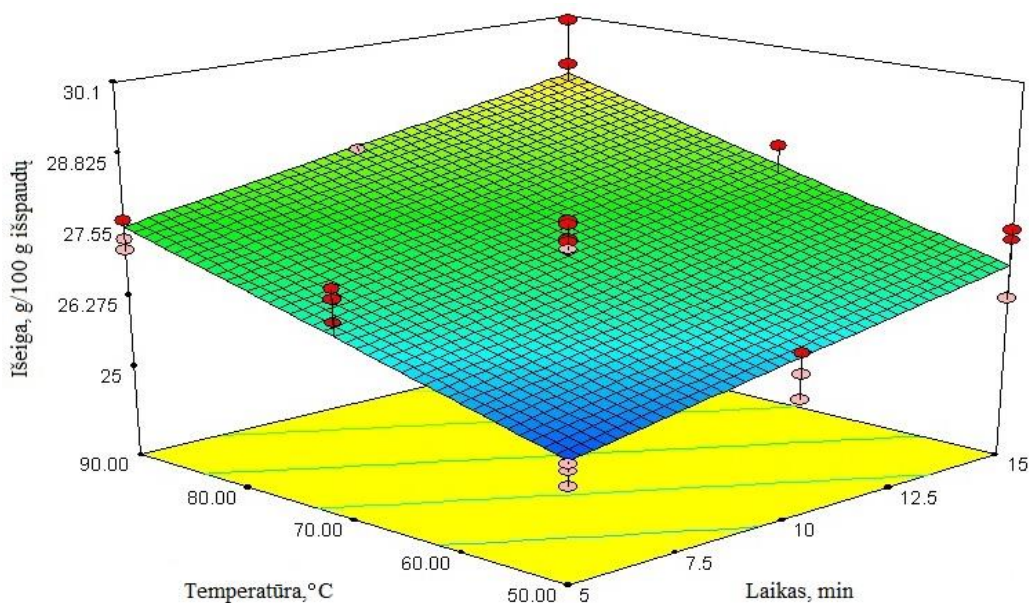
Pagal gautą regresinę lygtį apskaičiuotos išeigos skirtingomis ekstrakcijos sąlygomis buvo palygintos su išeigomis, gautomis atliekant eksperimentą. Gauti rezultatai pateikti 16 paveiksle.



16 pav. Gervuogių išspaudų EPS<sub>EiOH</sub> ekstraktų išeigų, gautų apskaičiavus pagal matematinį modelį ir išeigų, gautų eksperimento metu, palyginimas



Atliekant EPS optimizavimą, buvo gautas atsako paviršiaus grafikas (žr. 17 pav.), kuris parodo kokia priklausomybė tarp ekstrakto išeigos ir optimizuojamų parametrų. Iš grafiko matyti, kad išeigai didelę įtaką daro abu kintamieji, tačiau temperatūros įtaka šiek tiek didesnė nei laiko.



**17 pav.**  $\text{EPS}_{\text{EtOH}}$  atsako paviršiaus grafikas, rodantis išeigos priklausomybę nuo temperatūros ir laiko

Po optimizavimo, ekstrakcija buvo atlikta su didesniu kiekiu išspaudų optimaliomis sąlygomis, o po to likutis buvo dar ekstrahuojamas vandeniu  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3 ciklus po 10 min, kad būtų išekstrahuotos likusios tirpios medžiagos. Ekstrakcija su vandeniu buvo vykdyta todėl, kad vanduo yra poliškiausias tirpiklis iš visų naudojamų tirpiklių šiame tyrime.

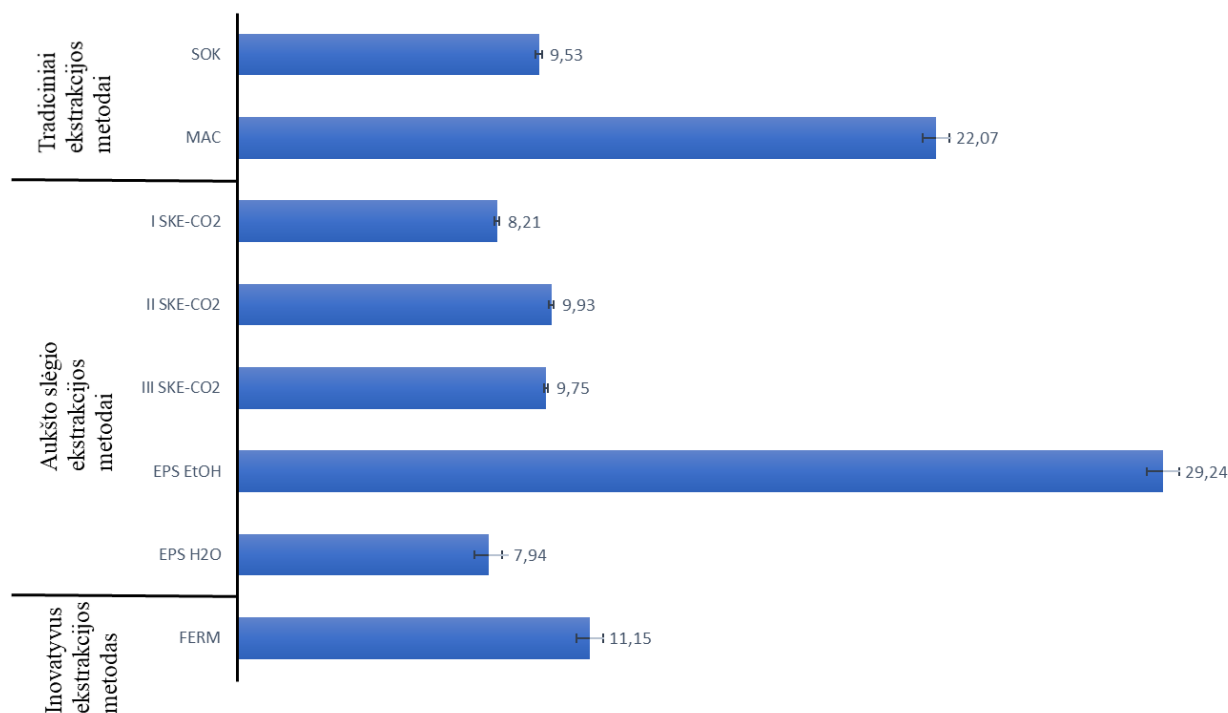
Pagal turimus išeigos priklausomybės nuo laiko ir temperatūros, rezultatus (10 lentelė, 17 pav.) matoma, kad didžiausia išeiga gaunama kai yra maksimalus ekstrakcijos laikas ir maksimali temperatūra. Viso eksperimentinio plano metu išeiga svyravo nuo 25,21 iki 29,09 g/100 g. Nustatyta, jog esant vienodam ekstrakcijos laikui, tačiau keliant temperatūrą, išeiga didėja. Taip pat esant vienodai temperatūrai, tačiau ilginant laiką, išeiga gaunama didesnė.

Atsako paviršiaus grafikas leidžia nuspręsti kokiomis sąlygomis vykdyti ekstrakciją, kad būtų gaunama vienoda ar labai panaši išeiga. Pagal atliktą eksperimentą galima matyti, kad ekstrakcijos metu nustačius aukštą temperatūrą ir atliekant trumpą laiką, buvo gauta labai panaši ekstrakto išeiga kaip ir atliekant ekstrakciją, naudojant žemą temperatūrą, tačiau ilgą laiką.

### 3.4. Gervuogių išspaudų ekstrakcija taikant tradicinius, aukšto slėgio ir fermentinius metodus, bei išeigų palyginimas

Norint išskirti funkcionaliuosius komponentus, gervuogių išspaudos buvo apdorojamos skirtingais ekstrakcijų metodais. Taikant superkritinę ekstrakciją CO<sub>2</sub>, kaip jau buvo minėta skyriuje 3.2., tiriama medžiaga buvo ekstrahuojama trimis skirtingomis sąlygomis: I SKE–CO<sub>2</sub>, II SKE–CO<sub>2</sub> ir III SKE–CO<sub>2</sub>. Su liekana po II SKE–CO<sub>2</sub> pirmiausia buvo atlikta ekstrakcija su etanoliumi (EPS<sub>EtOH</sub>), o po to dar su vandeniu (EPS<sub>H2O</sub>). Taip pat dar buvo atlikta Soksleto ekstrakcija (su heksanu), maceravimas ir purtymas purtyklėje (su 70 % etanoliumi), bei ekstrakcija, naudojant fermentą. Soksleto ekstrakcija atlikta naudojant neapdorotas gervuogių išspaudas, maceravimas – gervuogių išspaudas po II SKE–CO<sub>2</sub>, o ekstrakcija, naudojant fermentą atlikta su gervuogių išspaudomis po maceravimo ir purtymo purtyklėje. Medžiagos buvo ekstrahuojamos su skirtingais tirpikliais, kad būtų išgaunamas kuo didesnis kiekis funkcionaliųjų komponentų, kadangi su skirtingo poliškumo tirpikliais išekstrahuojami skirtingi junginiai. Vykdamas ekstrakcijas aukšto slėgio metodais, iš augalų išskiriama iki 50 % lipofilinių ir hidrofilinių ekstraktų. Siekiant padidinti bioaktyviųjų junginių išekstrahavimą, taikomi ekstrakcijos metodai su fermentais.

Ekstrakcijų metu gautos išeigos pateiktos 18 paveiksle.



18 pav. Skirtingų ekstrakcijų metu gautos išeigos (g/100 g SM)

Lyginant išeigas pagal naudotus tirpiklius, matoma, kad naudojant nepolinius ar mažo poliškumo tirpiklius, išeigos tarpusavyje gautos panašios. Tačiau ekstrakcijų metu su nepoliniais tirpikliais gautos išeigos yra mažesnės už nustatytas išeigas, kurios gautos vykdant ekstrakcijas su poliniais tirpikliais.

Įvertinus gervuogių išspaudų ekstraktų išeigas pagal naudojamą ekstrakcijos metodą matomas didesnis skirtumas. Taikant tradicinius ekstrakcijos metodus, išeiga net du kartus didesnė po maceravimo ir purtymo purtyklėje ( $22,07 \pm 0,85$  g/100 g SM) už gautą išeigą po Soksleto ekstrakcijos. Atliekant aukšto slėgio ekstrakcijas, efektyviausias metodas buvo ekstrakcija padidintame slėgyje su etanoliu, kadangi buvo gauta didžiausia gervuogių išspaudų ekstrakto išeiga. Pritaikius inovatyvų ekstrakcijos metodą (ekstrakciją su fermentu), išeiga nustatyta  $11,15 \pm 0,95$  g/100 g SM.

Palyginus visas ekstraktų išeigas nustatyta, kad didžiausia ekstraktų išeiga gauta atlikus  $90$  °C temperatūroje, 3 ciklus po 15 min ekstrakciją padidintame slėgyje su etanoliu, kuri buvo lygi  $29,24 \pm 1,03$  g/100 g SM. Šiek tiek mažesnis kiekis ekstrakto gautas po maceravimo ir purtymo purtyklėje ( $22,07 \pm 0,85$  g/100 g SM), kurios metu kaip tirpiklis buvo naudojamas etanolio ir vandens mišinys. Panašios išeigos gautos atlikus Soksleto ekstrakciją su heksanu ( $9,53 \pm 0,21$  g/100 g SM), II SKE–CO<sub>2</sub> ( $9,93 \pm 0,13$  g/100 g SM) ir III SKE–CO<sub>2</sub> ( $9,75 \pm 0,10$  g/100 g SM). Mažiausias kiekis ekstrakto gautas po EPS<sub>H<sub>2</sub>O</sub> ( $7,94 \pm 0,88$  g/100 g SM).

Pagal pateiktus rezultatus, galima teigti, kad ekstraktų išeigai įtakos turi skirtingi tirpikliai, parinkti ekstrakcijai. Taip pat mokslinėje literatūroje teigiama, kad ekstrakto kiekis didėja keliant temperatūrą, tačiau pagal atliktą SKE–CO<sub>2</sub> optimizavimą (žr. 3.2. skyrių) matoma, kad šio tyrimo metu išeigai temperatūra įtakos neturėjo, kadangi esant didesnei temperatūrai gauta mažesnė išeiga. Tačiau tai gali būti aiškinama taip, kad aukštesnėje temperatūroje gali suskilti flavonoidų glikozidai, todėl gali sumažėti ir bendras jų kiekis [97].

Reátegui ir kt. (2014) atliko superkritinę ekstrakciją CO<sub>2</sub> su gervuogių išspaudomis skirtingomis sąlygomis ir išeiga buvo gauta 7,13–9,48 % atitinkamai pagal tai, kokiomis sąlygomis buvo vykdyta ekstrakcija. Temperatūra taikyta 40–50 °C, o slėgis – 15–20 MPa. Didinant tiek temperatūrą, tiek slėgį išeiga didėjo [96]. Šiame darbe atlikto tyrimo metu gauta išeiga optimaliomis sąlygomis buvo šiek tiek didesnė.

Mokslinėje literatūroje aprašyta Soksleto ekstrakcija atlikta 50 °C temperatūroje naudojant tirpiklį – etanolį. Gauta išeiga 14,58 % [96]. Lyginant su rezultatais, gautais tiriamojo darbo metu matoma, kad literatūroje pateikta išeiga yra didesnė. Tam galėjo turėti įtakos pasirinktas tirpiklis ir žemesnė ekstrakcijos temperatūra. Tačiau Machado ir kt. (2015) atlikus Soksleto ekstrakciją (5 val) su metanoliu ir etanoliu, atitinkamai išeigos buvo gautos 5,25 % ir 5,51 % [4].

Šie rezultatai rodo, kad pasirinktas tirpiklis neturėjo didelės įtakos išeigoms ir matoma, kad šiame darbe nustatyta išeiga yra didesnė. Įtakos galėjo turėti vykdomos ekstrakcijos laikas.

Reátegui ir kt. (2014) taip pat atliko maceravimą, kurio metu kaip tirpiklis naudotas etanolis. Gauta išeiga (10,72 %) yra mažesnė už nustatytą šiame darbe (22,07 %) [96]. Machado ir kt. (2015) atlikus maceravimą, išeiga buvo gauta 5,02 % [4]. O tai yra keturis kartus mažesnė išeiga už nustatytą šio tyrimo metu. Tai galėjo sąlygoti tirpiklio pasirinkimas, kadangi vanduo yra labiau polinis tirpiklis, tai vandens ir etanolio mišinys padeda išekstrahuoti daugiau polinių junginių.

Machado ir kt. (2015) ekstrakciją padidintame slėgyje atliko įvairiomis sąlygomis, tačiau pasirinkta palyginti tik išeigas, gautas atlikus ekstrakciją su panašiomis sąlygomis kaip šiame darbe. EPS su vandeniu buvo atlikta 100 °C temperatūroje ir gauta išeiga nustatyta 6,39 %, kuri yra mažesnė už šiame tyrime nustatytą (7,94 %), tačiau nedaug skiriasi. O ekstrakcija su etanoliumi, atlikta 80 °C temperatūroje, nebuvo tokia efektyvi (4,23 %) lyginant su gautais rezultatais (29,24 %) [4].

Apie atliktą gervuogių ar gervuogių išspaudų ekstrakciją su fermentais literatūroje informacijos nepavyko rasti, todėl rezultatai palyginti su avietėmis. Laroze ir kt. (2010) atliko aviečių išspaudų ekstrakciją su 12 skirtingų fermentų. Ekstrakcijos temperatūra taikyta 50 °C kaip ir šiame tyrime, tik mokslinėje literatūroje aprašytas metodas vykdytas ilgesnį laiką (18 valandų). Ekstraktų išeigos kinta nuo 4,17 iki 12,19 g/100 g SM atitinkamai pagal tai koks naudotas fermentas. Vykiant ekstrakciją su fermentu *Viscozyme* išeiga nustatyta 7,7 g/100 g SM. Ši aviečių išspaudų ekstrakto išeiga gauta mažesnė už gervuogių išspaudų ekstrakto nustatytą išeigą (11,15 g/100 g SM). Tai įtakos gali turėti skirtinga naudojama žaliava, skirtingas ekstrakcijos metodas ar fermento koncentracija [98].

### **3.5. Gervuogių išspaudų antioksidacinių savybių įvertinimas**

#### **3.5.1. Gervuogių sulčių ir ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas**

Ekstraktų, gautų atlikus skirtingas ekstrakcijas, antioksidacinis aktyvumas nustatytas naudojant ABTS<sup>+</sup> laisvųjų radikalų sujungimo metodą ir deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo (ORAC) metodą. O pasinaudojus *Folin – Ciocalteu's* metodu, nustatytas bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK). Antioksidacinis aktyvumas išreikštas ekstrakto masei ir sausos medžiagos masei, kadangi gali būti ekstraktų, kurių išekstrahuojamas kiekis didelis, o antioksidacinis aktyvumas – mažas. Toks ryšys gali būti ir priešingas – kai išeiga gaunama maža, o antioksidacinis aktyvumas – didelis. Nustatyti antioksidacinio aktyvumo rezultatai pateikti 12 lentelėje.

12 lentelė. Ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas

Bandiniai	BFJK		ABTS <sup>++</sup>		ORAC	
	mg GRE/g ekstrakto	mg GRE/g SM	mg TE/g ekstrakto	mg TE/g SM	mg TE/g ekstrakto	mg TE/g SM
Sultys	1,70±0,03 <sup>a</sup>	–	5,55±0,06 <sup>a</sup>	–	6,18±0,14 <sup>a</sup>	–
<i>Tradiciniai ekstrakcijos metodai</i>						
SOK	18,62±0,19 <sup>f</sup>	1,77±0,02 <sup>e</sup>	–	–	11,05±0,64 <sup>b</sup>	1,05±0,06 <sup>a</sup>
MAC	117,40±0,40 <sup>h</sup>	23,34±0,08 <sup>i</sup>	489,20±0,85 <sup>g</sup>	97,25±0,17 <sup>f</sup>	428,22±4,16 <sup>f</sup>	85,03±0,83 <sup>d</sup>
<i>Aukšto slėgio ekstrakcijos metodai</i>						
I SKE–CO <sub>2</sub>	6,86±1,02 <sup>b</sup>	0,31±0,08 <sup>a</sup>	–	–	–	–
II SKE–CO <sub>2</sub>	15,02±0,11 <sup>e</sup>	1,49±0,01 <sup>d</sup>	11,30±0,25 <sup>c</sup>	1,12±0,02 <sup>a</sup>	37,27±1,68 <sup>c</sup>	3,70±0,17 <sup>b</sup>
III SKE–CO <sub>2</sub>	9,48±0,02 <sup>c</sup>	0,92±0,01 <sup>b</sup>	8,09±0,12 <sup>b</sup>	0,79±0,01 <sup>a</sup>	35,81±0,48 <sup>c</sup>	3,49±0,05 <sup>b</sup>
EPS <sub>EtOH</sub>	10,33±0,07 <sup>d</sup>	2,72±0,02 <sup>g</sup>	62,10±2,24 <sup>e</sup>	16,36±0,59 <sup>d</sup>	42,41±2,07 <sup>d</sup>	22,31±1,09 <sup>c</sup>
EPS <sub>H2O</sub>	160,42±0,11 <sup>i</sup>	9,38±0,01 <sup>h</sup>	636,54±1,22 <sup>h</sup>	37,24±0,07 <sup>e</sup>	359,36±3,60 <sup>e</sup>	4,20±0,04 <sup>b</sup>
<i>Inovatyvus ekstrakcijos metodas</i>						
FERM (buferis)	14,51±0,02 <sup>e</sup>	1,29±0,01 <sup>c</sup>	54,61±2,71 <sup>d</sup>	4,87±0,10 <sup>b</sup>	–	–
FERM (buferis ir fermentas)	29,06±0,23 <sup>g</sup>	1,92±0,02 <sup>f</sup>	126,96±1,11 <sup>f</sup>	8,37±0,07 <sup>c</sup>	–	–

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

Įvertinus gervuogių ekstraktų antioksidacines savybes matoma, kad bendras fenolinių junginių kiekis svyruoja nuo 0,31 iki 23,34 mg GRE/g SM. Didžiausias BFJK (23,34 mg GRE/g SM) nustatytas ekstraktuose, kurie gauti naudojant polinių tirpiklių mišinį (etanolio ir vandens). Taip pat nemažas kiekis (9,38 mg GRE/g SM) fenolinių junginių nustatytas ekstrakto, gautame po ekstrakcijos padidintame slėgyje su vandeniu. Panašiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo ekstraktai po II SKE–CO<sub>2</sub> ir po ekstrakcijos su fermentais, vykdytos su buferiu, kurių kiekiai atitinkamai buvo 1,49 mg GRE/g SM ir 1,29 mg GRE/g SM. Mažiausias kiekis (0,31 mg GRE/g SM) nustatytas po I SKE–CO<sub>2</sub>. Palyginimui buvo iširtos ir gervuogių sultys, kurios pasižymėjo mažiausiu fenolinių junginių kiekiu – 1,70 mg GRE/g ekstrakto.

Tiriant ekstraktus ABTS<sup>+</sup> laisvųjų radikalų sujungimo metodu, ekstraktų aktyvumo tendencija panaši kaip ir nustatant BFJK. Didžiausiu aktyvumu (97,25 mg TE/g SM) pasižymėjo ekstraktai po maceravimo ir purtymo purtyklėje, o mažiausiu (0,79 mg TE/g SM) – po III SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakcijos.

Matuojant ekstraktų ORAC vertes, didesniu deguonies radikalų absorbcijos pajėgumu pasižymėjo ekstraktai, gauti po maceravimo ir purtymo purtyklėje (85,03 mg TE/g SM) ir po ekstrakcijos padidintame slėgyje su etanoliumi (22,31 mg TE/g SM). Mažos ORAC vertės nustatytos ekstraktuose, gautuose po ekstrakcijų su nepoliniais ar mažai poliniais tirpikliais.

Vertinant antioksidacinį aktyvumą buvo tiriami ekstraktai po ekstrakcijos su fermentais, iš kurių vienas ekstraktas buvo gautas naudojant fermentą ir buferį, o kitas – naudojant tik buferį. Toks tyrimas atliktas norint išsiaiškinti ar fermento panaudojimas padeda išskirti daugiau fenolinių junginių bei padidinti ekstrakto antioksidacinį aktyvumą. Gauti rezultatai parodė, kad fermento panaudojimas daro teigiamą įtaką BFJK ir antioksidaciniam aktyvumui.

Pagal nustatytą ekstraktų antioksidacinį aktyvumą matyti, kad didžiausiu aktyvumu pasižymi ekstraktai, išgauti naudojant polinius tirpiklius. Tokie ekstraktai galėtų būti puikus natūralių antioksidantų šaltinis. O mažiausiu aktyvumu pasižymi ekstraktai, kurie gauti po III SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakcijos. Mažesnės antioksidacinio aktyvumo vertės galėjo būti gaunamos todėl, kad ekstrakcijos metu naudota aukšta temperatūra, kuri gali lemti dalies bioaktyvių junginių skilimą.

### ***3.5.2. Išspaudų ir kietos frakcijos antioksidacinių savybių įvertinimas***

Atlikus ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimą, buvo nuspręsta nustatyti ir pradinės žaliavos (gervuogių išspaudų) bei kietos frakcijos, gautos po skirtingų ekstrakcijos metodų, antioksidacinį aktyvumą, kadangi ne visi junginiai išekstrahuojami. Tam tikri junginiai, turintys antioksidacinių savybių, gali būti stipriu ryšiu susijungę su kitais junginiais, o tai sudaro sunkumų norint juos išskirti iš tiriamos medžiagos. Kietos frakcijos antioksidacinis aktyvumas

nustatytas BFJK, ABTS<sup>+</sup> ir ORAC metodais, taikant QUENCHER procedūrą. Ši procedūra parodo kuris ekstrakcijos metodas yra efektyviausias. Gauti rezultatai pateikti 13 lentelėje.

Ištyrus gervuogių išspaudų antioksidacinį aktyvumą prieš ekstrakcijas ir po jų nustatyta, kad išspaudose lieka nemažas kiekis bioaktyvių junginių.

Pateikti rezultatai rodo, kad neapdorotose gervuogių išspaudose BFJK yra 72,79 mg TE/g. Po ekstrakcijų didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis lieka išspaudose po Soksleto ekstrakcijos (55,10 mg GRE/g SM) ir po superkritinės ekstrakcijos CO<sub>2</sub> (44,49–52,21 mg GRE/g SM). Geriausiai fenoliniai junginiai išekstrahuojami vykdant ekstrakciją su fermentu (6,21 mg GRE/g SM) ir atliekant ekstrakciją padidintame slėgyje su vandeniu (7,82 mg GRE/g SM), kadangi po šių ekstrakcijų gautoje kietoje frakcijoje BFJK yra mažiausias.

Nustatant antioksidacinį aktyvumą radikalų sujungimo metodu ABTS<sup>+</sup>, neapdorotų gervuogių išspaudų aktyvumas buvo 382,25 mg TE/g, o liekanos po II SKE–CO<sub>2</sub> – 387,82 mg TE/g SM. Iš šių rezultatų matoma, kad įvykdžius superkritinę ekstrakciją CO<sub>2</sub>, išspaudų aktyvumas padidėjo. Tai galėjo turėti įtakos lipofiliškos frakcijos išgavimas, po kurio liekanoje padidėjo hidrofilios frakcijos kiekis. Vykiant I SKE–CO<sub>2</sub>, III SKE–CO<sub>2</sub> ir Soksleto ekstrakciją su heksanu, liekanos aktyvumas nežymiai sumažėja (356,63 mg TE/g SM, 351,34 mg TE/g SM ir 337,44 mg TE/g SM) lyginant su neapdorota žaliava. Didesnis pokytis tiriant aktyvumą pastebimas taikant ekstrakciją padidintame slėgyje. Kuo poliškesnis tirpiklis naudotas, tuo mažesnis antioksidacinis aktyvumas liekanoje (EPS<sub>EtOH</sub>=202,07 mg TE/g SM, EPS<sub>H<sub>2</sub>O</sub>=90,90 mg TE/g SM). ABTS<sup>+</sup> metodu nustatytą mažiausią antioksidacinį aktyvumą turėjo išspaudos, gautos po ekstrakcijos su fermentu (33,28 mg TE/g SM), kadangi fermentai padidina junginių išgavimą ir taip sumažėja jų kiekis kietoje frakcijoje.

Degunies radikalų absorbcijos pajėgumo (ORAC) rezultatai gauti panašūs kaip ir prieš tai aprašyti. Šiuo metodu tiriant kietą frakciją didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas liekanoje po SKE–CO<sub>2</sub> – 124,11 mg TE/g SM, kuris buvo nedaug didesnis už neapdorotų išspaudų aktyvumą (122,81 mg TE/g SM). O mažiausias aktyvumas nustatytas kietoje frakcijoje, ekstrahuotoje su poliniais tirpikliais bei jų mišiniu.

Taigi, iš gautų rezultatų matoma, kad didžiausią antioksidacinį aktyvumą turi išspaudos, gautos po ekstrakcijų su nepoliniais tirpikliais. Įvykdžius ekstrakcijas su poliniais tirpikliais, išspaudose sumažėjo junginių, pasižyminčių antioksidaciniu aktyvumu, tačiau vis tiek dar liko nemažas kiekis. Taip gali būti dėl stiprių antioksidantų ryšių augalo matricoje. Geriausiai aktyvumas kietoje frakcijoje sumažinamas panaudojus ekstrakciją su fermentais, kadangi fermentai pasižymi ląstelių sienelių bei membranų ardymo savybėmis, o tai sąlygoja geresnį bioaktyvių junginių išskyrimą [99].

**13 lentelė.** Kietos frakcijos antioksidacinių savybių įvertinimas

Bandiniai	BFJK		ABTS <sup>++</sup>		ORAC	
	mg GRE/g	mg GRE/g SM	mg TE/g	mg TE/g SM	mg TE/g	mg TE/g SM
Išspaudos	72,79±1,15 <sup>i</sup>	72,79±1,15 <sup>i</sup>	382,25±1,48 <sup>g</sup>	382,25±1,48 <sup>i</sup>	122,81±5,06 <sup>d</sup>	122,81±5,06 <sup>d</sup>
<i>Tradiciniai ekstrakcijos metodai</i>						
SOK	60,90±0,18 <sup>h</sup>	55,10±0,16 <sup>h</sup>	372,98±1,54 <sup>f</sup>	337,44±1,39 <sup>f</sup>	112,04±3,87 <sup>c</sup>	101,36±3,50 <sup>c</sup>
MAC	16,51±0,19 <sup>c</sup>	13,22±0,15 <sup>c</sup>	175,75±1,92 <sup>d</sup>	140,81±1,53 <sup>d</sup>	17,87±5,60 <sup>a</sup>	14,32±4,49 <sup>a</sup>
<i>Aukšto slėgio ekstrakcijos metodai</i>						
I SKE–CO <sub>2</sub>	52,33±0,83 <sup>f</sup>	48,03±0,76 <sup>f</sup>	388,52±5,91 <sup>h</sup>	356,63±5,43 <sup>h</sup>	112,74±6,55 <sup>c</sup>	103,48±6,02 <sup>c</sup>
II SKE–CO <sub>2</sub>	57,96±1,12 <sup>g</sup>	52,21±1,01 <sup>g</sup>	430,58±3,02 <sup>i</sup>	387,82±2,72 <sup>j</sup>	137,52±6,50 <sup>e</sup>	124,11±5,86 <sup>e</sup>
III SKE–CO <sub>2</sub>	49,30±2,16 <sup>e</sup>	44,49±1,95 <sup>e</sup>	389,30±1,24 <sup>h</sup>	351,34±1,12 <sup>g</sup>	106,96±1,71 <sup>c</sup>	96,42±1,10 <sup>c</sup>
EPS <sub>EtOH</sub>	31,83±0,77 <sup>d</sup>	23,44±0,57 <sup>d</sup>	274,32±2,15 <sup>e</sup>	202,07±1,58 <sup>e</sup>	60,43±3,37 <sup>b</sup>	44,51±2,48 <sup>b</sup>
EPS <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	8,30±0,43 <sup>a</sup>	7,82±0,40 <sup>a</sup>	96,55±1,24 <sup>b</sup>	90,90±1,17 <sup>b</sup>	21,91±0,95 <sup>a</sup>	20,63±0,90 <sup>a</sup>
<i>Inovatyvus ekstrakcijos metodas</i>						
FERM (buferis)	14,10±0,44 <sup>b</sup>	11,66±0,23 <sup>b</sup>	106,05±3,43 <sup>c</sup>	99,07±3,29 <sup>c</sup>	–	–
FERM (buferis ir fermentas)	7,12±0,13 <sup>a</sup>	6,21±0,10 <sup>a</sup>	36,42±0,64 <sup>a</sup>	33,28±0,59 <sup>a</sup>	–	–

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



### 3.6. Gervuogių išspaudų ekstraktų oksidacinis stabilumas

Siekiant įvertinti aliejaus kokybę, svarbu iširti oksidacinę būseną, kadangi oksidacijos procesai riebaluose ar aliejuose yra viena iš pagrindinių maisto produktų maistingumo bei organoleptinių savybių pablogėjimo priežasčių. Oksidacijos procesas gali būti suskirstytas į dvi fazes – tai pirmiausia riebalų rūgštys reaguoja su deguonimi, susidarant peroksidams kaip bekvapiams junginiams, kurie vėliau skyla į lakiuosius aldehydus ar kitus junginius, atsakingus už kartų aromatą bei skonį [100].

#### 3.6.1. Peroksidų skaičiaus nustatymas

Vienas iš populiariausių ir dažniausiai naudojamų metodų maisto produktų oksidacijos įvertinimui – peroksidų skaičiaus nustatymas. Šis skaičius parodo kiek susidaro pirminių oksidacijos produktų – hidroperoksidų [101].

Peroksidų kiekiui nustatyti buvo naudojamas gervuogių ekstraktas, gautas atlikus II SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakciją. Nustatytas PS gervuogių išspaudų aliejuje lygus  $6,38 \pm 0,16$  mekv O<sub>2</sub>/kg ( $3,19$  mmol O<sub>2</sub>/kg). Olga Radočaj ir kt. (2014) nustatė gervuogių (*Rubus fruticosus L.*) išspaudų aliejuje esantį peroksidų skaičių, kuris buvo lygus  $3,73 \pm 0,17$  mmol O<sub>2</sub>/kg. Mokslinėje literatūroje pateiktame tyrime aliejus buvo gautas ekstrahuojant gervuogių išspaudas 8 val heksanu [36]. Nors buvo skirtingomis sąlygomis gauti ekstraktai – rezultatai labai panašūs kaip ir šiame darbe nustatyti. Tačiau Dimić ir kt. (2012) taip pat pateikė peroksidų skaičiaus ( $8,89 \pm 0,12$  mmol O<sub>2</sub>/kg) rezultatus, gautus atlikus tyrimą su gervuogių (*Rubus fruticosus L.*) išspaudomis, tokiomis pat sąlygomis kaip aprašyta Olga Radočaj ir kt. (2014) pateiktame straipsnyje, tik buvo naudojamos uogos, užaugintos skirtingose vietovėse [24]. Rezultatai buvo gauti skirtingi, nors ir uogos buvo tiriamos taikant vienodą metodą.

Iš aprašytų rezultatų matoma, kad peroksidų kiekiui ekstraktuose įtakos gali turėti ne tik skirtingos ekstrakcijos sąlygos, bet ir skirtingos užauginimo vietos. Nors gaunami rezultatai skiriasi, tačiau svarbiausia, kad patenka į ribas, skirtas nerafinuotiems aliejams, kurios nurodytos CODEX STAN 210 ( $15$  mekv O<sub>2</sub>/kg), todėl galima teigti, kad toks aliejus gali būti naudojamas pramonėje [102].

#### 3.6.2. Ekstraktų oksidacinis stabilumas, vertinant Oksipres ir Rancimat metodais

Gervuogių išspaudų ekstraktų, kaip antioksidantų, veikimas buvo matuojamas instrumentiniais Oksipres ir Rancimat metodais, o rezultatai išreikšti indukciniu periodu (IP) (žr. 14 lentelė). Skirtingi ekstraktai tiriami jų įdėjus 0,5 %, 1 %, 2 % koncentracijomis į majonežą (Kėdainių „Be konservantų“) ir matuojama kaip veikiamas majonezo oksidacinis stabilumas (žr. 19 pav.).

Oksipres metodas yra labai patogus norint įvertinti oksidacinį stabilumą, kadangi atliekant šį metodą nereikia naudoti jokių cheminių medžiagų. Oksipres aparatas matuoja slėgio pokyčius, kurie atsiranda dėl deguonies absorbcijos, sunaudojamos riebalų oksidacijai [103]. Deguonies slėgio pokytis reakcijos inde, indukcijos periodo pabaigoje, rodantis greitą hidroperoksidų (pirminių oksidacijos produktų) susiformavimą, gali būti pakankamai tiksliai išmatuotas.

Rancimat metodas dažniausiai naudojamas taip pat oksidaciniam stabilumui nustatyti ir yra pagrįstas elektrinio laidumo padidėjimu dėl lakiųjų dikarboksirūgščių susidarymo riebalų oksidacijos metu [104].

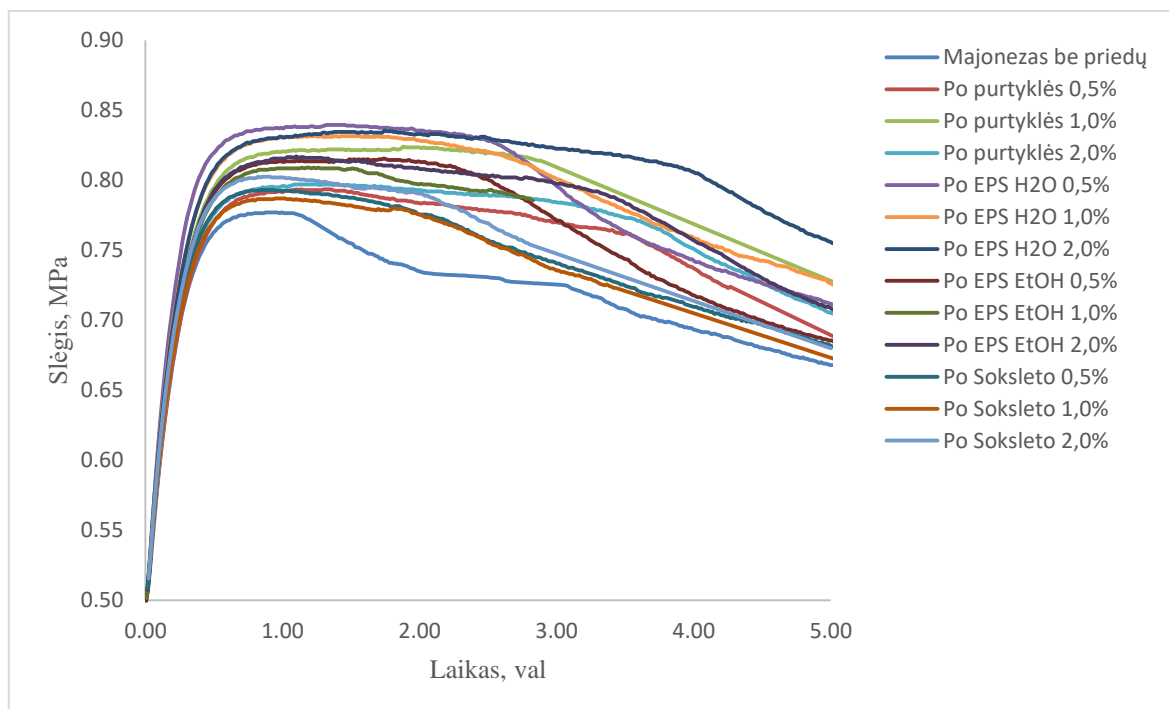
**14 lentelė.** Majonezo su gervuogių išspaudų ekstraktais indukciniai periodai

Ekstraktas	Oksipres metodu IP, val			Rancimat metodu IP, val
	0,5 % konc.	1 % konc.	2 % konc.	2 % konc.
<b>Majonezas (kontrolė)</b>	1,19±0,07 <sup>a</sup>	1,19±0,07 <sup>a</sup>	1,19±0,07 <sup>a</sup>	1,38±0,04 <sup>c</sup>
<b>Majonezas+ekstraktas po Soksleto</b>	1,42±0,08 <sup>b</sup>	1,88±0,07 <sup>c</sup>	2,04±0,01 <sup>b</sup>	2,62±0,03 <sup>b</sup>
<b>Majonezas+ekstraktas po EPS<sub>H2O</sub></b>	2,51±0,06 <sup>d</sup>	2,75±0,02 <sup>d</sup>	3,93±0,08 <sup>e</sup>	4,35±0,05 <sup>d</sup>
<b>Majonezas+ekstraktas po EPS<sub>E1OH</sub></b>	2,27±0,02 <sup>c</sup>	2,43±0,02 <sup>c</sup>	3,25±0,04 <sup>c</sup>	4,03±0,02 <sup>c</sup>
<b>Majonezas+ekstraktas po maceravimo</b>	1,61±0,03 <sup>b</sup>	2,69±0,03 <sup>d</sup>	3,63±0,02 <sup>d</sup>	4,15±0,03 <sup>c</sup>

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

Stabilizuojant emulsijas geriausiomis savybėmis pasižymėjo ekstraktai, gauti po EPS<sub>H2O</sub> ekstrakcijos, jų indukcinis periodas nustatytas didžiausias: IP<sub>0,5</sub>=2,51 val, IP<sub>1</sub>=2,75 val, IP<sub>2</sub>=3,93 val. Kitas ekstraktas, pasižymintis geromis stabilizavimo savybėmis – tai ekstraktas po maceravimo ir purtymo purtyklėje, kurio IP (IP<sub>0,5</sub>=1,61 val, IP<sub>1</sub>=2,69 val, IP<sub>2</sub>=3,63 val) nedaug skyrėsi nuo ekstrakto po EPS<sub>H2O</sub>. Nors emulsijos, paruoštos iš majonezo ir ekstrakto po maceravimo IP<sub>0,5</sub> buvo gautas mažesnis už emulsijos, paruoštos iš majonezo ir ekstrakto po EPS<sub>E1OH</sub> IP<sub>0,5</sub>, tačiau palyginus šių dviejų emulsijų IP<sub>1</sub> ir IP<sub>2</sub>, matoma, kad geresnės stabilizavimo savybės ekstrakto po maceravimo. Mažiausią stabilizuojantį poveikį turi ekstraktai po Soksleto, kurių IP (IP<sub>0,5</sub>=1,42 val, IP<sub>1</sub>=1,88 val, IP<sub>2</sub>=2,04 val) buvo panašūs į kontrolinio bandinio – majonezo IP (1,19 val). Stabilumo poveikio skirtumai gali būti aiškinami taip, kad polinis

ekstraktas po  $\text{EPS}_{\text{H}_2\text{O}}$  geriau ištirpinamas majoneze ir taip polinės antioksidacinės molekulės geriau ištirpsta vandens fazėje [105].

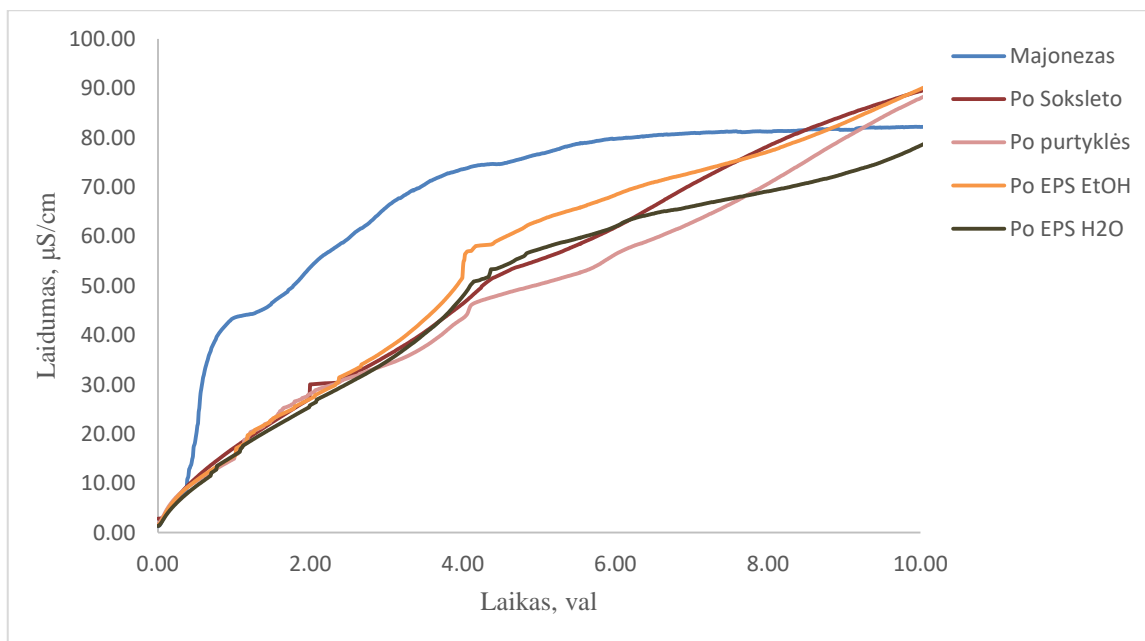


**19 pav.** Emulsijų oksidacinis stabilumas Oksipres metodu

Iš gautų rezultatų Oksipres metodu matoma, kad visi ekstraktai veikia kaip stabilizuojantys, o stabilizavimo poveikis didėjo didinant ekstrakto koncentraciją, todėl tiriant oksidacinį stabilumą Rancimat metodu, buvo nustatomas stabilumas tik su 2 % ekstrakto koncentracija.

Rancimat metodu nustatytos indukcinio periodo vertės kinta nuo 2,62 iki 4,35 valandų. Gauti rezultatai pateikti 14 lentelėje ir 20 paveiksle. Trumpiausias IP majonezo su ekstraktu po Soksleto, o ilgiausias – su ekstraktu po ekstrakcijos padidintame slėgyje su vandeniu. Emulsijos su ekstraktu po  $\text{EPS}_{\text{EtOH}}$  indukcinis periodas nustatytas 4,03 val, o su ekstraktu po maceravimo – 4,15 val. Rancimat metodu nustatytų rezultatų panašumas išliko toks pat, kaip ir Oksipres metodu, kadangi mažiausiai stabili emulsija su ekstraktu po Soksleto (2,62 val) , o geriausiu stabilumu pasižymėjo emulsija su ekstraktu, gautu po  $\text{EPS}_{\text{H}_2\text{O}}$  (4,35 val).

Taip pat Oksipres metodu buvo tiriamas grynas ekstraktas po II SKE– $\text{CO}_2$  ekstrakcijos 110 °C temperatūroje. Jo indukcinis periodas nustatytas  $8,04 \pm 0,01$  valandos. Palyginus su nerafinuotu rapsų („Obelių“) aliejumi buvo matoma, kad gervuogių išspaudų lipofilinis ekstraktas yra stabilesnis už aliejų ( $\text{IP} = 4,10 \pm 0,02$  val). Tačiau tokiomis pat sąlygomis ekstraktą tiriant Rancimat metodu IP nustatytas tik  $0,09 \pm 0,02$  valandos, o tai rodo, kad ekstraktas greit oksiduojasi.



**20 pav.** Emulsijų oksidacinis stabilumas Rancimat metodu

Mokslinėje literatūroje nebuvo rasta aprašytų tyrimų apie gervuogių išspaudų ekstraktų oksidacinio stabilumo nustatymą, todėl rezultatai palyginti su tos pačios šeimos uogomis – avietėmis (*Rubus idaeus L.*). Kryževičiūtė ir kt. (2016) nustatė aviečių išspaudų aliejaus (po SKE–CO<sub>2</sub>) oksidacinį stabilumą Oksipres ir Rancimat metodais [106]. Aviečių išspaudų aliejaus indukcinis periodas Oksipres metodu buvo 5,15 val, o nustatytas gervuogių išspaudų aliejaus – 8,04±0,01 val. Iš šių rezultatų matoma, kad gervuogių aliejus yra stabilesnis už aviečių, tačiau palyginus su kontrolinio aliejaus IP (4,10±0,02 val), akivaizdu, kad tiek gervuogių išspaudų aliejus, tiek aviečių išspaudų aliejus turi didesnę oksidacinį stabilumą.

Aviečių išspaudų aliejaus indukcinis periodas, gautas Rancimat metodu, buvo lygus 0,02 val. Nors gervuogių išspaudų aliejaus IP (0,09±0,02 val) nustatytas šiek tiek didesnis, tačiau nedaug skiriasi. Palyginus šiuos uogų išspaudų aliejaus indukcinis periodus su nerafinuoto saulėgrąžų aliejaus IP (3,82 val) pateiktu literatūroje [106], matoma, kad tiriamų bei literatūroje aprašytų uogų stabilumas Rancimat metodu nustatytas mažesnis. Labiausiai tikėtina, kad nedidelis uogų išspaudų indukcinis periodas gaunamas dėl kitų junginių, kurie ekstrahuojami kartu su triacilgliceroliais.

Tiek Oksipres, tiek Rancimat metodais nustatyti indukciniai periodai rodo, kad tiriamieji ekstraktai daro teigiamą įtaką produktui, taip pagerindami kokybę ir prailgindami galiojimo trukmę.

### 3.7. Riebalų rūgščių sudėtis

Riebalų rūgščių sudėtis – tai vienas iš pagrindinių rodiklių, apibūdinančių aliejaus maistinę vertę. Pagal dvigubuosius ryšius RR skirstomos į: SRR – tokias, kurios neturi dvigubųjų ryšių,

MNRR – turi vieną dvigubą ryšį ir PNRR – tokios, kurių struktūroje yra 2–6 dvigubosios jungtys. Polinesočiosios riebalų rūgštys dar skirstomos į  $\omega$ -3 ir  $\omega$ -6 RR, pagal tai, prie kurio anglies atomo yra pirma dviguba jungtis [107].  $\omega$ -3 riebalų rūgštims priklauso linoleno r., kuri gali būti metabolizuojama į eikozapentaeno r. (EPA) ir dekozaheksaeno r. (DHA). O  $\omega$ -6 PNRR priklauso linolo r. ir jos pagrindinis metabolitas – arachidono r. [108]. Šios riebalų rūgštys nėra sintetamos organizme, todėl turi patekti į organizmą su maistu [109, 110]. Mitybos rekomendacijose daug dėmesio skiriama RR ir ypač pabrėžiama, kad turėtų būti vartojama mažiau sočiųjų RR ir daugiau – MNRR, PNRR [111]. Daug atliktų mokslinių tyrimų įrodė, kad RR vaidmuo daugelyje biocheminių procesų yra reikšmingas, kadangi gali sumažinti vėžio, širdies ir kraujagyslių ligų, diabeto, osteoporozės riziką [107, 112].

Gervuogių išspaudų ekstraktuose nustatytos 6 skirtingos riebalų rūgštys (žr. 15 lentelė). RR sudėtis tirta trijuose skirtinguose ekstraktuose: po Soksleto ekstrakcijos, po II SKE–CO<sub>2</sub> ir po III SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakcijos. Visuose ekstraktuose nustatytos vienodos RR, kurių kiekiai labai panašūs. Pagrindinės ir labiausiai dominuojančios RR – tai linolo r., oleino r. ir linoleno r. Jos sudaro net ~92 % bendro visų riebalų rūgščių kiekio. Didžiausias kiekis ekstraktuose nustatytas polinesočiosios RR ( $\omega$ -6) – linolo rūgšties (C18:2). Jos kiekis sudaro nuo 64,06±0,01 iki 65,45±0,06 %. Antra RR pagal kiekį yra mononesočioji RR – oleino r. (C18:1), kurios kiekis kinta nuo 13,18±0,02 iki 15,74±0,16 %. Dar viena riebalų rūgštis, esanti trečia pagal kiekį, ekstraktuose – polinesočioji RR ( $\omega$ -3) linoleno r. (C18:3), kurios nustatyta 11,43–13,60 %. Be šių trijų pagrindinių RR, dar nustatytos sočiosios riebalų rūgštys: palmitino r. (C16:0), kurios kiekis 4,77–4,82 %, stearino r. (C18:0) – 2,29–2,93 % ir arachidino r. (C20:0), kurios kiekis mažiausias – svyravo nuo 0,72 iki 0,77 %.

**15 lentelė.** Riebalų rūgštys ir jų kiekiai gervuogių išspaudų ekstraktuose, %

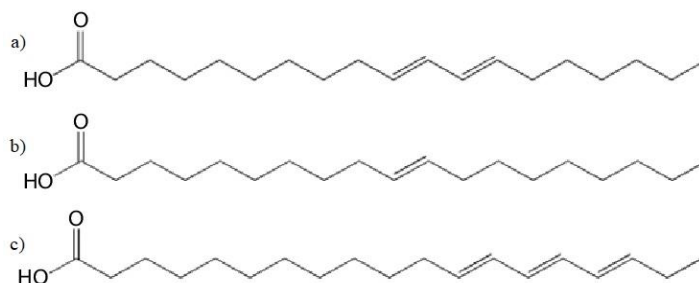
Riebalų rūgštis	Po SOK	Po II SKE–CO <sub>2</sub>	Po III SKE–CO <sub>2</sub>
<b>Palmitino rūgštis (C16:0)</b>	4,82±0,07 <sup>c</sup>	4,87±0,06 <sup>c</sup>	4,77±0,07 <sup>c</sup>
<b>Stearino rūgštis(C18:0)</b>	2,93±0,01 <sup>b</sup>	2,90±0,14 <sup>b</sup>	2,29±0,01 <sup>b</sup>
<b>Oleino rūgštis (C18:1)</b>	15,74±0,16 <sup>e</sup>	14,53±0,01 <sup>e</sup>	13,18±0,02 <sup>d</sup>
<b>Linolo rūgštis (C18:2)</b>	64,31±0,18 <sup>f</sup>	64,06±0,01 <sup>f</sup>	65,45±0,06 <sup>f</sup>
<b>Arachidino rūgštis (C20:0)</b>	0,77±0,04 <sup>a</sup>	0,76±0,04 <sup>a</sup>	0,72±0,08 <sup>a</sup>
<b>Linoleno rūgštis (C18:3)</b>	11,43±0,02 <sup>d</sup>	12,87±0,06 <sup>d</sup>	13,60±0,08 <sup>e</sup>

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

Nors literatūroje daugiausia pateikti riebalų rūgščių sudėties tyrimai su gervuogių uogomis, tačiau yra ir keli atlikti tyrimai su gervuogių išspaudomis. Yihua ir kt. (2006) nustatė, kad

gervuogių išspaudų ekstraktuose yra šios riebalų rūgštys: palmitino (C16:0) – 4,45–5,73 %, stearino (C18:0) – 1,98–2,58 %, oleino (C18:1) – 13,6–16,3 %, linolo (C18:2) – 61,0–66,1 % ir linoleno (C18:3) – 9,7–16,0 %. Pagrindinės trys rūgštys sudarė 92,0–93,3 % [113]. Bada ir kt. (2014) taip pat ištyrė gervuogių išspaudose esančias riebalų rūgštis, tarp kurių dominuojančios buvo tos pačios trys pagrindinės RR, kurios sudarė ~92 % visų riebalų rūgščių kiekio [114]. Wajs-Bonikowska ir kiti (2017) nustatė, kad gervuogių aliejuje RR ir jų kiekiai yra tokie: palmitino (C16:0) – 3,7–4,2 %, margarino (C17:0) – 0,1 %, stearino (C18:0) – 2,1–4,7 %, oleino (C18:1) – 12,1–13,9 %, linolo (C18:2) – 42,3–47,3 %, linoleno (C18:3) – 10,6–15,4 %, arachidino (C20:0) – 0,5–0,6 % [11]. Šiame darbe aprašyti rezultatai sutampa su literatūroje pateiktais rezultatais. Nors riebalų rūgščių sudėtis bei kiekiai šiek tiek skiriasi, tačiau pagrindinės dominuojančios RR visuose aprašytuose rezultatuose yra tos pačios: linolo r., oleino r. ir linoleno r. Kadangi šios rūgštys yra nesočiosios ir turi dvigubų jungčių, tai jos yra mažiau atsparios temperatūros, šviesos ir deguonies poveikiui, todėl aliejus gali lengviau oksiduotis. Pagrindinių RR, esančių gervuogių išspaudų ekstraktuose, struktūrinės formulės pateiktos 21 paveiksle. Gervuogių išspaudų ekstraktuose esančiai RR sudėčiai bei kiekiui įtakos gali turėti skirtingos auginimo sąlygos, laikymo sąlygos, uogų rūšis ir skirtingi RR nustatymo metodai.

Taigi, iš pateiktų rezultatų matoma, kad gervuogių išspaudos yra puikus MNRR oleino, PNRR ( $\omega$ -6) linolo ir PNRR ( $\omega$ -3) linoleno šaltinis.



**21 pav.** Gervuogių išspaudų ekstraktuose esančios pagrindinės riebalų rūgštys: a) Linolo r.; b) Oleino r.; c) Linoleno r.

### **3.8. Preliminarus bioaktyvių junginių identifikavimas taikant ultraefektyviają skysčių chromatografiją**

Naudojant UESCh-Q-TOF atlikta preliminari bioaktyviųjų junginių fitocheminė sudėties analizė gervuogių išspaudų ekstraktuose po Soksleto ekstrakcijos, SKE-CO<sub>2</sub>, ekstrakcijos padidintame slėgyje su etanoliu, vandeniu ir po maceravimo bei purtymo purtyklėje. Ekstraktuose esančių junginių identifikavimas atliktas pagal molekulinę joningą formulę ir tikslinę molinę masę lyginant su duomenimis, esančiais duomenų bazėse (Metlin, ChemSpider)

ir mokslinėje literatūroje. Ekstraktuose po Soksleto ir po SKE–CO<sub>2</sub> junginių nebuvo nustatyta. 16 lentelėje pateikti gauti rezultatai atlikus analizę.

Pagal pateiktus rezultatus matoma, kad gervuogių išspaudų ekstraktuose buvo nustatyta 18 skirtingų junginių. Junginio **(1)** molekuliniam jonui [M-H]<sup>-</sup> m/z=387,1144 priskirta formulė C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>O<sub>13</sub> ir junginys nustatytas kaip 2–hidroksiheptano r. Susidaręs molekulinis jonas [M-H]<sup>-</sup> m/z=179,0561 atitiko formulę C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub> ir junginys identifikuotas kaip gliukozė **(2)**. Junginių **(3)**, **(4)**, **(5)** molekuliniai jonai [M-H]<sup>-</sup> m/z=133,0142, m/z=225,0616, m/z=191,0197 atitiko formules C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub>, C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O<sub>8</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>7</sub> ir buvo identifikuoti kaip obuolių, gliukoheptono bei citrinų rūgšys. Analizuojant junginius **(6)**, **(7)** nustatyti susidarę jonai [M-H]<sup>-</sup> m/z=111,0088, m/z=173,0092, kuriems atitinkamai priskiriamos formulės C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub> ir C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, identifikuotos kaip 3–furoinė rūgštis ir dehidroaskorbo rūgštis. Junginių **(8)**, **(9)** formulės C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>6</sub>, C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub> ir molekuliniai jonai [M-H]<sup>-</sup> m/z=207,0874, m/z=253,0929 identifikuoti kaip etil-β-D-gliukopiranozidas bei galaktozilglicerolis. Taip pat buvo nustatyta galo rūgštis **(10)**, 1-hidroksipenktano-1,2,5-trikarboksilatas **(11)** ir kamferolio gliukozidas **(12)**, kurių molekuliniai jonai [M-H]<sup>-</sup> m/z=169,0142, m/z=219,0510, m/z=447,0931 ir atitiko molekulinės formules C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub>, C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub>, C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>11</sub>. Junginių **(13)** ir **(14)** molekuliniai jonai [M-H]<sup>-</sup> m/z=465,1038 ir m/z=300,9990 atitiko molekulinės formules C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>12</sub> bei C<sub>14</sub>H<sub>5</sub>O<sub>8</sub> ir buvo identifikuoti kaip epikatechin-7-O-gliukuronidas ir elago rūgštis. Analizuojant junginius **(15)**, **(16)**, **(17)**, **(18)** nustatyti susidarę jonai [M-H]<sup>-</sup> m/z=187,0976, m/z=811,4478, m/z=665,3906 ir m/z=603,3902, kuriems atitinkamai priskiriamos formulės C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>, C<sub>42</sub>H<sub>67</sub>O<sub>15</sub>, C<sub>36</sub>H<sub>57</sub>O<sub>11</sub> ir C<sub>35</sub>H<sub>55</sub>O<sub>8</sub>. Visi šie junginiai identifikuoti atitinkamai kaip heksano rūgštis, biogenin-3-O-celobiozidas, β-D-gliukopiranozė ir epipapirifero rūgštis.

Ekstraktuose po ekstrakcijos padidintame slėgyje su etanoliu buvo nustatyta daugiausiai junginių – 15, o mažiausiu kiekiu junginių pasižymėjo ekstraktas, gautas po ekstrakcijos padidintame slėgyje su vandeniu. Iš visų identifikuotų junginių, keturi junginiai buvo aptikti visuose tirtuose ekstraktuose – tai gliukozė (179,0561 m/z C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>), obuolių rūgštis (133,0142 m/z C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub>), 3–furoinė rūgštis (111,0088 m/z C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) ir biogenin-3-O-celobiozidas (811,4478 m/z C<sub>42</sub>H<sub>67</sub>O<sub>15</sub>).

**16 lentelė.** Gervuogių išspaudų ekstraktuose nustatyti junginiai

<b>Smailės nr.</b>	<b>Junginys</b>	<b>RT, min</b>	<b>MS [M-H]<sup>-</sup> m/z</b>	<b>Formulė [M-H]</b>	<b>Po EPS<sub>EtOH</sub></b>	<b>Po EPS<sub>H<sub>2</sub>O</sub></b>	<b>Po MAC</b>
1	2-hidroksiheptano r.	0,3	387,1144	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>13</sub>	+		+
2	Gliukozė	0,3	179,0561	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	+	+	+
3	Obuolių r.	0,4	133,0142	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	+	+	+
4	Gliukoheptono r.	0,4	225,0616	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub>		+	+
5	Citrinų r.	0,5	191,0197	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	+	+	+
6	3-furoinė rūgštis	0,5	111,0088	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		+	
7	Dehidroaskorbo r.	0,6	173,0092	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	+	+	+
8	Etil-β-D-gliukopiranozidas	0,9	207,0874	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	+		
9	Galaktozilglicerolis	0,9	253,0929	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	+		
10	Galo r.	0,9	169,0142	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>		+	
11	1-hidroksipentano-1,2,5-trikarboksilatas	1,5	219,0510	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	+		+
12	Kamferolio gliukozidas	1,7	447,0931	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	+		+
13	Epikatechin-7-O-gliukuronidas	1,8	465,1038	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	+		+
14	Elago r.	2,3	300,9990	C <sub>14</sub> H <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	+		
15	Heksano r.	2,8	187,0976	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub>	+		
16	Biogenin-3-O-celobiozidas	3,8	811,4478	C <sub>42</sub> H <sub>67</sub> O <sub>15</sub>	+		+
17	β-D-gliukopiranozė	4,4	665,3906	C <sub>36</sub> H <sub>57</sub> O <sub>11</sub>	+		
18	Epipapirifero r.	5,1	603,3902	C <sub>35</sub> H <sub>55</sub> O <sub>8</sub>	+		



### 3.9. Gervuogių išspaudų ir ekstraktų antocianinų analizė

#### 3.9.1. Bendras antocianinų kiekis gervuogių išspaudų ekstraktuose ir gervuogių sultyse

Atliekant antocianinų analizę buvo nustatytas bendras antocianinų kiekis ekstraktuose po maceravimo ir purtymo purtyklėje, bei po ekstrakcijos padidintame slėgyje su etanoliumi ir vandeniu (žr. 18 lentelė). Didžiausią kiekį antocianinų turėjo ekstraktas, gautas po maceravimo ir purtymo (165,23 mg/100 g SM), mažesnis kiekis nustatytas ekstrakte po ekstrakcijos padidintame slėgyje su etanoliumi (130,70 mg/100 g SM). Po EPS<sub>H2O</sub> ekstrakcijos gautame ekstrakte antocianinų kiekis nustatytas tik 8,63 mg/100 g SM. Ekstrakcija padidintame slėgyje su etanoliumi ir maceravimas buvo atlikti su vienoda žaliava (liekana po superkritinės ekstrakcijos CO<sub>2</sub>), tačiau gauti bendro antocianinų kiekio rezultatai parodė, kad EPS<sub>EtOH</sub> pritaikymas ekstraktuose sumažina antocianinų kiekį lyginant su maceravimo pritaikymu. Įtakos galėjo turėti naudojama temperatūra, kadangi maceravimo ir purtymo metu buvo naudojama 20 °C temperatūra, o EPS<sub>EtOH</sub> ekstrakcijos metu – 90 °C. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad aukštoje temperatūroje gali suskilti dalis antocianinų ir taip sumažėti bendras jų kiekis [115]. Liekana, gauta po EPS<sub>EtOH</sub> buvo apdorota taikant EPS<sub>H2O</sub> ekstrakciją 130 °C temperatūroje. Kadangi išspaudos jau buvo apdorotos taikant kelias ekstrakcijas ir dar naudojant vis didesnę temperatūrą, tai ir bendras antocianinų kiekis buvo gautas mažiausias.

17 lentelė. Bendras antocianinų kiekis gervuogių išspaudų ekstraktuose

Ekstraktas	mg/g ekstrakto	mg/100 g SM
Po EPS <sub>EtOH</sub>	4,47±0,05 <sup>b</sup>	130,70±1,34 <sup>b</sup>
Po EPS <sub>H2O</sub>	1,09±0,03 <sup>a</sup>	8,63±0,24 <sup>a</sup>
Po MAC	7,49±0,02 <sup>c</sup>	165,23±0,46 <sup>c</sup>

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

Mokslinėje literatūroje pateikti bendro antocianinų kiekio rezultatai labai įvairūs. Yamashita ir kt. (2017) gervuogių išspaudų vandeniniame ekstrakte nustatė 718,47 mg/100 g SM [116]. Pantelidis ir kt. (2007) skirtingose gervuogių uogų veislėse pateikė bendrą antocianinų kiekį, kuris kinta nuo 125,6 iki 152,2 mg/100 g šviežių uogų [117]. Vulić ir kt. (2011) ištyrė ekstraktus, paruoštus su metanolio vandeniniu tirpalu ir nustatė bendrą antocianinų kiekį 149,12 mg/100 g uogų išspaudų [118]. Patras ir kt. (2009) ištyrė, kad gervuogėse antocianinų kiekis yra net 1004,90 mg/100 SM. Didelis bendro antocianinų kiekio svyravimas gervuogių ekstraktuose

yra daugiausiai dėl genetinių ir aplinkos veiksnių, tokių kaip veislė, sunokimas, auginimo sąlygos. Taip pat įtakos turi pasirinktas apdoravimo būdas [119].

Vertinant bendrą antocianinų kiekį gervuogių išspaudų ekstraktuose, buvo ištirtos ir gervuogių sultys. Nustatytas bendras antocianinų kiekis –  $1432,76 \pm 0,31$  mg/L. Wang ir kt. (2007) aprašė bendrą antocianinų kiekį gervuogių sultyse, kuris buvo lygus 400,77 mg/L [31]. Pateiktas kiekis literatūroje yra daug mažesnis už šio tyrimo metu nustatytą kiekį. Kaip jau buvo minėta, įtakos rezultatams gali turėti genetiniai ir aplinkos veiksniai.

### 3.9.2. Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė

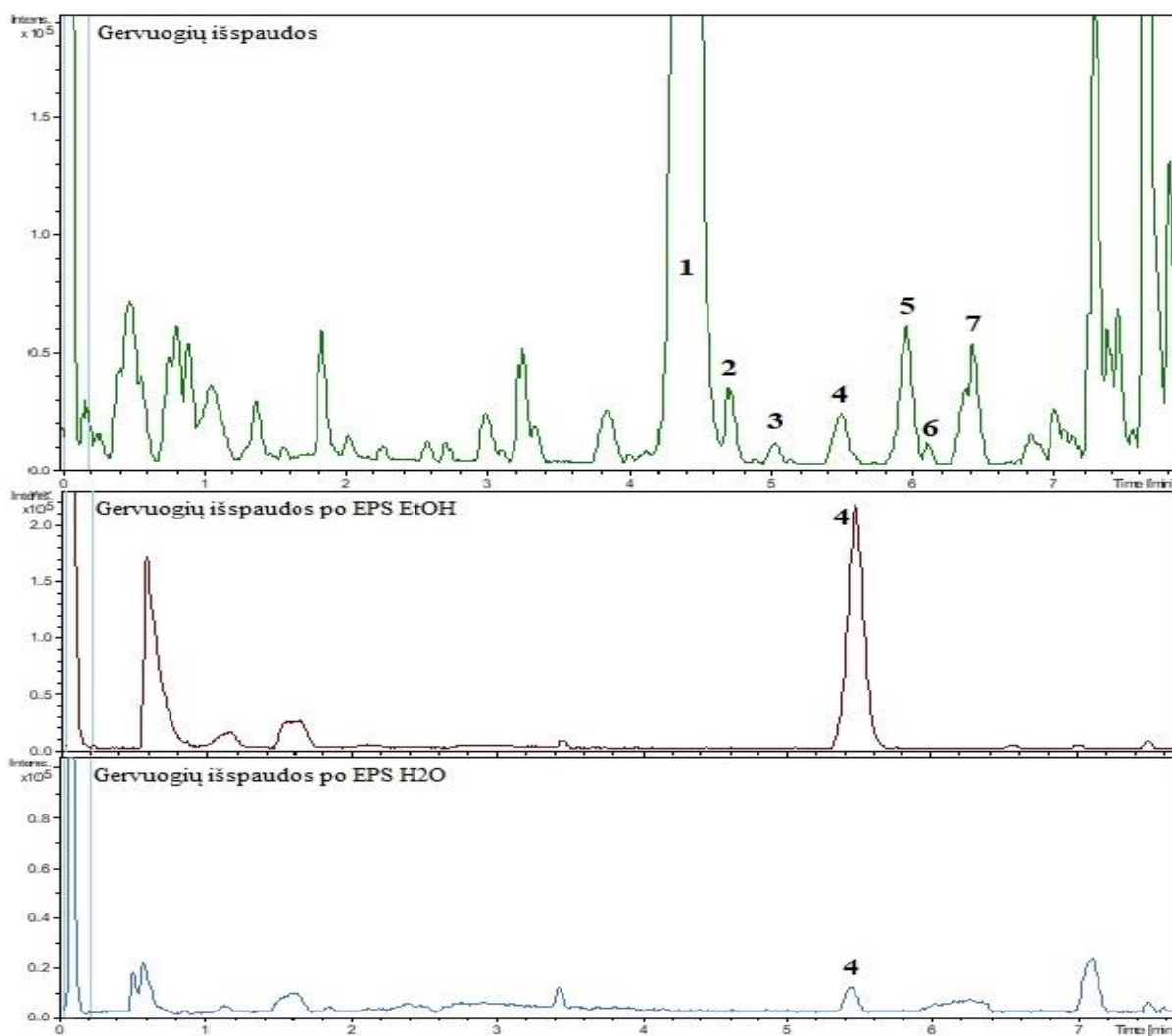
Ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodu buvo nustatyti antocianinai gervuogių išspaudose bei išspaudų  $\text{EPS}_{\text{EtOH}}$ ,  $\text{EPS}_{\text{H}_2\text{O}}$  ekstraktuose. Išskirtų junginių identifikavimas atliktas pagal molekulinę masę ir formulę lyginant su duomenimis, pateiktais komercines duomenų bazėse bei mokslinėje literatūroje.

Iš 17 lentelėje ir 22 paveiksle pateiktų rezultatų matoma, kad iš viso buvo identifikuoti 7 antocianinai. Smailės (1) molekuliniam jonui  $[\text{M-H}]^-$   $m/z=449,1087$  priskirta molekulinė formulė  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$  ir junginys identifiкуotas kaip cianidin-3-galaktozidas. Smailės (2) molekulinis jonas  $[\text{M-H}]^-$   $m/z=291,0862$  atitiko formulę  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_6$  ir junginys buvo nustatytas delfinidin-3-galaktozidas. Smailė (3) atitiko molekulinę formulę  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{10}$ , molekulinį joną  $[\text{M-H}]^-$   $m/z=433,1128$  ir buvo identifikuota kaip cianidin-3-O-ramnozidas. Smailės (4) molekulinis jonas  $[\text{M-H}]^-$   $m/z=449,1071$  atitiko  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$  formulę. Junginys nustatytas kaip cianidin-3-gliukoza. Smailės (5), (6) ir (7) atitiko molekulinis jonus  $[\text{M-H}]^-$   $m/z=535,1081$ ,  $m/z=435,0554$ ,  $m/z=593,1499$  bei molekulinės formules  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{O}_{14}$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{O}_{12}$  ir  $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{15}$ . Junginiai atitinkamai identifikuoti kaip cianidin-3-O-malonilgliukoza, delfinidin-3-ksilozidas ir cianidin-3-dioksalilgliukoza.

**18 lentelė.** Gervuogių išspaudose ir ekstraktuose nustatyti antocianinai

Smailės nr.	Junginys	Formulė $[\text{M-H}]^-$	MS $[\text{M-H}]^-$ $m/z$	mg/100 g SM		
				Išspaudos	$\text{EPS}_{\text{EtOH}}$	$\text{EPS}_{\text{H}_2\text{O}}$
1	CI-3-GA	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$	449,1087	$111,61 \pm 0,07$	–	–
2	DE-3-GA	$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_6$	291,0862	$2,17 \pm 0,02$	–	–
3	CI-3-O-RA	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{10}$	433,1128	$1,38 \pm 0,01$	–	–
4	CI-3-GL	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$	449,1071	$9,91 \pm 0,02$	$8,03 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,03$
5	CI-3-O-MG	$\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{O}_{14}$	535,1081	$4,52 \pm 0,03$	–	–
6	DE-3-KS	$\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{O}_{12}$	435,0554	$1,16 \pm 0,01$	–	–
7	CI-3-DG	$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{15}$	593,1499	$2,91 \pm 0,01$	–	–

CI – cianidinas; GA – galaktozidas; RA – ramnozidas; GL – gliukoza; MG – malonilgliukoza; KS – ksilozidas; DG – dioksalilgliukoza; DE – delfinidinas.



**22 pav.** Gervuogių išspaudų ir ekstraktų chromatogramos

Pagal cianidin-3-gliukozido standartą atlikta kiekybinė analizė. Nustatyta, kad gervuogių išspaudose pagrindinis antocianinas yra cianidin-3-galaktozidas, kuris sudaro net 85 % visų nustatytų antocianinų kiekio. Įvertinus antocianinus gervuogių išspaudų ekstraktuose po EPS<sub>EtOH</sub> ir po EPS<sub>H2O</sub> identifiкуotas tik vienas antocianinas – tai cianidin-3-gliukozidas. Po EPS<sub>EtOH</sub> gautas kiekis  $8,03 \pm 0,02$  mg/100 g SM, o po EPS<sub>H2O</sub> –  $0,27 \pm 0,03$  mg/100 g SM. Iš gautų rezultatų (žr. 18 lentelė) matoma, kad taikant ekstrakcijas, cianidin-3-gliukozido kiekis mažėjo.

Mokslinėje literatūroje nepavyko rasti nustatytų antocianinų gervuogių išspaudose, todėl rezultatai palyginti su gervuogių uogomis. Štefănuț ir kt. (2013) nustatė, kad didžiausias kiekis buvo rastas cianidin-3-gliukozido (90,72 %), o maži kiekiai – cianidin-3-ksilozido (3,44 %), cianidin-3-malonilgliukozido (2,97 %) ir cianidin-3-dioksalilgliukozido (2,04 %) [120]. Tačiau Genskowsky ir kt. (2016) gervuogėse nustatyti antocianinų kiekiai skyrėsi. Šiame aprašytame tyrime dominuojantis antocianinas buvo delfinidin-3-gliukozidas [121]. Remiantis Niculescu ir kt. (2013) pateiktais duomenimis, nustatyti antocianinai buvo cianidin-3-gliukozidas, cianidin-3-arabinozidas, malvidin-3-acetilmonogliukozidas ir cianidin-3-monogliukozidas, bet šių junginių

kiekiai nebuvo nustatyti [122]. Fan Chiang ir kt. (2005) antocianinus ištyrė 51-ame bandinyje, kurie 18 iš jų buvo skirtingų gervuogių veislių ir 20 pasirinkimų iš 5 skirtingų geografinių vietovių, bei 3 sezonų. Viso tyrimo metu nustatyti antocianinai: cianidin-3-gliukozidas, cianidin-3-rutinozidas, cianidin-3-ksilozidas, cianidin-3-malonilgliukozidas ir cianidin-3-dioksalilgliukozidas. Atitinkamai pagal tiriamą bandinį buvo nustatyti skirtingi antocianinai bei jų kiekiai, tačiau dažniausiai dominuojantis antocianinas – cianidin-3-gliukozidas [123]. Pagal mokslinėje literatūroje pateiktus rezultatus ir pagal nustatytus šio tyrimo metu, matoma, kad antocianinų sudėtis labai skirtinga. Nors daug tyrėjų nustatė, kad pagrindinis antocianinas gervuogėse yra cianidin-3-gliukozidas, tačiau yra ir priešingai gautų rezultatų. Skirtingus rezultatus gali lemti įvairūs veiksniai, tokie kaip uogų veislė, uogų sunokimo lygis, auginimo sąlygos, vietovė, tyrimų metodai ir daug kitų veiksnių [124].

## IŠVADOS

1. Įvertinus gervuogių išspaudų cheminę sudėtį, nustatyta, kad išspaudose drėgmės kiekis yra 3,62 g/100 g, baltymų – 12,83 g/100 g, riebalų – 13,56 g/100 g, o mineralinių medžiagų – 2,41 g/100 g.
2. Naudojant paviršiaus atsako metodą atliktas superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos parametru (slėgio, temperatūros ir laiko) optimizavimas. Nustatyta, kad didžiausia ekstraktų išeiga (9,93 g/100 g SM) gaunama esant 54,8 MPa slėgiui, 64 °C temperatūrai ir 171 min ekstrakcijos trukmei. Nustatyta, kad didžiausią įtaką išeigai turi pasirinktas slėgis.
3. Liekana, gauta po superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos, apdorota taikant ekstrakciją padidintame slėgyje su etanolium. Šiam procesui atliktas parametru (temperatūros ir laiko) optimizavimas ir nustatytos optimalios sąlygos (90 °C temperatūra, 3×15 min ekstrakcijos laikas), kurias vykdant gaunama didžiausia gervuogių išspaudų ekstraktų išeiga (29,24 g/100 g SM).
4. Apdorojant gervuogių išspaudas skirtingais ekstrakcijų metodais, buvo palygintos gautos išeigos, kurių vertės svyravo nuo 7,94 g/100 g SM iki 29,24 g/100 g SM ir nustatyta, kad didžiausios ekstraktų išeigos gautos po ekstrakcijos padidintame slėgyje su etanolium (29,24 g/100 g SM) ir po maceravimo bei purtymo purtyklėje (22,07 g/100 g SM). Mažiausia išeiga gauta atlikus ekstrakciją padidintame slėgyje su vandeniu (7,94 g/100 g SM).
5. Taikant *Folin Ciocalteu*'s, ABTS<sup>•+</sup> ir ORAC metodus, nustatytas gervuogių išspaudų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas. Gauti rezultatai parodė, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymi ekstraktai, gauti po maceravimo ir purtymo purtyklėje bei po ekstrakcijos padidintame slėgyje, naudojant polinius tirpiklius. Taip pat buvo įvertintas kietos frakcijos prieš ekstrakcijas ir po jų antioksidacinis aktyvumas naudojant tokius pat metodus, tik pritaikant QUENCHER procedūrą. Nustatyta, kad aktyviausia liekana, gauta po superkritinės ekstrakcijos CO<sub>2</sub> ir po Soksleto ekstrakcijos, kuriose naudojami nepoliniai tirpikliai.
6. Lipofiliniame ekstrakte po superkritinės ekstrakcijos CO<sub>2</sub> nustatytas peroksidų skaičius (6,38 mekv O<sub>2</sub>/kg), kuris neviršija leistinos nerafinuotiems aliejams (15 mekv O<sub>2</sub>/kg) ribos, todėl toks ekstraktas gali būti naudojamas atliekant tolimesnius tyrimus. Taikant Oksipres ir Rancimat metodus, buvo matuojamas gervuogių išspaudų ekstraktų oksidacinis stabilumas. Nustatyta, kad visi ekstraktai pasižymi stabilizuojančiomis savybėmis, o didžiausiu stabilumu pasižymi ekstraktas, gautas po ekstrakcijos padidintame slėgyje su vandeniu.

7. Dujų chromatografijos metodu nustatytos riebalų rūgštys, esančios gervuogių išspaudų lipofiliniuose ekstraktuose. Iš viso identifikuotos 6 riebalų rūgštys, iš kurių pagrindinės buvo linolo, linoleno ir oleino. Šios rūgštys sudaro ~92 % bendro visų riebalų rūgščių kiekio.
8. Ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodu atliktas bioaktyviųjų junginių identifikavimas. Gervuogių išspaudų lipofiliniuose ekstraktuose junginių nebuvo identifikuota, o likusiuose ekstraktuose iš viso buvo nustatyta 18 junginių. Didžiausiu kiekiu junginių pasižymėjo ekstraktas po ekstrakcijos padidintame slėgyje su etanolu, o mažiausiu – ekstraktas po ekstrakcijos padidintame slėgyje su vandeniu. Visuose ekstraktuose buvo nustatyti šie junginiai: gliukozė, obuolių rūgštis, 3–furoinė rūgštis ir biogenin-3-O-celobiozidas.
9. Atlikta antocianinų analizė gervuogių išspaudose ir ekstraktuose. Išspaudose nustatyti 7 antocianinai, iš kurių pagrindinis antocianinas – cianidin-3-galaktozidas, kuris sudaro 85 % visų nustatytų antocianinų kiekio. Ekstraktuose identifikuotas tik cianidin-3-gliukozidas. Palyginus ekstraktus pagal nustatytą bendrą antocianinų kiekį, nustatyta, kad didžiausias kiekis randamas ekstraktoje po maceravimo ir purtymo purtyklėje (165,23 mg/100 g SM), o mažiausias – po ekstrakcijos padidintame slėgyje su vandeniu (8,63 mg/100 g SM).
10. Šiame darbe atliktais tyrimais įrodyta, kad gervuogių išspaudos yra puikus bioaktyviųjų junginių šaltinis. Taikant aukšto slėgio ir fermentinio biorafinavimo procesus, galima išskirti ekstraktus, pasižyminčius dideliu fenolinių junginių kiekiu ir aukštu antioksidaciniu aktyvumu.

## BIBLIOGRAFINIŲ NUORODŲ SĄRAŠAS

1. MENRAD, K. Market and Marketing of Functional Food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 2003, vol. 56, no. 2-3. pp. 181-188.
2. KYLLI, P. Berry Phenolics: Isolation, Analysis, Identification, and Antioxidant Properties, 2010.
3. HALVORSEN, B.L., et al. Content of Redox-Active Compounds (Ie, Antioxidants) in Foods Consumed in the United States—. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, vol. 84, no. 1. pp. 95-135.
4. Machado, Ana Paula Da Fonseca, PASQUEL-REÁTEGUI, J.L., BARBERO, G.F. and MARTÍNEZ, J. Pressurized Liquid Extraction of Bioactive Compounds from Blackberry (*Rubus Fruticosus* L.) Residues: A Comparison with Conventional Methods. *Food Research International*, 2015, vol. 77. pp. 675-683.
5. SCHIEBER, A., STINTZING, F. and CARLE, R. By-Products of Plant Food Processing as a Source of Functional Compounds—recent Developments. *Trends in Food Science & Technology*, 2001, vol. 12, no. 11. pp. 401-413.
6. SEERAM, N.P. *Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of their Intake on Human Health, Performance, and Disease*, 2008.
7. DOS SANTOS, S.S., et al. Microencapsulation of Bioactive Compounds from Blackberry Pomace (*Rubus Fruticosus*) by Spray Drying Technique. *International Journal of Food Engineering*, 2017, vol. 13, no. 9.
8. GALANAKIS, C.M. Recovery of High Added-Value Components from Food Wastes: Conventional, Emerging Technologies and Commercialized Applications. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, vol. 26, no. 2. pp. 68-87.
9. HASSIMOTTO, N.M.A., MOTA, R.V.d., CORDENUNSI, B.R. and LAJOLO, F.M. Physico-Chemical Characterization and Bioactive Compounds of Blackberry Fruits (*Rubus* Sp.) Grown in Brazil. *Food Science and Technology*, 2008, vol. 28, no. 3. pp. 702-708.
10. KAUME, L., HOWARD, L.R. and DEVAREDDY, L. The Blackberry Fruit: A Review on its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, vol. 60, no. 23. pp. 5716-5727.
11. WAJS-BONIKOWSKA, A., et al. A Comparative Study on Composition and Antioxidant Activities of Supercritical Carbon Dioxide, Hexane and Ethanol Extracts from Blackberry (*Rubus Fruticosus*) Growing in Poland. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, vol. 97, no. 11. pp. 3576-3583.

12. SKROVANKOVA, S., et al. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, vol. 16, no. 10. pp. 24673-24706.
13. ZIA-UL-HAQ, M., et al. Rubus Fruticosus L.: Constituents, Biological Activities and Health Related Uses. *Molecules*, 2014, vol. 19, no. 8. pp. 10998-11029.
14. PATIL, B.S., JAYAPRAKASHA, G., CHIDAMBARA MURTHY, K. and VIKRAM, A. Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities, and Challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, vol. 57, no. 18. pp. 8142-8160.
15. CASTREJÓN, A.D.R., et al. Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Highbush Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.) during Fruit Maturation and Ripening. *Food Chemistry*, 2008, vol. 109, no. 3. pp. 564-572.
16. STAJČIĆ, S.M., et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Berry Fruits. *Acta Periodica Technologica*, 2012, no. 43. pp. 93-105.
17. BOBINAITĖ, R., VIŠKELIS, P. and VENSKUTONIS, P.R. Variation of Total Phenolics, Anthocyanins, Ellagic Acid and Radical Scavenging Capacity in various Raspberry (*Rubus* Spp.) Cultivars. *Food Chemistry*, 2012, vol. 132, no. 3. pp. 1495-1501.
18. MARJANOVIC-BALABAN, Z., GRUJIC, S., JASIC, M. and VUJADINOVIC, D. *Testing of Chemical Composition of Wild Berries*. Faculty of Agriculture, University of East Sarajevo, 2012.
19. RIGON, R.T. and NOREÑA, C.P.Z. Microencapsulation by Spray-Drying of Bioactive Compounds Extracted from Blackberry (*Rubus Fruticosus*). *Journal of Food Science and Technology*, 2016, vol. 53, no. 3. pp. 1515-1524.
20. SEGANTINI, D.M., et al. Chemical Quality Parameters and Bioactive Compound Content of Brazilian Berries. *Food Science and Technology*, 2015, vol. 35, no. 3. pp. 502-508.
21. KOLNIAK-OSTEK, J., KUCHARSKA, A.Z., SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, A. and FECKA, I. Characterization of Phenolic Compounds of Thorny and Thornless Blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, vol. 63, no. 11. pp. 3012-3021.
22. KONIĆ-RISTIĆ, A., et al. Biological Activity and Chemical Composition of Different Berry Juices. *Food Chemistry*, 2011, vol. 125, no. 4. pp. 1412-1417.
23. KUBOLA, J., SIRIAMORNPUN, S. and MEESO, N. Phytochemicals, Vitamin C and Sugar Content of Thai Wild Fruits. *Food Chemistry*, 2011, vol. 126, no. 3. pp. 972-981.
24. DIMIĆ, E.B., VUJASINOVIĆ, V.B., RADOČAJ, O.F. and PASTOR, O.P. Characteristics of Blackberry and Raspberry Seeds and Oils. *Acta Periodica Technologica*, 2012, no. 43. pp. 1-9.



25. DE SOUZA, V.R., et al. Determination of the Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Chemical Composition of Brazilian Blackberry, Red Raspberry, Strawberry, Blueberry and Sweet Cherry Fruits. *Food Chemistry*, 2014, vol. 156. pp. 362-368.
26. NILE, S.H. and PARK, S.W. Edible Berries: Bioactive Components and their Effect on Human Health. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 20130904, Feb, 2014, vol. 30, no. 2. pp. 134-144 ISSN 1873-1244; 0899-9007.
27. HUANG, W., ZHANG, H., LIU, W. and LI, C. Survey of Antioxidant Capacity and Phenolic Composition of Blueberry, Blackberry, and Strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2012, vol. 13, no. 2. pp. 94-102.
28. ABDALA, A.F., MENDOZA, N., BUSTOS, N.V. and SILVA, E.M.E. Antioxidant Capacity Analysis of Blackberry Extracts with Different Phytochemical Compositions and Optimization of their Ultrasound Assisted Extraction. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2017, vol. 72, no. 3. pp. 258-265.
29. COSTA, A.G.V., GARCIA-DIAZ, D.F., JIMENEZ, P. and SILVA, P.I. Bioactive Compounds and Health Benefits of Exotic Tropical Red-black Berries. *Journal of Functional Foods*, 2013, vol. 5, no. 2. pp. 539-549.
30. MEDDA, R., et al. Anti Inflammatory and Anti Angiogenic Effect of Black Raspberry Extract on Human Esophageal and Intestinal Microvascular Endothelial Cells. *Microvascular Research*, 2015, vol. 97. pp. 167-180.
31. WANG, W. and XU, S. Degradation Kinetics of Anthocyanins in Blackberry Juice and Concentrate. *Journal of Food Engineering*, 2007, vol. 82, no. 3. pp. 271-275.
32. KOSTECKA-GUGAŁA, A., et al. Antioxidant Properties of Fruits of Raspberry and Blackberry Grown in Central Europe. *Open Chemistry*, 2015, vol. 13, no. 1.
33. BENVENUTI, S., PELLATI, F., MELEGARI, M.a. and BERTELLI, D. Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *Journal of Food Science*, 2004, vol. 69, no. 3.
34. VAN DE VELDE, F., et al. Quantitative Comparison of Phytochemical Profile, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Properties of Blackberry Fruits Adapted to Argentina. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2016, vol. 47. pp. 82-91.
35. EDDERKAOUI, M., et al. Ellagic Acid Induces Apoptosis through Inhibition of Nuclear Factor Kappa B in Pancreatic Cancer Cells. *World Journal of Gastroenterology*, Jun 21, 2008, vol. 14, no. 23. pp. 3672-3680 ISSN 1007-9327; 1007-9327.
36. RADOČAJ, O., VUJASINOVIĆ, V., DIMIĆ, E. and BASIĆ, Z. Blackberry (*Rubus Fruticosus* L.) and Raspberry (*Rubus Idaeus* L.) Seed Oils Extracted from Dried Press Pomace After Longterm Frozen Storage of Berries can be used as Functional Food

- Ingredients. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2014, vol. 116, no. 8. pp. 1015-1024.
37. SHAHIDI, F. and ZHONG, Y. Lipid Oxidation and Improving the Oxidative Stability. *Chemical Society Reviews*, 2010, vol. 39, no. 11. pp. 4067-4079.
38. WONG, S.P., LEONG, L.P. and KOH, J.H.W. Antioxidant Activities of Aqueous Extracts of Selected Plants. *Food Chemistry*, 2006, vol. 99, no. 4. pp. 775-783.
39. YOUNG, I.S. and WOODSIDE, J.V. Antioxidants in Health and Disease. *Journal of Clinical Pathology*, Mar, 2001, vol. 54, no. 3. pp. 176-186 ISSN 0021-9746; 0021-9746.
40. PÉREZ-TORTOSA, V., et al. Antioxidant Activity and Rosmarinic Acid Changes in Salicylic Acid-Treated Thymus Membranaceus Shoots. *Food Chemistry*, 2012, vol. 130, no. 2. pp. 362-369.
41. PRIOR, R.L., WU, X. and SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, no. 10. pp. 4290-4302.
42. WOJDYŁO, A., OSZMIAŃSKI, J. and CZEMERYŚ, R. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in 32 Selected Herbs. *Food Chemistry*, 2007, vol. 105, no. 3. pp. 940-949.
43. ŠKROVÁNKOVÁ, S., MIŠURCOVÁ, L. and MACHŮ, L. Advances in food and nutrition research Elsevier, 2012 *Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants*, pp. 75-139.
44. LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A. and CHANDRA, N. Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Pharmacognosy Reviews*, Jul, 2010, vol. 4, no. 8. pp. 118-126 ISSN 0976-2787; 0973-6581.
45. SEN, S., et al. Free Radicals, Antioxidants, Diseases and Phytomedicines: Current Status and Future Prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2010, vol. 3, no. 1. pp. 91-100.
46. FRANKEL, E.N. *Lipid Oxidation*. Elsevier, 2014.
47. BOWEN-FORBES, C.S., ZHANG, Y. and NAIR, M.G. Anthocyanin Content, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anticancer Properties of Blackberry and Raspberry Fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, vol. 23, no. 6. pp. 554-560.
48. CAROCHO, M. and FERREIRA, I.C. A Review on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, vol. 51. pp. 15-25.
49. SHEBIS, Y., et al. Natural Antioxidants: Function and Sources. *Food and Nutrition Sciences*, 2013, vol. 4, no. 06. pp. 643.

50. PHAM-HUY, L.A., HE, H. and PHAM-HUY, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, Jun, 2008, vol. 4, no. 2. pp. 89-96 ISSN 1550-9702; 1550-9702.
51. NIMSE, S.B. and PAL, D. Free Radicals, Natural Antioxidants, and their Reaction Mechanisms. *Rsc Advances*, 2015, vol. 5, no. 35. pp. 27986-28006.
52. DE CASTRO, M.L. and PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet Extraction: Past and Present Panacea. *Journal of Chromatography A*, 2010, vol. 1217, no. 16. pp. 2383-2389.
53. WANG, L. and WELLER, C.L. Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, vol. 17, no. 6. pp. 300-312.
54. DE CASTRO, M.L. and GARCIA-AYUSO, L. Soxhlet Extraction of Solid Materials: An Outdated Technique with a Promising Innovative Future. *Analytica Chimica Acta*, 1998, vol. 369, no. 1-2. pp. 1-10.
55. ZARNOWSKI, R. and SUZUKI, Y. Expedient Soxhlet Extraction of Resorcinolic Lipids from Wheat Grains. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2004, vol. 17, no. 5. pp. 649-663.
56. MCHUGH, M. and KRUKONIS, V. *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*. Elsevier, 2013.
57. HERRERO, M., CIFUENTES, A. and IBÁÑEZ, E. Sub- and Supercritical Fluid Extraction of Functional Ingredients from Different Natural Sources: Plants, Food-by-Products, Algae and Microalgae: A Review. *Food Chemistry*, 2006, vol. 98, no. 1. pp. 136-148.
58. HERRERO, M., MENDIOLA, J.A., CIFUENTES, A. and IBÁÑEZ, E. Supercritical Fluid Extraction: Recent Advances and Applications. *Journal of Chromatography A*, 2010, vol. 1217, no. 16. pp. 2495-2511.
59. HERRERO, M., DEL PILAR SANCHEZ-CAMARGO, A., CIFUENTES, A. and IBANEZ, E. Plants, Seaweeds, Microalgae and Food by-Products as Natural Sources of Functional Ingredients obtained using Pressurized Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, vol. 71. pp. 26-38.
60. HAMBURGER, M., BAUMANN, D. and ADLER, S. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Selected Medicinal plants—Effects of High Pressure and Added Ethanol on Yield of Extracted Substances. *Phytochemical Analysis*, 2004, vol. 15, no. 1. pp. 46-54.
61. SAHENA, F., et al. Application of Supercritical CO<sub>2</sub> in Lipid extraction—A Review. *Journal of Food Engineering*, 2009, vol. 95, no. 2. pp. 240-253.
62. SAIRAM, P., et al. Supercritical Fluid Extraction (SFE)-an Overview. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science*, 2012, vol. 2, no. 3. pp. 112-120.

63. SIHVONEN, M., JÄRVENPÄÄ, E., HIETANIEMI, V. and HUOPALAHTI, R. Advances in Supercritical Carbon Dioxide Technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, vol. 10, no. 6-7. pp. 217-222.
64. LANG, Q. and WAI, C.M. Supercritical Fluid Extraction in Herbal and Natural Product Studies—a Practical Review. *Talanta*, 2001, vol. 53, no. 4. pp. 771-782.
65. KAUFMANN, B., CHRISTEN, P. and VEUTHEY, J. Study of Factors Influencing Pressurised Solvent Extraction of Polar Steroids from Plant Material. Application to the Recovery of Withanolides. *Chromatographia*, 2001, vol. 54, no. 5-6. pp. 394-398.
66. RICHTER, B.E., et al. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, 1996, vol. 68, no. 6. pp. 1033-1039.
67. ESKILSSON, C.S., HARTONEN, K., MATHIASSEN, L. and RIEKKOLA, M. Pressurized Hot Water Extraction of Insecticides from Process Dust—comparison with Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Separation Science*, 2004, vol. 27, no. 1-2. pp. 59-64.
68. YANG, Y., et al. Optimisation of Microwave-Assisted Enzymatic Extraction of Corilagin and Geraniin from *Geranium Sibiricum* Linne and Evaluation of Antioxidant Activity. *Food Chemistry*, 2010, vol. 122, no. 1. pp. 373-380.
69. PASSOS, C.P., YILMAZ, S., SILVA, C.M. and COIMBRA, M.A. Enhancement of Grape Seed Oil Extraction using a Cell Wall Degrading Enzyme Cocktail. *Food Chemistry*, 2009, vol. 115, no. 1. pp. 48-53.
70. HANMOUNGJAI, P., PYLE, D.L. and NIRANJAN, K. Enzyme-assisted Water-extraction of Oil and Protein from Rice Bran. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2002, vol. 77, no. 7. pp. 771-776.
71. GUAN, X. and YAO, H. Optimization of Viscozyme L-Assisted Extraction of Oat Bran Protein using Response Surface Methodology. *Food Chemistry*, 2008, vol. 106, no. 1. pp. 345-351.
72. HANRAHAN, G. and LU, K. Application of Factorial and Response Surface Methodology in Modern Experimental Design and Optimization. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2006, vol. 36, no. 3-4. pp. 141-151.
73. ŞAHİN, S., AYBASTIER, Ö and IŞIK, E. Optimisation of Ultrasonic-Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from *Artemisia Absinthium* using Response Surface Methodology. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141, no. 2. pp. 1361-1368.
74. AYBASTIER, Ö and DEMIR, C. Optimization of Immobilization Conditions of *Thermomyces Lanuginosus* Lipase on Styrene–divinylbenzene Copolymer using Response Surface Methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, vol. 63, no. 3-4. pp. 170-178.

75. BEZERRA, M.A., et al. Response Surface Methodology (RSM) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry. *Talanta*, 2008, vol. 76, no. 5. pp. 965-977.
76. ISO, L. 712: 2000 Grūdai Ir Grūdų Produktai. *Drėgmės Kiekio Nustatymas. Iprastinis Pamatinis Metodas*. Vilnius, 2000.
77. LST, E. 20483: 2007. *Varpiniai Ir Ankštiniai Javų Grūdai. Azoto Kiekio Nustatymas Ir Baltymų Kiekio Apskaičiavimas. Kjeldalio Metodas (ISO 20483: 2006)*. Vilnius: Lietuvos Standartizacijos Departamentas, 2007.
78. LST ISO 1443:2000. Mėsa ir mėsos produktai. Bendrojo riebalų kiekio nustatymas (tpt ISO 1443:1973(E)). Lietuvos standartizacijos departamentas Vilnius, 2000.
79. LST ISO 2171:2007. Varpinių, Ankštinių Javų Grūdai Ir Jų Šalutiniai Produktai. Pelenų, Gautų Po Sudeginimo, Nustatymas. Lietuvos Standartizacijos Departamentas Vilnius, 2007;.
80. BASEGMEZ, H.I.O., et al. Biorefining of Blackcurrant Pomace into High Value Functional Ingredients using Supercritical CO<sub>2</sub>, Pressurized Liquid and Enzyme Assisted Extractions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2017, vol. 124. pp. 10-19.
81. RODRIGUEZ-SAONA, L.E. and WROLSTAD, R.E. Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001.
82. KAPASAKALIDIS, P.G., RASTALL, R.A. and GORDON, M.H. Effect of a Cellulase Treatment on Extraction of Antioxidant Phenols from Black Currant (*Ribes Nigrum* L.) Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, vol. 57, no. 10. pp. 4342-4351.
83. GHOSE, T. Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, vol. 59, no. 2. pp. 257-268.
84. 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, vol. 20, no. 6-7. pp. 278-288.
85. SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R. and LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Methods in enzymology Elsevier, 1999 [14] *Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent*, pp. 152-178.
86. RE, R., et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, vol. 26, no. 9-10. pp. 1231-1237.
87. 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, vol. 51, no. 11. pp. 3273-3279.

88. LST EN ISO 3960:2010. Gyvūniniai Ir Augaliniai Riebalai Ir Aliejus. Peroksidų Skaičiaus Nustatymas. Jodometrinis (Vizualus) Nustatymas Pagal Ekvivalentinį Tašką (ISO 3960:2007, Pataisyta 2009-05-15 Versija);.
89. 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.
90. JAIN, S. and SHARMA, M. Review of Different Test Methods for the Evaluation of Stability of Biodiesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, vol. 14, no. 7. pp. 1937-1947.
91. HRÁDKOVÁ, I., et al. Antioxidant Effect of Mono-and Dihydroxyphenols in Sunflower Oil with Different Levels of Naturally Present Tocopherols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2013, vol. 115, no. 7. pp. 747-755.
92. MOREDA, W., PEREZ-CAMINO, M. and CERT, A. Gas and Liquid Chromatography of Hydrocarbons in Edible Vegetable Oils. *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 936, no. 1-2. pp. 159-171.
93. KRAUJALYTĖ, V., et al. Antioxidant Properties and Polyphenolic Compositions of Fruits from Different European Cranberrybush (*Viburnum Opulus L.*) Genotypes. *Food Chemistry*, 2013, vol. 141, no. 4. pp. 3695-3702.
94. GIUSTI, M.M. and WROLSTAD, R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001.
95. GRUNOVAITĖ, L., PUKALSKIENĖ, M., PUKALSKAS, A. and VENSKUTONIS, P.R. Fractionation of Black Chokeberry Pomace into Functional Ingredients using High Pressure Extraction Methods and Evaluation of their Antioxidant Capacity and Chemical Composition. *Journal of Functional Foods*, 2016, vol. 24. pp. 85-96.
96. REÁTEGUI, J.L.P., et al. Extraction of Antioxidant Compounds from Blackberry (*Rubus Sp.*) Bagasse using Supercritical CO<sub>2</sub> Assisted by Ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2014, vol. 94. pp. 223-233.
97. DENG, S., WEST, B.J. and JENSEN, C.J. Thermal Degradation of Flavonol Glycosides in Noni Leaves during Roasting. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2011, vol. 3, no. 2. pp. 155-159.
98. LAROZE, L., SOTO, C. and ZÚÑIGA, M.E. Phenolic Antioxidants Extraction from Raspberry Wastes Assisted by-Enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2010, vol. 13, no. 6. pp. 11-12.

99. PINELO, M., ARNOUS, A. and MEYER, A.S. Upgrading of Grape Skins: Significance of Plant Cell-Wall Structural Components and Extraction Techniques for Phenol Release. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, vol. 17, no. 11. pp. 579-590.
100. VAN HOED, V., et al. Berry Seeds: A Source of Specialty Oils with High Content of Bioactives and Nutritional Value. *Journal of Food Lipids*, 2009, vol. 16, no. 1. pp. 33-49.
101. ASNAASHARI, M., FARAHMANDFAR, R. and KENARI, R.E. Blackberry (*Rudus Plicates*) Leaves Extract Effect on Corn Oil Oxidation (Primary and Secondary Products) at High Temperature, 2016.
102. LST 1959. Įvardytų Rūšių Augaliniam Aliejui Taikomas Maisto Kodekso Standartas (CODEX STAN 210:1999, 1 Peržiūra:2001, 1 Keitinys:2003);.
103. VAN LENGERICH, B.H. and WALTHER, G. Fruit Products Containing Omega-3 Fatty Acids. *U.S. Patent Application no 12/507*, 2010.
104. CHMELOVÁ, D., ONDREJOVIČ, M., HAVRLETOVÁ, M. and KRAIC, J. Evaluation of Polar Polyphenols with Antioxidant Activities in *Papaver Somniferum L.* *Journal of Food & Nutrition Research*, 2018, vol. 57, no. 1.
105. BARANAUSKIENĖ, R., et al. Agrorefinery of *Tanacetum Vulgare L.* into Valuable Products and Evaluation of their Antioxidant Properties and Phytochemical Composition. *Industrial Crops and Products*, 2014, vol. 60. pp. 113-122.
106. 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, vol. 108. pp. 61-68.
107. ORSAVOVA, J., et al. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, vol. 16, no. 6. pp. 12871-12890.
108. CEBI, N., et al. Prediction of Peroxide Value in Omega-3 Rich Microalgae Oil by ATR-FTIR Spectroscopy Combined with Chemometrics. *Food Chemistry*, 2017, vol. 225. pp. 188-196.
109. MONTEIRO, J., et al. The Role of N-6 and N-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Manifestation of the Metabolic Syndrome in Cardiovascular Disease and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Food & Function*, 2014, vol. 5, no. 3. pp. 426-435.
110. SIMOPOULOS, A.P. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 2016, vol. 8, no. 3. pp. 128.

111. OOI, E.M., WATTS, G.F., NG, T.W. and BARRETT, P.H.R. Effect of Dietary Fatty Acids on Human Lipoprotein Metabolism: A Comprehensive Update. *Nutrients*, 2015, vol. 7, no. 6. pp. 4416-4425.
112. MOZAFFARIAN, D. and WU, J.H. (N-3) Fatty Acids and Cardiovascular Health: Are Effects of EPA and DHA Shared Or Complementary?–3. *The Journal of Nutrition*, 2012, vol. 142, no. 3. pp. 614S-625S.
113. XU, Y., ZHANG, Y., CHEN, M. and TU, P. Fatty Acids, Tocopherols and Proanthocyanidins in Bramble Seeds. *Food Chemistry*, 2006, vol. 99, no. 3. pp. 586-590.
114. BADA, J., LEON-CAMACHO, M., COPOVI, P. and ALONSO, L. Characterization of Berry and Currant Seed Oils from Asturias, Spain. *International Journal of Food Properties*, 2014, vol. 17, no. 1. pp. 77-85.
115. PATRAS, A., BRUNTON, N.P., DA PIEVE, S. and BUTLER, F. Impact of High Pressure Processing on Total Antioxidant Activity, Phenolic, Ascorbic Acid, Anthocyanin Content and Colour of Strawberry and Blackberry Purées. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2009, vol. 10, no. 3. pp. 308-313.
116. YAMASHITA, C., et al. Microencapsulation of an Anthocyanin-Rich Blackberry (*Rubus* Spp.) by-Product Extract by Freeze-Drying. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, vol. 84. pp. 256-262.
117. PANTELIDIS, G.E., VASILAKAKIS, M., MANGANARIS, G.A. and DIAMANTIDIS, G. Antioxidant Capacity, Phenol, Anthocyanin and Ascorbic Acid Contents in Raspberries, Blackberries, Red Currants, Gooseberries and Cornelian Cherries. *Food Chemistry*, 2007, vol. 102, no. 3. pp. 777-783.
118. VULIĆ, J.J., et al. Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of the Four Berry Fruits Pomace Extracts. *Acta Periodica Technologica*, 2011, no. 42. pp. 271-279.
119. TIWARI, B., O'DONNELL, C. and CULLEN, P. Effect of Sonication on Retention of Anthocyanins in Blackberry Juice. *Journal of Food Engineering*, 2009, vol. 93, no. 2. pp. 166-171.
120. ȘTEFĂNUȚ, M.N., et al. Anti-Hyperglycemic Effect of Bilberry, Blackberry and Mulberry Ultrasonic Extracts on Diabetic Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2013, vol. 68, no. 4. pp. 378-384.
121. GENSKOWSKY, E., et al. Determination of Polyphenolic Profile, Antioxidant Activity and Antibacterial Properties of Maqui [*Aristotelia Chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean Blackberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, vol. 96, no. 12. pp. 4235-4242.



122. NICULESCU, V., PAUN, N., SILION, M. and POPA, M.I. Anthocyanin Profile of Blackberries and Grapes. *Progress of Cryogenics and Isotopes Separation*, 2013, vol. 16, no. 1. pp. 119.
123. FAN-CHIANG, H. and WROLSTAD, R.E. Anthocyanin Pigment Composition of Blackberries. *Journal of Food Science*, 2005, vol. 70, no. 3.
124. SIRIWOHARN, T., WROLSTAD, R.E., FINN, C.E. and PEREIRA, C.B. Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus L. Hybrids*) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, vol. 52, no. 26. pp. 8021-8030.

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju magistro baigiamojo projekto vadovui prof. dr. Petriui Rimantui Venskutoniui už temos idėją, pagalbą ir konsultacijas moksliniais klausimais, bei nuolatinį skatinimą tobulėti. Dėkoju doc. dr. A. Pukalskui už pagalbą atliekant bioaktyviųjų junginių identifikavimo analizę, lekt. dr. M. Pukalskienei – už konsultacijas, patarimus ir kantrybę analizuojant antocianinus, lekt. dr. V. Kitrytei – už konsultacijas ir patarimus iškilus įvairiems moksliniams klausimams.

Nuoširdžiai dėkoju savo šeimai už kantrybę, supratingumą, pasitikėjimą ir nuolatinį palaikymą.