



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Vyšnių išspaudų biorafinavimas į vertingas mitybos
medžiagas taikant ekstrakcijos virškriziniais ir didelio slėgio
tirpikliais procesus**

Baigiamasis magistro projektas

Vita Morkūnienė

Projekto autorė

Prof., dr. Petras Rimantas Venskutonis

Vadovas

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

**Vyšnių išspaudų biorafinavimas į vertingas mitybos
medžiagas taikant ekstrakcijos virškriziniais ir didelio slėgio
tirpikliais procesus**

Baigiamasis magistro projektas
Maisto mokslas ir sauga (kodas 6211FX011)

Vita Morkūnienė

Projekto autorė

Prof., dr. Petras Rimantas Venskutonis

Vadovas

Lekt., dr. Milda Pukalskienė

Recenzentė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Vita Morkūnienė

Vyšnių išspaudų biorafinavimas į vertingas mitybos medžiagas taikant ekstrakcijos virškriziniais ir didelio slėgio tirpikliais procesus

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Vitos Morkūnienės, baigiamasis projektas tema „Vyšnių išspaudų biorafinavimas į vertingas mitybos medžiagas taikant ekstrakcijos virškriziniais ir didelio slėgio tirpikliais procesus“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Morkūnienė, V. Vyšnių išspaudų biorafinavimas į vertingas mitybos medžiagas taikant ekstrakcijos virškriziniais ir didelio slėgio tirpikliais procesus. Magistro baigiamasis projektas / vadovas prof., dr. Petras Rimantas Venskutonis; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų sritis (studijų krypčių grupė), studijų kryptis: Technologijų mokslai, Maisto technologijos.

Reikšminiai žodžiai: *Prunus cerasus išspaudos; superkrizinė ekstrakcija anglies dvideginiu; ekstrakcija suspaustais skysčiais; riebalų rūgščių sudėtis; antocianinų sudėtis; antioksidacinis aktyvumas.*

Kaunas, 2019. 92 p.

Santrauka

Augalinėje žaliavoje gausu bioaktyvių junginių, kurie pasižymi teigiamomis savybėmis sveikatai. Pritaikius įvairius ekstrakcijos metodus galima atlikti šių vertingų junginių išskyrimą. Vyšnių išspaudos – šalutinis sulčių/vyno gamybos produktas. Didžioji jų dalis, kuri susidaro technologinio proceso metu yra kompostuojama, panaudojama gyvulių maistui, ar tiesiog išmetama kaip atliekos. Verta pabrėžti, jog pritaikius skirtingus biorafinavimo metodus yra galimybė išskirti likusius veiklius junginius (antocianinus, flavonoidus, fenolines rūgštis ir kt.) ir panaudoti gaminant pridėtinės vertės produktus.

Šio darbo tikslas buvo sukurti vyšnių išspaudų biorafinavimo į vertingas funkcines maisto medžiagas technologiją, taikant superkrizinės (virškrizinės) ekstrakcijos anglies dvideginiu ir didelio slėgio tirpikliais (ekstrakcijos suspaustais skysčiais) metodus. Nustatyti gautų frakcijų sudėtį, antioksidacinį potencialą ir antocianinų kiekį.

Ekstraktai iš vyšnių išspaudų frakcijų buvo išskirti tradiciniu (Soksleto) ir inovatyviais ekstrakcijos metodais (superkrizine ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO₂) ir ekstrakcija suspaustais skysčiais (ESS)), naudojant skirtingo poliškumo tirpiklius. Pritaikius paviršiaus atsako metodą atliktas suspaustų skysčių ekstrakcijos etanolio/vandens (70:30) mišiniu proceso parametru (temperatūros ir laiko) optimizavimas, kuriems esant gaunama didžiausia ekstrakto išeiga bei proantocianidinų kiekis.

Gautų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas nustatytas ABTS^{•+} radikalo blukimo metodu ir deguonies radikalų surišimo geba (ORAC), o bendras fenolinių junginių kiekis įvertintas pagal *Folin-Ciocalteu* metodą. Vyšnių išspaudų ir kietų liekanų po ekstrakcijų antioksidacinis aktyvumas išmatuotas, pritaikant Quencher procedūrą. Lipofilinių ekstraktų riebalų rūgščių, lakių aromato junginių sudėtis ištirta naudojant dujų chromatografijos metodus, o triacilglicerolių kiekis nustatytas taikant ultra efektyviąją skysčių chromatografiją. Bendras karotinoidų (lipofiliniuose ekstraktuose) ir proantocianidinų (poliniuose ekstraktuose) kiekis įvertintas spektrofotometriškai. Kokybinė ir kiekybinė antocianinų analizė atlikta taikant ultra efektyviąją skysčių chromatografiją.

Morkūnienė, Vita. Biorefining of Cherry Pomace into Valuable Nutrients by using Supercritical Fluid and Pressurized Liquid Extraction Processes: *Master's thesis in Food Science and Safety / supervisor prof., dr. Petras Rimantas Venskutonis. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.*

Study area (study field group), study field: Technological Science, Food Technologies.

Key words: *Prunus cerasus pomace; supercritical carbon dioxide extraction; pressurized liquid extraction; composition of fatty acids; composition of anthocyanins; antioxidant capacity.*

Kaunas, 2019. 92 p.

Summary

Plant raw material is rich in bioactive compounds, which have positive health effects. These compounds can be recovered by using different extraction methods. Processing of cherries for juice production generates large amounts of by-products, which are called pomace. Currently, sour cherry pomace are used very inefficiently, for instance by composting or by producing animal feed. Moreover, large amounts of pomace are discarded as a waste causing environmental pollution problems. Considering that sour cherry pomace is a rich source of health beneficial polyphenols including anthocyanins, flavonoids, phenolic acids, there is an urgent need of valorizing sour cherry pomace for the recovery of high added value food grade ingredients. For this purpose, the application of biorefining concept seems to be a preferable approach for developing effective processes for recovery of various valuable substances from sour cherry pomace, which may serve as functional ingredients the high value-added food products.

The aim of this work was to develop multistep biorefining scheme for valorizing cherry pomace as a source of valuable nutrients by using supercritical fluid and pressurized liquid extraction processes. The objectives include evaluation of chemical composition, antioxidant properties and anthocyanins content in different sour cherry pomace fractions.

Extracts from sour cherry pomace were isolated by different solvents using traditional (Soxhlet) and modern (supercritical fluid extraction with carbon dioxide and pressurized liquid extraction) extraction techniques. Pressurized liquid extraction (ethanol/water; 70:30) parameters (temperature and time) were optimized for obtaining the highest yields and proanthocyanidins content by using Central Composite Design and Response Surface Methodology modelling. The sour cherry pomace fractions obtained were evaluated by determining important compositional characteristics and their antioxidant values.

Antioxidant potential of extracts was measured by ABTS^{•+} scavenging, oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays and total phenolic content, which was determined by *Folin-Ciocalteu* method. Antioxidant capacity of solid substances was evaluated by Quencher method. Fatty acids composition and volatiles compounds of lipophilic extracts were analyzed by gas chromatography and triacylglycerols were determined by ultra high performance liquid chromatography. Total carotenoids of lipophilic extract and proanthocyanidins of hydrophilic extracts determination were evaluated by spectrophotometry. Quantitative and qualitative analysis of anthocyanins was performed by ultra high performance liquid chromatography.

Turinys

Lentelių sąrašas	9
Paveikslų sąrašas	10
Santrumpų ir terminų sąrašas	11
Įvadas	12
1. Literatūros apžvalga	14
1.1. Vyšnių (<i>Prunus cerasus</i>) paplitimas ir jų panaudojimas pramonėje	14
1.2. Vyšnių biocheminė sudėtis	16
1.2.1. Vanduo	16
1.2.2. Angliavandeniai	16
1.2.3. Organinės rūgštys	16
1.2.4. Baltymai	17
1.2.5. Riebalai	17
1.2.6. Mineralai	17
1.2.7. Vitaminai	17
1.2.8. Fenoliniai junginiai	18
1.2.9. Lakieji aromato junginiai	19
1.3. Vyšnių bioaktyvieji junginiai	19
1.3.1. Bioaktyvieji cheminiai junginiai vyšnių išspaudose – VI	20
1.3.2. Bioaktyvieji cheminiai junginiai vyšnių kauliukuose – VK	21
1.4. Vyšnių šalutinių produktų funkcinės savybės ir nauda sveikatai	22
1.4.1. Antioksidacinės savybės	23
1.4.2. Priešuždegiminės savybės	24
1.4.3. Priešvėžinės savybės	24
1.5. Veikliųjų junginių išskyrimo metodai	24
1.5.1. Soksleto ekstrakcija	25
1.5.2. Superkrizinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO ₂)	26
1.5.3. Ekstrakcija suspaustais skysčiais (ESS)	29
1.6. Procesų optimizavimas	30
2. Tyrimo objektas ir metodai	33
2.1. Vyšnių išspaudos	33
2.2. Tyrimų metodai	34
2.2.1. Cheminiai reagentai ir medžiagos	34
2.2.2. Cheminės sudėties komponentų nustatymas	34
2.2.2.1. Drėgmės kiekio nustatymas	34
2.2.2.2. Baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu	35
2.2.2.3. Riebalų kiekio nustatymas Soksleto metodu	35
2.2.2.4. Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas	36
2.2.2.5. Angliavandenių kiekio apskaičiavimas	36
2.2.3. Dalelių dydžio ir jų pasiskirstymo nustatymas	36
2.2.4. Vyšnių išspaudų ekstraktų gamyba	37
2.2.4.1. Soksleto ekstrakcija	37
2.2.4.2. Superkrizinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO ₂)	38
2.2.4.3. Ekstrakcija suspaustais skysčiais (ESS)	38
2.2.4.3.1. Ekstrakcijos suspaustais skysčiais (ESS) proceso optimizavimas	38

2.2.5.	Ekstraktų antioksidacinio potencialo nustatymas	39
2.2.5.1.	Bandinių paruošimas	39
2.2.5.2.	Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK)	39
2.2.5.3.	2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS ⁺⁺) radikalo katijono sujungimo metodas	40
2.2.5.4.	Deguoies radikalų surišimo gebos nustatymas (ORAC)	40
2.2.6.	Kietųjų medžiagų antioksidacinio potencialo nustatymas (Quencher metodai)	41
2.2.6.1.	Bandinių paruošimas	41
2.2.6.2.	Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK)	41
2.2.6.3.	2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS ⁺⁺) radikalo katijono sujungimo metodas	41
2.2.6.4.	Deguoies radikalų surišimo gebos nustatymas (ORAC)	41
2.2.7.	Vyšnių išspaudų eksperimentiniai tyrimai po SKE-CO ₂	42
2.2.7.1.	Riebalų rūgščių (RR) sudėties nustatymas dujų chromatografijos metodu	42
2.2.7.2.	Triacilglicerolių sudėties nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu	42
2.2.7.3.	Bendro karotinoidų kiekio nustatymas UV – Vis metodu	43
2.2.7.4.	Lakiųjų junginių sudėties nustatymas dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu	43
2.2.8.	ESS būdu gautų medžiagų tyrimai	44
2.2.8.1.	Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu	44
2.2.8.2.	Proantocianidinų kiekio nustatymas UV – Vis metodu	44
3.	Rezultatai ir jų aptarimas	46
3.1.	Vyšnių išspaudų bendra cheminė sudėtis	46
3.2.	Vyšnių išspaudų dalelių dydis ir jų pasiskirstymas	46
3.3.	Vyšnių išspaudų ekstrakcija Soksleto metodu ir gautų ekstraktų/liekanų eksperimentiniai tyrimai	48
3.3.1.	Soksleto ekstrakcijos metu gautos išėigos	48
3.3.2.	Ekstraktų ir ekstrakcijos liekanų po Soksleto antioksidacinio potencialo įvertinimas	48
3.3.3.	Bendro karotinoidų kiekio analizė	50
3.4.	Vyšnių išspaudų ekstrakcija SKE-CO ₂ metodu ir gautų ekstraktų/liekanų eksperimentiniai tyrimai	51
3.4.1.	Superkrizinė ekstrakcija anglies dioksidu (SKE-CO ₂)	51
3.4.2.	Ekstraktų ir ekstrakcijos liekanų po SKE-CO ₂ antioksidacinio potencialo įvertinimas	53
3.4.3.	Riebalų rūgščių sudėties analizė	55
3.4.4.	Triacilglicerolių sudėties analizė	58
3.4.5.	Bendro karotinoidų kiekio analizė	59
3.4.6.	Lakiųjų junginių sudėties analizė	60
3.5.	Vyšnių išspaudų ekstrakcija suspaustais skysčiais (ESS) ir gautų ekstraktų/liekanų eksperimentiniai tyrimai	65
3.5.1.	Ekstrakcijos suspaustais skysčiais (ESS) proceso optimizavimas	65
3.5.1.1.	Ekstrakcijos suspaustais skysčiais (ESS) eksperimentinio modelio ir optimalių ekstrakcijos sąlygų sudarymas	65

3.5.1.2.	Kokybinė ir kiekybinė antocianinų analizė, optimalių ESS sąlygų parinkimui	70
3.5.1.3.	Ekstraktų gautų optimizuojant ESS procesą antioksidacinio potencialo įvertinimas	72
3.5.2.	Ekstraktų ir jų liekanų gautų po ekstrakcijos suspaustais skysčiais charakterizavimas	73
3.5.2.1.	Vyšnių išspaudų frakcijų ekstrakcijos išeigos, gautos atlikus ESS optimaliomis sąlygomis	73
3.5.2.2.	Proantocianidinų kiekio analizė, atlikus ESS optimaliomis sąlygomis	73
3.5.2.3.	Ekstraktų ir ekstrakcijos liekanų, gautų optimaliomis ESS sąlygomis, antioksidacinio potencialo įvertinimas	74
	Išvados	77
	Literatūros sąrašas	79

Lentelių sąrašas

1 lentelė. Bendras fenolinių junginių (BFJK) ir bendras antocianinų (BAK) kiekis skirtingose vyšnių veislėse	19
2 lentelė. Tirpiklių, kurie naudojami SKE, kritinių parametrų charakteristikos	27
3 lentelė. Vyšnių išspaudų frakcijos	33
4 lentelė. Nepriklausomų kintamųjų užkodavimas optimizuojant ESS procesą	38
5 lentelė. Vyšnių išspaudų biocheminė sudėtis	46
6 lentelė. Vyšnių dalelių dydžio nustatymas	47
7 lentelė. Vyšnių ekstraktų gautų po Soksleto ekstrakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	49
8 lentelė. Vyšnių liekanų gautų po Soksleto ekstrakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	49
9 lentelė. Bendras karotinoidų kiekis vyšnių ekstraktuose, gautuose po Soksleto ekstrakcijos	50
10 lentelė. Vyšnių ekstraktų gautų po SKE–CO ₂ antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	53
11 lentelė. Išspaudų ir liekanos, gautos po SKE–CO ₂ , antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	54
12 lentelė. Riebalų rūgščių sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po SKE–CO ₂	55
13 lentelė. Triacilglicerolių sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po SKE–CO ₂	58
14 lentelė. Bendras karotinoidų kiekis vyšnių ekstraktuose, gautuose po SKE–CO ₂	59
15 lentelė. Lakiųjų aromato junginių sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po SKE–CO ₂	61
16 lentelė. Vyšnių išspaudų 1 F liekanos gautos po SKE–CO ₂ optimizavimas atliekant ESS pagal centriškai kompozicinį planavimo modelį	65
17 lentelė. Centriškai kompozicinio modelio dispersinė analizė pagal kintamąsias vertes	66
18 lentelė. Centriškai kompozicinio modelio dispersinė analizė pagal kintamąsias vertes	68
19 lentelė. Antocianinų sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po ESS optimaliomis sąlygomis	70
20 lentelė. Vyšnių ekstraktų gautų po ESS optimizavimo proceso antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	72
21 lentelė. Ekstraktų išeigos gautos po ESS optimaliomis sąlygomis (60°C, 3x15 min.)	73
22 lentelė. PAC kiekis gautas iš ekstraktų, atlikus ESS optimaliomis sąlygomis (60 °C,3x15 min)	73
23 lentelė. Vyšnių ekstraktų gautų po ESS optimaliomis sąlygomis antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	74
24 lentelė. Vyšnių liekanų gautų po ESS optimaliomis sąlygomis antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	75

Paveikslų sąrašas

1 pav. Paprastoji vyšnia (lot. <i>Prunus cerasus</i>)	14
2 pav. Vyšnių pramoninio perdirbimo schema su susidaranciais šalutiniais gamybos produktais	16
3 pav. Augalų fitocheminių junginių sintezės schema ląstelėje	18
4 pav. Fenoliniai junginiai randami vyšnių išspaudose	21
5 pav. Bioaktyvieji junginiai randami vyšnių kauliukų aliejuje	22
6 pav. Apsauginiai efektai, kuriuos sukelia fenoliniai junginiai ir jų poveikis chroniškomis ligoms	23
7 pav. Soksleto aparatūra	26
8 pav. Medžiagos fazių diagrama, nurodanti kritinį tašką	27
9 pav. SKE–CO ₂ ekstraktoriaus schema	28
10 pav. ESS veikimo schema	29
11 pav. Pagrindiniai eksperimentų planavimo modeliai naudojant paviršiaus atsako metodą	30
12 pav. Centriškai kompozicinis modelis	31
13 pav. Vyšnių išspaudų biorafinavimo metodai ir vykdytų eksperimentinių tyrimų schema	37
14 pav. Proantocianidinų modelinė spalvinė reakcija	45
15 pav. Vyšnių išspaudų dalelių pasiskirstymas	47
16 pav. Vyšnių ekstraktų išeigos gautos po Soksleto ekstrakcijos	48
17 pav. Vyšnių ekstraktų kinetinės kreivės vykdant SKE–CO ₂	51
18 pav. Vyšnių ekstraktų išeigos gautos po SKE–CO ₂	52
19 pav. Ekstraktų, gautų po Soksleto ekstrakcijos ir SKE–CO ₂ , išeigų palyginimas	52
20 pav. Riebalų rūgštys, kurios buvo identifikuotos vyšnių ekstraktuose	57
21 pav. Bendro karotinoidų kiekio, gauto po Soksleto ekstrakcijos ir SKE–CO ₂ , palyginimas	59
22 pav. Matematinio modelio nuspėjamos ir faktinės ekstrakcijos išeigos palyginimas	67
23 pav. ESS paviršiaus atsako plotas, parodantis vyšnių išspaudų ekstrakto išeigos priklausomybę nuo optimizuojamų parametrų (temperatūros ir laiko)	67
24 pav. Matematinio modelio nuspėjamo ir faktinio proantocianidinų kiekio palyginimas	69
25 pav. ESS paviršiaus atsako plotas, parodantis proantocianidinų kiekio priklausomybę nuo optimizuojamų parametrų (temperatūros ir laiko)	69

Santrumpų ir terminų sąrašas

- ABTS^{•+} – 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties radikalas;
- Azobis – 2,2'-azobis(2-metilpropionamidino) dihidrochloridase (AAPH);
- BAA – bendras antioksidacinis aktyvumas;
- BAK – bendras antocianinų kiekis;
- BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis;
- BKK – bendras karotinoidų kiekis;
- CGE – cianidin-3-gliukozido ekvivalentas;
- DCh – dujų chromatografija;
- DCh-MS – dujų chromatografija – masių spektrometrija;
- ESS – ekstrakcija suspaustais skysčiais (didelio slėgio tirpikliais);
- GRE – galo rūgšties ekvivalentas;
- ORAC – deguonies radikalų absorbcijos (surišimo) geba (angl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*);
- PAC – proantocianidinai;
- PBS – fosfatinis buferinis tirpalas (angl. *phosphate buffered saline solution*);
- RR – riebalų rūgštis;
- SKE-CO₂ – superkrizinės ekstrakcija anglies dvideginiu (virškrizinė ekstrakcija);
- SM – sausos medžiagos;
- SN – standartinis nuokrypis;
- TE – trolokso ekvivalentas;
- UESCh – ultra efektyvioji skysčių chromatografija;
- v.d. – valgomoji dalis.

Įvadas

Maistas yra egzistencijos pagrindas, be kurio neišgyventų nei vienas gyvas organizmas, todėl pagrindinė jo funkcija aprūpinti organizmą būtiniausiomis medžiagomis. Šiais laikais visuomenė vis daugiau dėmesio skiria savo sveikatai, todėl labai aktualu tampa imtis prevencinių priemonių, siekiant išvengti įvairių ligų. Pastaruoju metu atlikta daug mokslinių tyrimų, susijusių su sveika mityba ir lėtinių ligų prevencija. Gauti rezultatai parodė, kad pridėtinės vertės funkcinis maistas be pagrindinės savo funkcijos (suteikti visas būtinas maistines medžiagas gyvybei palaikyti) dar suteikia ir papildomą naudą sveikatai, pagerindamas žmonių savijautą ir/ar sumažindamas įvairių ligų susirgimų riziką.

Nustatyta, jog augalinėje žaliavoje gausu bioaktyvių junginių, kurie turi ne tik teigiamą poveikį sveikatai, tačiau kartu gali prisidėti gydant įvairias ligas. Norint išskirti aukštos pridėtinės vertės produktus iš augalinės žaliavos taikomi įvairūs biorafinavimo procesai. Šiomis dienomis susiduriama su problema, jog didėja įvairių šalutinių žemės ūkio ir maisto perdirbimo produktų (atliekų), kurie panaudojami neefektyviai. Todėl pritaikius biorafinavimo metodus iš pramonės atliekų galima išskirti bioaktyvias medžiagas, pasižyminčias teigiamu poveikiu sveikatai. Įvairūs mokslininkų atlikti tyrimai parodė, jog didesnis vaisių, uogų bei daržovių vartojimas sumažina riziką susirgti kai kuriomis širdies ir kraujagyslių ligomis, cukriniu diabetu ar onkologinėmis ligomis [1]. Šį poveikį lemia didelė įvairovė bioaktyvių junginių randamų vaisiuose/uogose, ypač svarbūs fitocheminiai junginiai [2]. Fitocheminės medžiagos veikia kaip natūralūs antioksidantai, kurie naikina žalingą laisvųjų radikalų poveikį, slopina oksidacinius procesus [3].

Vienas iš populiariausių vaisių Lietuvoje yra vyšnia, kuri priskiriama erškėtinių šeimos augalams. Jos skirstomos į trešnes (*Prunus avium*) ir paprastąsias vyšnias (*Prunus cerasus*). Trešnės labiausiai tinkamos valgyti šviežias, o vyšnios – puikiai tinka maisto pramonėje [4]. Šiuose vaisiuose gausu vitaminų, antocianinų ir kitų fenolinių junginių, kurie siejami su teigiamu poveikiu žmogaus sveikatai. Atlikti tyrimai parodė, kad reguliarus vyšnių vartojimas siejamas su subalansuota mityba ir įvairių ligų prevencija dėl vaisiuose esančio didelio bioaktyvių junginių kiekio [5].

Vyšnių paklausa pasaulyje vis auga, todėl atitinkamai didėja pagaminamos produkcijos kiekis ir sparčiai plečiasi jų auginimo plotai. Paskutiniaisiais duomenimis šie vaisiai pasaulyje užima daugiau kaip 2 milijonus hektarų žemės ploto, o Europoje daugiau kaip 1 mln. hektarų žemės. Remiantis FAOSTAT (angl. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) 2016 m. duomenimis, Europoje pagaminama įvairių vyšnių produktų daugiau nei 8,5 milijonų tonų, iš kurių didžiausiomis gamintojomis laikomos: Rusija (230443 tonų), Lenkija (194817 tonų) ir Ukraina (156450 tonų) [6]. Pagrindiniai produktai gaminami iš vyšnių yra sultys, įvairūs džemai, alkoholiniai gėrimai, koncentratai, konservuoti vaisiai arba vyšnios tiesiog užšaldomos ar išdžiovinamos [7].

Vykdamas įvairių produktų gamybą gaunamas didelis kiekis šalutinių gamybos produktų, kurie dažniausiai panaudojami neefektyviai, kaip pavyzdžiui, spaudžiant vyšnių sultis gaunamas didelis kiekis išspaudų. Išspaudose ir kauliukuose neretai lieka didelis kiekis bioaktyvių junginių ir kitų naudingų medžiagų (pvz. skaidulų) [8]. Tačiau dažniausiai šie šalutiniai gamybos produktai panaudojami gyvūnų pašarams, trąšoms, kompostuojami arba tiesiog išmetami. Tokie panaudojimo būdai yra visai neracionalūs, todėl būtina ieškoti efektyvesnių. Pritaikant įvairius biorafinavimo procesus iš antrinių žaliavų išskiriamos įvairios medžiagos, kurios pasižymi teigiamomis funkcijomis ir gali būti panaudojamos kaip antioksidantai, antimikrobinės medžiagos, maistinės

skaidulos, dažikliai, tirštikliai įvairių maisto ir ne maisto produktų gamyboje. Neretai iš tokių žaliavų gauti produktai pasižymi ir sveikatą gerinančiomis savybėmis dėl savo sudėties.

Darbo tikslas – sukurti vyšnių išspaudų biorafinavimo į vertingas funkcines maisto medžiagas technologiją, taikant superkrizinės (virškrizinės) ekstrakcijos anglies dvideginio ir ekstrakcijos suspaustais skysčiais metodus.

Uždaviniai:

1. mechaniškai išfrakcionuoti susmulkintas vyšnių išspaudas, nustatyti dalelių pasiskirstymą frakcijose ir nustatyti pagrindinius vyšnių išspaudų frakcijų cheminės sudėties rodiklius;
2. išskirti vyšnių išspaudų frakcijų lipofiliškas medžiagas taikant tradicinę ekstrakcijos Soksleto aparate ir superkrizinės ekstrakcijos anglies dvideginio SKE–CO₂ metodus. Įvertinti SKE–CO₂ proceso kinetiką ir nustatyti gautų ekstraktų cheminę sudėtį bei antioksidacines savybes;
3. optimizuoti pagrindinius vyšnių išspaudų ekstrakcijos suspaustais skysčiais rodiklius (proceso trukmę ir temperatūrą), taikant centriškai kompozicinį eksperimento planą ir atsako paviršiaus metodologiją;
4. nustatyti optimaliomis sąlygomis gautų produktų sudėtį ir antioksidacines savybes, nustatyti ekstrakcijos liekanų antioksidacinę gebą ir įvertinti kiekvieno ekstrakcijos proceso efektyvumą išskiriant antioksidantus iš žaliavos;
5. integruotai įvertinti vyšnių išspaudų biorafinavimo proceso efektyvumą pagal visus eksperimento metu gautus rezultatus.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Vyšnių (*Prunus cerasus*) paplitimas ir jų panaudojimas pramonėje

Vyšnia (*Prunus cerasus*) priklauso *Cerasus* pogenčiui, *Prunus* genčiai ir priskiriama Rosaceae šeimai. Jos yra labiausiai paplitusios Europoje ir Azijoje. Paprastoji vyšnia – nedidelis vaismedis (žr. 1 pav.), užaugantis iki 6 m aukščio su šakninėmis atžalomis. Laja plati, apvali, su trumpomis, tvirtomis, į viršų augančiomis šakomis. Ilgaūglių galuose susikaupia daug trumpų ūglių, kurie būna pliki, vyšninės spalvos, su pilku apnašu. Lapai plačiai elipsiški arba atvirkščiai kiaušiniški, 6–9 cm ilgio, 3,5–6 cm pločio, standūs su smailiu galu. Lapo pakraštys pjūkliškas arba dantytas, viršutinė pusė tamsiai žalia, blizganti, apatinė lapo dalis – šviesesnė. Lapkotis 1–2,5 cm ilgio su liaukomis, prielapiai siauri, nukrentantys. Žiedynas – skėtinis, žiedai susitelkę po 2–4 žiedelius, žiedynų apačioje yra maži žali lapeliai. Žiedų pumpurų žvynai žydėjimo metu išsidėstę stačiai. Žiedai balti, medingi, iki 2,5 cm pločio, turi nektaro. Žiedkočiai dažniausiai ilgi, bet gali būti ir trumpi. Taurėlapiai atsilenkę, dantytu pakraščiu. Vainiklapiai iki 12 mm ilgio, balti, atvirkščiai kiaušiniški. Žiedo įgautas žiedsostis. Piestelė viena, su laisva mezgine (nesuaugusia), sėklapradžių 1–2. Kuokelių daug, jie prisegti prie žiedsosčio krašto [9–11].



1 pav. Paprastoji vyšnia (lot. *Prunus cerasus*) [12]

Vyšnių medžiai yra priskiriami lapuočių grupei, kurie auga vietovėse, kur vyrauja vidutinis klimatas. Jie prisitaiko prie metų sezoniškumo. Vis dėlto didžiausią įtaką vyšnių augimui turinčios klimato sąlygos yra temperatūra, krituliai ir vėjas. Vaismedžių augimas prasideda atšilus orams po žiemos, todėl šiluma yra labai svarbi. Taip pat temperatūra gali turėti įtakos ir greitesniam medžių sužydėjimui. Tačiau reikia paminėti, kad atlikti moksliniai tyrimai parodė, jog *Prunus* rūšis labiau reaguoja į atšilimo pokyčius ir tai turi didesnę poveikį žydėjimo trukmei nei pati šiluma [13]. Vyšnių medžiai žydi prieš lapojimąsi. Žievėje yra citrinos rūgštis ir dažančios medžiagos. Mediena kieta, sunki, rusvai gelsva, naudojama baldų gamyboje [11, 14].

Vyšnių veislės pasirinkimas priklauso nuo dirvožemio. Vyšnioms labiausiai tinkamas šviesus ir gerai drėkinamas dirvožemis, kurio pH turėtų būti 5,5–7,5. Dirva papildomai pagerinta dumblu būtų geriausia vieta augti šiems vaismedžiams. Vyšnios gali toleruoti priesmėlį ar priemolį su sąlyga, kad bus gerai išvystyta drenažo sistema. Drėkinimas ypač svarbus augant vyšnioms, nors žydėjimo ir nokimo metu jis nėra reikalingas. Šiais etapais drėgmės perteklius gali pakenkti vyšnių vaisių

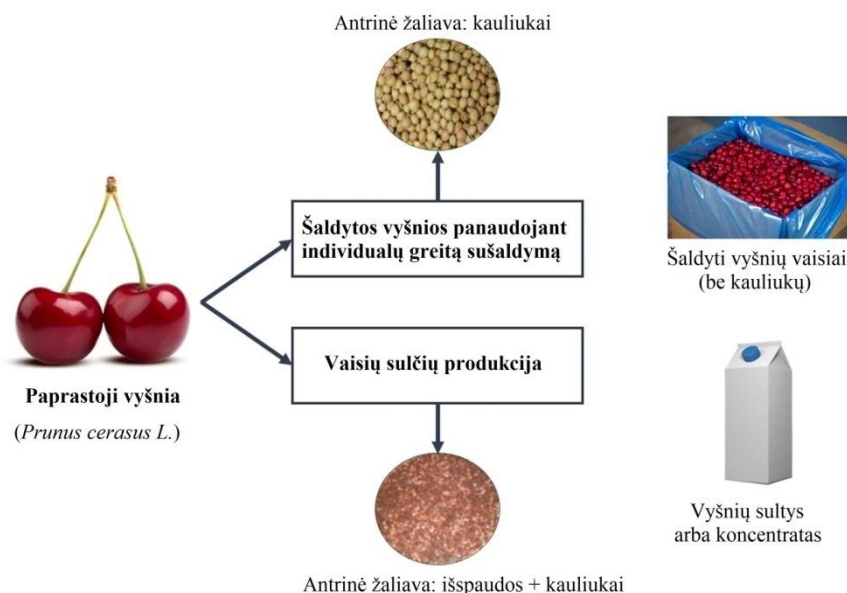
formavimuisi. Dėl tokių nepalankių aplinkos sąlygų gali būti gaunamas mažesnis derlius ir/ar atsirasti vaisių pažeidimai (defektai) [5].

Vyšnių nokinami vaisiai priskiriami kaulavaisių grupei. Jie yra valgomi, sultingi, rūgštaus skonio, be vaškinio apnašo, viduryje esantis kauliukas apvalios arba kiaušiniškos formos. Kauliukas lygaus, rečiau raukšlėto paviršiaus, kartais su aštria viršūnėle. Kai vaisiai prisirpsta, rutuliškas kauliukas sunkiai atsiskiria nuo minkštosios valgomosios dalies [10]. Dažniausiai vyšnios pagal nokinamus vaisius skirstomos į trešnes (*Prunus avium*) ir paprastąsias vyšnias (*Prunus cerasus*). Paprastosios vyšnios priskiriamos vienai iš dviejų grupių (angl. *amarellas* – amarena arba *morellas* – moreno), atsižvelgiant į odelės ir sulčių spalvą bei nokinamų vaisių formą. Amarenos vyšnios paprastai būna plokščios formos, odelės spalva šviesiai raudona, jų sultys bespalvės. Moreno vaisiai – sferinės arba širdinės formos, odelės ir sulčių spalva sodriai (tamsiai) raudona [5].

Trešnės tinkamiausios greitam suvartojimui, t.y. jos valgomos šviežios, kai tuo tarpu vyšnios – puikiai tinka įvairiose maisto pramonės šakose, konditerijos gaminiams, džemų ir sulčių produktams gaminti [4]. Dažniausiai ir plačiausiai žinomi iš vyšnių gaminami produktai yra sultys, džemai, piurė, įvairūs koncentratai, alkoholiniai gėrimai, neretai jos būna užšaldomos, konservuojamos ar išdžiovinamos įvairiais metodais (pvz. liofilizuojamos). Kiek rečiau panaudojamos marmeladų, želė ar konditerijos pramonės šakose [7, 15–17]. Vyšnių kauliukai taip pat turi savo panaudojimo sritį. Jų aliejus gali būti naudojamas muilo gamyboje [10], nors nustatyta, kad kauliukų sudėtyje yra amigdalinio gliukozido, turinčio ciano rūgštis.

Vyšnių sudėtyje randama daug įvairių bioaktyvių junginių, kurie turi teigiamos įtakos sveikatai. Vyšnių perdirbimo metu lieka nemažai atliekų, kurios vis dar panaudojamos neefektyviai [18]. Didžiausia jų dalis gaunama po greito vyšnių užšaldymo, pašalinus kauliukus (angl. *individual quick frozen* – IQF) ir sulčių spaudimo (20–30 % išspaudų) (žr. 2 pav.). Vaisių šalutinius gamybos produktus sudaro išspaudos (odelė ir minkštoji dalis) ir/ar kauliukas. Taikant greitą vyšnių užšaldymo technologiją kauliukai atskiriami, naudojant automatinius įrenginius, kai tuo tarpu sultys dažniausiai spaudžiamos presais, taip atskiriant ne tik kauliukus bet ir odeles bei kitas dalis. Naudojant sulčių spaudimui šiuolaikišką įrangą gaunama ne tik didesnė sulčių išeiga, tačiau ir nesutraikomi kauliukai [8].

Vaisiai savo sudėtyje turintys bioaktyvių junginių gali būti vartojami kaip prevencinė priemonė prieš tokias ligas kaip širdies ir kraujagyslių, diabetą ir net vėžį. Atlikti įvairūs moksliniai tyrimai leidžia galvoti, jog šis poveikis atsiranda dėl įvairių maistinių medžiagų buvimo (t.y. maistinių skaidulų, vitaminų ir/ar fitocheminių junginių). Nustatyta, jog reguliarus vyšnių vartojimas yra siejamas su subalansuota mityba ir galimu teigiamu poveikiu sveikatai dėl didelio bioaktyvių junginių kiekio [5].



2 pav. Vyšnių pramoninio perdirbimo schema su susidarančiais šalutiniais gamybos produktais [19]

1.2. Vyšnių biocheminė sudėtis

1.2.1. Vanduo

Vanduo yra pagrindinė vyšnių sudedamoji dalis, kuri nokinimo metu trešnėse ir vyšniose sudaro apie 80–83 % [5, 20].

1.2.2. Angliavandeniai

Angliavandeniai taip pat yra viena iš pagrindinių maistinių medžiagų vaisiuose (12,2–17,0 %) [5, 20, 21]. Maistinės skaidulos sudaro tik 1,3–2,1 % nuo bendro jų kiekio. Nors maistinių skaidulų kiekis nėra didelis, tačiau lyginant su kitais *Prunus* genties vaisiais, vyšniose jų yra kur kas daugiau [22]. Sausose išspaudose didžiąją dalį sudaro skaidulos (71,44 %), kuriose randama lignino (69,4 %), celiuliozės (18,4 %), hemiceliuliozės (10,7 %) ir pektino (1,5 %) [23]. Remiantis atliktais tyrimais krakmolos vyšniose nenustatytas, tačiau cukraus kiekis kinta nuo 11 iki 15 %. Cukraus kiekį vaisiuose lemia ne tik veislė, bet ir klimato sąlygos, auginimo būdas bei poskiepai [24–26]. Priklausomai nuo veislės cukraus kiekis gali kisti nuo 8 iki 20 % [26–31]. Pagrindinė angliavandenių sudedamoji dalis – gliukozė, kurios randama nuo 6 iki 10 g/100 g žaliavos. Kiek mažiau yra fruktozės, jos kiekis kinta nuo 4,6 iki 6,7 g/100 g žaliavos [5]. Nustatyta, jog vyšniose yra mažesnis kiekis gliukozės ir fruktozės lyginant su trešnėmis. Sorbitolio koncentracija kinta nuo 0,44 iki 4 g/100 g žaliavos, o sacharozės – nuo 0,05 iki 1,18 g/100 g žaliavos [32, 33]. Cukrų sudėtis tiesiogiai susijusi su tirpių kietųjų medžiagų kiekiu, o tai yra vienas iš svarbiausių rodiklių, lemiančių vartotojų pasirinkimą [34, 35]. Nustatyta procentiškai, jog trešnėse (15–19 %) ir vyšniose (14,4–23,1 %) tirpių kietųjų medžiagų išraiška yra labai panaši [36].

1.2.3. Organinės rūgštys

Vaisių rūgštingumas yra vienas iš svarbiausių priimtino rodiklių vartotojams. Trešnės (pH siekia 3,7–4,2) paprastai būna kiek saldesnės nei vyšnios (pH kinta nuo 3,1 iki 3,6), nors pH kaip ir titruojamasis rūgštingumas (TR) gali skirtis priklausomai nuo veislės [5, 36, 37]. Titruojamas rūgštingumas priešingai nei pH trešnėse yra mažesnis ir kinta nuo 0,7 iki 0,9 % obuolių rūgšties, o

vyšniose būna apie 1,2 % obuolių rūgštis, nors priklausomai nuo veislės gali pasiekti ir 1,9 % obuolių rūgštis [36–38]. Pagrindinės organinės rūgštys randamos vaisiuose yra obuolių (600–900 mg/100 g žaliavos), citrinų (4–50 mg/100 g žaliavos) ir gintaro (4 iki 38 mg/100 g žaliavos) rūgštys, kurių kiekis kinta priklausomai nuo vyšnių veislės. Kitos organinės rūgštys, kurių kiekis yra mažesnis nei 5 mg/100 g žaliavos, yra sikiminė, fumaro ir oksalo rūgštys [5]. Santykis bendro tirpiųjų medžiagų kiekio ir titruojamojo rūgštingumo (BTM/TR) parodo sunokimo indeksą. Procentinė išraiška BTM/TR (angl. *total soluble solids/total titratable acidity – TSS/TA*) dažniausiai naudojama įvertinti kada buvo nuimtas derlius. Paprastai BTM/TR santykis trešnėse kinta nuo 20 iki 30 %, tačiau kai kuriose veislėse gali pasiekti ir 40 % vertę [5]. Vyšniose BTM/TR indeksas paprastai būna mažesnis nei 16 %, nors priklausomai nuo veislės šis rodiklis gali siekti ir 20 % [36–38].

1.2.4. Baltymai

Baltymų kiekis vyšniose kinta nuo 0,8 iki 1,4 % [5, 20, 21], kuriose yra visos nepakeičiamos amino rūgštys, tačiau jų koncentracija yra labai maža, pavyzdžiui, 5–10 mg metionino/100 g v.d., 32–46 mg lizino/100 g v.d. [5]. Vaisiuose gausu asparto rūgštis, kuri sudaro 57–62,3 % visų amino rūgščių kiekio. Glutamo rūgštis randama labai mažai (0,04–0,08 % nuo visų esančių amino rūgščių kiekio). Vyšniose gausu melatonino, kuris veikia kaip reguliatorius (oksidacinis agentas) miego – pabudimo cikluose [5].

1.2.5. Riebalai

Vyšniose yra labai mažai riebalų, nuo 0,2 iki 0,7 g/100 g v.d. Sočių, mononesočių ir polinesočių riebalų rūgščių kiekis vyšniose yra labai panašus [20]. Palmitino (C 16:0) ir stearino (C 18:0) sočiosios riebalų rūgštys yra pagrindinės, o jų randamas kiekis aprašomas toks: palmatino 30–50 mg/100 g v.d. ir stearino 10–20 mg/100 g v.d. Didžiąją dalį mononesočių riebalų rūgščių vyšniose sudaro oleino rūgštis (C 18:1, n-9), kurios koncentracija kinta nuo 10 iki 80 mg/100 g v.d. Pagrindinės polinesočios riebalų rūgštys yra linolo rūgštis (C 18:2 c9, c12, n-6), kurios koncentracija 25 mg/100 g v.d., ir α -linoleno rūgštis (C18:3 c6, c12, c15, n-3), kurios koncentracija 50 mg/100 g v.d. Augalinių sterolių kiekis apytiksliai siekia 12 mg/100 g v.d. Cholesterolis vyšniose nebuvo aptiktas [5, 20, 21].

1.2.6. Mineralai

Vyšniose yra daug kalio (170–260 mg/100 g v.d.), todėl jos laikomos geru šio junginio šaltiniu [22]. Kitų mineralų vyšniose yra mažiau: fosforo – 15–18, kalcio – 13–20, magnio – 8–13, natrio – 1–8 mg/100 g. Vyšniose taip pat yra mikroelementų – geležies, mangano, vario, cinko, jodo ir seleno, jų kiekis <1 mg/100 g v.d. [20, 21].

1.2.7. Vitaminai

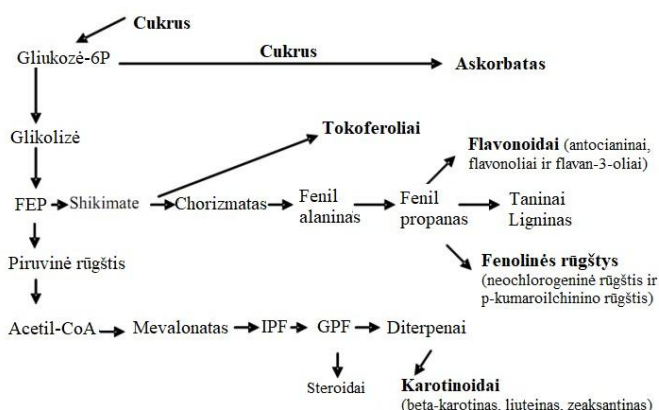
Vyšnios yra geras askorbo rūgštis (vitamino C) šaltinis, kurios koncentracija siekia 6–10 mg/100 g žaliavos [5, 20, 21]. Kitų vandenyje tirpių vitaminų kiekis vyšniose yra kur kas mažesnis. Niacino ir pantoteno rūgštis būna 0,15–0,40 mg/100 g v.d. Tiamino, riboflavino, piridoksino kiekis kinta nuo 0,02 iki 0,05 mg/100 g v.d., o folio rūgštis ir biotinas randami tik mikro koncentracijomis. Vitaminas E yra pagrindinis vyšniose randamas vitaminas tirpus riebaluose, kurio koncentracija

siekia 0,07–0,2 mg tokoferolio ekvivalentų/100 g v.d. Vitamino A koncentracija siekia 64 mg retinolio aktyvumo ekvivalentų/100 g v.d. [5].

1.2.8. Fenoliniai junginiai

Vyšnios yra laikomos puikiu fenolinių ir polifenolinių junginių šaltiniu. Šios medžiagos – tai antriniai metabolitai, kurie sintetinami augalų audiniuose fotosintezės metu. Fenoliniai ir polifenoliniai junginiai turi įtakos augalinių maisto produktų kokybei, kuri siejama su išvaizda, skoniu ir kvapu bei sveikatinimo savybėmis [39]. Vaisiai, turintys daug bioaktyvių ar fitocheminių junginių, gali sumažinti susirgimo riziką įvairiomis degeneracinėmis ligomis, pavyzdžiui, vėžiu, ateroskleroze, širdies ir kraujagyslių ligomis, kurias sukelia oksidacinis stresas [40, 41]. Taip pat mažina artritinį bei uždegiminį skausmą [42, 43] ir apsaugo nuo neurodegeneracinių ligų [44]. Atlikti moksliniai tyrimai parodė, kad fenoliniai junginiai yra biologiškai prieinami ir apsaugo nuo oksidacinio streso bei laisvųjų radikalų neigiamo poveikio [3, 45]. Fitocheminių junginių, prisidedančių prie anksčiau išvardintų ligų prevencijos, sintezė augaluose pavaizduota 3 paveiksle.

Nokimo metu vyšnių žalia spalva kinta į raudoną, o tai vyksta dėl chlorofilo pigmento skilimo ir polifenolių kaupimo [46, 47]. Pagrindinės trys polifenolinių junginių grupės vyšniose: antocianinai, flavan-3-oliai ir hidroksicinamo rūgštys [40]. Antocianinai yra vieni iš pagrindinių pigmentų, kurie atsakingi už ryškiai raudoną, mėlyną ir violetinę vaisių spalvą [48, 49]. Jie yra vandenyje tirpūs junginiai, suteikiantys vyšnioms būdingą (raudoną) odelės spalvą. Atliekant tyrimus buvo pastebėta teigiama koreliacija tarp odelės spalvos pokyčių ir antocianinų kaupimosi bręstant vyšnių vaisiams [50–52]. Antocianinai turi didelę įtaką galutinei vaisių kokybei, nes odelės spalva yra vienas iš svarbiausių vyšnių vaisių kokybės rodiklių [34]. Cianidin-3-gliukozil-rutinozidas yra dominuojantis antocianinas vyšniose, jis yra triglikozidas, kai kitų rūšių vaisiuose antocianinai daugiausiai būna monoglikozidinėse formose. Kiti antocianinai randami vyšniose yra cianidin-3-gliukozidas, cianidin-3-rutinozidas, cianidin-3-soforozidas, peonidin-3-gliukozidas, malvinidin-3-gliukozidas, delfinidin-3-gliukozidas, pelargonidin-3-gliukozidas, cianidin-3-arabinozilo rutinozidas, cianidin-3-gentiobiozidas, peonidin-3-rutinozidas [19, 36, 53–55].



3 pav. Augalų fitocheminių junginių sintezės schema ląstelėje [46]

Vyšnios yra geras proantocianidinų šaltinis. Šie junginiai susideda iš oligomerų arba polimerų flavan-3-olių sudarančių vienetų. Proantocianidinai turi vidutinę keturių monomerų vienetų ilgio grandinę. Proantocianidinai – tai didelį susidomėjimą keliantys junginiai, nes trumpos grandinės proantocianidinai yra susiję su koronarinės širdies ligos prevencija [7]. Labiausiai dominuojantys, tačiau spalvai neturintys įtakos fenoliai yra neochlorogeno rūgštis, chlorogeno rūgštis, kvercetin-3-

gliukozidas, kvercetin-3-rutinozidas, kaempferol-3-rutinozidas, izorhamnetin-3-rutinozidas, hidroksicinamo rūgštys, kvercetas, kaempferolis ir kt. [40, 53–56].

Visi šie junginiai daugiau ar mažiau lemia vyšnių bei trešnių antioksidacinį aktyvumą. Yra atlikta daug įvairių tyrimų kur nustatyta, kad vyšnios yra puikus natūralių antioksidantų šaltinis [22, 40, 57, 58]. Nustatyta, jog bendras antioksidacinis aktyvumas – BAA (angl. *total antioxidant activity*) kaip ir bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) paprastai būna didesnis vyšniose nei trešnėse [59]. Polifenolinių junginių kiekis kaip ir daugelis kitų rodiklių vyšniose bei trešnėse taip pat priklauso ir nuo veislės (žr. 1 lentelė) [44]. Lyginant anatomines dalis pastebima, kad didesnis BFJK yra vyšnių odelėse nei kauliukuose [40].

1 lentelė. Bendras fenolinių junginių (BFJK) ir bendras antocianinų (BAK) kiekis skirtingose vyšnių veislėse [44, 60]

Veislė	BFJK, mg GRE/100 g šviežių vyšnių	BAK, mg CGE/100 g šviežių vyšnių
trešnės Brooks	60,00 ± 13,00	10,00 ± 2,00
trešnės Newstar	75,00 ± 14,00	20,00 ± 5,00
trešnės Black Gold	92,00 ± 12,00	30,00 ± 9,00
trešnės Hedelfingen	96,00 ± 20,00	40,00 ± 7,00
trešnės Regina	104,00 ± 6,00	41,00 ± 2,00
trešnės Hartland	147,00 ± 19,00	76,00 ± 12,00
trešnės Cristalina	155,00 ± 20,00	79,00 ± 5,00
vyšnios Balaton	254,10 ± 6,00	45,00 ± 2,03
vyšnios Danube	162,00 ± 1,00	65,00 ± 3,00
vyšnios Schattenmorelle	295,00 ± 34,00	72,00 ± 6,00
vyšnios Sumadinka	312,00 ± 8,00	109,00 ± 6,00

1.2.9. Lakieji aromato junginiai

Augaluose kaupiami riebalai ir eteriniai aromato aliejai. Riebalai susideda iš glicerolio esterų, riebalų rūgščių (trigliceridų ar triacilglicerolių), tuo tarpu eteriniai aliejai yra mišinys įvairios cheminės prigimties lakiųjų ir organinių junginių: angliavandenilių, alkoholių, ketonų, rūgščių, esterų, eterių bei kitų junginių.

Vyraujantys lakieji aromato junginiai vyšniose ir trešnėse yra heksanalis, (E)-2-heksenalis (vyšniose), (Z)-3-heksenalis (trešnėse), benzaldehidas, (E)-2-heksen-1-olis, 1-butanolis, 2-feniletanolis, etil-2-metilbutanoatas, etil-oktanoatas ir benzilo alkoholis [5, 61]. Benzaldehidas ir 2-heptanonas buvo identifikuoti kaip pagrindiniai vyšnių lakieji junginiai, suteikiantys joms būdingą aromatą [61].

1.3. Vyšnių bioaktyvieji junginiai

Sveikatai naudingi funkciniai junginiai randami ne tik vyšnių valgomojoje dalyje, bet ir jų išspaudose ir kauliukuose, kurie po mechaninio apdorojimo yra laikomi, kaip šalutiniai produktai. Vis dėlto, iki šiol jie nėra pakankamai plačiai panaudojami, nors bioaktyvių junginių kiekis juose aptinkamas gana didelis [18]. Paprastųjų vyšnių išspaudose gausu fenolinių junginių, kai tuo tarpu

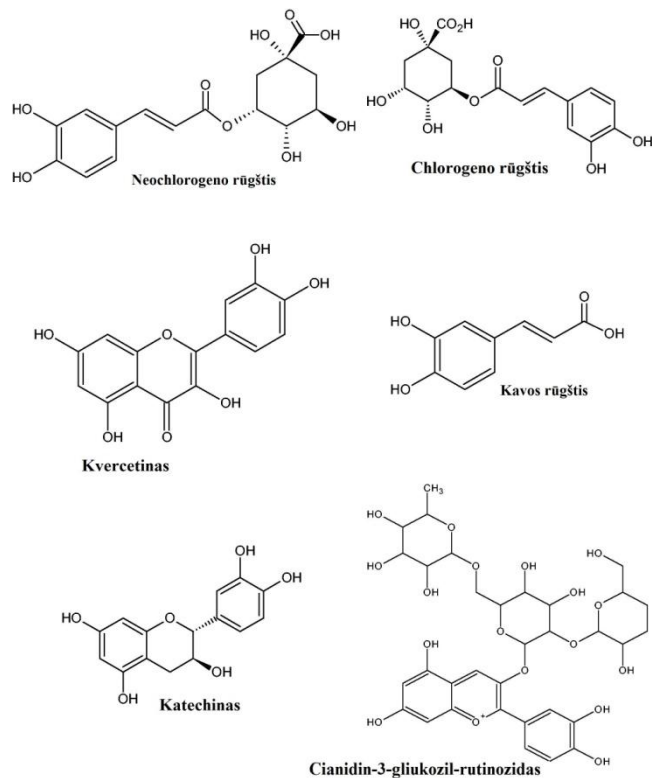
iš kauliukų branduolių išgaunama didelė aliejaus išeiga. Šiuose vyšnių šalutiniuose produktuose esantys komponentai turi teigiamą poveikį žmonių sveikatai dėl jų antioksidacinių ir priešūždegiminių savybių [8].

1.3.1. Bioaktyvieji cheminiai junginiai vyšnių išspaudose – VI

Vyšnių išspaudas (VI) sudaro vyšnių odelė ir minkštoji dalis. Jos laikomos šalutiniu gamybos produktu po sulčių spaudimo, alkoholinių gėrimų gamybos [8]. Dažniausiai VI naudojamos gyvūnų pašarams, degalams, kompostuojamos, rečiau ekstraktų gamybai, kurie toliau panaudojami įvairiose srityse [53].

Vyšnių išspudose gausu bioaktyvių komponentų bei fitocheminių medžiagų [62]. Polifenoliai laikomi, kaip biologiškai aktyvūs junginiai, kurių biologinis efektyvumas yra laikomas didesniu už atskirus komponentus, tai gali būti paaiškinama dėl įvairių sąveikų, kurios daro papildomą poveikį [63]. 4 paveiksle pavaizduoti fenoliniai junginiai, kurie randami vyšnių išspaudose. Nemažai polifenolinių junginių vyšnių išspaudose sudaro antocianinai (cianidin-3-gliukozidas, cianidin-3-soforozidas, cianidin-3-rutinozidas, peonidin-3-rutinozidas, cianidin-3-gliukozilo rutinozidas, cianidin-3-ksilosilo rutinozidas), flavan-3-oliai ((+)-katechinas, (-)-epikatechinas), fenolinės rūgštys (vanilino rūgštis (angl. *vannilic acid*), alyvų rūgštis (angl. *syringic acid*), gentizo rūgštis (angl. *gentisic acid*), chlorogeno rūgštis, neochlorogeno rūgštis, 3-p-kumarilchino rūgštis (angl. *3-p-coumarylquinic acid*), 3,5-dikafeoilchino rūgštis (angl. *3,5-dicaffeoylquinic acid*)), flavonoliai (kvercetin-3-rutinozidas, kvercetin-3-gliukozid-diramnosidas, kvercetin-3-galaktozidas, izoramnetin-3-rutinozid-7-ramnosidas, kaempferolio-3-rutinozidas, izoramnetin-3-rutinozidas) [53, 64–66].

Nustatyta, kad šie junginiai pasižymi antioksidaciniu aktyvumu, BFJK išspaudose gautas 14,23 mg GRE/g, o BAK – 0,41 mg CGE/g. Šie rezultatai rodo, kad apie 1,4 % VI (pagal svorį) sudaro polifenoliniai junginiai, todėl pačios išspaudos ar iš jų pagaminti produktai (pvz. ekstraktai) galėtų būti panaudoti įvairių maisto produktų gamybai [67]. VI gali būti naudojamos užkandžiams, sausiems pusryčiams, gėrimų mišiniams, kepiniams, konditerijos gaminiams, jogurtams, gyvūnų maistui [17, 68, 69]. VI milteliai gali būti naudojami, kaip maistvaisčiai ir dažikliai. Didėjant natūralių antioksidantų paklausai maisto pramonėje, tai padidina vyšnių išspaudų svarbą, kaip vertingą žaliavą antioksidaciniu požiūriu [8].



4 pav. Fenoliniai junginiai randami vyšnių išspaudose [8]

1.3.2. Bioaktyvieji cheminiai junginiai vyšnių kauliukuose – VK

Vyšnių kauliukas susideda iš dviejų dalių: lukšto (75–80 %) ir branduolio (20–25 %) [70, 71]. Vyšnių kauliukas sudaro 7–15 % viso vaisiaus masės (svorio) [40, 70, 72]. Šiuo metu įmonės atsisako VK ir laiko juos atliekomis [8]. Nors kauliukų lukštai dažniausiai yra panaudojami kurui, o iš branduolių išgaunamas aliejus, vis dėlto neretai šie antriniai produktai yra tiesiog išmetami. Technologinio proceso metu aliejus išskiriamas tokiu eiliškumu: lukšto ir branduolio atskyrimas, kaitinimas ir galiausiai atliekama ekstrakcija. Branduoliuose vidutiniškai sukaupiama 17–36 % aliejaus, todėl jie gali tapti aliejaus gavybos šaltiniu [8]. VK galėtų būti panaudojami, kaip baltymų, maistinių skaidulų, lipidų ar polifenolinių junginių šaltinis. Jau yra ištirta keletas VK panaudojimo sričių, kurios labiausiai orientuojasi į aliejaus išgavimą ekstrakcijos būdu, užpildą cemento gamyboje, kurą šildymui, trąšas, terapinius produktus ar tradicinį tam tikrų ligų gydymą [71, 73].

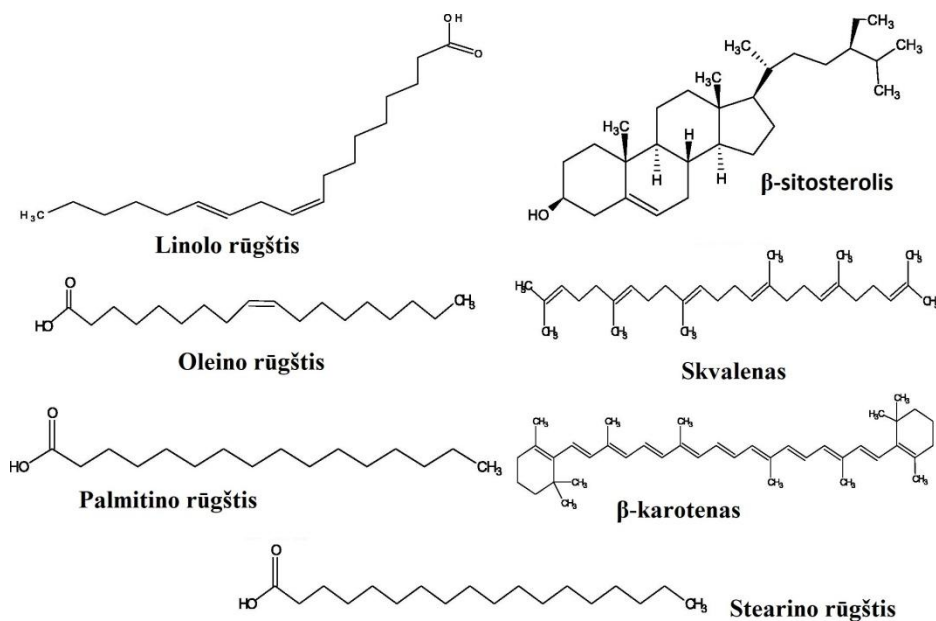
Nustatytas antioksidacinis aktyvumas vyšnių kauliukuose įvairiais metodais (BFJK – 157 mg GRE/100 g, ORAC – 978 μ mol TE/100 g) parodė, kad jie yra pakankamai aktyvūs, taip pat įvertintas ir BAK kiekis (0,8 mg CGE/100 g) [40]. Vyšnių kauliukų fenolinių junginių sudėtis literatūroje pateikiama tokia: bendras katechino kiekis – 3,3 mg/100 g SM, bendras epikatechino kiekis – 49,5 mg/100 g SM, bendras procianidinų kiekis – 22,5 mg/100 g, hidroksicinamo rūgščių (angl. *hydroxycinnamates*) kiekis – 12,7 mg/100 g. Pagrindinės hidroksicinamo rūgštys VK yra 3'-p-kumarilchino rūgštis (angl. *coumaroylquinic acid* – 18,5 %), chlorogeno rūgštis (4,72 %), neochlorogeno rūgštis (3,49 %). Antocianinų grupės junginiai VK yra cianidin-3-soforozidas, cianidin-3-rutinozidas ir pelargonidin-3-gliukozidas [19, 40].

Vyšnių kauliukų branduolyje randama 7,2 % drėgmės, 4,4 % pelenų, 46,6 % angliavandenių (iš kurių 30,25 % maistinių skaidulų ir 2,91 % cukrų) ir 29,3 % baltymų.

Dėl didelio maistinių skaidulų kiekio vyšnių branduoliai galėtų būti panaudojami virškinamojo trakto tyrimams, siekiant pagerinti patį virškinimo procesą. Dominuojanti amino rūgštis – glutamo rūgštis (27,96 % bendro baltymų kiekio). Pagrindiniai mineralai įeinantys į branduolių sudėtį yra kalis ir kalcis. Taip pat jų sudėtyje yra vitaminų B₁, B₃, B₅, B₆, tačiau nerasta vitamino B₁₂ ir askorbo rūgšties (vitamino C). Branduolių sudėtyje yra įvairių fenolinių grupių: flavonoidų, antocianinų, stilbenų, katechinų, flavonų, procianidinų tokių kaip, resveratrolis, ramnetinas, malvidinas, delfinidinas, pinokembrinas, naringeninas, kvercetas, dihidrokvercetas, peonidinas, apigeninas, galo rūgštis ir kt. BFJK branduolyje siekė 53,87 mg GRE/100 g [70, 72, 74, 75].

Aliejus, gaunamas iš vyšnių kauliukų branduolių, yra praturtintas lipofiliniais bioaktyviais junginiais, tokiais, kaip nepakeičiamos riebalų rūgštys, tokoferoliai, karotenoidai, steroliai, tokochromanoliai (angl. *tocochromanols*) ir skvalenai. Skirtingos vyšnių veislės gali turėti įtakos šių bioaktyvių junginių kiekiui [76]. Branduolių aliejų pagrindė sudaro nesočios riebalų rūgštys (NRR), sočios riebalų rūgštys sudaro mažiau nei 10 % bendro riebalų rūgščių kiekio. Labiausiai dominuojančios nesočios riebalų rūgštys yra oleino ir linolo, o sočios – palmitino ir stearino. Junginių cheminės struktūros, kurios yra randamos VK, pateikiamos 5 paveiksle. Kiti iš branduolių aliejaus gauti analizės tyrimai pateikia tokius rezultatus: rūgštinė vertė – 1,45 mg kalio hidroksido (KOH)/g aliejaus, peroksidų kiekis – 1,6 miliekv. deguonies/kg aliejaus, jodo kiekis – 122,5 g jodo/100 g aliejaus, apmuilinimo vertė – 193 mg KOH/g aliejaus [70–72, 76].

Dėl savo unikalios sudėties vyšnių branduolių aliejus turi didelę paklausą, nors dažniausiai naudojamas muilo gamyboje [10]. Šis aliejus plačiai galėtų būti pritaikomas kosmetikos ir farmacijos pramonės šakose [8].



5 pav. Bioaktyvieji junginiai randami vyšnių kauliukų aliejuje [8]

1.4. Vyšnių šalutinių produktų funkcinės savybės ir nauda sveikatai

Vyšnių antriniai produktai gali būti panaudojami kaip antioksidantų, antimikrobinių medžiagų, maistinių skaidulų šaltinis, dažikliai, tirštikliai ar kaip maistvaisčiai. Vyšnių sudėtyje yra gausu fenolinių junginių, kuriems būdingas biologinis aktyvumas. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad

vyšnios pasižymi antioksidacinėmis, priešuždegiminėmis ir priešvėžinėmis savybėmis, o jų veikimo mechanizmas yra apibendrintas 6 paveiksle [46].

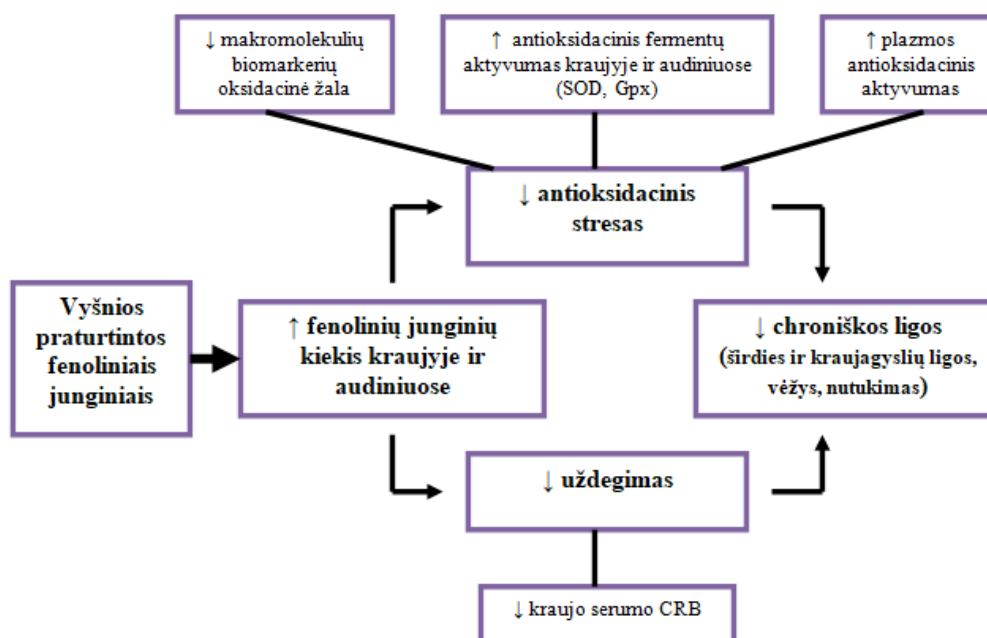
1.4.1. Antioksidacinės savybės

Oksidacinė žala (oksidacinis stresas) dėl laisvųjų radikalų veiklos sukelia struktūrinius ir funkcinius ląstelių makromolekulių pokyčius ir yra susijusi su lėtinių ligų molekuliniais mechanizmais. Remiantis atliktais moksliniais tyrimais, vyšniose randamos bioaktyvios medžiagos (sudarytos iš fitocheminių junginių) ir antioksidantai [46]. Pastarieji gali suardyti arba neutralizuoti laisvuosius radikalus.

Vyšnių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo geba buvo analizuojama įvairiomis metodologijomis. Naudojant ORAC *in vitro* tyrimą buvo nustatyta, kad antioksidacinis aktyvumas kinta nuo 1,145 iki 1,916 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ vyšnių [77]. Būtina paminėti, kad didesnės antioksidacinės gebos vertės randamos vyšniose lyginant su kitais vaisiais, tokiais kaip obuoliai ar kiviai.

Vyšnių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo tyrinėjamas ir skirtingose biologinėse sistemose. Tarp tirtų antocianinų, cianidin-3-gliukozidas parodė stipresnį antioksidacinį aktyvumą nei kiti. Naudojant liposomas, kaip membranos modelį, antocianinai, cianidiniai ir hidrokscinamo rūgštys, išgauti iš vyšnių ar trešnių, buvo daug aktyvesni lyginant su kitomis uogomis (gervuogėmis, raudonosiomis avietėmis, mėlynėmis ir braškėmis) [78–80].

Vyšnios taip pat parodė antioksidacinį poveikį ir *in vivo* sistemose. Atlikti moksliniai tyrimai su gyvūnais, kurie buvo šeriami (girdomi) vyšnių sultimis, parodė antioksidacinių fermentų SOD (kepenyse, kraujyje) ir Gpx (kepenyse) aktyvumo padidėjimą, o lipidų peroksidacijos fermentų – sumažėjimą [81].



6 pav. Apsauginiai efektai, kuriuos sukelia fenoliniai junginiai, ir jų poveikis chroniškomis ligoms [46]
(↑ – padidėjimas, ↓ – sumažėjimas)

1.4.2. Priešuždegiminės savybės

Vyšnios pasižymi priešuždegiminėmis savybėmis. Yra atlikta nemažai tyrimų, kuriuose vyšnių vartojimas slopino priešuždegiminį poveikį. Kraujo serumo C reaktyvusis baltymas (CRB) – tai vienas iš svarbiausių rodiklių, kuris parodo uždegimo atsiradimą. CRB taip pat yra svarbus širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksnys. Plazmoje CRB sumažėjimas po vyšnių vartojimo rodo, kad uždegimas mažėja, tai gali taip pat turėti įtakos mažinant širdies ir kraujagyslių ligų riziką [82, 83].

Nutukimas yra susijęs su uždegimo daromu poveikiu. Atliekant mokslinius tyrimus su gyvūnais įrodyta, kad praturtinant dietą vyšniomis, sumažėjo plazmos ir audinių uždegimas. Tokios dietos laikymasis 90 dienų žymiai sumažino uždegiminių procesų lygį plazmoje ir branduolio kapa aktyvumą. Vartojant vyšnias padaugėja peroksisomų proliferatorių suaktyvintų receptorių – PPAR (angl. *peroxisome proliferator-activated receptors*) pilvo riebaluose ir kepenų audiniuose [84, 85].

1.4.3. Priešvėžinės savybės

Vyšnios taip pat pasižymi priešvėžinėmis savybėmis. Tyrimai *in vitro* su antocianiniais, išskirtais iš šių vaisių, parodė, kad jie gali sumažinti žmogaus gaubtinės žarnos vėžinių ląstelių proliferaciją. Vyšnių ekstrakto vartojimas (375–3000 mg/kg dietoje) sumažino auglių vystymąsi, atliekant eksperimentą su pelėmis, sergančiomis APC(Min) gaubtinės žarnos vėžiu [41, 86].

Prevencija prieš vėžį, širdies ir kraujagyslių ligas bei nutukimą yra labai naudinga žmogaus organizmui. Ji yra susijusi su bioaktyviais junginiais, esančiais vaisiuose. Reikšmingas biomarkerių (uždegimo ir/ar oksidacinio streso) sumažėjimas, kurį lemia vyšnių ir jų produktų vartojimas, gali prisidėti valdant įvairius sveikatos sutrikimus bei sumažinti riziką susirgti širdies ir kraujagyslių bei lėtinėmis ligomis. Vyšniose randamas didelis kiekis fitocheminių junginių, kurie priklauso ne tik nuo genetinių faktorių, aplinkos veiksnių, bet ir nuo technologinio proceso naudojamo joms apdoroti. Pritaikius įvairias auginimo technologijas, kurios leidžia padidinti vaisių maistinę vertę, apsaugoti nuo defektų (įplyšimų bei įtrūkimų), atidėti minkštėjimo procesą, tokiais atvejais derlių būtų galima nuimti jam pilnai subrendus, kuomet yra sukaupiamas didžiausias fitocheminių junginių kiekis [46].

1.5. Veikliųjų junginių išskyrimo metodai

Pastaraisiais dešimtmečiais buvo sukurta daug naujų metodų bioaktyviųjų junginių analizei atlikti. Tačiau prieš bet kokią kokybinę ar kiekybinę žaliavos įvertinimą būtina išgryninti – išekstrahuoti skirtingus veikliuosius junginius iš medžiagos kietosios matricos [87]. Ekstrakcija yra labai svarbus procesas, po kurio gauti koncentruoti ekstraktai yra panaudojami tolimesniuose tyrimų etapuose [88]. Išskiriama labai daug ekstrakcijos metodų, tačiau vieno standarto nėra. Dėl šios priežasties, būtina gerai žinoti žaliavos charakteristikas ir pasirinkti palankiausią ekstrakcijos būdą, tam, kad būtų gauta kuo didesnė išeiga ir pasiektas didžiausias proceso efektyvumas [89].

Tradiciniu ekstrakcijos metodu laikoma Soksleto ekstrakcija. Šio metodo esmė – panaudojant šilumą išekstrahuoti junginius skirtingais tirpikliais. Soksleto ekstrakcija yra naudojama daugelį metų, tačiau šis būdas reikalauja daug laiko ir pakankamai didelio tirpiklio kiekio.

Bioaktyvios medžiagos iš augalinės žaliavos yra ekstrahuojamos pritaikant inovatyvius (modernius) ekstrakcijos metodus, tokius kaip superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO₂) bei ekstrakcija suspaustais skysčiais (ESS, angl. *pressurized liquid extraction*). Naudojant šiuos

metodus yra sutrumpinamas ekstrakcijos laikas, sumažinamos tirpiklio sąnaudos, padidinama išeiga bei pagerinama ekstrakto kokybė [88].

1.5.1. Soksleto ekstrakcija

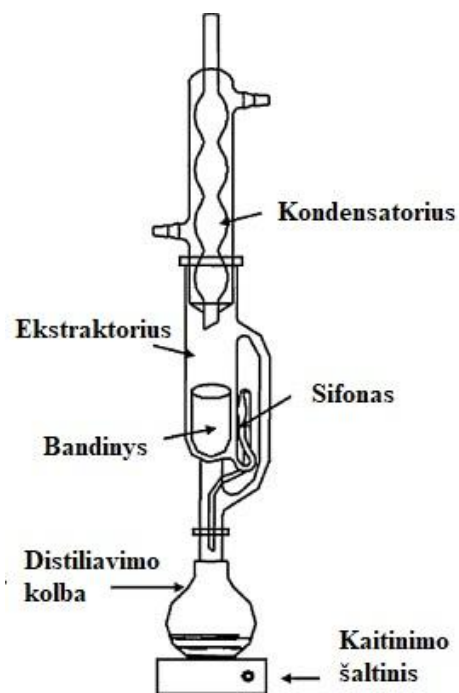
1879 m. mokslininkas *Soksletas* sukūrė naują ekstrakcijos sistemą, kuri pirmiausiai buvo naudojama lipidų frakcijos išskyrimui, tačiau šiais laikais šis metodas yra naudojamas įvairių junginių išgavimui [90].

Naudojant Soksleto ekstrakciją veikliųjų junginių išgavimas priklauso nuo tirpiklio pasirinkimo, kuris lemia ekstrakto išeigą bei veikliųjų medžiagų sudėtį [91]. Plačiausiai naudojamas tirpiklis yra heksanas. Heksanas yra nepolinis tirpiklis, kurio virimo temperatūra 68–72 °C. Šis tirpiklis pasižymi geromis aliejaus išgavimo savybėmis iš augalinės žaliavos. Tačiau heksanas, kuris naudojamas ekstrakcijose, yra priskiriamas prie aplinkos užterštumą didinančių medžiagų. Alternatyvūs tirpikliai, kurie būtų netoksiški, pigūs, lengvai utilizuojami, saugūs aplinkai ir sveikatai yra izopropanolis, etanolis, vanduo [92]. Vis dėlto naudojant alternatyvius tirpiklius gali būti pastebėtas ekstraktų išeigos sumažėjimas, nes sumažėja molekulinis giminingumas tarp tirpiklio ir ekstrahuojamo objekto. Taip pat šie ekstrahentai (tirpikliai) gali būti brangesni komercinėje rinkoje. Siekiant padidinti ekstrakto išeigą yra naudojami tirpiklių mišiniai, tokiu būdu padidinamas skystos fazės poliariškumas [93]. Soksleto ekstrakcijos efektyvumas priklauso nuo žaliavinės matricos ir dalelių dydžio. Esant smulkioms dalelėms didėja ekstrahuojamos žaliavos paviršiaus plotas ir taip pasiekama didesnė išeiga [94].

Soksleto ekstrakcijos veikimo principas: ekstrahuojama medžiaga dedama į ekstraktorių ir palaipsniui užpildoma tirpikliu. Kai tirpiklis pasiekia perpildymo lygį, tirpiklis per sifoną patenka atgal į distiliavimo kolbą kartu su išekstrahuotais junginiais. Išgryninti junginiai nuo tirpiklio yra atskiriami distiliavimo būdu ir ekstrakcijos tirpiklis vėl yra kaupiamas ekstraktoriuje, ši operacija kartojama tol, kol pasibaigia ekstrakcijos procesas [90]. Soksleto aparatas pateikiamas 7 paveiksle.

Soksleto ekstrakcijos privalumai: 1) pigus metodas, 2) galima atlikti su paprasta įranga ir yra lengvai automatizuojamas, 3) tirpiklis gali būti pakartotinai panaudojamas.

Soksleto ekstrakcijos trūkumai: 1) mažas selektyvumas, 2) mažas ekstrahavimo efektyvumas, 3) lieka didelis tirpiklio kiekis, kurį reikia nugarinti, 4) ilga ekstrakcijos trukmė, 5) didžiąją laiko dalį, ekstrakcija vyksta tirpiklio virimo taške, tai lemia šiluminės skilimo reakcijas, 6) naudojami tirpikliai gali prisidėti prie aplinkos taršos [87].



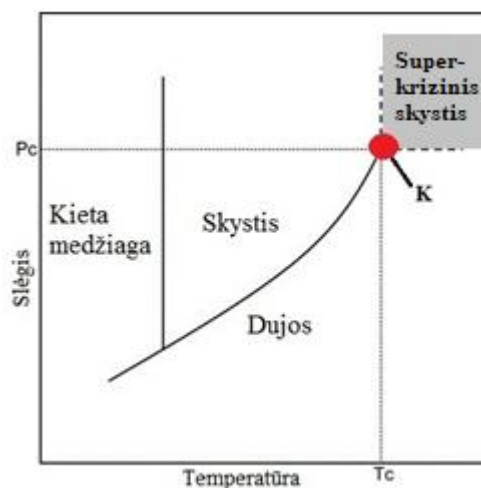
7 pav. Soksleto aparatūra [90]

1.5.2. Superkryzinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO₂)

Superkryzinė ekstrakcija (virškryzinė) – tai atskyrimo procesas, kurio metu veikliosios medžiagos yra ištirpinamos skystyje, kuris gali keisti savo tirpinimo galią pagal specialias sąlygas viršijančias jo krytinę temperatūrą ir slėgį [95].

Superkryzinės ekstrakcijos (SKE) metodu yra išgaunamos bioaktyvios medžiagos iš kietos matricos. SKE naudoja unikalias superkryzinių skysčių savybes siekiant palengvinti veikliųjų medžiagų išekstrahavimą iš kietos matricos. Superkryzinis skystis yra medžiaga, kuri viršija krytinę temperatūrą ir slėgį. Tokiu būdu superkryzinis skystis (ekstrahentas) pasižymi geromis tirpinimo savybėmis [88]. Krytinė temperatūra – tai aukščiausia temperatūros vertė, kuriai esant dujos gali pereiti į skysčių fazę, kai padidinamas slėgis. Krytinis slėgis – tai didžiausia slėgio vertė, kuriai esant skystis gali pereiti į dujinę fazę, kai pakeliama temperatūra. Esant tokioms sąlygoms superkryziniai skysčiai yra tarp dujų ir skysčių būsenų. Tai yra dėl to, kad superkryzinio skysčio tankis yra panašus į skysčių, o klampumas į dujų, tad superkryzinio skysčio difuzija yra tarpinėje būsenoje. Skysčio superkryzinė charakteristika apibrėžiama kaip būseną, kurioje skystis ir dujos yra neatskirti vienas nuo kito arba kaip būseną, kurioje skystis yra suspaudžiamas [96].

Medžiagos fazių diagrama pavaizduota 8 paveiksle, kurioje taškas K – krytinis taškas. Kai temperatūra yra aukštesnė už krytinę temperatūrą, tuomet didinant slėgio vertę dujos nebeskystėja, bet yra suspaudžiamos į superkryzinį skystį. Krytinis taškas (K) yra specifinis parametras kiekvienai konkrečiai tirpiklio medžiagai. Tirpiklių krytinės savybės pateikiamos 2 lentelėje.



8 pav. Medžiagos fazių diagrama, nurodanti kritinį tašką [96]

2 lentelė. Tirpiklių, kurie naudojami SKE, kritinių parametrų charakteristikos [97]

Tirpiklis	Kritinė temperatūra, °C	Kritinis slėgis, MPa	Kritinis molinis tūris, cm ³ /mol
Amoniakas	133,25	11,35	72,50
Anglies dioksidas	31,95	7,37	94,10
Dimetil eteris	127,95	5,27	171,00
Etanas	33,15	4,87	145,50
Etilenas	10,15	5,04	131,00
Metanolis	240,45	8,09	118,00
n-heksanas	235,35	3,02	368,00
Propanas	97,65	4,25	200,00
Vanduo	374,95	22,06	55,90
Ksenonas	17,95	5,80	118,00

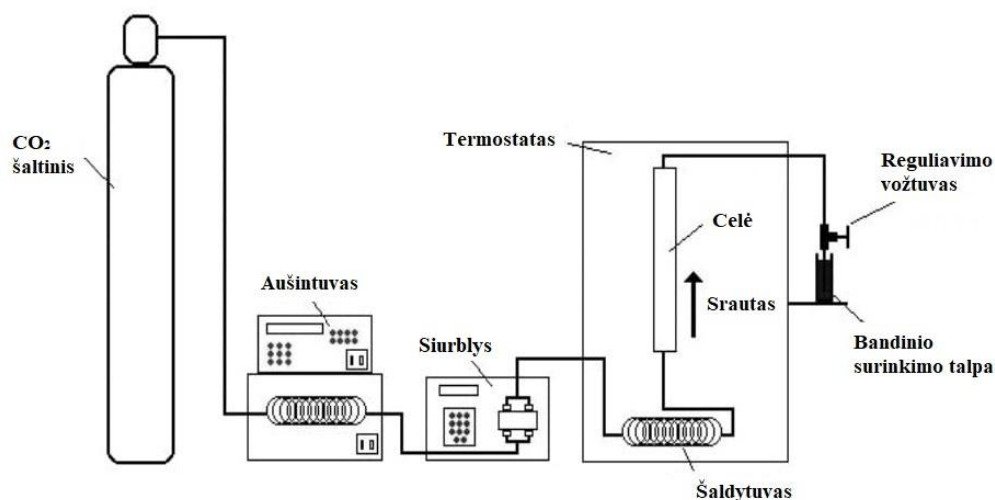
Nors kritinėse sąlygose gali būti naudojami įvairūs tirpikliai, anglies dioksidas yra vienas iš dažniausiai naudojamų [98]. Šios dujos superkrizinėje būsenoje pasižymi žema kritine temperatūra ir slėgiu (temperatūra – 31,95 °C, slėgis – 7,37 MPa) [97]. Anglies dioksidas kambario temperatūroje yra dujų fazėje, todėl pasibaigus ekstrakcijos procesui ir sistemoje sumažėjus slėgiui, dujos pašalinamos iš sistemos, o gautas ekstraktas neturi tirpiklio liekanų [96]. Anglies dvideginis yra netoksiškas, nedegus ir vykdant SKE–CO₂ reikalauja minimalaus kiekio. Pats ekstrakcijos procesas greitas, selektyvus, nereikalauja papildomo valymo ir gali būti vykdomas su nedideliu bandinio kiekiu. SKE–CO₂ tinka lakių, šilumai labilių ir lipofilinių junginių ekstrakcijai [87]. Vis dėlto superkrizinis CO₂ pasižymi mažu poliškumu, tai reiškia, yra mažiau veiksmingas išekstrahuoti didesnio poliškumo junginius iš natūralių šaltinių [96]. Superkrizinis anglies dioksidas yra linkęs selektyviai ekstrahuoti mažesnio poliškumo junginių grupes, tokias kaip lipidai, cholesterolis, aldehydai, eteriai, esteriai ir ketonai. Polinės junginių grupės yra palyginti netirpios superkriziniame CO₂, pavyzdžiui hidroksilas, karboksilas, cukrai, polisacharidai, amino rūgštys, baltymai, fosfatidai, glikozidai, neorganinės druskos [95].

Norint padidinti CO₂ poliškumą, dažniausiai yra naudojami modifikatoriai. Modifikatoriai – tai didelio poliškumo tirpikliai, kurie gali sukelti esminius superkrizinio skysčio pokyčius. Įvedant į

sistemą nedidelį modifikatoriaus kiekį (1–10 %) padidinamas anglies dioksido poliškumas [96]. Cheminiais modifikatoriais gali būti metanolis, etanolis, acetonitrilas, acetonas, vanduo, etilo eteris ir dichlormetanas. Dažniausiai naudojamas modifikatorius – metanolis, nes jis efektyviausiai padidina anglies dioksido poliškumą. Metanolis su anglies dvideginiu maišomas iki 20 %. Vis dėlto, naudojant metanolį kaip cheminį modifikatorių, privaloma padidinti ekstrakcijos proceso temperatūrą, kad būtų pasiekta superkriazinė būsena, o tai gali turėti įtakos termolabiliems junginiams. Dėl metanolio daromo neigiamo poveikio, vis dažniau pasirenkamas etanolis, kuris yra saugesnis, dėl mažesnio toksiškumo [91].

Ekstrakcijos procesą lemia daugelis veiksnių, tai ne tik prieš tai aptarti: superkriziniai tirpikliai, cheminiai modifikatoriai, temperatūra bei slėgis, bet ir kiti rodikliai, tokie kaip bandinio savybės ir ekstrakcijos parametrai. Pradinis augalinės žaliavos paruošimas (vandens kiekis bandinyje, dalelių dydis ir kt.) taip pat labai svarbus veiksnys ekstrakcijos efektyvumui užtikrinti. Pavyzdžiui, kuo smulkiau sumaltas bandinys, tuo didesnės ekstrakcijos išėigos galima tikėtis. Taip pat didelę įtaką ekstrakcijos procesui turi SKE–CO₂ srautas bei pats ekstrakcijos laikas [98].

Superkriazinės ekstrakcijos sistemą sudaro: 1) siurblys, skirtas suspaustų CO₂ dujų padavimui į sistemą, 2) celė, kurioje patalpinama augalinė žaliava (bandinys), 3) slėgį ir temperatūrą palaikančios sistemos dalys bei 4) ekstrakto surinkimo indai. Ekstrakcijos tirpiklis (CO₂) yra paduodamas į šildymo zoną, kurioje dujos pasiekia superkriazines sąlygas (tampa superkrizinis skysčiu), tuomet skystis pereina į ekstrahavimo indą – celę. Celėje superkrizinis tirpiklis pasiskirsto kietojoje matricoje ir ištirpina žaliavoje esančias bioaktyvias medžiagas. Iš celės ištirpę junginiai su tirpikliu patenka į separatorių, kur yra atskiriami. Ekstraktas yra surenkamas į specialius surinkimo indus, o CO₂ dujos gali būti ataušinamos, suspaudžiamos ir panaudojamos perdirbimui, arba išleidžiamos į aplinką (atmosferą) [99]. SKE–CO₂ veikimo schema pateikiama 9 paveiksle.



9 pav. SKE–CO₂ ekstraktoriaus schema [99]

Pagrindiniai SKE privalumai: 1) aplinkai palanki ekstrakcija, nes tirpikliai naudojami labai mažais kiekiais, 2) superkrizinių skysčių selektyvumas yra didesnis nei įprastų tirpiklių ir jo charakteristikas galima kontroliuoti reguliuojant slėgį ir/arba temperatūrą, 3) ekstrakcijos laikas trumpas palyginus su tradiciniais metodais, 4) superkrizinių skysčių difuzija vyksta daug greičiau, todėl ekstrakcija yra efektyvesnė, 5) superkrizinių tirpiklių paviršiaus įtempimas ir klampumas yra mažesnis nei įprastų skysčių, todėl tirpiklis gali prasiskverbti į mažas kietosios matricos poras,

kurių įprasti skysčiai nepasiektų. Superkritiniai skysčiai yra 6) pigūs, 7) inertiški ir 8) netoksiški. Pagrindiniai trūkumai, jog dauguma superkritinių skysčių yra nepoliniai tirpikliai, o įrangos eksploatacija brangi [99].

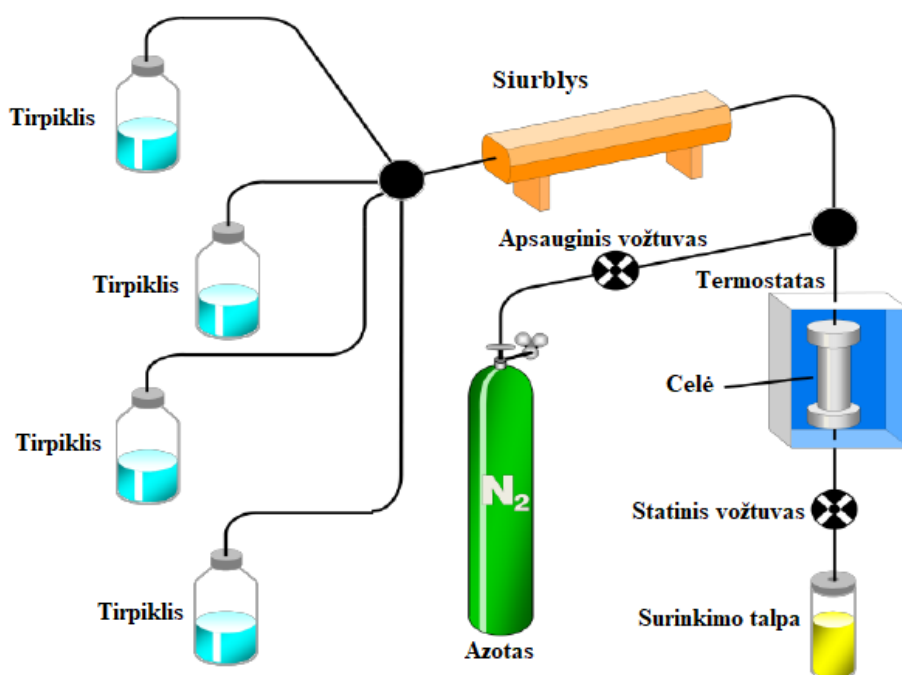
1.5.3. Ekstrakcija suspaustais skysčiais (ESS)

Ekstrakcija suspaustais skysčiais (didelio slėgio tirpikliais) atliekama ekstrahuojant kietą matricą su įvairiais tirpikliais, aukštesnėje temperatūroje (50–200 °C) ir didesniame slėgyje (10–15 MPa) [91]. Ekstrakcijos suspaustais skysčiais (ESS) veikimo schema pavaizduota 10 paveiksle.

Ekstrakcijos suspaustais skysčiais metu slėgis palaikomas tam, kad tirpiklis išlaikytų savo skystą būseną esant aukštai temperatūrai. Tačiau tirpiklio temperatūra ekstrakcijos metu nepasiekia kritinės vertės. Padidėjusi temperatūra padidina difuzijos procesą, dėl tos priežasties pagreitėja ekstrakcijos kinetika [91]. Dėl aukšto slėgio tirpikliai yra išlaikomi skystoje būsenoje, tokiu būdu užtikrinant saugią ir greitą ekstrakciją. Padidintas slėgis taip pat leidžia greičiau užpildyti ekstrakcijos celę tirpikliu ir lengviau prasiskverbti į kietosios matricos poras [91]. ESS metodas reikalauja mažo tirpiklių kiekio dėl aukšto slėgio ir temperatūros derinimo tarpusavyje, kas lemia greitesnę ekstrahavimą. Aukštesnė ekstrakcijos temperatūra gali paskatinti didesnę veikliųjų junginių tirpumą ir masės perdavimo greitį, taip pat sumažinti tirpiklio klampumą ir paviršiaus įtempimą. Šios charakteristikos taip pat pagreitina ESS procesą [100].

ESS tinka polinių junginių išgryninimui, taip pat galima ekstrahuoti termostabilius organinius teršalus iš įvairių matricų [91].

Ekstrakcijos suspaustais skysčiais privalumai: 1) ESS laikoma kaip papildomas metodas po superkritinės ekstrakcijos su CO₂, norint išekstrahuoti likusius polinius junginius. 2) Lyginant ESS su tradiciniu Soksleto metodu, pastebimos sumažėjusios tirpiklio sąnaudos bei ekstrakcijos trukmė [91].



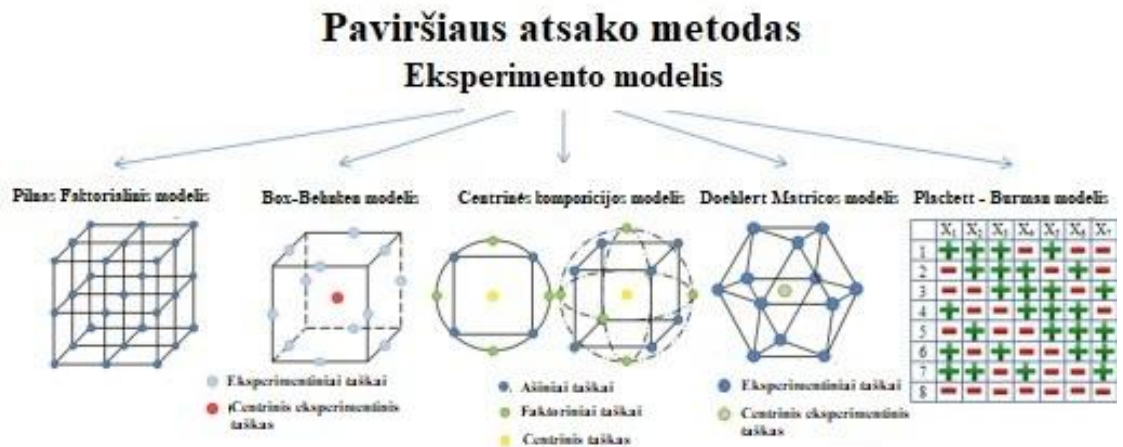
10 pav. ESS veikimo schema [101]

1.6. Procesų optimizavimas

Box ir *Wilson* (1951) pirmieji pasiūlė paviršiaus atsako metodą eksperimentų optimizavimui. Paviršiaus atsako metodas susideda iš skirtingų technikų – matematinės ir statistinės. Šis metodas apibūdina ryšį tarp kelių nepriklausomų kintamųjų ir vieno ar daugiau atsako veiksnių. Paviršiaus atsako metodas grindžiamas matematinio modelio pritaikymu eksperimentiniams duomenims, kuris yra gautas atlikus eksperimentinį projektavimą. Eksperimentinis projektavimas naudojamas siekiant pagerinti procesų efektyvumą. Kitaip sakant, procesų optimizavimas atliekamas tam, kad būtų gaunama maksimali atsako vertė (pvz. išeiga). Pagrindinė eksperimento projektavimo užduotis yra tuo pačiu metu diversifikuoti visus reikšmingus parametrus per nustatytus eksperimentus ir tuomet apjungti rezultatus kartu su matematinio modeliu. Šis matematinis modelis gali būti panaudojamas optimizavimui, prognozėms ar interpretavimui. Procesų optimizavimas pagerina proceso efektyvumą, sumažina kintamųjų skaičių jame bei yra atsižvelgiama tik į svarbiausius veiksnius. Optimizavimas taip pat sumažina eksploatacijos išlaidas ir eksperimentinį laiką [102].

Procesų optimizavimui naudojant paviršiaus atsako metodą yra išskiriami šeši etapai: 1) nepriklausomų kintamųjų parinkimas ir galimi atsako veiksniai, 2) eksperimentinio modelio (strategijos) parinkimas, 3) eksperimentų atlikimas ir rezultatų gavimas, 4) modelio lygties pritaikymas eksperimentiniams duomenims, 5) atsako grafinis pateikimas ir modelio (ANOVA) tikrinimas, 6) optimalių sąlygų nustatymas [102, 103].

Eksperimentinis modelis pasirenkamas pagal eksperimento taškus, kuriuose atsakas turėtų būti įvertintas. Populiariausi skirtingi projektavimo modeliai pagal paviršiaus atsako metodą pavaizduoti 11 paveiksle [102].



11 pav. Pagrindiniai eksperimentų planavimo modeliai naudojant paviršiaus atsako metodą [102]

Paprasčiausias paviršiaus atsako metodo modelis gali būti apibūdinamas linijine priklausomybe ir yra išreiškiamas pagal lygtį (1):

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (1)$$

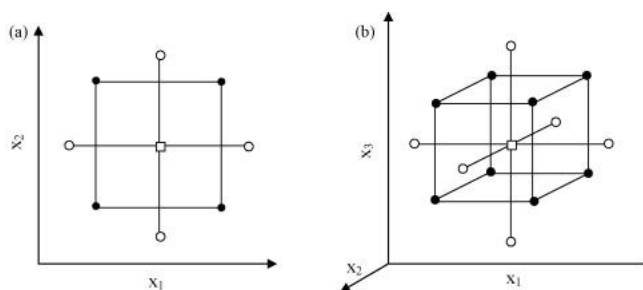
Čia: k – kintamųjų skaičius, β_0 – pastovi konstanta (narys); β_i – linijiniai parametro koeficientai (regresijos koeficientai); x_i – nepriklausomi kintamieji; ε – eksperimentinės klaidos narys.

Siekiant nustatyti kritinį eksperimento tašką yra naudojama antrojo laipsnio polinominė lygtis (2) [104]:

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

Čia: β_{ij} – kvadratiniai parametro koeficientai (regresijos koeficientai); x_{ij} – nepriklausomi kintamieji; k – kintamųjų skaičius.

Centriškai kompozicinis eksperimentų planavimas yra dažnai naudojamas paviršiaus atsako metodo būdas. Ši optimizavimo forma plačiai naudojama įvairiuose moksliniuose tyrimuose, nes suteikia daug informacijos apie kintamųjų įtaką optimizuojamam procesui. Centriškai kompozicinį planavimo modelį sudaro šios dalys: 1) pilnas faktorinis arba dalinis faktorinis dizainas (strategija/modelis), 2) papildomas modelis, kuriame eksperimentiniai taškai yra atstumu a nuo centro, ir 3) centrinis taškas [103]. Centriškai kompozicinis modelis skirtas dviejų (a) ir trijų (b) kintamųjų optimizavimui pateikiamas 12 paveiksle.



12 pav. Centriškai kompozicinis modelis

(•) faktinio projektavimo taškai, (◦) ašiniai taškai, (◻) centrinis taškas [103]

Centriškai kompozicinis eksperimentų modelis suteikia daug informacijos bei reikalauja mažesnio eksperimentų skaičiaus, jis taip pat užtikrina aukštos kokybės procesų prognozes. Šis metodas apima visą faktorinį arba dalinį faktorinį projektavimą dviem lygiais, centriniai taškai, atitinka vidutinį faktorių lygį ir ašiniai taškai, kurie priklauso nuo konkrečių norimo dizaino ir susijusių parametru skaičiaus savybių. Priklausomai nuo to, kur yra ašiniai taškai, centriškai kompozicinis planas gali būti suskirstytas į tris tipus: 1) apribotas, 2) apibrėžtas ir 3) centriškai orientuotas [102].

Centriškai kompozicinis modelis pasižymi tokiomis savybėmis [103]:

1. Eksperimento numeris apskaičiuojamas pagal lygtį (3):

$$N = k^2 + 2k + c_p \quad (3)$$

Čia: k – faktoriaus skaičius; c_p – centrinio taško kartotinis skaičius.

2. Specifinis papildomų eksperimentinių taškų atstumas (a) priklauso nuo kintamųjų skaičiaus ir yra apskaičiuojamas pagal lygtį (4):

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

Čia: dviem kintamiesiems $a = 1.41$; trimis kintamiesiems $a = 1.68$; keturiems kintamiesiems $a = 2.00$.

3. Visi kintamieji užkoduojami penkiais lygiais ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$).

Centriškai kompozicinis modelis taikomas daugelyje mokslinės analizės atliekamose procesuose, nes tai yra patikimas atrankos ir optimizavimo būdas. Šis modelis padeda optimizuoti biologiškai aktyvių junginių ekstrakciją, kad būtų pasiektos didesnės išeigos arba optimalios vertės skirtingo poveikio aktyvavime (pvz. priešvėžinis, antimikrobinis, antibakterinis, priešuždegiminis).







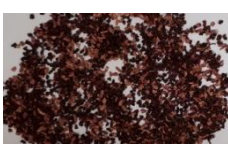




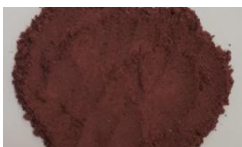
Dispersinė analizė (ANOVA) atliekama siekiant nustatyti individualų linijinį, kvadratinį ir sąveikos regresijos koeficientą, naudojant Design Expert programą. Pagal regresijos koeficientą (R^2) nustatomas polinominės lygties tinkamumas. Paviršiaus atsako grafikai generuojami naudojant programinę įrangą [104].

2. Tyrimo objektas ir metodai

2.1. Vyšnių išspaudos

Tyrimams buvo pasirinktos vyšnių (*Prunus cerasus*) išspaudos gautos iš AB „Anykščių vynos“. Naudota žaliava buvo sudaryta iš vyšnių vaisių odelių, minkštosios dalies, kauliukų, jų branduolių bei šakelių (stiebų) ir iki tyrimų pradžios laikyta -18 °C temperatūroje. Šaldytos vyšnių išspaudos buvo atšildytos kambario temperatūroje (20 °C) ir džiovinamos Standart Dehydrator džiovykloje (Standart Dehydrator Food and Ferky, Kinija) 35 °C temperatūroje 24 val. Išdžiovintos vyšnių išspaudos buvo suskirstytos į 6 frakcijas su skirtingo dydžio sietais. Pirmoji frakcija – stambiausia, kurioje daugiausiai likusių kauliukų, šeštoji frakcija – smulkiausia, kurioje didžiąją dalį sudarė išspaudų minkštoji dalis ir labai maža dalis priemaišų (susitraiškėtų kauliukų lukštų ir/ar branduolių). Vėliau kiekviena frakcija buvo susmulkinama laboratoriniame malūne ZM 200 (Retsch, Haan, Vokietija) naudojant 0,5 mm diametro akučių sietą. Tokiu būdu buvo gauti pakankamai homogeniški 6 skirtingų frakcijų mišiniai. Vyšnių išspaudų frakcijų duomenys po džiovinimo ir po malimo pateikiami 3 lentelėje.

3 lentelė. Vyšnių išspaudų frakcijos

Bandinys	Naudoto sieto akučių diametras, mm	Frakcijos po atskyrimo skirtingo diametro sietais	Frakcijos po malimo, 0,5 mm
1 Frakcija	>10 mm		
2 Frakcija	4–10 mm		
3 Frakcija	3–4 mm		
4 Frakcija	1–3 mm		
5 Frakcija	0,8–1 mm		
6 Frakcija	<0,8 mm		

2.2. Tyrimų metodai

2.2.1. Cheminiai reagentai ir medžiagos

Tyrimams naudoti tirpikliai: heksanas (C₆H₁₄) (Eurochemicals, Vilnius, Lietuva), etanolis (C₂H₅OH) (Stumbras, Kaunas, Lietuva), metanolis (CH₃OH), suspaustas CO₂ (99,9 %) (Gaschema, Jonava, Lietuva), distiliuotas vanduo, pagamintas vandens gryninimo sistemoje Milipore (Bedford MA, JAV).

Naudoti reagentai: natrio chloridas (NaCl), kalio chloridas (KCl), kalio persulfatas (K₂S₂O₈) (Lach-Ner, Brno, Čekija); kalio dihidrofosfatas (KH₂PO₄) (Panreac, Barselona, Ispanija); natriohidrofosfato-dodekahidratas (Na₂HPO₄×12 H₂O) (Merck KGaA, Darmstadt, Vokietija); natrio karbonatas (Na₂CO₃) (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japonija); *Folin-Ciocalteu* reagentas (Sigma-Aldrich, Buchs, Šveicarija); 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgštis (ABTS), fluoresceinas, 2,2'-azobis(2-metilpropionamidino) dihidrochloridase (AAPH), galo rūgštis (C₇H₆O₅), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis (Trolox) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Vokietija); 24% boro trifluorido/metanolio kompleksas (Acros organics, Belgija); reagentas C, reagentas B, reagentas A, standard (Bioquochem, Asturias, Ispanija); β-karotenai (Sigma-Aldrich, Steinheim, Vokietija).

Kitos medžiagos: diatomitine žemė (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, JAV), mikrokristalinė celiuliozė (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, JAV), azoto dujos (AGA, Vilnius, Lietuva).

Chromatografinės analizės medžiagos: skruzdžių rūgštis (CH₂O₂), acetronitrilas (Sigma-Aldrich, Steinheim, Vokietija); ultra švarus vanduo (vandens gryninimo sistema Milipore, Bedford MA, JAV), helio dujos (AGA, Vilnius, Lietuva), cianidin-3-gliukozidas (98 %) (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd., Kinija).

2.2.2. Cheminės sudėties komponentų nustatymas

2.2.2.1. Drėgmės kiekio nustatymas

Drėgmės kiekis bandinyje buvo nustatytas standartiniu metodu, pagal kurį bandinys išdžiovinamas 105 °C temperatūroje, iki pastovios masės. Drėgmės kiekis apskaičiuojamas, pagal sausų medžiagų likutį [105].

Į pastovios masės iškaitintus biuksus buvo pasverti 2–4 g sumaltų vyšnių išspaudų. Biuksai su bandiniais išdžiovinami krosnelėje 105 °C temperatūroje. Išimti bandiniai atvėsunami eksikatoriuje išlaikant 30 min. Atlikti trys bandymų pakartojimai ir rezultatai buvo pateikiami kaip vidurkio reikšmė.

Bandinio drėgmės kiekis (%) apskaičiuojamas pagal formulę (5):

$$x = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{(m_1 - m)} \quad (5)$$

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

2.2.2.2. Baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu

Baltymų kiekis buvo nustatytas remiantis standartiniu Kjeldalio metodu (AOAC 978.04). Šis metodas pagrįstas bandinio organinių junginių mineralizavimu (deginimu) koncentruotoje sieros rūgštyje, jos virimo temperatūroje. Tiriamasis bandinys oksiduojasi iki anglies dvideginio ir vandens. Bandinyje esantis azotas išsiskiria kaip amoniakas, kuris sieros rūgšties terpėje sudaro amonio druską. Pagal standartinės rūgšties, surištos su amoniaku, kiekį apskaičiuojamas azoto kiekis tiriamajame bandinyje [106].

Kjeldalio kolboje buvo pasverta apie 1 g sumaltų vyšnių išspaudų, įpilta 20 ml koncentruotos H_2SO_4 rūgšties ir įdėtas katalizatorius (K_2SO_4 ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; TiO_2). Kjeldalio kolba mineralizavimo aparate buvo lėtai kaitinama 68–72 °C temperatūroje taip, kad tirpalas neputotų. Kolba kaitinama tol, kol mineralizatas tampa beveik skaidrus, žalsvai – melsvos spalvos. Kai tirpalas nuskaidrėjo, tai reiškė, kad bandinio mineralinės medžiagos suskilo ir liko tik mineraliniai junginiai. Kjeldalio kolba buvo atvėsinama.

Amoniakui nudistiliuoti gautas mineralizato tirpalas buvo distiliuojamas 5 min. vandens garais įrenginyje, kuris automatiškai pasiima į sistemą reikalingą NaOH kiekį. Išsiskyrę amoniako garai buvo kondensuojami grįžtamajame šaldytuve ir surenkami distiliato surinkimo kolboje į kurią buvo įpilta 25 ml 3 % boro rūgšties (H_3BO_3) tirpalo. Į distiliatą papildomai įpilta 2–3 lašai Taširo indikatoriaus tirpalo ir titruojama 0,01 M HCl tirpalu, kol distiliato spalva iš žalsvos virto į pilkai violetinę.

Tokiomis pat sąlygomis buvo distiliuojamas ir titruojamas kontrolinis bandinys, vietoj mineralizato pilant 20 ml konc. H_2SO_4 .

Azoto kiekis (%) tiriamajame bandinyje apskaičiuojamas pagal formulę (6):

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

Čia: 1,4 – azoto kiekis, kurį sujungia 1 ml 0,01 M HCl; V_1 – 0,01 M HCl kiekis, sunaudotas iš distiliuojamo mineralizato išsiskyrusiam amoniakui sujungti, ml; V_0 – 0,01 M HCl kiekis, sunaudotas kontroliniam bandiniui nutitruoti, ml; m – tiriamojo bandinio masė, g.

Baltyminių medžiagų kiekis buvo apskaičiuojamas padauginus nustatytą azoto kiekį iš atitinkamo perskaičiavimo koeficiento (6,25). Atlikti du bandymų pakartojimai ir rezultatai buvo pateikiami kaip vidurkio reikšmė.

2.2.2.3. Riebalų kiekio nustatymas Soksleto metodu

Riebalų kiekis buvo nustatytas remiantis Soksleto metodu (AOAC 948.22). Šis metodas pagrįstas daugkartine riebalų ekstrakcija tirpikliu iš išdžiovinto bandinio, tirpiklio pašalinimu ir nuriebinto bandinio išdžiovinimu iki pastovaus svorio [106]. Riebalų ekstrahavimui buvo naudojamas organinis tirpiklis – heksanas. Ekstrakcija buvo atlikta naudojant automatinę ekstrakcijos įrangą. Atlikti du bandymų pakartojimai ir rezultatai buvo pateikiami kaip vidurkio reikšmė.

2.2.2.4. Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas

Mineralinių medžiagų kiekis bandinyje buvo nustatytas remiantis standartiniu bendrojo pelenų kiekio nustatymo metodu (AOAC 930.05). Bendras mineralinių medžiagų kiekis nustatytas iš pelenų kiekio. Pelenai gauti po to, kai bandinys buvo sudegintas mufelinėje krosnyje esant 500–600 °C temperatūrai [106].

Vyšnių išspaudos buvo pasvertos porcelianiniuose tigluose (apie 2–3 g). Bandiniai atsargiai apdeginami ant elektrinės kaitlentės (60–120 min.), kol iš tiglo nustojo rūkti dūmai. Tuomet apanglėjęs bandinys dedamas į mufelinę krosnį ir deginamas 600–650 °C temperatūroje 15–16 val. Bandinys išimtas iš krosnies dedamas į eksikatorių, atvėsintas iki kambario temperatūros ir pasveriamas analitinėmis Scaltec SPB31 svarstyklėmis (Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Vokietija). Atlikti du bandymų pakartojimai ir rezultatai pateikiami kaip vidurkio reikšmė.

Pelenų kiekis (%), apskaičiuojamas pagal formulę (7):

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

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

2.2.2.5. Angliavandenių kiekio apskaičiavimas

Angliavandenių kiekis (%) apskaičiuojamas pagal formulę (8):

$$A = 100 - B - R - M - D \quad (8)$$

Čia: B – baltymų kiekis, %; R – riebalų kiekis, %; M – mineralinių medžiagų kiekis, %; D – drėgmės kiekis, %.

2.2.3. Dalelių dydžio ir jų pasiskirstymo nustatymas

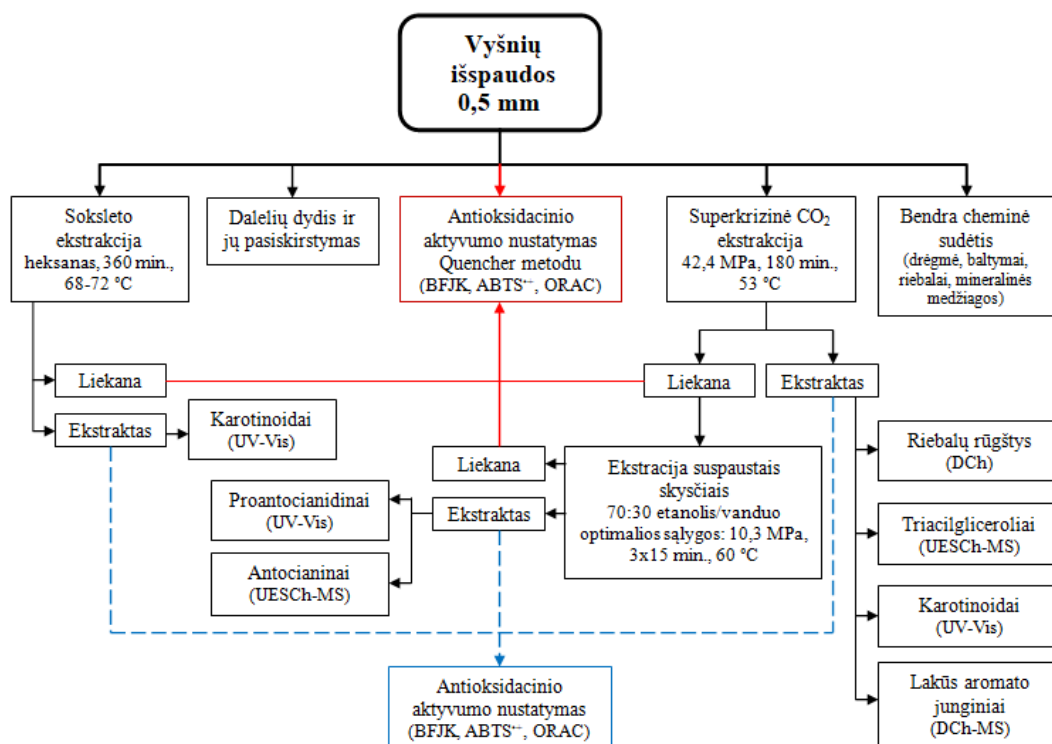
Dalelių dydžio nustatymas buvo atliktas remiantis metodika, kuri aprašyta *Eisinaite* ir kiti (2016) su nežymiais pakeitimais [107]. Dalelių dydis ir jų pasiskirstymas vandenyje išmatuotas Malvern Mastersizer 2000 lazeriniu difrakcijos dalelių dydžio analizatoriumi (Malvern Instrument Ltd, Worcestershire, Jungtinė Karalystė). Vyšnių išspaudų dalelės buvo disperguotos distiliuotame vandenyje esant 1330 aps./min. Vidutinis dalelių dydis pagal paviršiaus plotą ($d_{3,2}$) buvo užfiksuotas pagal šiuos optinius parametrus: disperguotos fazės lūžio rodiklis 1,47, disperguojančio skysčio (distiliuoto vandens) lūžio rodiklis 1,33. Dalelių dydis, kuris buvo išreiškiamas pagal paviršiaus plotą, pateikiamas 9 formulėje. Santykinis Span (tarpinis) faktorius – be matmenis parametras, kuris nurodo dalelių dydžio pasiskirstymo vienodumą. Šis parametras apibrėžiamas taip: $\text{Span} = (D_{90} - D_{10}) / D_{50}$, kur D_{90} , D_{50} , D_{10} yra atitinkami dalelių skersmenys 10, 50, 90 tūrio %. Atlikti trys bandymų pakartojimai ir rezultatai buvo pateikiami kaip vidurkio reikšmė.

$$d_{3,2} = \frac{6}{S_v} \left(\sum_{i=1}^{n_s} \frac{v_i}{d_i} \right)^{-1} \quad (9)$$

Čia: S_v – dalelių paviršiaus plotas tūrio vienetu, v_i – dalelių tūrio dalis i -osios klasės pasiskirstymo vietoje, d_i – vidutinis dalelių skersmuo pagal atitinkamą klasę, n_s – skirtingų dalelių klasių skaičius.

2.2.4. Vyšnių išspaudų ekstraktų gamyba

Išdžiovintos ir sumaltos vyšnių išspaudos buvo ekstrahuojamos skirtingais metodais, tam kad būtų išgauti ekstraktai su juose esančiais bioaktyviais junginiais. Eksperimentui atlikti buvo taikytos superkrizinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO₂), ekstrakcija suspaustais skysčiais (ESS) ir Soksleto ekstrakcija. ESS atlikti pasirinktas etanolio/vandens mišinys (70:30), dėl mažesnio toksiškumo, didesnio saugumo vartotojui bei poliškumo (išgaunamas didesnis kiekis polinių bioaktyvių junginių). Vyšnių išspaudų ekstraktų ir eksperimentinių tyrimų eiga pateikiama 13 paveiksle.



13 pav. Vyšnių išspaudų biorafinavimo metodai ir vykdytų eksperimentinių tyrimų schema

2.2.4.1. Soksleto ekstrakcija

Soksleto ekstrakcija buvo atlikta remiantis *Luque de Castro* (1998) metodu panaudojant automatinį Soksleto ekstraktorių (Behr Labor-Technik, Düsseldorf, Vokietija) [108].

20 g sumaltų vyšnių išspaudų buvo suvyniotos į filtrinį popierių. Prieš ekstrakcija paketėlis su žaliava ir filtriniu popieriumi buvo pasveriami analitinėmis Scaltec SPB31 svarstyklėmis (Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Vokietija). Ekstrakcija atlikta naudojant heksano tirpiklį. Ekstrakcija buvo vykdyta 360 min., palaikant virimo temperatūrą (68–72 °C). Po ekstrakcijos gautas ekstraktas buvo garinamas rotaciniu garintuvu (Biuchi labortechnik AG, Konztanz, Šveicarija) ir atliktas praputimas azoto dujomis, kad būtų pašalintos tirpiklio liekanos. Galiausiai ekstraktai sveriami analitinėmis svarstyklėmis ir apskaičiuojama jų išeiga (%) skirtingoms frakcijoms. Po Soksleto ekstrakcijos gauti ekstraktai buvo saugomi tamsaus stiklo buteliukuose -18 °C temperatūroje iki tolimesnių eksperimento tyrimų. Liekana po ekstrakcijos buvo džiovinama 24 val. 40 °C temperatūroje iki pastovios masės. Vyšnių išspaudų kietoji liekana saugoma sandariai uždarytuose indeliuose, sausoje tamsioje aplinkoje. Atlikti du bandymų pakartojimai ir rezultatai buvo pateikiami kaip vidurkio reikšmė.

2.2.4.2. Superkazinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO₂)

Ekstrakcija atliekama naudojant Supercritical Fluid Technologies (Supercritical fluid technologies INC Model SFT-110, Newark, JAV) ekstrakcijos sistemą. 20 g sumaltų išspaudų buvo sudėta į 50 ml tūrio ceļę. Statinė ekstrakcija vykdoma 10 min., jai pasibaigus atliekama dinaminė ekstrakcija. Ekstrakcijos slėgis (42,4 MPa) ir temperatūra (53 °C) buvo pasirinkti remiantis *Tamkutės* duomenimis (duomenys dar nepublikuoti), o laikas kontroliuojamas atitinkamai, pagal atliktą kinetikos planą. Visos ekstrakcijos metu palaikomas pastovus CO₂ srautas (2 l/min.). Ekstraktai surenkami į mėgintuvėlius, sveriami analitinėmis Scaltec SPB31 svarstyklėmis (Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Vokietija) ir apskaičiuojamos jų išeigos (%). Ekstraktai saugomi sandariai uždarytuose, rudo stiklo buteliukuose ir laikomi šaldiklyje (-18 °C) iki tolimesnių eksperimentų. Liekana po ekstrakcijos saugoma sandariai uždarytuose indeliuose, sausoje tamsioje vietoje. Atlikti du/trys bandymų pakartojimai ir rezultatai buvo pateikiami kaip vidurkio reikšmė.

2.2.4.3. Ekstrakcija suspaustais skysčiais (ESS)

Ekstrakcija atliekama naudojant Dionex ASE 350 sistemą (Dionex, Sunnyvale, JAV). 3 g vyšnių išspaudų liekanų, kurios gautos po SKE–CO₂, sumaišomos su 1 g diatomitinės žemės. Mišinys patalpinamas į ceļę, kurios galai užfiksuoti su celiuliozės filtrais (ThermoFisher Scientific, Vilnius, Lietuva) bei nerūdijančio plieno dangteliais. Ekstrakcija atlikta naudojant vandens ir polinio tirpiklio mišinį – etanolis/vanduo (70:30). Vykdamas ekstrakciją optimaliomis sąlygomis atliekami trys ekstrakcijos ciklai esant 10,3 MPa slėgiui, ekstrakcijos trukmė 15 min., temperatūra 60 °C. Pasibaigus ekstrakcijai organinis tirpiklis – etanolis pašalintas rotaciniu garintuvu 36 °C temperatūroje, o vanduo – liofilizacijos būdu, naudojant sublimacinę Zirbus džiovyklą (Zirbus technology, Vokietija). Apskaičiuojamos ekstraktų išeigos (%). Po ESS gauti ekstraktai saugomi tamsaus stiklo buteliukuose -18 °C temperatūroje iki tolimesnių eksperimento tyrimų. Liekana po ekstrakcijos laikoma sandariai uždarytuose indeliuose, sausoje tamsioje vietoje. Atlikti trys bandymų pakartojimai ir rezultatai buvo pateikiami kaip vidurkio reikšmė.

2.2.4.3.1. Ekstrakcijos suspaustais skysčiais (ESS) proceso optimizavimas

Vyšnių išspaudų liekana, kuri buvo gauta po SKE–CO₂, buvo naudojama atliekant ESS optimizavimo procesą. Ekstrakcijai naudotas tirpiklių etanolis/vanduo (70:30) mišinys, siekiant išskirti didesnę polinių bioaktyvių junginių kiekį. ESS optimalios sąlygos, siekiant gauti didžiausią ekstrakto išeigą bei proantocianidinų kiekį nustatytos atlikus matematinį paviršiaus atsako planavimo metodą, pritaikant centriškai kompozicinį eksperimentinį modelį. Proceso optimizavimas sumodeliuotas, naudojant statistinę programą Design – expert 7.0. (Stat-Ease Inc, Mineapolis, JAV). Optimizuojant ESS procesą buvo keičiami du parametrai – temperatūra ir laikas. Tyrimų duomenys išanalizuoti dispersinės ir koreliacinės – regresinės analizės metodais. Ekstrakcijos temperatūra (A) ir laikas (B) užkoduoti trimis lygiais (-1, 0, +1). Nepriklausomi kintamieji pateikiami 4 lentelėje.

4 lentelė. Nepriklausomų kintamųjų užkodavimas optimizuojant ESS procesą

Simboliai	Nepriklausomi kintamieji	Užkoduoti lygiai		
		-1	0	+1
A	T (°C)	60	90	120
B	t (min.)	5	10	15

Ekstrakcijos išeiga (%) apskaičiuojama pagal formulę (10):

$$Išeiga (\%) = b_0 + \sum_{i=1}^2 b_i x_i + \sum_{i=1}^2 b_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j}^2 b_{ij} x_i x_j \quad (10)$$

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

Modelio patikimumas (adekvatumas) nustatytas įvertinant koeficientų reikšmingumą, regresijos koeficientą (R^2) ir Fišerio testo vertę (F), kurios yra gaunamos dispersinėje analizėje (ANOVA). Paviršiaus atsako metodas ir kontūrų plotas buvo sukurtas naudojant kvadratinį daugianarį. Atlikti trys bandymų pakartojimai ir rezultatai pateikiami kaip vidurkio reikšmė.

2.2.5. Ekstraktų antioksidacinio potencialo nustatymas

Yra sukurta daug skirtingų metodų, kaip įvertinti augalų (ekstraktų/liekanų) antioksidacines savybes. Didžioji dalis jų grindžiama vandenilio atomo arba vieno elektrono perdavimo reakcijomis [109]. Įvertinant skirtingas metodologijas buvo padaryta išvada, kad deguonies radikalų surišimo gebos (ORAC), bendro fenolinių junginių kiekio (BFJK) ir 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties radikalo surišimo gebos (ABTS⁺) nustatymai turėtų būti naudojami kaip pagrindiniai metodai pateikiant maisto ar jo ingredientų antioksidacinį įvertinimą. Remiantis šia rekomendacija, ORAC, BFJK ir ABTS⁺ metodai buvo taikomi įvertinant vyšnių žaliavos/ekstrakto/liekanos antioksidacinį potencialą viso eksperimento metu.

2.2.5.1. Bandinių paruošimas

Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymui buvo paruošti skirtingų koncentracijų ekstraktų tirpalai (skiedimai). Naudoti tirpikliai (metanolis arba vanduo) pasirinkti priklausomai nuo ekstraktų tirpumo. Ekstraktai po SKE-CO₂ ir Soksleto ekstrakcijos buvo skiedžiami metanoliu, o ekstraktai po ESS – vandeniui.

Absorbicija matuota Genesys 8 (Thermo Electron Scientific Instruments Corporation, JAV) arba FLUOstar Omega reader (BMG Labtech, Offenburg, Vokietija) spektrofotometrais. ORAC atlikti eksperimentiniai duomenys buvo eksportuojami iš „Mars“ programinės įrangos į „Excel 2003“ (Microsoft, Roselle, IL) tolimesniam duomenų apdorojimui. Atlikti 5–6 bandymų pakartojimai, o rezultatai išreikšti kaip vidurkio reikšmė.

2.2.5.2. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK)

Bendras fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas *Folin-Ciocalteu* metodu pagal *Singleton* ir kiti (1999) [110]. *Folin-Ciocalteu* reagentas sumaišytas su distiliuotu vandeniu santykiu 1:9, kad būtų gautas darbinis tirpalas. Na₂CO₃ tirpalas pagamintas, ištirpinant 75 g Na₂CO₃ viename litre distiliuoto vandens.

150 µl tiriamo ekstrakto bandinio arba kontrolinio bandinio (metanolio arba vandens) sumaišoma su 750 µl darbinio *Folin-Ciocalteu* tirpalo ir po 3 min. vykiosios reakcijos pridėjama 600 µl Na₂CO₃. Paruošti bandiniai 15 s maišomi ir paliekami 120 min. tamsoje. Absorbicija matuojama Genesys 8 spektrofotometru esant 760 nm bangos ilgiui. Bendras fenolinių junginių kiekis išreikštas galo

rūgšties ekvivalentais (mg GRE/g ekstrakto ir mg GRE/g SM). Kalibracinė kreivė buvo sudaryta pagal 11 lygtį:

$$y = 0,0104x + 0,0185; R^2 = 0,9987 \quad (11)$$

2.2.5.3. 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS^{•+}) radikalo katijono sujungimo metodas

Tyrimas atliktas šiek tiek modifikuotu *Re* ir kiti (1999) metodu [111]. Pradžioje ruošiamas fosfatinis buferinis tirpalas – PBS, kurį ruošiant 1 l matavimo kolboje ištirpinta 8,18 g NaCl, 0,27 g KH₂PO₄, 1,42 g Na₂HPO₄ ir 0,15 g KCl. Paruošto PBS tirpalo pH reikšmė 7,4. Pradinis ABTS^{•+} tirpalas buvo paruoštas 50 ml matavimo kolboje ištirpinus 0,05487 g ABTS reagento PBS-e, praskiedus iki brūkšnio ir papildomai įpylus K₂S₂O₈ tirpalo (0,2 ml distiliuotame vandenyje ištirpinta 0,0038 g K₂S₂O₈). Taip paruoštas pradinis ABTS^{•+} tirpalas laikomas tamsoje kambario temperatūroje 15–16 val. Darbinis ABTS^{•+} tirpalas ruošiamas prieš eksperimentą, praskiedus pradinį tirpalą PBS-u iki gaunama absorbcija 0,7 ± 0,01 optinio tankio vienetų esant 734 nm bangos ilgiui.

25 µl tiriamo ekstrakto arba kontrolinio bandinio (metanolio arba vandens) buvo sumaišyta su 1500 µl darbinio ABTS^{•+} tirpalo. Paruošti bandiniai 15 s maišomi ir paliekami 120 min. tamsoje. Absorbcija matuojama Genesys 8 spektrofotometru esant 734 nm bangos ilgiui. Kiekvieno bandinio antioksidacinis aktyvumas išreikštas trolokso ekvivalentais (mg TE/g ekstrakto ir mg TE/g SM). Kalibracinė kreivė buvo sudaryta pagal 12 lygtį:

$$y = 0,0638x - 1,3042; R^2 = 0,9977 \quad (12)$$

2.2.5.4. Deguonies radikalų surišimo gebos nustatymas (ORAC)

ORAC tyrimas buvo atliktas pagal *Prior* ir kiti (2003) metodą, panaudojant fluoresceiną [112]. Eksperimento atlikimui buvo paruošti trys skirtingų koncentracijų fluoresceino tirpalai (S₁, S₂ ir S₃) bei PBS tirpalas, kurio gamyba aprašyta ABTS metodikoje (žr. 2.2.5.3 skyrius).

Fluoresceino tirpalai buvo ruošiami:

S₁ = 0,045 g fluoresceino reagento ištirpinama 100 ml PBS;

S₂ = 0,5 ml S₁ tirpalo praskiedžiama 100 ml PBS;

S₃ = 0,8 ml S₂ tirpalo praskiedžiama 50 ml PBS.

Specialiose mikrolėkštelėse buvo sumaišyta 25 µl tiriamo arba kontrolinio bandinio (metanolio arba vandens) ir 150 µl S₃ koncentracijos fluoresceino tirpalo. Mikrolėkštelė inkubuojama 15 min. 37 °C temperatūroje FLUOstar Omega reader spektrofotometre. Po inkubacijos su daugiakanale pipete buvo supilama 25µl azobio tirpalo (AAPH), kuris paruošiamas azobio reagentą ištirpinus PBS tirpale. Fluorescencija matuojama prie 120 ciklų. Kiekvieno bandinio antioksidacinis aktyvumas išreikštas trolokso ekvivalentais (mg TE/g ekstrakto ir mg TE/g SM).

Po kalibracinė kreivė esantis plotas (AUC) kiekvienam bandiniui apskaičiuojamas integruojant santykinę fluoresceino kreivę. Kalibracinė kreivė buvo sudaryta pagal 13 lygtį:

$$y = 0,1394x - 0,7395; R^2 = 0,9926 \quad (13)$$

AUC apskaičiuojamas pagal formulę (14):

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=120} \frac{f_1}{f_0} \quad (14)$$

Čia: f_0 – pradinė fluoresceino vertė (0 min.); f_i – fluoresceino vertė laiko momentu i (i-tąją min.)

2.2.6. Kietųjų medžiagų antioksidacinio potencialo nustatymas (Quencher metodai)

2.2.6.1. Bandinių paruošimas

Kietųjų frakcijų antioksidacinio aktyvumo matavimams paruošti skirtingų koncentracijų skiedimai, naudojant mikrokristalinę celiuliozę. Antioksidacinės savybės buvo tiriamos žaliavai prieš ir liekanoms po naudotų ekstrakcijos metodų. Visų tyrimų darbiniai tirpalai paruošiami taip pat, kaip nustatant ekstraktų antioksidacinį aktyvumą (žr. 2.2.5 skyrius). Bandiniai prieš matavimą centrifuguojami Velocity 18R centrifūga (Precisa Gravimetrics AG, Šveicarija). Absorbicija matuojama Genesys 8 (Thermo Electron Scientific Instruments Corporation, JAV) arba FLUOstar Omega reader (BMG Labtech, Offenburg, Vokietija) spektrofotometrais. ORAC atlikti eksperimentiniai duomenys eksportuojami iš „Mars“ programinės įrangos į „Excel 2003“ (Microsoft, Roselle, IL) tolimesniam duomenų apdorojimui. Atlikti 5–6 bandymų pakartojimai, o rezultatai išreikšti kaip vidurkio reikšmė.

2.2.6.2. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK)

10 mg tiriamo arba kontrolinio bandinio (celiuliozės) sumaišyta su 150 μ l distiliuoto vandens, 750 μ l darbinio *Folin-Ciocalteu* reagento ir 600 μ l Na_2CO_3 . Paruošti mišiniai 15 s maišomi, purtomi tamsoje 120 min. (250 aps./min.) ir centrifuguojami 4500 aps./min. greičiu 5 min. Absorbicija matuojama Genesys 8 spektrofotometru esant 760 nm bangos ilgiui. Bendras fenolinių junginių kiekis išreikštas mg GRE/g bandinio ir mg GRE/g SM. Kalibracinė kreivė buvo sudaryta pagal 15 lygtį:

$$y = 0,0121x + 0,0298; R^2 = 0,9934 \quad (15)$$

2.2.6.3. 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS^{•+}) radikalo katijono sujungimo metodas

10 mg tiriamo arba kontrolinio bandinio (celiuliozės) sumaišyta su 25 μ l metanolio ir 1500 μ l darbinio ABTS^{•+} tirpalo. Paruošti mišiniai 15 s maišomi, purtomi tamsoje 120 min. (250 aps./min.) ir centrifuguojami 4500 aps./min. greičiu 5 min. Absorbicija matuojama Genesys 8 spektrofotometru esant 734 nm bangos ilgiui. Kiekvieno bandinio antioksidacinis aktyvumas išreikštas mg TE/g bandinio ir mg TE/g SM. Kalibracinė kreivė buvo sudaryta pagal 16 lygtį:

$$y = 0,0625x - 2,804; R^2 = 0,9971 \quad (16)$$

2.2.6.4. Deguonies radikalų surišimo gebos nustatymas (ORAC)

Ant 10 mg tiriamo arba kontrolinio bandinio (celiuliozės) užpilama 150 μ l PBS tirpalo ir 900 μ l S_3 koncentracijos fluoresceino tirpalo. Paruošti mišiniai 15 s maišomi, 60 min. purtomi tamsoje (250 aps./min.) ir centrifuguojami 4500 aps./min. greičiu 5 min. 175 μ l paruošto mišinio skaidriosios dalies perkelta į mikrolėkštelę, inkubuojama 15 min. 37 °C temperatūroje FLUOstar Omega spektrofotometre. Po inkubacijos su daugiakanale pipete supilama 25 μ l azobio tirpalo (AAPH).

Fluorescencija matuojama esant 150 ciklų. Kiekvieno bandinio antioksidacinis aktyvumas išreikštas mg TE/g bandinio ir mg TE/g SM. Kalibracinė kreivė buvo sudaryta pagal 17 lygtį:

$$y = 0,1212x + 4,1924; R^2 = 0,9671 \quad (17)$$

2.2.7. Vyšnių išspaudų eksperimentiniai tyrimai po SKE–CO₂

2.2.7.1. Riebalų rūgščių (RR) sudėties nustatymas dujų chromatografijos metodu

SKE–CO₂ ekstraktų, gautų po superkryzinės ekstrakcijos anglies dvideginiu, riebalų rūgščių sudėtis analizuojama dujų chromatografijos (DCh) metodu. Trigliceridų esterinimui ir laisvųjų riebalų rūgščių apmuilinimui buvo paimta 0,1 g ekstrakto ir 0,8 ml metanolinio NaOH (0,5 M). Viskas supilta į apvaliadugnę kolbą ir kaitinama su grįžtamuju šaldytuvu, kol išnyksta riebalų fazė.

Po riebalų esterifikacijos per grįžtamojo šaldytuvo viršų įpilta 1 ml 24 % boro trifluorido/metanolio komplekso ir verdama dar 2 min., po to atšaldoma iki kambario temperatūros. Atvėsintas bandinys praskiedžiamas 1 ml heksano ir gerai sukratomas. Bandinys paliekamas nusistovėti, kol susidaro atskiri sluoksniai. Viršutinė heksano fazė surenkama ir laikoma -20 °C temperatūroje iki tolimesnių tyrimų. RR analizei paimta 100 µl heksaninės fazės ir praskiesta 900 µl grynu, chromatografiniams tyrimams skirtu, heksanu.

Riebalų rūgščių metilesteriai analizuojami dujiniu chromatografu HRGC 5300 (Mega Series, Carlo Erba, Milan, Italija) naudojant liepsnos jonizacinį detektorių su poline SPTM – 2560 kolonėle (100 m ilgio, 0,25 mm vidinio skersmens, adsorbento sluoksnis 0,20 µm) (Supelco, Bellefonte, PA, JAV). Analizės parametrai: inžektoriaus temperatūra 220 °C, detektoriaus – 240 °C, krosnelės temperatūra buvo suprogramuota trimis pakopomis: nuo 80 °C didėjant iki 135 °C kas 4 °C/min.; nuo 135 °C iki 185 °C kas 4 °C/min. ir nuo 185 °C iki 240 °C kas 4 °C/min. su 5 min. išlaikymu. Helio dujos naudotos esant 20 cm³/s srautui. Įleisto bandinio kiekis – 1 µl. Junginiams identifikuoti naudojamas etaloninis riebalų rūgščių metilesterių mišinys. Bandinių junginiai analizuojami palyginant jų sulaikymo laikus su etalonu. Riebalų rūgščių kiekis išreikštas procentais nuo identifikuotų RR smailių plotų sumos. Atlikti trys bandymų pakartojimai ir rezultatai pateikiami kaip vidurkio reikšmė.

2.2.7.2. Triacilglicerolių sudėties nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu

Triacilglicerolių (TAG) tyrimas atliktas remiantis Zeb ir kiti (2010) metodika su nežymiais pakeitimais [113]. Tyrimas atliekamas naudojant Waters Acquity ultra efektyviosios skysčių chromatografijos sistemą (angl. *ultra performance liquid chromatography*) (Waters Corp., Milford, MA, JAV), kuri sujungta su hibridiniu kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru (UESCh-Q-TOF-MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Vokietija). Ultra efektyviosios skysčių chromatografijos įrangą sudarė binarinių tirpiklių valdymo blokas, bandinių valdymo blokas, kolonėlės šildytuvai sujungtas su masių spektrometru ir ESI šaltiniu, kuris veikia teigiamu režimu. Prietaisų kontrolė ir duomenų apdorojimas buvo atliekamas naudojant HyStar programinę įrangą (Bruker Daltonic, Bremen, Vokietija). Analizių skirstymas atliktas analitine kolonėle Acquity BEH C18 (2,1 x 50 mm, dalelių dydis – 1,7 µm) (Waters Sverige, Sollentuna, Švedija). Automatinio bandinių ėmimo įrenginio temperatūra palaikoma 20 °C, kolonėlės – 40 °C. Eliuentų sistemą sudarė 18 % izopropanolis metanolyje (0,1 % acto rūgšties). Amonio acetatas (0,05 %) buvo pridėtas į

tirpiklių sistemą. Srauto greitis 0,4 ml/min. Atskyrimo laikas – 7 min. Azoto dujos naudojamos džiovimui, jų temperatūra siekė 200 °C, jonizacijos įtampa – 4000 V. ESI-MS spektrai gauti 200–1000 m/z intervale. Triacilglicerolių kiekis išreikštas procentais nuo identifikuotų TAG junginių smailių plotų sumos.

2.2.7.3. Bendro karotinoidų kiekio nustatymas UV – Vis metodu

Karotinoidai yra lipofiliniai pigmentiniai junginiai, šių junginių ekstrakcija paprastai atliekama naudojant organinius tirpiklius arba jų mišinius. Išgauti karotinoidų ekstraktą iš augalinės žaliavos arba maisto produktų naudojami acetono, heksano, metanolio, etanolio, etilo eterio, tetrahidrofurano, dichloertano tirpikliai bei jų deriniai [114].

Bendro karotinoidų kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu (UV-Vis) buvo atliktas pagal Zymone ir kiti (2018) metodą [115]. Karotinoidų kiekis apskaičiuotas pagal β-karoteno kalibracinę kreivę ir išreikštas mg β-karoteno/g ekstrakto ir mg β-karoteno/g SM. Komercinis β-karoteno standartas ištirpinamas heksane. Ekstraktų absorbcija buvo matuojama Genesys 8 spektrofotometru (Thermo Electron Scientific Instruments Corporation, JAV) esant 450 nm bangos ilgiui. Atlikti keturi bandymų pakartojimai ir rezultatai pateikiami kaip vidurkio reikšmė. Kalibracinė kreivė buvo sudaryta pagal 18 lygtį:

$$y = 0,774x - 0,0364; R^2 = 0,99 \quad (18)$$

2.2.7.4. Lakiųjų junginių sudėties nustatymas dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu

Lakiųjų junginių esančių ekstrakto, gautame po superkritinės ekstrakcijos CO₂, sudėtis buvo analizuojama dvidimensine dujų chromatografijos – skriejimo laiko masių spektrometrijos (DCh×DCh-TOF-MS) LECO Pegasus 4D sistema. Sistema sudaryta iš Agilent 7890A DCh dujų chromatografo, GERSTEL MPS mėginio įleidimo įrenginio (Gerstel, Mulheim an der Ruhr, Vokietija) sujungto su didelės spartos TOF-MS detektoriumi (LECO, St. Joseph, MI, JAV) ir dviejų srautų moduliatoriumi (Zoex, Houston, TX, JAV).

Kietosios fazės mikroekstrakcija (angl. *solid – phase microextraction*) buvo atlikta MPS-2 mėginio įleidimo įrenginyje (Gerstel, Mulheim an der Ruhr, Vokietija), naudojant divinilbenzeno/karbokseno/polidimetilsiloksano pluoštą (angl. *divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxanefiber*) (Supelco, Bellefonte, PA, JAV). Į 20 ml buteliuką įdėta 100 mg ekstrakto, 15 min. palaikant 40 °C temperatūrą pasiekta pusiausvyra buteliuko viršerdvėje. Vėliau kietosios fazės sluoksnis buvo laikomas buteliuko viršerdvėje esant 40 °C temperatūrai 30 min.

Agilent 7890A DCh yra įdiegtos dvi kolonėlės: nepolinė kolonėlė BPX-5 (ilgis 30 m, vidinis skersmuo 0,25 mm, stacionarios fazės sluoksnio storis 0,25 μm) (SGE Analytical Science, Australija) sujungta su antrąja poline kolonėle, BPX-50 (ilgis 2 m, vidinis skersmuo 0,10 mm, stacionarios fazės sluoksnio storis 0,1 μm). Pirmosios kolonėlės temperatūrinė programa buvo tokia: pradinė temperatūra 40 °C, išlaikant 1 min., po to temperatūra keliama 7 °C/min. greičiu iki 250 °C, išlaikant 1 min., kai moduliatoriaus nuokrypio temperatūra +15 °C. Perdavimo linijos temperatūra 250 °C. Pradinė DC inžektoriaus PORT temperatūra buvo nustatyta 150 °C, po to pakelta iki 250 °C (750 °C/min.), desorbcijos laikas – 5 min. TOF-MS registravimo greitis 10

spektrų per sekundę. Identifikuojant junginius masių diapazonas – 30-550 m/z vienetų. Detektoriaus įtampa 1550 V, jonų šaltinio temperatūra 250 °C, įleidimo srauto pasiskirstymas 1:20. Gauti duomenys iš DCh×DCh-TOF-MS sistemos apdorojami ChromaTOF v.4.22 (LECO) programine įranga, naudojant tirpiklio piko atidėjimo laiką 360 s ir esant masių spektro atitikimui.

Lakieji aromato junginiai, esantys ekstraktuose, buvo identifikuoti pagal masių spektrus ir Kovats (KI) sulaikymo indeksus, kurie apskaičiuoti pagal C₇ – C₃₀ sočiųjų alkanų standartą. Gauti masių spektrai palyginti su spektrais esančiais Adams, NIST, Mainlib, ir Replib masių spektrų bibliotekose ir laikomi priimtinais, kai signalo ir triukšmo santykis didesnis nei 50, o masių spektro atitikimas ne mažesnis kaip 750. Vyšnių ekstraktuose esantys lakieji junginiai buvo laikomi identifikuotais, esant geram Kovats indekso ir masių spektro suderinamumui, o rezultatai išreikšti procentais nuo identifikuotų junginių smalių plotų sumos. Atlikti trys bandymų pakartojimai ir rezultatai buvo pateikiami kaip vidurkio reikšmė.

2.2.8. ESS būdu gautų medžiagų tyrimai

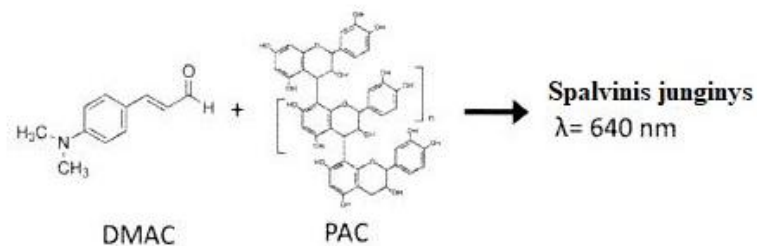
2.2.8.1. Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu

Kokybinė ir kiekybinė antocianinų analizė buvo atlikta ultra efektyviosios skysčių chromatografijos metodu remiantis *Grunovaitė* ir kiti (2016) metodika [116]. Antocianinų analizė atlikta Waters Acquity sistema (Waters, Milford, JAV), kuri sujungta su hibridiniu kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru (UESCh-Q-TOF-MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Vokietija). Analizių skirstymas atliktas atvirkščių fazių analitine kolonėle Acquity BEH C18, Amide 2,1 × 100 mm, sorbento dalelių dydis – 1,7 μm (Waters, Milford, JAV), kuria palaikoma 40 °C temperatūra. Eliuentų sistema: A – 1% skruzdžių rūgštis ir B – 100% acetronitrilas. Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min., įleidžiamas tūris – 2 μl. Iš kolonėlės išeinantys junginiai aptikti diodų matricos detektoriumi esant 220–550 nm bangos ilgiui. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas teigiamos elektrinės jonizacijos režimu. Masių spektrai užrašyti pilno skenavimo režime, intervale 100–800 m/z. Chromatografinis identifikavimas buvo atliktas remiantis literatūros duomenimis, kuriuos pateikė kiti mokslininkai savo atliktais tyrimais bei MS/MS režimu gautų junginių fragmentais. Antocianinų kiekis ekstraktuose apskaičiuotas pagal cianidin-3-gliukozido kalibracinę kreivę, išreikštas mg CGE/100 g ekstrakto ir mg CGE/100 g SM. Atlikti du bandymų pakartojimai ir rezultatai pateikiami kaip vidurkio reikšmė. Kalibracinė kreivė buvo sudaryta pagal 19 lygtį:

$$y = 0,006876196x + 518,604626042; R^2 = 0,99 \quad (19)$$

2.2.8.2. Proantocianidinų kiekio nustatymas UV – Vis metodu

Proantocianidinų kiekis nustatytas spektrofotometrinio metodu (UV-Vis), remiantis BQCKit pateikiama metodika. 4 - (dimetilamino) - cinamaldehydas (DMAC) reaguoja su proantocianidinų A ciklo C₈ atomu, susidarant žalios/mėlynos spalvos chalkonams. Ši spalvinė reakcija ir yra analizuojama spektrofotometriškai. Principinis reakcijos modelis pateikiamas 14 paveiksle.



14 pav. Proantocianidinų modelinė spalvinė reakcija

DMAC (4-(dimetilamino)-cinamaldehydo) reagento paruošimas analizei: į komercinį reagento C tirpalą pilama 500 μl reagento B. Gautas DMAC reagento tirpalas yra švelniai sumaišomas ir laikomas 4 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki analizės atlikimo.

Tyrimui buvo paimta 230 μl komercinio reagento A, 10 μl ekstrakto, gauto atlikus ESS, arba kontrolinio bandinio (H_2O) ir sumaišyta su 10 μl DMAC reagento tirpalu specialiose skaidriose mikrolėkštelėse. 15 min. purtoma tamsoje esant 200 aps./min., po to matuojama tirpalo šviesos absorbcija su FLUOstar Omega reader spektrofotometru (BMG Labtech, Offenburg, Vokietija) esant 640 nm bangos ilgiui. Suminis proantocianidinų kiekis ekstrakto išreikštas mg PAC/g ekstrakto bei mg PAC/ g SM. Atlikti trys bandymų pakartojimai, o rezultatai pateikiami kaip vidurkio reikšmė. Kalibracinė kreivė buvo sudaryta pagal 20 lygtį:

$$y = 0,210x - 0,205; R^2 = 0,993 \quad (20)$$

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Vyšnių išspaudų bendra cheminė sudėtis

Vyšnių išspaudų pagrindiniai cheminės sudėties komponentai pateikiami 5 lentelėje. Baltymų kiekis 1–6 frakcijose kito nuo 9,71 % iki 16,41 %. Didžiausiais baltymų kiekis nustatytas 5 F (16,41 %), mažiausias – 3 F (9,71 %). Lyginant nustatytą baltymų kiekį su moksline literatūra pastebima, kad eksperimento metu gauti rezultatai yra nuo 2 iki 4 kartų didesni lyginant su straipsniuose pateiktas duomenimis. Pagal literatūrą džiovintose vyšniuose baltymų kiekis siekia 4 g/100 g, tačiau jis priklauso ne tik nuo pasirinktos veislės, bet ir nuo klimato sąlygų bei nustatymo metodo. Riebalų kiekis bandiniuose siekė 5,04–12,16 %. Verta paminėti, kad riebalų kiekio analizė buvo atlikta naudojant Soksleto ekstrakciją. Lyginant riebalų kiekį tarp visų vyšnių išspaudų frakcijų, nustatyta, kad 5 frakcijoje jis buvo didžiausias (12,6 %) ir net du kartus viršijo 1, 3, 4 ir 6 frakcijose nustatytą kiekį, atitinkamai 5,68, 5,04, 5,89 ir 6,75 %. Didžiausias mineralinių medžiagų (pelenų) kiekis nustatytas smulkiausioje 6 F (3,02 %), o mažiausias – 3 F (1,06 %). Visose šešiose vyšnių išspaudų frakcijose pelenų kiekis kito nuo 1,06 % iki 3,02 %. Mokslinėje literatūroje pateikiamas labai panašus mineralinių medžiagų kiekis (3,11 g/100 g) lyginant su eksperimento metu gautais rezultatais. Drėgmės kiekis analizuotose vyšnių išspaudose kito 5,76–6,71 % ribose ir buvo panašus visose frakcijose. Kitų mokslininkų atlikti tyrimų rezultatai buvo panašūs, tačiau drėgmės kiekis gali skirtis nuo 5 iki 14 % priklausomai nuo veislės. Daugiausiai drėgmės buvo 6 F (6,71 %), mažiausias – 4 F (5,76 %). Didžiausias apskaičiuotas angliavandenių kiekis nustatytas 3 F (78,24 %), mažiausias – 5 F (62,35 %). Lyginant apskaičiuotą angliavandenių kiekį su literatūroje pateiktomis vertėmis (46–66 g/100 g) pastebima, kad jos yra labai artimos. Vis dėlto, svarbu paminėti, kad cheminė sudėtis priklauso nuo daugelio veiksnių, tokių kaip: klimato sąlygos, veislės pasirinkimas bei dirvožemio sudėtis, taip pat taikytų nustatymo metodų [70, 117].

5 lentelė. Vyšnių išspaudų biocheminė sudėtis

Bandinys	Baltymų kiekis, %	Riebalų kiekis, %	Mineralinių medžiagų kiekis, %	Drėgmės kiekis, %	Angliavandenių kiekis, %
1 Frakcija	13,17 ± 0,30	5,68 ± 0,15	1,62 ± 0,00	6,47 ± 0,02	73,07
2 Frakcija	12,54 ± 0,09	8,31 ± 0,15	1,20 ± 0,07	6,10 ± 0,15	71,71
3 Frakcija	9,71 ± 0,00	5,04 ± 0,15	1,06 ± 0,04	5,80 ± 0,12	78,24
4 Frakcija	11,38 ± 0,04	5,89 ± 0,14	1,37 ± 0,00	5,76 ± 0,05	75,74
5 Frakcija	16,41 ± 0,32	12,16 ± 0,11	2,33 ± 0,00	6,55 ± 0,04	62,35
6 Frakcija	15,27 ± 0,15	6,75 ± 0,14	3,02 ± 0,10	6,71 ± 0,02	68,44

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN.

3.2. Vyšnių išspaudų dalelių dydis ir jų pasiskirstymas

Vyšnių dalelių dydžio matavimo rezultatai pateikiami 6 lentelėje. Dalelių dydis nustatytas pagal paviršiaus plotą ($d_{3,2}$), kuris parodo, kad didžiausias dalelių dydis buvo 53,32 μm (5 F), mažiausias – 24,50 μm (4 F). Didesnis paviršiaus plotas gaunamas tuomet, kai terpėje yra mažiau didesnio dydžio ar daugiau mažesnio dydžio dalelių. Pagal gautus rezultatus ir atsižvelgiant į dalelių pasiskirstymo grafiką (žr. 15 pav.) matyti, kad 5 frakcijos dalelių dydis akivaizdžiai skiriasi nuo kitų frakcijų nustatytų verčių. Tai parodo, kad 5 frakcijoje yra daugiausiai didesnio dydžio dalelių,

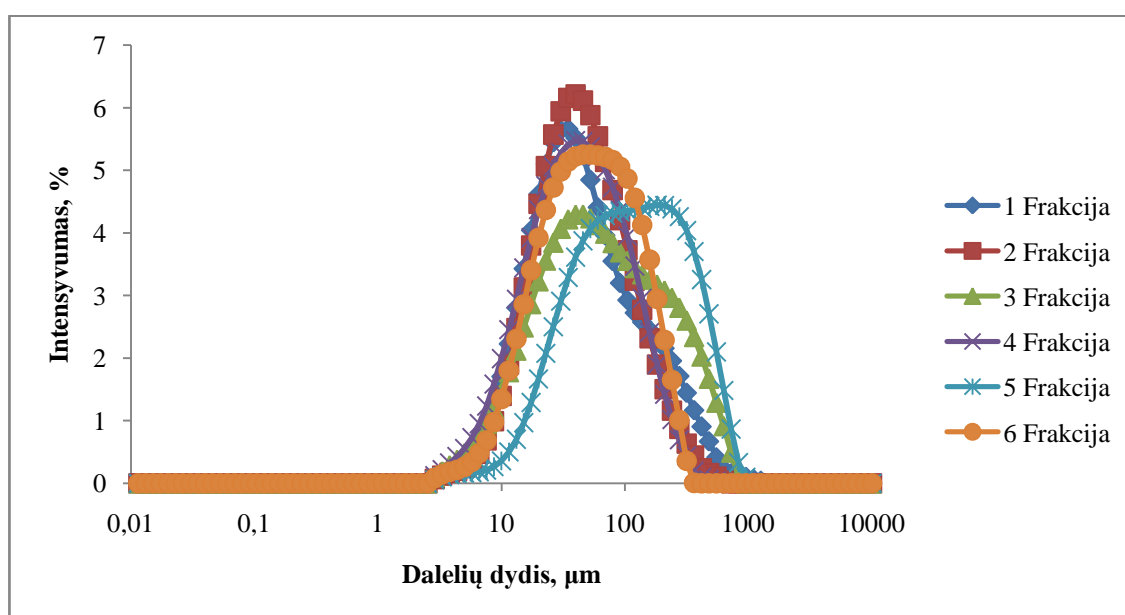
kurios ir padidino paviršiaus plotą bei tūrį (gautos maksimalios vertės). Vertinant vyšnių išspaudų dalelių dydį pagal tūrį ($d_{4,3}$) matyti, kad reikšmės kito nuo 57,02 μm (4 F) iki 157,09 μm (5 F).

6 lentelė. Vyšnių dalelių dydžio nustatymas

Bandinys	Dalelių dydis pagal tūrį [$d_{4,3}$], μm	Dalelių dydis pagal paviršiaus plotą [$d_{3,2}$], μm	Span faktorius
1 Frakcija	71,39 \pm 3,72	26,85 \pm 0,57	4,72 \pm 0,58
2 Frakcija	61,15 \pm 1,84	28,46 \pm 0,18	2,97 \pm 0,07
3 Frakcija	111,72 \pm 4,85	30,83 \pm 0,59	4,95 \pm 0,19
4 Frakcija	57,02 \pm 1,90	24,50 \pm 0,30	3,00 \pm 0,04
5 Frakcija	157,09 \pm 1,43	53,32 \pm 0,02	3,43 \pm 0,06
6 Frakcija	66,17 \pm 0,53	30,19 \pm 0,29	2,83 \pm 0,03

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės \pm SN.

Pateiktoje diagramoje (žr. 15 pav.) pavaizduotas vyšnių išspaudų dalelių pasiskirstymas. Visų frakcijų dalelės buvo paskirstytos vandens terpėje. 1 frakcijos dalelės pasiskirsto intervale nuo 2,88 μm iki 1258,93 μm , 2 frakcijos – 2,88–630,96 μm , 3 frakcijos – 2,88–831,76 μm , 4 frakcijos – 2,88–630,96 μm , 5 frakcijos – 2,88–954,99 μm , 6 frakcijos – 2,88–363,08 μm . Iš rezultatų matyti, kad visų frakcijų dalelių pasiskirstymo pradinė reikšmė – 2,88 μm ir visų frakcijų dalelių dydis pasiskirsto vienoje plačioje smailėje. Iš grafiko matyti, jog 1–4 ir 6 frakcijose daugiausiai buvo 30–100 μm dydžio dalelių, kai 5 frakcijoje vyravo 60–200 μm dalelės. 2 frakcijos dalelės sudarė didžiausią intensyvumo lygį (6,15 %) lyginant su visomis šešiomis frakcijomis. Gauti rezultatai rodo, kad gaunamas heterogeninių dalelių mišinys. Dalelių dydžio skirtumus galėjo lemti netolygus malimo ir homogenizavimo (dalelės sukibo į didesnes dėl didesnio aliejaus kiekio joje (5 F)) procesas.



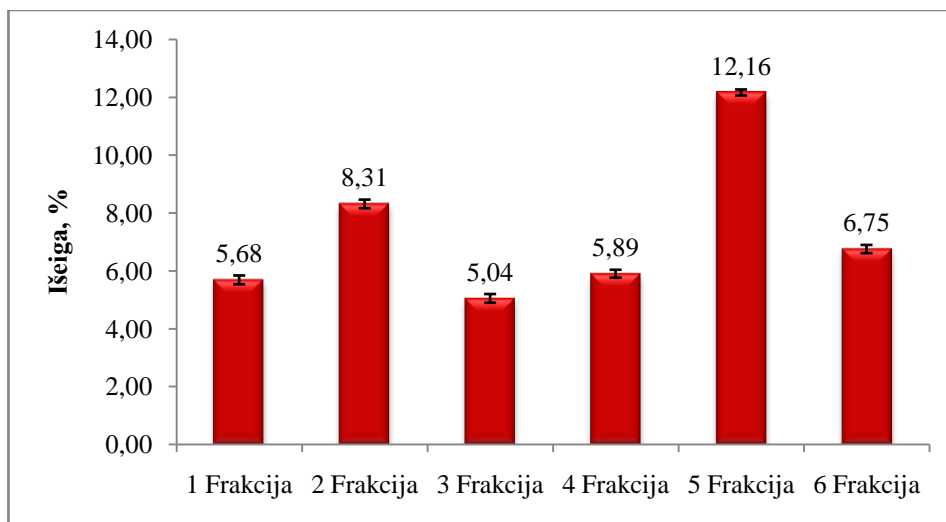
15 pav. Vyšnių išspaudų dalelių pasiskirstymas

Palyginti šiuos rezultatus su literatūroje pateikiamais kol kas nėra galimybės, nes niekas iki šiol nėra nustatęs dalelių dydžio kietai žaliavai.

3.3. Vyšnių išspaudų ekstrakcija Soksleto metodu ir gautų ekstraktų/liekanų eksperimentiniai tyrimai

3.3.1. Soksleto ekstrakcijos metu gautos išeigos

Vyšnių išspaudų frakcijomis buvo atlikta Soksleto ekstrakcija naudojant heksaną. Eksperimento metu gautos ekstraktų išeigos pateikiamos 16 paveiksle.



16 pav. Vyšnių ekstraktų išeigos gautos po Soksleto ekstrakcijos

Iš gautų rezultatų matyti, kad didžiausia išeiga gaunama iš 5 frakcijos (12,16 %), o tam įtakos galėjo turėti tai, jog šioje frakcijoje yra gana didelis kiekis sutraiškytų kauliukų branduolių, kuriuose gausu aliejaus. Mažiausia išeiga gauta iš 3 frakcijos 5,04 %. Lyginant tarpusavyje visas 6 vyšnių išspaudų frakcijas matyti, kad 2 F ir 5 F nustatyta didžiausia išeiga. Soksleto ekstrakcijos efektyvumas priklauso nuo žaliavos matricos, sudėties ir dalelių dydžio. Esant smulkiems kauliukų lukštams, branduoliams ar smulkioms žaliavos dalelėms didėja ekstrahuojamas paviršiaus plotas ir taip pasiekama didesnė išeiga. *Górnaš* ir kiti (2016) atliko 6 skirtingų vyšnių veislių (Tamaris, Zentenes, Harito novskaya, Latvijas Zemais, Shokoladnica ir Bulatnikovskaya) kauliukų branduolių ekstrakciją su heksanu ir nustatė, jog išeiga kito nuo 17,5 iki 37,1 % [118]. Lyginant literatūroje pateiktus rezultatus su darbe gautais duomenimis pastebima, kad išeigos smarkiai skyrėsi. Tai gali būti siejama su pasirinktomis vyšnių veislėmis bei žaliava (vyšnių kauliukų branduoliai/vyšnių išspaudos), kuri buvo naudota ekstrakcijai. Pasirinktas ekstrakcijos metodas taip pat gali turėti įtakos išeigai. Iš šešių veislių, kurias tyrė mokslininkų grupė *Górnaš* ir kiti (2016), tik iš Tamario veislės vyšnių branduolių gauta išeiga (17,5 %) buvo artima vyšnių 5 frakcijos išeigai (12,16 %). Šios išeigų vertės galimai yra artimos dėl to kad, Tamaris veislė pasižymi mažesniu branduolių aliejingumu nei kitos veislės, o 5-oje vyšnių frakcijoje yra likę daugiau priemaišų (branduolių).

3.3.2. Ekstraktų ir ekstrakcijos liekanų po Soksleto antioksidacinio potencialo įvertinimas

Ekstraktų ir ekstrakcijos liekanų gautų po Soksleto ekstrakcijos antioksidacinis aktyvumas buvo įvertintas ABTS⁺ ir ORAC metodais, o bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) nustatytas pritaikant *Folin-Ciocalteu* metodiką. BFJK (mg GRE/g) ir antioksidacinis aktyvumas (mg TE/g) išreikštas grame ekstrakto/bandinio ir grame sausų medžiagų. Rezultatai pateikiami 7 ir 8 lentelėse.

7 lentelė. Vyšnių ekstraktų gautų po Soksleto ekstrakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Bandinys	BFJK, mg GRE/g ekstrakto	BFJK, mg GRE/g SM	ABTS ⁺⁺ , mg TE/g ekstrakto	ABTS ⁺⁺ , mg TE/g SM	ORAC, mg TE/g ekstrakto	ORAC, mg TE/g SM
1 Frakcija	15,62 ± 0,50	0,89 ± 0,03	2,81 ± 0,14	0,16 ± 0,01	26,16 ± 0,35	1,49 ± 0,02
2 Frakcija	14,08 ± 0,22	1,17 ± 0,02	2,49 ± 0,08	0,21 ± 0,01	19,29 ± 0,57	1,60 ± 0,05
3 Frakcija	14,92 ± 0,34	0,75 ± 0,02	2,30 ± 0,12	0,12 ± 0,01	25,18 ± 0,75	1,27 ± 0,04
4 Frakcija	15,31 ± 0,21	0,90 ± 0,01	3,79 ± 0,15	0,22 ± 0,01	21,84 ± 0,98	1,29 ± 0,06
5 Frakcija	10,00 ± 0,38	1,22 ± 0,05	0,57 ± 0,05	0,07 ± 0,01	19,95 ± 1,11	2,43 ± 0,13
6 Frakcija	11,67 ± 0,22	0,79 ± 0,01	3,39 ± 0,24	0,23 ± 0,02	27,94 ± 0,68	1,89 ± 0,05

Nurodytos vidutinės penkių/šešių pakartojimų vertės ± SN.

Ekstraktuose po Soksleto ekstrakcijos BFJK kito 10,00–15,62 mg GRE/g ekstrakto ribose. Didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas 1 frakcijoje (15,62 mg GRE/g ekstrakto), tai buvo stambiausia frakcija. Mažiausiu bendru fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo 5 frakcijos ekstraktas (10,00 mg GRE/g ekstrakto). Literatūroje nėra duomenų apie vyšnių išspaudų ekstraktų antioksidacinį įvertinimą atlikus Soksleto ekstrakciją su heksanu, todėl palyginti kol kas nėra galimybės.

Radikalo blukinimo ABTS⁺⁺ metodu nustatytas didžiausias antioksidacinis aktyvumas 4 frakcijoje (3,79 mg TE/g ekstrakto), mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo 5 frakcija (0,57 mg TE/g ekstrakto). Išmatavus deguonies radikalų surišimo gebą (ORAC) bandinių vertės kito nuo 19,29 iki 27,94 mg TE/g ekstrakto. Didžiausia surišimo geba pasižymėjo smulkiausias 6 frakcijos ekstraktas, mažiausia – 2 frakcijos.

8 lentelė. Vyšnių liekanų gautų po Soksleto ekstrakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Bandinys	BFJK, mg GRE/g bandinio	BFJK, mg GRE/g SM	ABTS ⁺⁺ , mg TE/g bandinio	ABTS ⁺⁺ , mg TE/g SM	ORAC, mg TE/g bandinio	ORAC, mg TE/g SM
1 Frakcija	14,48 ± 1,00	13,66 ± 0,94	57,82 ± 5,91	54,53 ± 5,57	23,04 ± 1,24	21,73 ± 1,17
2 Frakcija	9,77 ± 0,55	8,96 ± 0,50	37,52 ± 3,36	34,40 ± 3,08	25,21 ± 2,06	23,12 ± 1,89
3 Frakcija	9,37 ± 0,62	8,90 ± 0,59	48,54 ± 1,58	46,09 ± 1,50	37,34 ± 2,36	35,46 ± 2,24
4 Frakcija	11,84 ± 0,88	11,14 ± 0,83	43,22 ± 2,17	40,67 ± 2,04	39,23 ± 2,74	36,92 ± 2,58
5 Frakcija	20,70 ± 2,03	18,18 ± 1,78	85,01 ± 1,34	74,67 ± 1,18	34,00 ± 3,28	29,87 ± 2,88
6 Frakcija	27,43 ± 1,65	25,58 ± 1,54	103,14 ± 2,06	96,18 ± 1,92	33,11 ± 0,34	30,88 ± 0,32

Nurodytos vidutinės penkių/šešių pakartojimų vertės ± SN.

Vyšnių išspaudų liekanose po Soksleto ekstrakcijos BFJK kito 9,37–27,43 mg GRE/g bandinio intervale. Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas 6 frakcijos liekanoje (27,43 mg GRE/g bandinio). Tarp 2 ir 3 frakcijos nebuvo pastebėtas reikšmingas skirtumas, kur BFJK atitinkamai siekė 9,77 ir 9,37 mg GRE/g bandinio. Mažiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas 3 frakcijos liekanoje.

Radikalo blukinimo ABTS⁺⁺ metodu nustatytas didžiausias antioksidacinis aktyvumas 6 frakcijos liekanoje (103,14 mg TE/g bandinio). Beveik trigubai mažesniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo 2 frakcijos liekana (37,52 mg TE/g bandinio). 3 ir 4 frakcijos tarpusavyje skyrėsi labai

nežymiai, atitinkamai 48,54 ir 43,22 mg TE/ g bandinio. 1 frakcijos liekana (57,82 mg TE/g bandinio) pasižymėjo beveik dvigubai mažesniu antioksidaciniu aktyvumu lyginant su 6 F.

Matuojant ORAC, didžiausia deguonies radikalų surišimo geba pasižymėjo 4 frakcijos liekana (39,23 mg TE/g bandinio), o mažiausiu – 1 (23,04 mg TE/g bandinio). Lyginant antioksidacinio aktyvumo vertes tarpusavyje artimiausios vertės nustatytos tarp 1 (23,04 mg TE/g bandinio) ir 2 (25,21 mg TE/g bandinio) frakcijų liekanų, taip pat tarp 3 (37,34 mg TE/g bandinio) ir 4 (39,23 mg TE/g bandinio) bei tarp 5 (34,00 mg TE/g bandinio) ir 6 (33,11 mg TE/g bandinio) frakcijų liekanų. Stebint tokią tendenciją, galima sakyti, kad tarp sudėtimi panašių frakcijų (įvertinant išspaudų/kauliukų lukštų/branduolių kiekį) yra gaunamas panašus antioksidacinis aktyvumas.

3.3.3. Bendro karotinoidų kiekio analizė

Karotinoidai yra pigmentiniai junginiai, labai paplitę gamtoje. Karotinoidų spalva kinta nuo geltonos iki raudonos. Ši junginių klasė aptinkama augalų valgomosiose ir nevalgomoiose dalyse [114]. Kadangi karotinoidai yra lipofiliniai junginiai, šių junginių ekstrakcija buvo atliekama naudojant heksaną. Nustatytas bendras karotinoidų kiekis (BKK) vyšnių ekstraktuose po Soksleto ekstrakcijos pateikiamas 9 lentelėje. BKK išreikštas mg β -karoteno grame ekstrakto arba grame sausos medžiagos.

9 lentelė. Bendras karotinoidų kiekis vyšnių ekstraktuose, gautuose po Soksleto ekstrakcijos

Bandinys	BKK, mg β -karoteno/g ekstrakto	BKK, mg β -karoteno/g SM
1 Frakcija	1,41 ± 0,07	0,08 ± 0,00
2 Frakcija	0,79 ± 0,03	0,07 ± 0,00
3 Frakcija	1,07 ± 0,00	0,05 ± 0,00
4 Frakcija	1,12 ± 0,02	0,07 ± 0,00
5 Frakcija	0,56 ± 0,00	0,07 ± 0,00
6 Frakcija	1,93 ± 0,04	0,13 ± 0,00

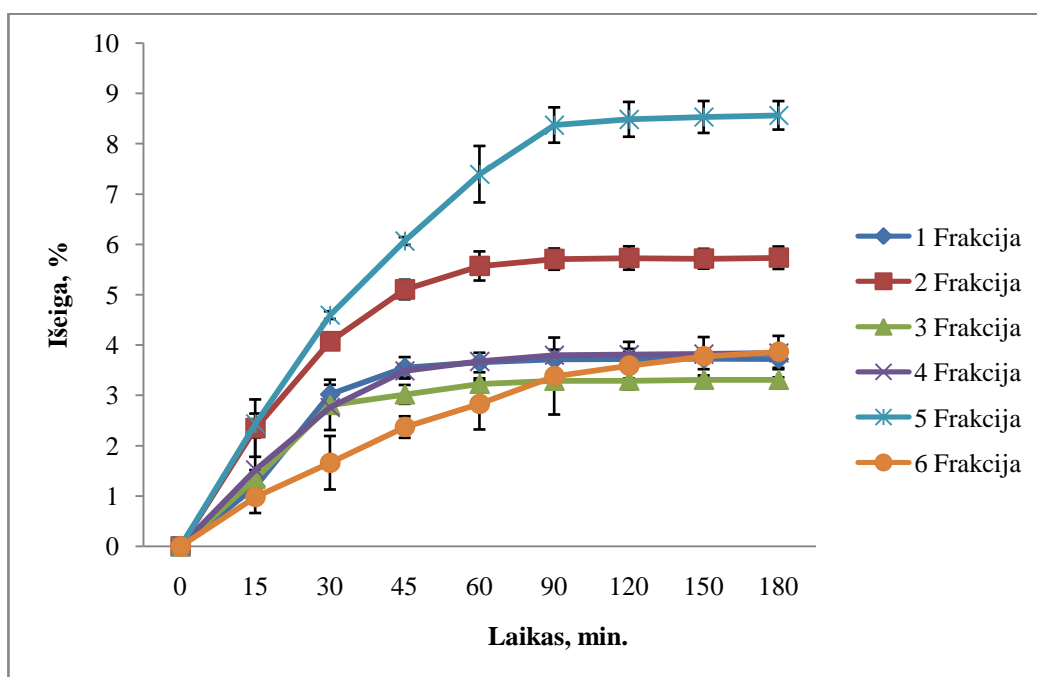
Nurodytos vidutinės keturių pakartojimų vertės ± SN.

Iš gautų duomenų matyti, kad bendras karotinoidų kiekis vyšnių ekstraktuose kito nuo 0,56 iki 1,93 mg β -karoteno/g ekstrakto. Labai artimas BKK buvo nustatytas tarp 3 ir 4 frakcijų, atitinkamai 1,07 ir 1,12 mg β -karoteno/g ekstrakto. Didžiausias jų kiekis gautas 6 (smulkausioje) frakcijoje – 1,93 mg β -karoteno/g ekstrakto, mažiausias – 5 frakcijoje (0,56 mg β -karoteno/g ekstrakto). 1-oje, 3-oje, 4-oje ir 6-oje frakcijose BKK viršijo 1 mg β -karoteno/g ekstrakto. *Górnaš* ir kiti (2016) nustatė, kad bendras karotinoidų kiekis vyšnių kauliukuose buvo 0,51-1,75 mg/100 g aliejaus [118]. Palyginus literatūroje pateiktus duomenis su šiame darbe gautais rezultatais (0,56–1,93 mg β -karoteno/g ekstrakto) pastebimi dideli skirtumai. Atliktas eksperimentas parodė, kad karotinoidai yra kaupiami ne tik vyšnių kauliukų branduoliuose, tačiau ir pačiose išspaudose (tyrimo metu naudotose frakcijose tik nedidelę dalį sudarė branduoliai). Tokiems dideliems skirtumams vertinant bendrą karotinoidų kiekį galėjo turėti įtakos naudoti skirtingi ekstrakcijos metodai, sąlygos ir rezultatų apskaičiavimo metodika. Žinoma būtina paminėti, kad pats tiriamasis objektas (vyšnios/jų išspaudos arba kauliukai), vyšnių auginimo sąlygos bei pasirinkta veislė taip pat gali turėti įtakos gaunamiems duomenims.

3.4. Vyšnių išspaudų ekstraktacija SKE–CO₂ metodu ir gautų ekstraktų/liekanų eksperimentiniai tyrimai

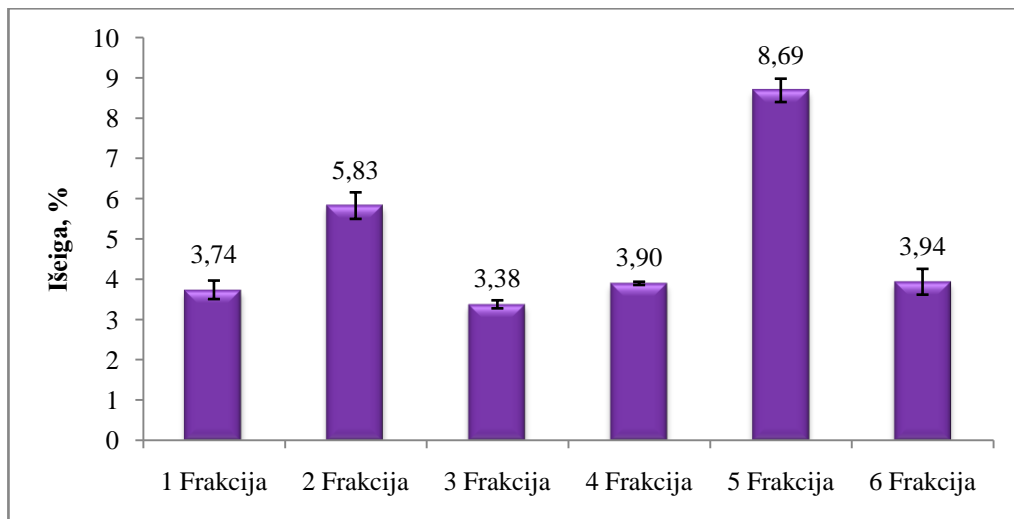
3.4.1. Superkriazinė ekstraktacija anglies dioksidu (SKE–CO₂)

Superkriazinė ekstraktacija anglies dvideginiu buvo vykdyta su visomis 6-iomis vyšnių išspaudų frakcijomis. SKE–CO₂ optimalios sąlygos buvo pasirinktos 42,4 MPa slėgis ir 53 °C temperatūra. Ekstrakcijos laikas nustatytas eksperimentiškai, analizuojant SKE–CO₂ kinetiką palaikant pastovų anglies dvideginio srautą (2 l/min.). Ekstrakcijų kinetinės kreivės buvo išreikštos ekstrakto išeigos priklausomybe nuo laiko (žr. 17 pav.). Eksperimento pradžioje ekstrakto išeiga buvo matuojama kas 15 min., po 60 min. matavimai buvo atliekami kas 30 min. Eksperimentas buvo laikomas baigtu, kai ekstraktacijos išeiga nusistovėjo.



17 pav. Vyšnių ekstraktų kinetinės kreivės vykdant SKE–CO₂

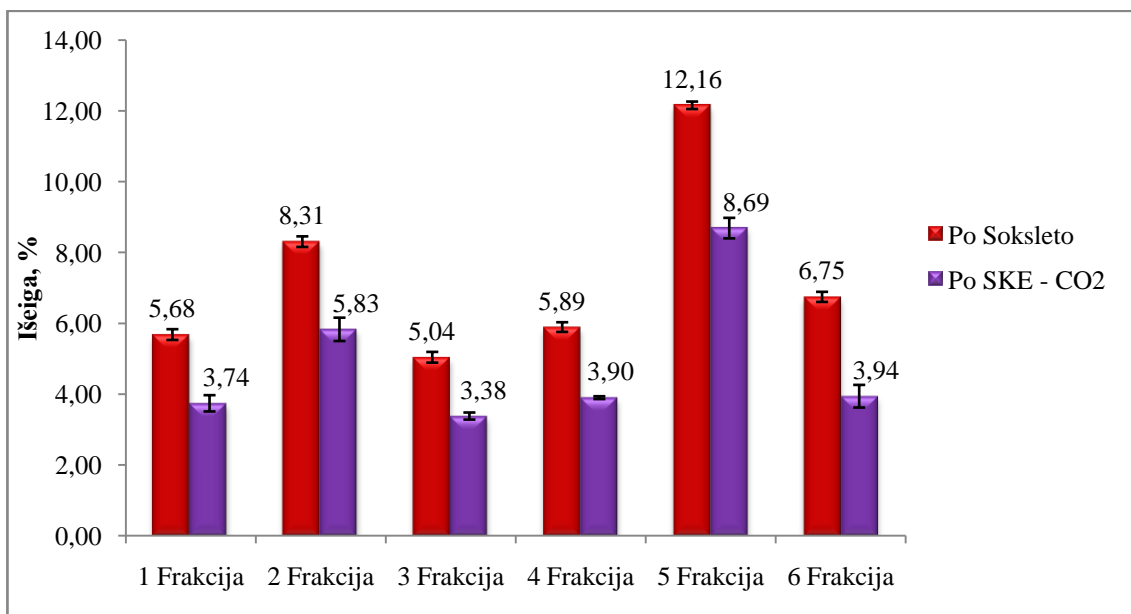
Iš gautų kinetikos kreivių matyti, kad ekstraktacijos išeiga ženkliai nustoja kilusi praėjus 60 min. 1–4 frakcijose, tačiau 5 ir 6 frakcijose didžiausia vertė buvo pasiekta praėjus 90 min. Visų 6 frakcijų išeiga nusistovėjo pasiekus 180 min. Esant tokioms eksperimento sąlygoms (42,4 MPa, 53 °C, 180 min.) gautos ekstraktų išeigos pateiktos 18 paveiksle.



18 pav. Vyšnių ekstraktų išeigos gautos po SKE–CO₂

Iš atlikto SKE–CO₂ eksperimento duomenų matyti, kad išeiga tarp skirtingų vyšnių frakcijų kito nuo 3,38 iki 8,69 %. Didžiausia išeiga gauta 5 frakcijoje (8,69 %) dėl joje likusio didžiausio kiekio kauliukų branduolių. Iš 2 frakcijos gauta išeiga (5,83 %) buvo beveik 1,5 karto mažesnė lyginant su didžiausia reikšme. O iš 1 F (3,74 %), 3 F (3,38 %), 4 F (3,90 %) ir 6 F (3,94 %) gautos išeigos buvo labai artimose vertėse lyginant tarpusavyje, tačiau dvigubai mažesnės nei 5 frakcijos.

Palyginus SKE–CO₂ ir Soksleto ekstrakcijų išeigas (žr. 19 pav.) pastebima, kad bendra išeigos pokyčių tendencija atsikartojo, nors po Soksleto ekstrakcijos išeigos buvo didesnės.



19 pav. Ekstraktų, gautų po Soksleto ekstrakcijos ir SKE–CO₂, išeigų palyginimas

Mokslinėje literatūroje buvo pateikta trešnių (*Prunus avium*) SKE–CO₂ (25 MPa, 60 min., 50 °C) ekstrakcijos išeiga, kuri siekė 0,5 % [119]. Lyginant literatūroje pateiktą išeigą su eksperimento metu gautomis (3,38–8,69 %) pastebimas ženklus skirtumas tarp jų. Didesnę išeigą galėjo lemti ekstrakcijos metu naudotas didesnis slėgis bei ilgesnė trukmė. Taip pat įtakos turėjo ir išspaudų sudėtis, nes visose frakcijose buvo kauliukų branduolių, kurie yra labai aliejingi.

3.4.2. Ekstraktų ir ekstrakcijos liekanų po SKE–CO₂ antioksidacinio potencialo įvertinimas

Ekstraktų ir ekstrakcijos liekanų gautų po SKE–CO₂ antioksidacinis aktyvumas įvertintas tokiais pačiais metodais kaip aprašyta anksčiau (žr. 3.3.2. skyrius). BFJK (mg GRE/g) ir antioksidacinis aktyvumas (mg TE/g) išreikštas grame ekstrakto/bandinio bei grame sausų medžiagų (SM). Rezultatai pateikiami 10 ir 11 lentelėje.

10 lentelė. Vyšnių ekstraktų gautų po SKE–CO₂ antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Bandinys	BFJK, mg GRE/g ekstrakto	BFJK, mg GRE/g SM	ABTS ⁺⁺ , mg TE/g ekstrakto	ABTS ⁺⁺ , mg TE/g SM	ORAC, mg TE/g ekstrakto	ORAC, mg TE/g SM
1 Frakcija	8,75 ± 0,22	0,33 ± 0,01	4,26 ± 0,10	0,16 ± 0,00	54,92 ± 2,73	2,06 ± 0,10
2 Frakcija	8,19 ± 0,33	0,48 ± 0,02	4,35 ± 0,34	0,25 ± 0,02	36,85 ± 1,97	2,15 ± 0,11
3 Frakcija	7,94 ± 0,63	0,27 ± 0,02	6,37 ± 0,22	0,22 ± 0,01	54,53 ± 1,42	1,84 ± 0,05
4 Frakcija	7,86 ± 0,47	0,31 ± 0,02	4,85 ± 0,13	0,19 ± 0,01	58,99 ± 3,11	2,30 ± 0,12
5 Frakcija	8,17 ± 0,12	0,71 ± 0,01	1,72 ± 0,15	0,15 ± 0,01	35,12 ± 1,60	3,05 ± 0,14
6 Frakcija	8,64 ± 0,34	0,34 ± 0,01	2,61 ± 0,17	0,10 ± 0,01	95,49 ± 4,92	3,76 ± 0,19

Nurodytos vidutinės penkių/šešių pakartojimų vertės ± SN.

Ekstraktuose po SKE–CO₂ bendras fenolinių junginių kiekis kito nuo 7,86 iki 8,75 mg GRE/g ekstrakto. Didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas ekstrakto, gautame iš 1 frakcijos išspaudų (8,75 mg GRE/g ekstrakto), kurios buvo stambiausios. Mažiausiu fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo ekstraktas, gautas iš 4 frakcijos (7,86 mg GRE/g ekstrakto). BFJK labai mažai skyrėsi lyginant visas frakcijas tarpusavyje, tai rodo kad ekstraktai gauti po superkrizinės ekstrakcijos buvo panašaus aktyvumo nepriklausomai nuo to, kokia buvo frakcijų sudėtis. Palyginus gautų ekstraktų BFJK su literatūroje pateikiamais rezultatais pastebimas labai didelis skirtumas. *Adil* ir kiti (2008) atliko SKE–CO₂ ekstrakciją su vyšnių išspaudomis papildomai pridedant etanolio (14, 17 ir 20 %) modifikatoriaus ir nustatė BFJK, kuris siekė tik 0,16–0,54 mg GRE/g ekstrakto [120]. Nors *Adil* ir kitų (2008) atliktame tyrime buvo naudojamas modifikatorius, kuris turėjo padidinti tirpiklio poliškumą bei pagerinti bioaktyvių junginių išsiskyrimą, vis dėlto nebuvo gautas toks fenolinių junginių kiekis, koks nustatytas vyšnių išspaudų frakcijų ekstraktuose po SKE–CO₂. Tokius skirtumas tarp *Adil* ir kitų (2008) bei vyšnių frakcijų atliktų eksperimentų rezultatų galėjo lemti vyšnių išspaudų frakcijų sudėtis, nes jose buvo likę kauliukų branduolių, kurie taip pat kaip ir išspaudos savo sudėtyje turi bioaktyvių junginių.

Didžiausias antioksidacinis aktyvumas ABTS⁺⁺ radikalo blukinimo metodu nustatytas 3 frakcijoje (6,37 mg TE/g ekstrakto), mažiausias – 5 frakcijoje (1,72 mg TE/g ekstrakto). Iš gautų rezultatų matyti, kad 5 ir 6 frakcijos pasižymėjo 2–3 kartais mažesniu antioksidaciniu aktyvumu lyginant su 3 frakcija, ir atitinkamai siekė 1,72 ir 2,61 mg TE/g ekstrakto. Išmatavus deguonies radikalų surišimo gebą (ORAC) vertės kito nuo 35,12 iki 95,49 mg TE/g ekstrakto. Didžiausia surišimo geba pasižymėjo smulkiausia 6 frakcija, mažiausiu – 5 frakcija.

Palyginus lipofilinių ekstraktų gautų skirtingais metodais (Soksleto ekstrakcija ir SKE–CO₂) antioksidacinį potencialą matyti, kad visų frakcijų Soksleto ekstraktai pasižymėjo didesniu BFJK, tačiau mažesniu aktyvumu, vertinant ABTS⁺⁺ ir ORAC metodais. Tokoferoliai ir karotinoidai yra pagrindiniai riebaluose tirpūs antioksidantai, kurie slopina laisvųjų radikalų veiklą. Įvertinus bendrą

karotinoidų kiekį (žr. 9 ir 14 lentelės) matyti, kad daugiau šių junginių nustatyta ekstraktuose po SKE–CO₂ nei po Soksleto ekstrakcijos visose frakcijose. Manoma, kad didesnis tokoferolių kiekis išgaunamas taikant superkriazinę ekstrakciją nei tradicinę Soksleto ekstrakciją, todėl galimai dėl didesnio tiek tokoferolių, tiek karotinoidų kiekio SKE–CO₂ ekstraktuose nustatytas ir didesnis antioksidacinis potencialas.

11 lentelė. Vyšnių išspaudų ir liekanos, gautos po SKE–CO₂, antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Bandinys	BFJK, mg GRE/g bandinio	BFJK, mg GRE/g SM	ABTS ⁺⁺ , mg TE/g bandinio	ABTS ⁺⁺ , mg TE/g SM	ORAC, mg TE/g bandinio	ORAC, mg TE/g SM
Prieš SKE–CO ₂						
1 Frakcija	14,16 ± 1,56	13,24 ± 1,46	44,31 ± 2,68	41,44 ± 2,50	17,99 ± 1,16	16,83 ± 1,09
2 Frakcija	8,76 ± 0,71	8,23 ± 0,67	39,43 ± 2,99	37,03 ± 2,80	16,42 ± 1,26	15,42 ± 1,18
3 Frakcija	11,61 ± 0,53	10,94 ± 0,50	35,80 ± 2,18	33,73 ± 2,06	22,61 ± 1,34	21,30 ± 1,26
4 Frakcija	11,36 ± 0,35	10,71 ± 0,33	53,42 ± 5,78	50,35 ± 5,45	16,85 ± 1,09	15,88 ± 1,03
5 Frakcija	12,64 ± 1,19	11,81 ± 1,11	51,09 ± 3,18	47,75 ± 2,97	49,48 ± 1,64	46,24 ± 1,53
6 Frakcija	25,59 ± 1,53	23,87 ± 1,43	106,24 ± 5,55	99,12 ± 5,18	19,29 ± 1,32	18,00 ± 1,23
Po SKE–CO ₂						
1 Frakcija	15,83 ± 0,80	15,24 ± 0,77	52,42 ± 2,36	50,45 ± 2,27	34,52 ± 2,82	33,23 ± 2,71
2 Frakcija	7,35 ± 0,78	6,92 ± 0,73	33,84 ± 1,70	31,86 ± 1,60	14,26 ± 1,23	13,43 ± 1,16
3 Frakcija	8,85 ± 0,70	8,55 ± 0,68	33,31 ± 0,46	32,18 ± 0,44	17,82 ± 0,45	17,22 ± 0,43
4 Frakcija	11,70 ± 0,59	11,24 ± 0,57	45,26 ± 1,91	43,50 ± 1,84	13,57 ± 0,36	13,04 ± 0,35
5 Frakcija	13,31 ± 0,54	12,15 ± 0,49	74,15 ± 6,15	67,71 ± 5,62	25,78 ± 2,41	23,54 ± 2,20
6 Frakcija	22,52 ± 0,80	21,63 ± 0,77	101,51 ± 7,56	97,51 ± 7,26	37,12 ± 2,69	35,66 ± 2,58

Nurodytos vidutinės penkių/šešių pakartojimų vertės ± SN.

Vyšnių išspaudose prieš ekstrakciją BFJK siekė 8,23–23,87 mg GRE/g SM. Didžiausiu fenolinių junginiu kiekiu pasižymėjo 6 frakcija (23,87 mg GRE/g SM). Verta paminėti, kad 6 F – smulkiausia frakcija, kurioje buvo didžiausia dalis vyšnių išspaudų ir mažiausia dalis priemaišų (kauliukų lukštų ir/arba branduolių). 1-oje, 3-oje, 4-oje ir 5-oje frakcijose nustatytos labai panašios BFJK vertės lyginant jas tarpusavyje. Mažiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas 2 frakcijoje (8,23 mg GRE/g SM). Panašius rezultatus gavo ir *Toydemir* ir kiti (2013), jog vyšniose BFJK siekė 9,22 mg GRE/g SM [121].

ABTS⁺⁺ radikalo blukinimo metodu didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas 6 frakcijoje (99,12 mg TE/g SM). Trigubai mažesniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo 3 frakcija (33,73 mg TE/g SM). *Aneta* ir kiti (2014) atliko antioksidacinio aktyvumo įvertinimą ABTS⁺⁺ metodu su 33 skirtingomis vyšnių veislių išspaudomis (Agat, Ametyst, Cesarzowa Eugenia, Dradem, Erdi Botermo, Erdi Nagygyvmvscu, Fanal, Fortuna, Groniasta, Karneol, Keleris 14, Ksiazeca, Lucyna, Lutowka, Meteor Korai, Morina, Nana, Nordstar, Pandy, Sabina, Safir, Skierka, Stevensbaer, Topas, Turgieniewka, Wanda, Wiblek, Wifor, Wilena, Wilga, Winer, Wisok, Wolynska) ir nustatė, kad jis kito nuo 3,72 iki 18,40 mmol TE/100 g SM [122]. Lyginant literatūroje pateiktus duomenis

su gautais eksperimentiniais rezultatais matyti, kad tiek naudojamos frakcijos sudėtis, tiek veislės pasirinkimas turi labai didelės įtakos antioksidaciniam aktyvumui.

Matuojant ORAC, didžiausia deguonies radikalų surišimo geba pasižymėjo 5 frakcija (46,24 mg TE/g SM), o mažiausia – 2 frakcija (15,42 mg TE/g SM). Išspaudų antioksidacinio aktyvumo vertės prieš ekstrakciją kito 15,42–46,24 mg TE/g SM intervale. Mažiausiu aktyvumu pasižymėjo 2 ir 4 frakcijos lyginant su visomis 6 frakcijomis. *Aneta* ir kiti (2014) atliko antioksidacinio aktyvumo įvertinimą vyšniose pagal ORAC metodą ir nustatė, kad jis kito nuo 8,13 iki 38,11 mmol TE/100 g SM [122].

Po SKE–CO₂ taip pat buvo analizuojamas gautų liekanų antioksidacinis aktyvumas, kuris sumažėjo lyginant su pradine žaliava. Didžiausias BFJK nustatytas 6 frakcijoje – 21,63 mg GRE/g SM, o mažiausias – 6,92 mg GRE/g SM (2 F liekanoje). Antioksidacinis aktyvumas pagal ABTS^{•+} didžiausias nustatytas 6 frakcijos liekanoje (97,51 mg TE/g SM), o mažiausiu aktyvumu pasižymėjo 2-os (31,86 mg TE/g SM) ir 3-os (32,18 mg TE/g SM) frakcijų liekanos. Matuojant ORAC nustatytas didžiausias aktyvumas 1 frakcijos (33,23 mg TE/g SM) ir 6 frakcijos (35,66 mg TE/g SM) liekanose. Mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo taip pat dvi frakcijos, tai 2 F (13,43 mg TE/g SM) ir 4 F (13,04 mg TE/g SM).

3.4.3. Riebalų rūgščių sudėties analizė

Riebalų rūgštys sudaro lipidus (riebalus) ir jos yra skirstomos į kelias grupes pagal dvigubus ryšius (jungtis) grandinėje. Sočiosios riebalų rūgštys neturi dvigubų jungčių, mononesočios – turi vieną dvigubą jungtį, polinesočios – turi 2–6 dvigubus ryšius. Vyšnių ekstraktų, gautų po superkritinės ekstrakcijos anglies dioksidu, riebalų rūgščių sudėtis pateikiama 12 lentelėje.

12 lentelė. Riebalų rūgščių sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po SKE–CO₂

Riebalų rūgštis	Riebalų rūgščių kiekis, %					
	1F	2F	3F	4F	5F	6F
1	2	3	4	5	6	7
Palmitino rūgštis (C16:0)	8,26 ± 0,00	7,99 ± 0,11	8,51 ± 0,38	9,53 ± 0,12	8,33 ± 0,56	12,94 ± 0,66
Palmitolio rūgštis (C16:1)	0,46 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,52 ± 0,00	0,26 ± 0,01	-
Heptadekano rūgštis (C17:0)	0,15 ± 0,07	-	0,11 ± 0,01	-	-	0,43 ± 0,02
Stearino rūgštis (C18:0)	1,66 ± 0,01	1,79 ± 0,04	1,86 ± 0,02	1,94 ± 0,00	1,74 ± 0,03	2,72 ± 0,03
Oleino rūgštis (C18:1n9c)	30,37 ± 0,29	34,30 ± 0,22	33,58 ± 0,09	32,61 ± 0,07	20,56 ± 0,02	27,91 ± 0,05
Linolelaidino rūgštis (C18:2n6t)	0,52 ± 0,00	0,60 ± 0,03	0,56 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,32 ± 0,01	-
Linolo rūgštis (C18:2n6c)	39,52 ± 0,30	41,40 ± 0,46	41,38 ± 0,14	40,39 ± 0,29	42,06 ± 0,24	33,54 ± 0,11

lentelės tęsinys kitame puslapyje

12 lentelės tęsinys. Riebalų rūgščių sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po SKE–CO₂

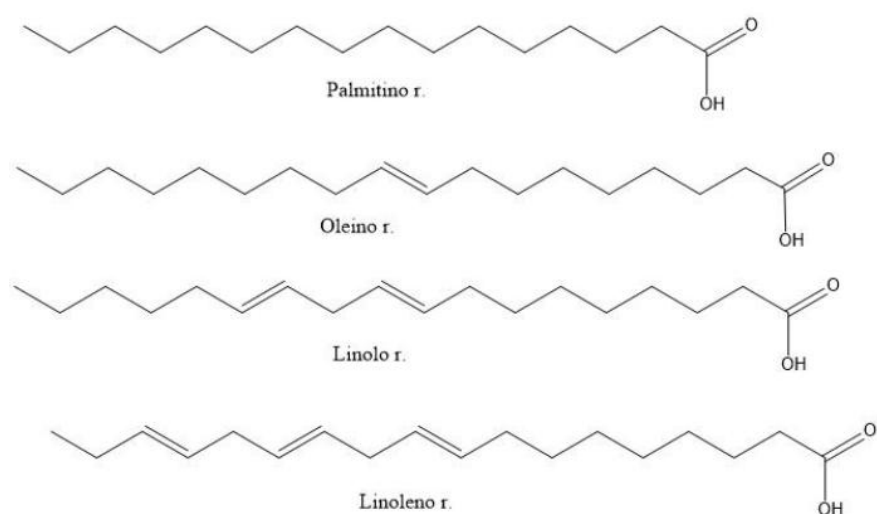
1	2	3	4	5	6	7
Arachidinė rūgštis (C20:0)	0,60 ± 0,01	0,76 ± 0,07	0,77 ± 0,03	0,69 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,92 ± 0,05
γ-Linolo rūgštis (C18:3n6)	0,93 ± 0,01	-	0,51 ± 0,00	-	9,25 ± 0,10	0,55 ± 0,00
cis-11-Eikozeno rūgštis (C20:1)	-	-	0,37 ± 0,02	0,57 ± 0,00	0,55 ± 0,05	-
Linoleno rūgštis (C18:3n3)	2,57 ± 0,01	1,16 ± 0,04	1,74 ± 0,01	3,05 ± 0,03	9,58 ± 0,01	7,45 ± 0,07
Heneikozano rūgštis (C21:0)	0,49 ± 0,01	-	0,25 ± 0,01	0,55 ± 0,02	-	2,11 ± 0,27
cis-11,14-Eikosadieno rūgštis (C20:2)	-	-	-	-	1,98 ± 0,00	-
cis-8,11,14-Eikosatrieno rūgštis (C20:3n6)	1,00 ± 0,16	-	-	-	-	-
cis-5,8,11,14,17-Eikosapentaeno rūgštis (C20:5n3)	8,40 ± 0,02	9,04 ± 0,32	6,35 ± 0,12	4,39 ± 0,00	1,08 ± 0,10	4,79 ± 0,19
Nervono rūgštis (C24:1)	-	-	1,32 ± 0,07	2,06 ± 0,04	1,36 ± 0,14	1,05 ± 0,10

Nurodytos vidutinės dviejų pakartojimų vertės ± SN, (-) – neaptiktas junginys.

Visuose ekstraktų frakcijose dominuojančios sočiosios riebalų rūgštys buvo: palmitino ir stearino, nesočios riebalų rūgštys – oleino ir linolo. Iš viso šešiolika skirtingų riebalų rūgščių (RR) buvo identifikuota paprastųjų vyšnių ekstraktuose, kuriuose didžiąją dalį sudarė nesočios riebalų rūgštys, iš kurių apie 25 % sudarė mononesočios RR, o 44 % polinesočios RR nuo viso riebalų rūgščių kiekio. Viso nustatytos 4 mononesočios RR ir 7 polinesočios RR. Mononesočias riebalų rūgštis sudarė: palmitolio rūgštis, oleino rūgštis, cis-11-eikozeno rūgštis, nervono rūgštis. Didžiausias iš mononesočių RR kiekis nustatytas oleino rūgšties (C18:1), kuris kito 20,56–34,30 % intervale. Kitų RR kiekis buvo ženkliai mažesnis. Nustatyta palmitolio riebalų rūgšties (C16:1) koncentracija visuose ekstraktuose siekė 0,26–0,52 %, išskyrus 6 F, kurioje ji nebuvo identifikuota. Panašus kiekis nustatytas ir cis-11-eikozeno rūgšties (C20:1) (0,37–0,57 %) 3-os, 4-os ir 5-os frakcijos ekstraktuose. Nervono riebalų rūgšties (C24:1) 3-oje, 4-oje, 5-oje ir 6-oje frakcijose buvo kiek daugiau nuo 1,05 iki 2,06 %. Vertinant polinesočių riebalų rūgščių sudėtį, matyti, kad daugiausiai vyšnių ekstraktuose buvo linolo riebalų rūgšties (C18:2) 33,54–42,06 %. Antra pagal kiekį buvo linoleno rūgštis (C18:3), kurios koncentracija ekstraktuose kito nuo 1,16 iki 9,58 %. Nors γ-linolo rūgšties (C18:3) koncentracija buvo labai panaši (0,51–9,25 %), tačiau ji nebuvo aptikta 2 ir 4 frakcijose. Tirtuose vyšnių ekstraktuose buvo ir tokių polinesočių riebalų rūgščių, kurių koncentracija vos siekė 1–2 %. Tarp tokių RR buvo: linolelaidino rūgštis (C18:2), kurios kiekis kito 0,32–0,60 % ribose, cis-11,14-eikosadieno rūgštis (C20:2), kuri buvo aptikta tik 5 frakcijoje (1,98 %), cis-8,11,14-eikosatrieno rūgštis (C20:3), kuri buvo identifikuota tik 1 frakcijoje (1,00 %) ir cis-5,8,11,14,17-eikosapentaeno rūgštis (C20:5), kurios kiekis siekė 1,05–2,06 %. Visuose ekstraktuose

sočių RR kiekis siekė apie 31 % nuo viso riebalų rūgščių kiekio. Tarp sočiųjų riebalų rūgščių didžiausias kiekis rastas palmitino RR (7,99–12,94 %) (C16:0), o stearino RR (1,66–2,72 %) (C18:0) kiekis buvo beveik 5 kartus mažesnis lyginant su palmitino RR. Soti heneikozano riebalų rūgštis (C21:0) buvo aptikta 1, 3, 4 ir 6 frakcijose, o jos kiekis kito nuo 0,25 iki 2,11 %. Kitos sočios riebalų rūgštys kaip, heptadekano riebalų rūgštis (C17:0 – 0,11–0,43 %) ir arachidinė riebalų rūgštis (C20:0 – 0,38–0,92 %) rastos labai mažomis koncentracijomis. Heptadekano RR buvo nustatyta ne visose vyšnių ekstraktų frakcijose, o tik 1-oje, 3-oje ir 6-oje. Iš gautų analizės rezultatų matyti, kad vyšnių ekstraktas po superkrižinės ekstrakcijos su CO₂ buvo geras nesočiųjų riebalų rūgščių šaltinis. Pagrindinės riebalų rūgščių, kurios buvo identifikuotos SKE–CO₂ ekstraktuose, struktūrinės formulės pateikiamos 20 paveiksle.

Literatūroje pateikiama duomenų, kuomet taikant skirtingus ekstrakcijos metodus, nustatoma vyšnių kauliukų aliejaus riebalų rūgščių sudėtis. Mokslininkų grupė *Górnaš* ir kiti (2016) nustatė, kad priklausomai nuo pasirinktos vyšnių veislės, kauliukų aliejaus sudėtis nekinta, tačiau randamas skirtingas riebalų rūgščių kiekis. Šio eksperimento metu buvo iširtos 6 vyšnių veislės (Bulatnikovskaya, Haritonovskaya, Latvijas Zemais, Shokoladnica, Tamaris ir Zentenes), o gauti rezultatai parodė, kad šių vyšnių kauliukų aliejus buvo geras riebalų rūgščių (palmitino (C16:0) – 5,06–7,38 %, palmitolio (C16:1) – 0,16–0,33 %, stearino (C18:0) – 2,22–3,45 %, oleino (C18:1) – 25,25–45,30 %, linolo (18:2) – 35,50–46,06 % ir arachidinės riebalų rūgšties (C20:0) – 0,95–1,38 %) šaltinis [118]. *Yilmaz* ir kiti (2013) atlikę eksperimentą nustatė, kad vyšnių kauliukų aliejuje pagrindinės riebalų rūgštys šios: palmitino (C16:0) (7,24 %), stearino (C18:0) (1,33 %), oleino (C18:1) (44,99 %), linolo (18:2) (41,81 %) ir linoleno (C18:3) (4,63 %) [70]. Abiejų mokslinių grupių duomenys labai panašūs, tačiau *Górnaš* ir kiti (2016) stearino RR nustatė apie 1,5 karto daugiau nei *Yilmaz* ir kiti (2013). *Górnaš* darbo grupė (2016) nurodė identifikavę arachidinę rūgštį (C20:0), o *Yilmaz* ir kiti (2013) nustatė linoleno RR (C18:3). Palyginus mokslininkų gautus duomenis su baigiamajame projekte pateiktais, matyti labai panašūs rezultatai. Nežymius skirtumus galėjo lemti skirtingi ekstrakcijos metodai bei jų sąlygos, žaliava, pradinis paruošimas, vyšnių auginimo sąlygos bei tyrimams naudotos vyšnių veislės.



20 pav. Riebalų rūgštys, kurios buvo identifikuotos vyšnių ekstraktuose

3.4.4. Triacilglicerolių sudėties analizė

Triacilgliceroliai (TAG) yra esterinti riebalai. Triacilglicerolius sudaro glicerolis ir prie jo prijungti trys riebalų rūgščių esteriai. TAG sudėtis vyšnių ekstraktuose po SKE–CO₂ pateikiama 13 lentelėje.

13 lentelė. Triacilglicerolių sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po SKE–CO₂

Triacilglicerolio junginys	Triacilglicerolių kiekis, %					
	1F	2F	3F	4F	5F	6F
LLLn	19,50	18,95	19,54	20,22	22,00	21,65
LnLnLn	-	-	-	-	3,19	0,52
SLO	7,62	8,20	7,74	7,83	3,00	6,07
NK1	6,62	5,58	5,66	5,68	6,29	6,82
PLS	2,89	2,90	3,09	2,95	1,36	2,82
LLnLn	3,57	2,97	3,93	4,28	11,07	7,49
OLL	18,83	19,76	18,30	18,49	14,30	15,26
PLnLn	0,70	-	0,52	0,35	2,30	0,88
PLL	4,91	4,64	4,69	4,74	6,01	6,19
OLnL	13,20	13,61	13,97	13,37	19,27	13,02
PLO	6,95	7,12	6,92	6,86	3,72	6,69
SLL	15,20	16,28	15,63	15,24	7,49	12,60

Čia: P: palmitino rūgštis; S: stearino rūgštis; O: oleino rūgštis; L: linolo rūgštis; Ln: linoleno rūgštis, (-) – neaptikta.

Pagal gautus eksperimentinius rezultatus matyti, kad lipofiliniuose vyšnių ekstraktuose buvo identifikuota 12 TAG junginių, kuriuos pagrindė sudaro penkios riebalų rūgštys (P – palmitino, S – stearino, O – oleino, L – linolo ir Ln – linoleno). Taip pat tyrimo metu buvo aptiktas vienas naujas TAG junginys. Šis triacilglicerolis (NK1), dar kol kas nėra identifikuotas literatūroje, todėl jį sudarančių riebalų rūgščių sudėtis nėra pateikiama. Didžiausias TAG kiekis vyšnių ekstraktuose buvo nustatytas šių junginių: dilinoloil-linolenoilglicerolio (LLLn – 18,95–22,00 %), oleoil-dilinoloilglicerolio (OLL – 14,30–19,76 %), oleoil-linolenoil-linoloilglicerolio (OLnL 13,02–19,27 %) ir stearoil-dilinoloilglicerolio (SLL 7,49–16,28 %). Tik 5-oje ir 6-oje vyšnių išspaudų frakcijų ekstraktuose nustatytas triacilglicerolis, kurio molekulėje visos trys riebalų rūgštys buvo vienodos (LnLnLn). LnLnLn kiekis 5 F siekė 3,19 %, o 6 F – 0,52 %. Toks didelis skirtumas galėtų būti dėl to, kad 5 F linoleno riebalų rūgšties kiekis yra didžiausias (9,58 %), o 6 frakcijoje mažesnis – 7,45 %. Kitų identifikuotų TAG junginių koncentracija vyšnių išspaudų ekstraktuose buvo mažesnė nei 12 %. Eksperimento metu identifikuojant TAG nebuvo nustatyti tokie junginiai, kurių sudėtyje būtų dvi ar trys sočios riebalų rūgštys. Tais atvejais kai į triacilglicerolio sudėtį įėjo viena soti riebalų rūgštis, iš pateiktų rezultatų matyti, kad tai – palmitino arba stearino riebalų rūgštis.

Comes ir kiti (1992) literatūroje pateikė duomenis apie trešnių kauliukų aliejaus, gauto po Soksleto ekstrakcijos, TAG sudėtį ir kiekį. Vyšnių kauliukų aliejuje buvo nustatyti LLO, LOO, OOO ir EEL triacilglicerolių junginiai, kur L – linolo riebalų rūgštis, O – oleino riebalų rūgštis, E – elaidinė riebalų rūgštis (angl. *elaidic acid*) [123]. Po vyšnių išspaudų SKE–CO₂ ekstrakcijos identifikuotas triacilglicerolio OLL kiekis (14,30–19,76 %) buvo labai panašus kaip Comes ir kitų (1992) nustatytas trešnių aliejuje (18,5 %).

3.4.5. Bendro karotinoidų kiekio analizė

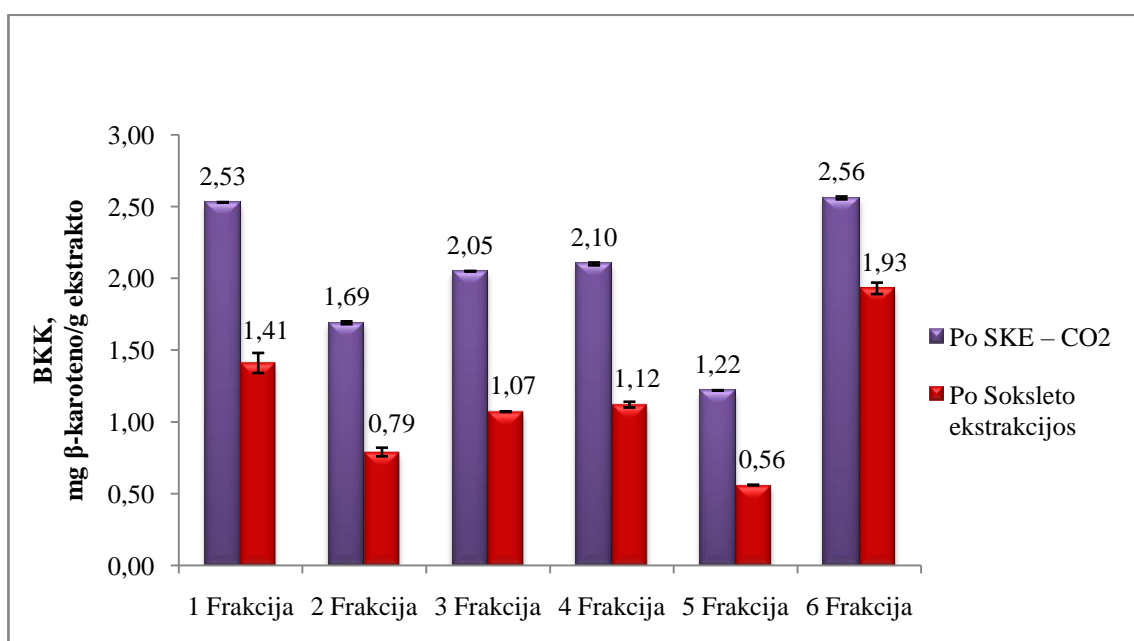
Nustatytas bendras karotinoidų kiekis (BKK) vyšnių ekstraktuose po atliktos superkrizinės ekstrakcijos anglies dvideginiu (SKE–CO₂) pateikiamas 14 lentelėje. BKK išreikštas mg β-karoteno grame ekstrakto bei grame sausų medžiagų.

14 lentelė. Bendras karotinoidų kiekis vyšnių ekstraktuose, gautuose po SKE–CO₂

Bandinys	BKK, mg β-karotino/g ekstrakto	BKK, mg β-karotino/g SM
1 Frakcija	2,53 ± 0,00	0,09 ± 0,00
2 Frakcija	1,69 ± 0,01	0,10 ± 0,00
3 Frakcija	2,05 ± 0,00	0,07 ± 0,00
4 Frakcija	2,10 ± 0,01	0,08 ± 0,00
5 Frakcija	1,22 ± 0,00	0,11 ± 0,00
6 Frakcija	2,56 ± 0,01	0,10 ± 0,00

Nurodytos vidutinės keturių pakartojimų vertės ± SN.

Iš gautų analizės duomenų matyti, kad bendras karotinoidų kiekis vyšnių ekstraktuose kito nuo 1,22 iki 2,56 mg β-karoteno/g ekstrakto. Labai panaši koncentracija nustatyta 3-oje (2,05 mg β-karoteno/g ekstrakto) ir 4-oje frakcijose (2,10 mg β-karoteno/g ekstrakto). Didžiausias karotinoidų kiekis gautas 6 frakcijoje (smulkausioje) – 2,56 mg β-karoteno/g ekstrakto, mažiausias – 5 frakcijoje (1,22 mg β-karoteno/g ekstrakto). Lyginant BKK vyšnių ekstraktuose po Soksleto ekstrakcijos ir superkrizinės ekstrakcijos anglies dvideginiu pastebima labai panaši tendencija tarp rezultatų (žr. 21 pav.). Atliktas eksperimentas parodė, kad bendras karotinoidų kiekis gautas po SKE–CO₂ buvo didesnis lyginant su Soksleto duomenimis, kai kuriais atvejais net 2 kartus (2 ir 5 frakcijos). Įvertinus išėigą ir paskaičiavus BKK kiekį gramui sausos žaliavos rezultatai buvo labai panašūs, naudojant abu ekstrakcijos būdus, o tai parodo, kad SKE-CO₂ pakankamai efektyviai išekstrahavo karotinoidus iš žaliavos.



21 pav. Bendro karotinoidų kiekio, gauto po Soksleto ekstrakcijos ir SKE–CO₂, palyginimas

3.4.6. Lakiųjų junginių sudėties analizė

Vyšnių išspaudų ekstraktai, kurių sudėtyje buvo lakiųjų aromato junginių, gauti po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu (SKE–CO₂). Atlikus ekstraktų mikroekstrakciją, viršerdvėje nustatyti 86 lakieji aromato junginiai iš kurių identifikuoti – 55 (žr. 15 lentelė), kurie priklauso įvairioms organinių junginių grupėms (aldehidams, esteriams, terpenams, ketonams ir kt.). Gauti rezultatai (lakiųjų junginių kiekis) išreikšti procentais nuo identifikuotų junginių smailių plotų sumos.

Pagrindiniai lakieji aromato junginiai, kurie buvo identifikuoti vyšnių išspaudų ekstraktuose: humulenas (angl. *humulene*), vanilinas (angl. *vanillin*), 2E,4E-dekadienalis (angl. *2E,4E-decadienal*), 2-undekanonas (angl. *2-undecanone*), nonankarboksirūgštis (angl. *nonanoic acid*), maltolis (angl. *maltol*), β-mircenas (angl. *β-myrcene*), 2,3-butandiolis (angl. *2,3-butanediol*) ir benzaldehidas (angl. *benzaldehyde*). Dominuojantis vyšnių aromato junginys 1–6 frakcijose – benzaldehidas, kurio kiekis kito nuo 8,16 iki 22,78 %. Benzaldehido kiekis mažėjimo tvarka frakcijose išsidėsto taip: didžiausias jo kiekis nustatytas 5 frakcijoje (22,78 %), labai panašiais kiekiais lyginant tarpusavyje gauta 2-oje F (15,63 %), 1-oje F (12,82 %) ir 3-oje F (11,54 %) frakcijose, o mažiausi kiekiai nustatyti 4 (9,43 %) ir 6 (8,16 %) frakcijose. β-mircenas rastas 1-oje (0,22 %), 3-oje (2,23 %), 4-oje (3,70 %) ir 6-oje (3,65 %) frakcijose, 2 F ir 5 F nebuvo aptiktas. Šio junginio nustatytas kiekis buvo antras pagal dydį, tačiau lyginant su benzaldehidu net 6 kartus mažesnis. Kitų pagrindinių lakiųjų aromato junginių (humuleno, 2E,4E-dekadienalio, vanilino, nonankarboksirūgšties, 2,3-butandiolio, 2-undekanono, maltolio) koncentracija buvo mažesnė nei 1 % nuo visų identifikuotų junginių smailių plotų sumos, o visų kitų likusių – mažesnė nei 0,01 %. 15 lentelėje pateikiami ir nežinomi junginiai, kurių kiekis didesnis nei 1 %, tačiau jie kol kas dar nėra identifikuoti.

Remiantis literatūros duomenimis, benzaldehidas laikomas pagrindiniu vyšnių lakiuoju aromato junginiu. Sun ir kiti (2010) atliko lakiųjų junginių analizę 5-ioms skirtingoms trešnių (*Prunus avium*) veislėms (Lapins, Rainier, Hongdeng, Stella ir Zhifuhong) ir nustatė, kad benzaldehidas buvo vienas iš dominuojančių junginių jose. Gauti rezultatai parodė, kad šio junginio koncentracija priklauso šiek tiek ir nuo veislės, nes benzaldehido kiekis atitinkamai jose siekė: Lapins – 17,74 %, Rainier – 13,50 %, Hongdeng – 16,77 %, Stella – 11,03 %, Zhifuhong – 2,18 % [124]. Literatūroje pateikiami duomenys yra labai panašūs ir/arba sutampa su šio darbo rezultatais.

15 lentelė. Lakiųjų aromato junginių sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po SKE–CO₂

Sulaikymo trukmė, s	Junginio pavadinimas	Sulaikymo indeksas	Sulaikymo indeksas*	Smalių plotas, %						Nuoroda
				1F	2F	3F	4F	5F	6F	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1368,7	Butilintas hidroksitoluenas	1520	1515	p	p	p	p	p	p	Waterman (2003) [125]
1347,9	Germacrenas D	1500	1497	-	-	0,02	-	-	0,08	Okamoto ir kiti (1981) [126]
1347,3	α-Bulnezenas	1499	1509	-	-	-	-	-	0,08	Waterman (2003) [125]
1334,4	Humulenas	1487	1487	-	-	0,36	0,31	-	0,87	Minyard ir kiti (1967) [127]
1306,6	Geranilacetonas	1461	1455	0,03	-	0,02	0,01	-	0,07	Waterman (2003) [125]
1302,1	E-β-Farnezenas	1457	1456	-	-	-	0,01	-	-	Waterman (2003) [125]
1294,9	Nežinomas junginys 1	1450		-	-	-	-	-	1,04	-
1294,5	Nežinomas junginys 2	1450		-	-	-	-	-	1,04	-
1282,5	Vanilinas	1439	1447	0,28	0,47	0,39	0,37	0,02	0,05	Grzybowski ir kiti (1980) [128]
1274,5	Z-β-Farnezenas	1431	1442	-	-	-	0,01	-	-	Waterman (2003) [125]
1239,4	n-tetradekanas	1399	1400	-	-	-	0,03	-	0,09	Waterman (2003) [125]
1210,3	Dekankarboksirūgštis	1373	1366	0,03	-	-	-	-	-	Waterman (2003) [125]
1194,9	2-Metilundekanalės	1360	1368	-	p	-	-	-	-	Waterman (2003) [125]
1190,7	Citronelilacetatas	1356	1352	0,01	-	-	-	-	-	Waterman (2003) [125]
1185,3	Etano rūgšties dibutilo esteris	1351	1359	-	-	-	-	-	0,01	Zulaica ir Guiochon (1963) [129]
1171,5	1-Metilnaftalenas	1339	1330	p	-	-	p	0,01	-	Kuhn (2001) [130]
1165	Metilgeranatas	1333	1324	-	-	-	0,05	-	0,03	Waterman (2003) [125]
1161,7	Metildekanoatas	1330	1325	-	-	-	-	0,02	-	Waterman (2003) [125]
1144,3	2E,4E-Dekadienalis	1316	1316	0,05	0,06	0,28	0,27	0,07	0,50	Waterman (2003) [125]

lentelės tęsinys kitame puslapyje

15 lentelės tęsinys. Lakiųjų aromato junginių sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po SKE–CO₂

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1130,2	2-Undekanonas	1303	1294	-	-	-	0,12	-	0,18	Waterman (2003) [125]
1126,1	n-tridekanas	1299	1300	-	-	-		0,01	0,10	Waterman (2003) [125]
1097,5	Nonankarboksirūgštis	1277	1276	0,03	0,38	-	0,25	-	-	Waterman (2003) [125]
1075,7	Nežinomas junginys 3	1258		-	1,72	-	0,49	-	-	-
1052,3	Nežinomas junginys 4	1238		-	-	-	-	-	1,72	-
1051,8	Nežinomas junginys 5	1238		-	-	-	-	-	1,69	-
1050,7	Nežinomas junginys 6	1237		-	-	-	-	-	1,71	-
1042,6	Metilnonanoatas	1230	1226	-	-	0,03	-	-	0,04	Waterman (2003) [125]
1036,1	Naftalenas	1225	1219	p	-	-	p	-	0,01	Oszczapowicz ir kiti (1984) [131]
1024	2E,4E-nonandienalis	1215	1212	0,02	0,05	0,01	0,01	0,01	0,06	Waterman (2003) [125]
1007,9	n- butilo eteris dietileno glikolis	1201	1193	p	0,02	-	-	-	-	Voelkel (1987) [132]
1007,3	Etiloktanoatas	1201	1197	-	-	-	-	0,05	-	Waterman (2003) [125]
986,4	Benzilo acetatas	1185	1177	0,05	0,02	0,01	0,02	-	-	Tomori ir kiti (1974) [133]
944,2	Heksilbutanoatas	1152	1156	-	-	-	0,01	-	-	Ashes ir Haken (1974) [134]
936,5	Amfetaminas	1146	1150	-	-	0,06	-	-	-	Berninger ir Möller (1977) [135]
928,2	Maltolis	1139	1130	0,13	0,13	-	0,12	-	-	Viani ir kiti (1965) [136]
916,8	Metiloktanoatas	1130	1127	-	-	0,05	-	-	0,05	Waterman (2003) [125]
894,7	Amil izovaleratas	1113	1112	-	-	-	-	-	0,05	Ashes ir Haken (1974) [134]
876,3	ρ-cimėnenas	1099	1091	-	-	-	-	-	0,01	Waterman (2003) [125]
874,5	n-undekanas	1098	1100	-	-	-	-	-	p	Waterman (2003) [125]
851,1	γ-heksalaktonas	1081	1081	0,05	-	-	-	0,06	-	Brander ir kiti (1980) [137]
830,8	Nežinomas junginys 7	1065		0,74	0,79	0,97	-	-	-	-
829,8	Nežinomas junginys 8	1065		-	-	1,14	-	-	-	-

lentelės tęsinys kitame puslapyje

15 lentelės tęsinys. Lakiųjų aromato junginių sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po SKE–CO₂

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
829,4	Nežinomas junginys 9	1064		-	1,02	-	-	-	-	-
828,9	Nežinomas junginys 10	1064		-	-	1,46	1,22	-	-	-
828,8	Nežinomas junginys 11	1064		-	1,35	1,73	1,20	-	-	-
828,5	Nežinomas junginys 12	1064		-	1,37	-	-	-	-	-
828,4	Nežinomas junginys 13	1064		-	-	-	-	1,11	-	-
827,8	Nežinomas junginys 14	1063		-	-	-	-	-	1,08	-
826,4	Nežinomas junginys 15	1062		-	15,84	15,14	12,89	13,83	-	-
825,2	Nežinomas junginys 16	1061		10,92	15,83	14,94	12,71	13,84	-	-
824,7	Nežinomas junginys 17	1061		-	-	-	-	-	11,58	-
822,5	Nežinomas junginys 18	1059		-	-	1,59	-	-	-	-
822,0	Nežinomas junginys 19	1059		-	-	-	-	-	1,27	-
808,1	1,8-cineolis	1049	1050	-	-	-	-	0,09	-	Szabolcs ir kiti (1985) [138]
806,1	β-felandrenas	1047	1056	-	-	p	-	0,09	0,01	Burns ir Tingey (1983) [139]
795,9	o-cimenas	1040	1038	-	-	-	-	0,12	0,06	Gerasimenko ir kiti (1981) [140]
787,2	1,3-dimetil-5-etilbenzenas	1033	1042	-	-	-	-	-	0,09	Tóth (1983) [141]
787,1	m-cimenas	1033	1037	-	-	p	-	0,07	-	Raina ir kiti (2003) [142]
782,6	γ-terpinenas	1030	1039	-	-	-	-	0,02	-	Pala-Paul ir kiti (2001) [143]
756,9	1,2,3-trimetilbenzenas	1011	1010	0,01	-	-	p	-	0,03	Hoekman (1993) [144]
747,2	Etilheksanoatas	1004	998	-	-	-	-	0,09	-	Waterman (2003) [125]
740,4	Fenolis	999	1002	-	0,02	-	-	-	-	Yamaguchi ir Shibamoto (1981) [145]
735,4	Nežinomas junginys 20	995		-	-	2,24	-	-	-	-
735,2	β-mircenas	995	995	0,22	-	2,23	3,70	-	3,65	Burns ir Tingey (1983) [139]
734,6	Nežinomas junginys 21	994		-	-	-	-	-	3,66	-

lentelės tęsinys kitame puslapyje

15 lentelės tęsinys. Lakiųjų aromato junginių sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po SKE–CO₂

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
733,0	Nežinomas junginys 22	993		-	-	2,23	-	-	-	-
733,0	Nežinomas junginys 23	933		-	-	-	1,84	-	-	-
732,8	Nežinomas junginys 24	933		-	-	-	-	-	3,65	-
730,5	Nežinomas junginys 25	992		0,98	-	-	9,48	-	-	-
729,5	Nežinomas junginys 26	991		-	1,48	-	-	2,16	-	-
726,4	Benzaldehidas	988	978	12,82	15,63	11,54	9,43	22,78	8,16	Korhonen ir Knuutinen (1984) [146]
725,7	Nežinomas junginys 27	988		12,82	15,53	23,15	9,45	23,08	-	-
724,6	Nežinomas junginys 28	987		12,78	-	-	-	-	-	-
724,6	Nežinomas junginys 29	987		-	-	-	9,21	1,78	-	-
724,5	Nežinomas junginys 30	987		-	-	-	-	-	8,17	-
723,9	Nežinomas junginys 31	987		-	-	-	-	-	8,15	-
723,7	Heksano rūgštis	987	981	-	-	0,18	-	-	-	Takeoka ir kiti (1996) [147]
719,5	5-metilfurfuralis	984	984	0,02	0,07	0,02	0,01	-	-	Shibamoto ir kiti (1981) [148]
709,1	Pentilpropanoatas	976	980	-	-	-	-	-	0,07	Ashes ir Haken (1974) [134]
627,3	Izobutil izobutiratas	917	911	-	-	p	p	-	p	Waterman (2003) [125]
621,3	Heptanalis	913	904	p	-	-	-	-	0,02	Minyard ir kiti (1967) [127]
586,8	Pentano rūgštis	887	883	0,08	0,02	0,04	0,02	0,09	0,21	Shashkova ir kiti (1969) [149]
582,4	1,3-dimetilbenzenas	885	886	-	-	-	-	-	p	Mitra ir kiti (1974) [150]
526,3	Izopentano rūgštis	845	835	-	-	-	-	0,01	-	Waterman (2003) [125]
462,8	2,3-butandiolis	799	789	0,19	0,27	0,22	0,22	0,25	0,11	Waterman (2003) [125]
446,4	Toluenas	788	786	-	-	0,01	-	-	-	Kuhn (2001) [130]

p – pėdsakas (<0,01 %); (-) – neaptiktas junginys; (*) – sulaikymo indeksas, pagal literatūroje pateiktus duomenis; nurodytas nežinomų junginių kiekis, kurių plotas > 1 %.

3.5. Vyšnių išspaudų ekstrakcija suspaustais skysčiais (ESS) ir gautų ekstraktų/liekanų eksperimentiniai tyrimai

3.5.1. Ekstrakcijos suspaustais skysčiais (ESS) proceso optimizavimas

3.5.1.1. Ekstrakcijos suspaustais skysčiais (ESS) eksperimentinio modelio ir optimalių ekstrakcijos sąlygų sudarymas

Anglies dvideginis (CO₂) yra nepolinis tirpiklis, kuris tirpina tik nepolines ar mažai polines medžiagas. Atlikus SKE–CO₂ optimaliomis sąlygomis buvo išekstrahuota tik lipofiliška vyšnių išspaudų dalis, o liekanoje dar buvo likę įvairių polinių (hidrofilinių) junginių, kuriuos norint išgauti buvo pasirinkta suspaustų skysčių ekstrakcija. Taikant ESS buvo naudojamas etanolio/vandens (70:30) mišinys. Verta paminėti, jog norint gauti didesnes ekstraktų išeigas ir didesnę veikliųjų komponentų kiekį bei siekiant sumažinti tirpiklių sąnaudas, būtina parinkti optimalias ekstrakcijos sąlygas (temperatūrą ir laiką).

ESS proceso optimizavimas atliktas stambiausiai 1 frakcijai po SKE–CO₂, o nustatytos optimalios sąlygos galiausiai pritaikytos visoms likusioms frakcijoms. Optimalioms sąlygoms nustatyti taikytas matematinis paviršiaus atsako metodas, pritaikant centriškai kompozicinį planavimo modelį. Gauti eksperimentiniai duomenys buvo apdoroti Design-Expert 7.0. programa. Paviršiaus atsako metodas pasirinktas dėl to, kad tiriamieji atsakai (išeiga ir proantocianidinų kiekis) priklauso nuo kintamųjų parametrų (temperatūros (A) ir laiko (B)). Atlikto eksperimento tikslas optimizuoti kintamuosius parametrus (A ir B), siekiant gauti didžiausias tiriamųjų atsakų (išeigos ir proantocianidinų kiekio) vertes.

Naudojant centriškai kompozicinį planavimo modelį vyšnių išspaudų liekanoms po SKE–CO₂ buvo sudarytas 2-jų kintamų parametrų (A ir B) 13-os ciklų planas, kurį sudarė 5 centriniai ir 8 faktoriai taškai. Sudaryto plano centriniai taškai – 90 °C temperatūra, 3x10 min. ekstrakcijos trukmė. Pagal sudaryto centriškai kompozicinio modelio planą atlikti eksperimento rezultatai pateikiami 16 lentelėje.

16 lentelė. Vyšnių išspaudų 1 F liekanos gautos po SKE–CO₂ optimizavimas atliekant ESS pagal centriškai kompozicinį planavimo modelį

Nr.	EES sąlygos		Atsako kintamieji parametrai		Teorinė išeiga, %	Teorinis proantocianidinų kiekis, mg PAC/g SM
	Ekstrakcijos temperatūra, °C	Ekstrakcijos trukmė, min.	Išeiga, %	Proantocianidinų kiekis, mg PAC/g SM		
1	2	3	4	5	6	7
1	60	15	23,70 ± 2,94	101,92 ± 9,24	23,58	98,86
2	90	10	20,99 ± 0,82	115,44 ± 1,29	21,77	115,31
3	90	10	21,76 ± 0,82	115,44 ± 1,29	21,77	115,31
4	90	10	22,71 ± 0,82	115,44 ± 1,29	21,77	115,31
5	90	10	21,21 ± 0,82	115,44 ± 1,29	21,77	115,31
6	120	5	29,38 ± 0,00	148,02 ± 8,26	29,38	150,75
7	90	5	19,63 ± 3,45	87,56 ± 7,61	20,04	93,85

lentelės tęsinys kitame puslapyje

16 lentelės tęsinys. Vyšnių išspaudų 1 F liekanos gautos po SKE–CO₂ optimizavimas atliekant ESS pagal centriškai kompozicinį planavimo modelį

1	2	3	4	5	6	7
8	120	10	29,64 ± 2,71	170,20 ± 8,27	29,34	158,78
9	60	5	16,42 ± 2,35	76,25 ± 0,63	16,01	67,23
10	120	15	29,61 ± 1,26	119,94 ± 6,51	29,29	128,63
11	90	10	22,74 ± 0,82	115,44 ± 1,29	21,77	115,31
12	60	10	18,97 ± 2,35	90,06 ± 1,09	19,50	102,14
13	90	15	24,26 ± 6,11	104,23 ± 6,78	24,09	98,60

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN.

Optimizavimo proceso kiekvienas atsakas buvo analizuojamas atskirai, pirmiausiai buvo tiriama kintamųjų parametru įtaka išeigai. Modelio, gauto pagal centriškai kompozicinį planą, analizė (ANOVA) pateikiama 17 lentelėje. Analizė parodė, kad modelis yra reikšmingas pagal Studento kriterijų ($p < 0,0001$), apskaičiuotą F vertę (94,70), o klaidos tikimybė nėra reikšminga ($p > 0,6943$) ir modelis gali būti naudojamas visoje planavimo erdvėje. Gauti rezultatai taip pat parodė, kad yra 4 reikšmingi veiksniai, kurie turi įtakos vyšnių išspaudų išeigai: A, B, A², AB. Išanalizuoti nepriklausomi kintamieji pagal jų įtaką vyšnių išspaudų ekstrakto išeigai gali būti išdėstyti tokia tvarka: P ($p < 0,0001$) > B ($p = 0,0002$) > A² ($p = 0,0003$) > AB ($p = 0,0011$). Atlikus vyšnių išspaudų kvadratinio modelio regresinių lygčių analizę nustatyta, kad matematinis modelis, sudarytas pagal gautas ekstraktų išeigas, atitinka gautus rezultatus, nes nustatytas determinacijos koeficientas yra pakankamai aukštas ($R^2 = 0,99$). Teorinis determinacijos koeficientas ($R^2 = 0,94$) yra labai panašus į eksperimentinį determinacijos koeficientą ($R^2 = 0,98$), o tai parodo labai gerą ryšį tarp pasirinktų kintamųjų parametru ir išeigos. Apskaičiuota adekvatumo preciziškumo santykinė reikšmė 30,90 (ši reikšmė turėtų būti daugiau nei 4), kuri parodo prognozuojamų verčių palyginimą su vidutinėmis prognozuojamomis paklaidomis eksperimento taškuose, rodo, kad signalas yra tinkamas ir modelis gali būti naudojamas modeliuojant plano erdvę.

17 lentelė. Centriškai kompozicinio modelio dispersinė analizė pagal kintamąsias vertes (atsakas – išeigos kiekis)

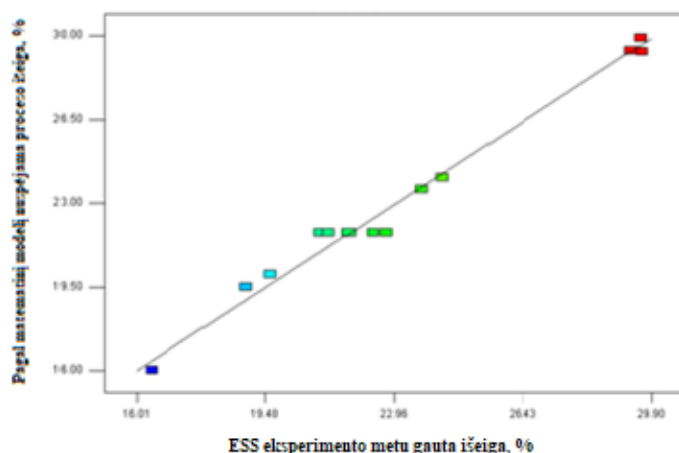
Kintamieji	Kvadratų suma	Kvadratų vidurkis	F – kriterijus	p – reikšmė
Modelis	207,26	41,45	94,70	< 0,0001 reikšmingas
A – Temperatūra	145,36	145,36	332,07	< 0,0001
B – Laikas	24,54	24,54	56,06	0,0001
AB	12,41	12,41	28,36	0,0011
A ²	19,43	19,43	44,40	0,0003
B ²	0,24	0,24	0,56	0,4805
Liekana (angl. <i>residual</i>)	3,06	0,44	-	-
Klaidos tikimybė	0,85	0,28	0,51	0,6943 nereikšmingas

F – Fišerio kriterijus; p – reikšmė < 0,05 (tuomet kintamasis yra statistiškai reikšmingas).

Paviršiaus atsako metodas buvo naudojamas nustatyti optimalias kintamųjų vertes, kurioms esant būtų gaunama didžiausia ekstrakto išeiga atliekant ESS procesą. Pagal regresijos koeficientus sudarytas polinominis modelis, kuris užrašomas 21 lygtimi. Polinominis modelis apibūdina santykį

tarp priklausomų ir nepriklausomų kintamųjų (A ir B). Teorinės (prognozuojamos) išeigų vertės buvo apskaičiuotos pagal polinominę lygtį ir palygintos su gautais rezultatais (žr. 22 pav.).

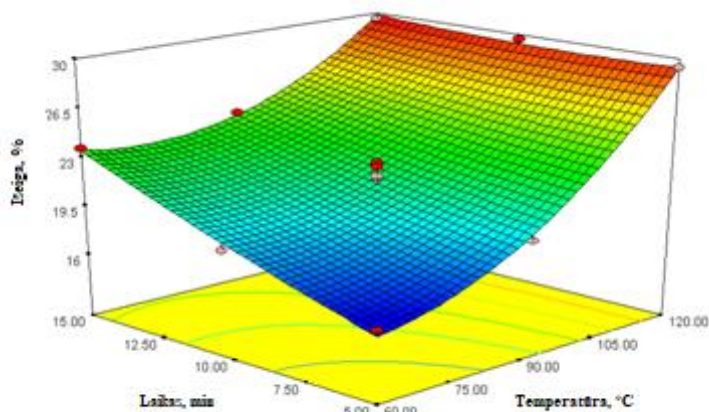
$$I\text{šei}ga (\%) = 21,77 + 4,92 \times A + 2,02 \times B - 1,76 \times A \times B + 2,65 \times A^2 + 0,30 \times B^2 \quad (21)$$



22 pav. Matematinio modelio nuspėjamos ir faktinės ekstrakcijos išeigos palyginimas

Pagal sudarytą antrojo laipsnio polinominį modelį matyti, kad gautos atsako (išeigos) faktinės reikšmės yra labai mažai arba nežymiai nutolusios nuo nuspėjamo modelio apskaičiuotų atsako verčių.

Erdvinis 3D grafikas (žr. 23 pav.) rodo kintamųjų parametrų (temperatūros ir laiko) įtaką ekstrakto išeigai, esant pastoviam slėgiui (10,3 MPa). Iš pateiktų rezultatų matyti, kad temperatūra turi daug didesnę įtaką išeigos pokyčiui, nei ekstrakcijos trukmė. Nors remiantis modelio analize (žr. 17 lentelė) tiek ekstrakcijos laikas, tiek temperatūra yra labai reikšmingi parametrai lemiantys ekstrakcijos išeigos pokyčius, tačiau erdvinis 3D grafikas parodė, kad temperatūros pokyčiai turi didesnę įtaką išeigai. Iš pateiktų rezultatų (žr. 23 pav.) matyti, kad temperatūros pakėlimas nuo 60 °C iki 120 °C išeigą padidino nuo 6 iki 13 %, o ekstrakcijos trukmės prailginimas nuo 5 iki 15 min. tokios didelės įtakos neturėjo. Didžiausias pokytis keičiant ekstrakcijos trukmę nustatytas esant 60 °C temperatūrai, kuomet išeiga padidėjo nuo 2 iki 5 %.



23 pav. ESS paviršiaus atsako plotas, parodantis vyšnių išspaudų ekstrakto išeigos priklausomybę nuo optimizuojamų parametrų (temperatūros ir laiko)

Toliau analizuojant kintamųjų parametų (ekstrakcijos laiko (B) ir temperatūros (A)) įtaka antrajam atsakui – proantocianidinų kiekiui (PAC) (žr. 16 lentelė). Modelio, gauto pagal centriškai kompozicinį planą, analizė (ANOVA) parodė, kad modelis yra reikšmingas pagal Stjudento kriterijų ($p = 0,0007$), o apskaičiuota F vertė siekė 18,20 (žr. 18 lentelė). Pagal gautus rezultatus matyti, kad 4 reikšmingi veiksniai turi įtakos vyšnių išspaudų ekstraktuose esančiam PAC kiekiui. Reikšmingi veiksniai pagal įtaką proantocianidinų kiekiui gali būti išdėstomi šia tvarka: A ($p < 0,0001$), B² ($p = 0,0079$), AB ($p = 0,0170$), A² ($p = 0,0224$). Atlikus vyšnių išspaudų kvadratinio modelio regresinių lygčių analizę nustatyta, kad matematinis modelis, sudarytas pagal gautą PAC kiekį, atitinka gautus rezultatus, nes nustatytas determinacijos koeficientas vis dar aukštas ($R^2 = 0,93$). Teorinis determinacijos koeficientas pakankamai skiriasi nuo eksperimentinio, o tai parodo silpnesnę ryšį tarp pasirinktų kintamųjų parametų ir PAC kiekio. Apskaičiuota adekvatumo preciziškumo santykinė reikšmė 15,62 yra gerokai didesnė nei 4, todėl prognozuojamų verčių palyginimas su vidutinėmis prognozuojamomis paklaidomis eksperimento taškuose, rodo, kad signalas yra tinkamas ir modelis gali būti naudojamas modeliuojant plano erdvę.

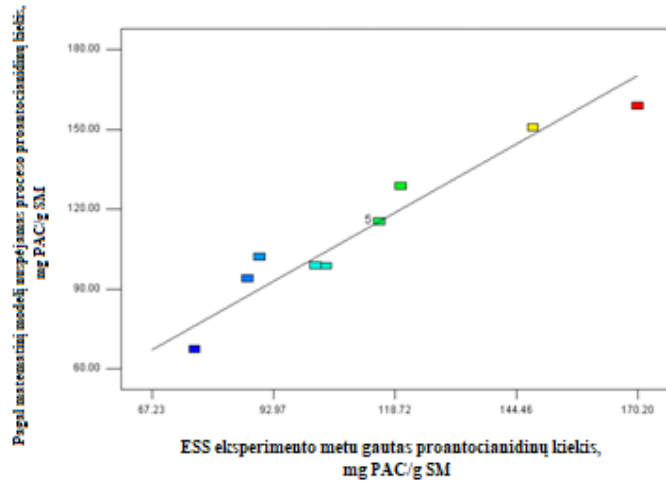
18 lentelė. Centriškai kompozicinio modelio dispersinė analizė pagal kintamąsias vertes (atsakas – PAC kiekis)

Kintamieji	Kvadratų suma	Kvadratų vidurkis	F – kriterijus	p – reikšmė
Modelis	6775,53	1355,11	18,20	0,0007 reikšmingas
A – Temperatūra	4812,70	4812,70	64,64	< 0,0001
B – Laikas	33,89	33,89	0,46	0,5215
AB	722,27	722,27	9,70	0,0170
A ²	633,70	633,70	8,51	0,0224
B ²	1006,26	1006,26	13,51	0,0079
Liekana (angl. residual)	521,19	74,46	-	-
Klaidos tikimybė	521,19	173,73	-	-

F – Fišerio kriterijus; p – reikšmė < 0,05 (tuomet kintamasis yra statistiškai reikšmingas).

Pagal regresijos koeficientus sudaromas polinominis modelis, kuris užrašomas 22 lygtimi, apibūdinant santykį tarp priklausomų ir nepriklausomų kintamųjų (A ir B). Prognozuojamas proantocianidinų kiekis apskaičiuotas pagal polinominę lygtį ir palygintas su gautais rezultatais (žr. 24 pav.)

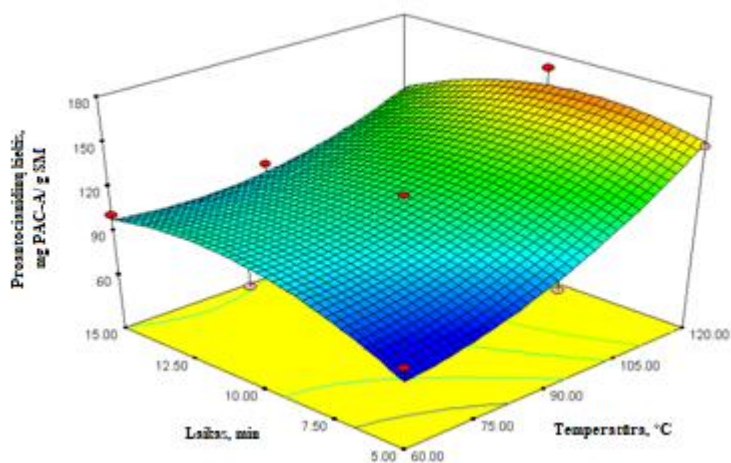
$$PAC \text{ kiekis} \left(\frac{mg \text{ PAC}}{g \text{ SM}} \right) = 115,31 + 28,32 \times A + 2,38 \times B - 13,44 \times A \times B + 15,15 \times A^2 - 19,09 \times B^2 \quad (22)$$



24 pav. Matematinio modelio nuspėjamo ir faktinio proantocianidinų kiekio palyginimas

Tiek iš teorinio, tiek eksperimentinio determinacijos koeficientų bei matematinio modelio grafiko matyti, kad gautos PAC reikšmės yra šiek tiek nutolusios nuo teorinių modelio reikšmių. Lyginant matematinis modelius tarpusavyje pagal abu atsakus (išeigą ir proantocianidinų kiekį), galima teigti, kad patikimesnis modelis gautas vertinant išeigą.

Erdvinis 3D grafikas (žr. 25 pav.) rodo kintamųjų parametų (temperatūros ir laiko) įtaką proantocianidinų kiekiui, esant pastoviam slėgiui (10,3 MPa). Iš pateiktų rezultatų matyti, kad prailgintas ekstrakcijos laikas, nepriklausomai nuo naudojamos temperatūros neigiamai veikė proantocianidinų kiekį (jis sumažėjo). Verta paminėti, kad proantocianidiniai yra termolabilūs junginiai, kurie esant aukštai temperatūrai gali skilti. Būtent šia jų savybe būtų galima paaiškinti gautus rezultatus, kuomet ilgesnis poveikis (15 min.) žemesne (60 °C) ar aukštesne (120 °C) temperatūra lėmė PAC kiekio sumažėjimą. Gauti rezultatai rodo, kad keliant ekstrakcijos temperatūra (nuo 60 °C iki 120 °C), bet esant trumpiausiai ekstrakcijos trukmei (5 min), nustatytas didžiausias proantocianidinų pokytis nuo 76,25 iki 148,02 mg PAC/g SM. Vykstant 10 min. ekstrakciją temperatūros pokyčiai neturėjo tokios reikšmingos įtakos PAC kiekiui.



25 pav. ESS paviršiaus atsako plotas, parodantis proantocianidinų kiekio priklausomybę nuo optimizuojamų parametų (temperatūros ir laiko)

Optimizuojant ESS proceso sąlygas (temperatūrą ir laiką) buvo pasirinkti du atsakai (išeiga ir proantocianidinų kiekis), siekiant gauti didžiausias jų reikšmes, taip su efektyvinant ekstrakcijos procesą, išgaunant bioaktyvius junginius. Naudojant Design-Expert 7.0 programą buvo nustatytos dvi optimalios sąlygos (60 °C, 3x15 min. ir 120 °C, 3x10 min.), kuomet gaunama didžiausia išeiga ir PAC kiekis. Įvertinus gautus rezultatus (žr. 16 lentelę), matyti kad, tiek didesnė išeiga, tiek didesnis proantocianidinų kiekis nustatytas esant 120 °C (išeiga – 29,64 %, PAC kiekis – 170,20 mg PAC/g SM) nei 60 °C (išeiga – 23,70 %, PAC kiekis – 101,92 mg PAC/g SM) temperatūrai. Tačiau temperatūra yra vienas iš pagrindinių veiksnių lemiančių termolabilių junginių skilimą ekstrakcijos metu. Dėl šios priežasties suabejojus, kad esant 120 °C temperatūrai išlieka daug termolabilių bioaktyviųjų junginių, nors gaunama ekstrakto išeiga ir aukšta, buvo nuspręsta optimalių sąlygų patvirtinimui įvesti dar vieną papildomą analizės metodą – antocianinų kokybinę ir kiekybinę analizę (žr. 3.5.1.2. skyrius). Gauti rezultatai parodė, kad ekstraktuose gautuose esant 60 °C temperatūrai ir vykdant 3x15 min. ekstrakciją antocianinai buvo identifikuoti, kai tuo tarpu įvykdžius ekstrakciją aukštesnėje temperatūroje (120 °C, 3x10 min.) jų kiekis ženkliai sumažėjo arba buvo aptinkami tik pėdsakai. Todėl ESS optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis, naudojant etanolio/vandens mišinį (70:30), buvo pasirinktos 60 °C temperatūra ir 3x15 min. ekstrakcijos trukmė.

3.5.1.2. Kokybinė ir kiekybinė antocianinų analizė, optimalių ESS sąlygų parinkimui

Antocianinų kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui vyšnių išspaudų ekstraktuose, gautuose dvejomis ESS optimaliomis sąlygomis, taikyta ultra efektyvioji skysčių chromatografija su kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių detektoriumi (UESCh-Q-TOF-MS). Taikant UESCh-Q-TOF-MS ekstraktuose nustatyti junginiai buvo identifikuoti pagal tikslias jų mases, molekulinės formules, UV spektro duomenis, MS/MS režimu gautų junginių fragmentus bei sulaikymo laikus lyginant su literatūros duomenimis bei duomenų bazėmis. Identifikuoti junginiai bei jų kiekis, išreikštas 100 g ekstrakto bei 100 g sausų medžiagų, pateikiami 19 lentelėje. Nustatyti 4 pagrindiniai antocianinų junginiai ESS ekstraktuose: cianidin-3-O-sophorozidas, cianidin-3-O-gliukozil-rutinozidas, cianidin-3-O-gliukozidas ir cianidin-3-O-rutinozidas.

19 lentelė. Antocianinų sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po ESS optimaliomis sąlygomis

Junginys	Išėjimo laikas, min.	Cheminė formulė	Masė [M + H] ⁺	BAK, mg CGE/100 g ekstrakto	BAK, mg CGE/100 g SM
ESS optimalios sąlygos: 60 °C temperatūra ir 3x15 min. ekstrakcijos trukmė					
1	2	3	4	5	6
Cianidin-3-O-sophorozidas	5,00	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611,1613	59,60 ± 1,01	14,13 ± 0,24
Cianidin-3-O-gliukozil-rutinozidas	5,20	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₀	757,2195	90,12 ± 1,66	21,36 ± 0,39
Cianidin-3-O-gliukozidas	5,40	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1078	58,29 ± 1,35	13,82 ± 0,32
Cianidin-3-O-rutinozidas	5,70	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595,1666	84,87 ± 0,60	20,11 ± 0,14

lentelės tęsinys kitame puslapyje

19 lentelės tęsinys. Antocianinų sudėtis vyšnių ekstraktuose, gautuose po ESS optimaliomis sąlygomis

ESS optimalios sąlygos: 120 °C temperatūra ir 3x10 min. ekstrakcijos trukmė					
1	2	3	4	5	6
Cianidin-3-O-sophorozidas	5,00	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611,1613	p	p
Cianidin-3-O-gliukozil-rutinozidas	5,20	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₀	757,2195	68,78 ± 0,14	16,30 ± 0,03
Cianidin-3-O-rutinozidas	5,70	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595,1666	67,29 ± 0,57	15,95 ± 0,13

Nurodytos vidutinės dviejų pakartojimų vertės ± SN, p – pėdsakai.

Nustatyta, kas molekulinis jonas [M+H]⁺ 611,1613 atitiko molekulinę formulę C₂₇H₃₁O₁₆. Šis junginys buvo identifikuotas kaip cianidin-3-O-sophorozidas (angl. *cyanidin-3-O-sophoroside*). Molekuliniam jonui [M+H]⁺ 757,2195 buvo priskirta molekulinė formulė C₃₃H₄₁O₂₀ ir šis junginys buvo atpažintas kaip cianidin-3-O-gliukozil-rutinozidas (angl. *cyanidin-3-O-glucosyl-rutinoside*). Molekulinis jonas [M+H]⁺ 449,1078 atitiko molekulinę formulę C₂₁H₂₁O₁₁, o šis junginys buvo sutapatintas su cianidin-3-O-gliukozidu (angl. *cyanidin-3-O-glucoside*). Molekulinis jonas [M+H]⁺ 595,1666 atitiko molekulinę formulę C₂₇H₃₁O₁₅. Šis junginys buvo identifikuotas kaip cianidin-3-O-rutinozidas (angl. *cyanidin-3-O-rutinoside*).

Kiekybinė antocianinų analizė atlikta pagal komercinį cianidin-3-gliukozido standartą. Pagrindiniai antocianinai aptikti vyšnių išspaudų ekstraktuose – cianidin-3-O-gliukozil-rutinozidas ir cianidin-3-O-rutinozidas. Literatūroje nurodoma, kad būtent anksčiau paminėti junginiai yra dominuojantys ir sudaro didžiausią dalį nuo viso antocianinų kiekio paprastųjų vyšnių išspaudų ekstraktuose [53]. Kokybinė ir kiekybinė antocianinų analizė buvo atlikta dviem ekstraktams, gautiems po ESS, siekiant nustatyti optimalias sąlygas, prie kurių išlieka didžiausias bioaktyvių junginių kiekis. Ekstraktuose, kurie buvo gauti esant 60 °C temperatūrai ir 3x15 min. ekstrakcijos trukmei, nustatyti 4 antocianinai (cianidin-3-O-sophorozidas, cianidin-3-O-gliukozil-rutinozidas, cianidin-3-O-gliukozidas ir cianidin-3-O-rutinozidas). Tuo tarpu ekstraktuose gautuose esant aukštesnei temperatūrai (120 °C, 3x10 min.) nustatyti tik du pagrindiniai antocianinai (cianidin-3-O-gliukozil-rutinozidas ir cianidin-3-O-rutinozidas), o cianidin-3-O-sophorozido rasti tik pėdsakai. Cianidin-3-O-gliukozil-rutinozidas ir cianidin-3-O-rutinozidas yra pakankamai atsparūs temperatūros poveikiui, nes tiek ekstrakte gautame prie 60 °C, tiek prie 120 °C temperatūros nustatytas labai panašus kiekis, kuris atitinkamai siekė 90,12 ir 68,78 (O-gliukozil-rutinozido) bei 84,87 ir 67,29 (cianidin-3-O-rutinozido) mg CGE/100 g ekstrakto. Remiantis *Kolodziejczyk* ir kitų (2013) pateiktais duomenimis, antocianinų kiekis vyšnių išspaudų ekstraktuose kito nuo 18,5 iki 4421,6 mg/100 g [53]. *Blando* ir kiti (2019) nurodė, jog vyšniose antocianinų kiekis siekė 54,5 mg/100 g šviežios masės (angl. *fresh weight* – FW), o *Ferretti* ir kiti (2010) nustatė 45–109 mg CGE/100 g šviežių vaisių [46, 151]. Lyginant literatūroje pateiktus duomenis su eksperimento metu gautais, matyti, kad bendras antocianinų kiekis (sudėjus visų junginių koncentracijas) gaunamas panašus į anksčiau aprašytus mokslininkų duomenis, nors *Kolodziejczyk* ir kiti (2013) autoriai nustatė ženkliai didesnį kiekį. Tokius rezultatus galėjo lemti pasirinkta žaliavos (vyšnių) veislė, jos apdorojimas, ekstrakcijos būdas, tirpiklis, ekstrakcijos sąlygos bei taikyti skirtingi kiekybinės analizės metodai.

3.5.1.3. Ekstraktų gautų optimizuojant ESS procesą antioksidacinio potencialo įvertinimas

Ekstraktų, gautų atlikus ESS optimizavimą, antioksidacinis aktyvumas išmatuotas spalvine ABTS⁺ reakcija bei ORAC metodu, bendras fenolinių junginių kiekis įvertintas taikant *Folin-Ciocalteu* metodiką. BFJK (mg GRE/g) ir antioksidacinis aktyvumas (mg TE/g) išreikštas grame ekstrakto bei grame sausų medžiagų. Pirmoji išraiška parodo ekstrakto antioksidacinį aktyvumą, o antroji bioaktyvių junginių išskyrimą, kuris siejamas su ekstrakcijos efektyvumu. Rezultatai pateikiami 20 lentelėje.

20 lentelė. Vyšnių ekstraktų gautų po ESS optimizavimo proceso antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Bandinys	BFJK, mg GRE/g ekstrakto	BFJK, mg GRE/g SM	ABTS ⁺⁺ , mg TE/g ekstrakto	ABTS ⁺⁺ , mg TE/g SM	ORAC, mg TE/g ekstrakto	ORAC, mg TE/g SM
ESS – 1 F						
60 °C, 3x5 min.	64,37 ± 1,30	10,18 ± 0,21	267,24 ± 9,87	42,25 ± 1,56	192,52 ± 10,11	30,43 ± 1,60
60 °C, 3x10 min.	73,44 ± 1,73	13,41 ± 0,32	265,34 ± 12,05	48,44 ± 2,20	198,33 ± 10,52	36,21 ± 1,92
60 °C, 3x15 min.	55,90 ± 1,04	12,75 ± 0,24	205,08 ± 3,33	46,78 ± 0,76	190,29 ± 10,04	43,41 ± 2,29
90 °C, 3x5 min.	50,87 ± 1,04	9,61 ± 0,20	184,85 ± 2,34	34,93 ± 0,44	213,23 ± 18,49	40,29 ± 3,49
90 °C, 3x10 min.	62,33 ± 1,33	13,13 ± 0,28	209,96 ± 6,45	44,22 ± 1,36	204,75 ± 6,88	43,13 ± 1,45
90 °C, 3x15 min.	62,60 ± 1,83	14,62 ± 0,43	179,09 ± 3,11	41,82 ± 0,73	210,28 ± 9,02	49,11 ± 2,11
120 °C, 3x5 min.	66,02 ± 4,05	18,67 ± 1,15	276,77 ± 30,52	78,26 ± 8,63	254,05 ± 11,66	71,84 ± 3,30
120 °C, 3x10 min.	83,29 ± 3,77	23,76 ± 1,08	307,44 ± 8,27	87,71 ± 2,36	263,93 ± 11,67	75,30 ± 3,33
120 °C, 3x15 min.	53,79 ± 0,50	15,33 ± 0,14	218,38 ± 12,73	62,23 ± 3,63	222,15 ± 10,89	63,31 ± 3,10

Nurodytos vidutinės penkių/šešių pakartojimų vertės ± SN.

Nustatyta, kad BFJK ir antioksidacinis aktyvumas didėjo, didėjant temperatūrai. Tačiau prailginus ekstrakciją iki 3x15 min. tiek BFJK, tiek antioksidacinis aktyvumas sumažėjo nepriklausomai nuo naudojamos temperatūros. Ilgesnis ekstrakcijos laikas padidina jautresnių/termolabilių junginių skilimo ar kitų nepageidaujamų pokyčių riziką. Siekiant įvertinti temperatūros įtaką ESS efektyvumui, naudojant etanolio vandens mišinį (70:30), pasirinktas intervalas nuo 60 iki 120 °C. Nustatyta, kad didžiausios BFJK, ABTS⁺⁺ radikalo blukinimo ir ORAC vertės buvo esant 120 °C temperatūrai, vykdant ekstrakciją 3x10 min. ir atitinkamai siekė 83,29 mg GRE/g ekstrakto, 307,44 mg TE/g ekstrakto ir 263,93 mg TE/g ekstrakto. Įvertinus išėigas ir perskaičius rezultatus gramui sausos medžiagos, nustatytas didžiausias antioksidacinis aktyvumas tokiomis pačiomis sąlygomis. Galima teigti, kad aukštesnė temperatūra padidina fenolinių junginių ir kitų bioaktyvių junginių išskyrimą iš vyšnių išspaudų. Įrodyta, kad šiluma padidina tirpiklio difuziją į augalo ląsteles ir desorbciją bioaktyvių junginių iš jų.

3.5.2. Ekstraktų ir jų liekanų gautų po ekstrakcijos suspaustais skysčiais charakterizavimas

3.5.2.1. Vyšnių išspaudų frakcijų ekstrakcijos išeigos, gautos atlikus ESS optimaliomis sąlygomis

Nustačius proceso optimalias sąlygas, ESS buvo atlikta su likusiomis vyšnių išspaudų frakcijomis po SKE–CO₂, gautos išeigos pateikiamos 21 lentelėje, o proantocianidinų kiekio pokyčiai aptarti 3.5.2.2 skyriuje (žr. 22 lentelė).

21 lentelė. Ekstraktų išeigos gautos po ESS optimaliomis sąlygomis (60°C, 3x15 min.)

Bandinys	Išeiga, %	Išeiga SM, %
1 Frakcija	23,70 ± 2,94	0,23 ± 0,03
2 Frakcija	14,79 ± 1,77	0,14 ± 0,02
3 Frakcija	19,26 ± 0,28	0,19 ± 0,00
4 Frakcija	12,59 ± 0,96	0,12 ± 0,01
5 Frakcija	26,33 ± 2,57	0,24 ± 0,02
6 Frakcija	24,66 ± 1,44	0,24 ± 0,01

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN.

Iš gautų rezultatų matyti, kad didžiausios išeigos gautos 1-oje, 3-oje, 5-oje ir 6-oje frakcijose, kur atitinkamai siekė 23,70, 19,26, 26,33 ir 24,66 %, o mažiausios buvo nustatytos 2 ir 4 frakcijose (14,79 ir 12,59 %). Atlikus ESS optimaliomis sąlygomis matyti, kad išeigų vertės tarp frakcijų kito labai netolygiai, o tokiems rezultatams galėjo turėti įtakos jų sudėtis. Kiekvienoje frakcijoje buvo nevienodas kiekis priemaišų (susmulkinėtų vyšnių kauliukų lukštų ir branduolių), kurios ir galėjo turėti įtakos išeigų pokyčiams tarp frakcijų. Nustatyta, kad 4 frakcijos išeiga (12,59 %) buvo 1,5 karto mažesnė nei 3 F ir net 2 kartus mažesnė nei 5-oje frakcijose gauta didžiausia išeiga.

3.5.2.2. Proantocianidinų kiekio analizė, atlikus ESS optimaliomis sąlygomis

Proantocianidiniai (PAC) – polimeriniai fenolinių junginiai arba kondensuoti taninai (angl. *condensed tannins*), kurie susideda iš flavan-3-olių sudarančių vienetų. Tai yra vieni iš svarbiausių bioaktyvių junginių randamų uogose, vaisiuose, įskaitant vyšnias. Proantocianidinų kiekis nustatytas atliekant spalvinę reakciją su DMAC reagentu. PAC kiekis vyšnių ekstraktuose gautuose po ESS išreikštas grame ekstrakto bei grame sausų medžiagų. Rezultatai pateikiami 22 lentelėje.

22 lentelė. PAC kiekis gautas iš vyšnių ekstraktų, atlikus ESS optimaliomis sąlygomis (60 °C, 3x15 min.)

Bandinys	Proantocianidinų kiekis, mg PAC/g ekstrakto	Proantocianidinų kiekis, mg PAC/g SM
1 Frakcija	446,80 ± 40,50	101,92 ± 9,24
2 Frakcija	478,45 ± 9,69	66,63 ± 1,38
3 Frakcija	561,73 ± 8,08	104,54 ± 1,50
4 Frakcija	695,83 ± 20,36	84,19 ± 2,47
5 Frakcija	656,09 ± 33,52	157,74 ± 8,50
6 Frakcija	780,51 ± 33,31	184,89 ± 7,91

Nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN.

Proantocianidinų kiekis ekstraktuose buvo pakankamai didelis ir tarp 4-os, 5-os ir 6-os frakcijų didesnių skirtumų nenustatyta, atitinkamai siekė 4 F – 695,83, 5 F – 656,09 ir 6 F – 780, 51 mg PAC/g ekstrakto. Tuo tarpu 1–3 frakcijose nustatytas daugiau nei 1,5 karto mažesnis proantocianidinų kiekis lyginant su 6 frakcija. Tačiau įvertinus išeigą ir perskaičius PAC kieki sausiai medžiagai (išspaudoms) matyti, kad didžiausias šių junginių kiekis išliko 5 ir 6 frakcijose, tačiau labai ženkliai sumažėjo 4-oje frakcijoje. Didesnių skirtumų nenustatyta tarp 1 ir 3 bei 2 ir 4 frakcijų, kur proantocianidinų kiekis atitinkamai buvo nustatytas 101,92 ir 104,54 bei 66,63 ir 84,19 mg PAC/g SM. Palyginti šiuos rezultatus su literatūroje pateikiamais kol kas nėra galimybės, nes niekas iki šiol nėra nustatęs proantocianidinų kiekio vyšnių išspaudose. Tačiau, verta paminėti, kad procianidiniai yra proantocianidinų klasės nariai, kitaip sakant, tai yra oligomerai sudaryti tik iš cianidino sudarančių vienetų. Remiantis *Nemes* ir kitų (2018) pateiktais duomenimis, procianidinų kiekis vyšnių liekanoje po ekstrakcijos su etanolio/vandens mišiniu buvo 0,21 g procianidino A2/100 g SM, tuo tarpu pačiose vyšniuose – 0,48 g procianidino A2/100 g šviežių vyšnių [152]. Kaip matyti iš mokslininkų pateiktų rezultatų procianidino kiekis, išreikštas procianidinu A2, po ekstrakcijos sumažėjo 2 kartus, kai šio eksperimento metu perskaičius sausoms žaliavoms (išspaudoms) gautas, kur kas didesnis proantocianidinų kiekis. Tai galėtų reikšti, kad eksperimentui naudotos vyšnių išspaudos buvo geresnis proantocianidinų šaltinis nei švieži vaisiai.

3.5.2.3. Ekstraktų ir ekstrakcijos liekanų, gautų optimaliomis ESS sąlygomis, antioksidacinio potencialo įvertinimas

Ekstraktų ir ekstrakcijos liekanų gautų atlikus ESS optimaliomis sąlygomis (60 °C, 3x15 min.) antioksidacinis aktyvumas išmatuotas ABTS⁺ ir ORAC metodais, o bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) įvertintas pritaikant *Folin-Ciocalteu* metodiką. BFJK (mg GRE/g) ir antioksidacinis aktyvumas (mg TE/g) išreikštas grame ekstrakto/bandinio bei grame sausų medžiagų. Rezultatai pateikiami 23 ir 24 lentelėje.

23 lentelė. Vyšnių ekstraktų gautų po ESS optimaliomis sąlygomis antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Bandinys	BFJK, mg GRE/g ekstrakto	BFJK, mg GRE/g SM	ABTS ⁺ , mg TE/g ekstrakto	ABTS ⁺ , mg TE/g SM	ORAC, mg TE/g ekstrakto	ORAC, mg TE/g SM
1 Frakcija	55,90 ± 1,04	12,75 ± 0,24	205,08 ± 3,33	46,78 ± 0,76	190,29 ± 10,04	43,41 ± 2,29
2 Frakcija	53,83 ± 2,10	7,50 ± 0,29	143,02 ± 4,95	19,92 ± 0,69	230,70 ± 17,80	32,13 ± 2,48
3 Frakcija	81,83 ± 1,21	15,23 ± 0,23	211,00 ± 6,50	39,27 ± 1,21	252,20 ± 22,77	46,93 ± 4,24
4 Frakcija	76,67 ± 0,66	9,28 ± 0,08	211,00 ± 10,03	25,53 ± 1,21	249,13 ± 19,82	30,14 ± 2,40
5 Frakcija	72,02 ± 1,83	17,32 ± 0,44	191,93 ± 6,56	46,14 ± 1,58	244,61 ± 15,52	58,81 ± 3,73
6 Frakcija	83,21 ± 1,95	19,71 ± 0,46	254,94 ± 4,58	60,39 ± 1,08	209,58 ± 9,93	49,65 ± 2,35

Nurodytos vidutinės penkių/šešių pakartojimų vertės ± SN.

Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas itin priklauso nuo jų fitocheminės sudėties ir bioaktyvių junginių kiekio. Atlikus ESS ekstrakciją optimaliomis sąlygomis visoms (1–6 F) vyšnių išspaudų frakcijoms po SKE-CO₂ nustatyta, kad BFJK kito nuo 53,83 iki 83,21 mg GRE/g ekstrakto. Didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas smulkiausioje 6 frakcijoje (83,21 mg GRE/g ekstrakto), o mažiausias 2 frakcijoje (53,83 mg GRE/g ekstrakto). *Adil* ir kiti (2008) atliko su vyšnių išspaudomis aukšto slėgio ekstrakciją (HPE) (angl. *high pressure extraction*) etanoliumi ir nustatė bendrą fenolinių junginių kiekį gautuose ekstraktuose, kuris kito nuo 1,79 iki 3,73 mg GRE/g

bandinio. Lyginant literatūroje pateiktus duomenis ir šio eksperimento metu gautus rezultatus matyti, kad etanolio/vandens mišinys (70:30) bei ekstrakcija suspaustais skysčiais buvo efektyvesnė išgaunant polinius polifenolinius junginius. BFJK atlikus ESS buvo netgi 20 kartų didesnis (53,83–83,21 mg GRE/g ekstrakto) lyginant su *Adil* ir kitų (2008) pateiktais duomenimis. Tokią efektyvią ekstrakciją galėjo lemti etanolio/vandens mišinys, kuris padidina tirpiklio poliškumą taip pagerindamas bioaktyvių junginių prasiskverbimą iš kietosios matricos, tuo pačiu padidindamas jų koncentraciją ekstrakto (gaunamas didesnis fenolinių junginių kiekis). Nustatyta, kad naudojant grynus tirpiklius (pvz. gryną etanolį), išekstrahuojamas mažesnis kiekis veikliųjų medžiagų. Dar vienas veiksnys galimai lėmęs didesnę BFJK yra slėgis, nes ESS metu naudotas slėgis (10 MPa) buvo nuo 5 iki 20 kartų mažesnis lyginant su *Adil* ir kitų (2008) atliktu eksperimentu.

Panaši antioksidacinio aktyvumo tendencija ekstraktuose išliko atliekant ABTS⁺ radikalo blukinimo metodą, kuomet didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas 6 frakcijoje (254,94 mg TE/g ekstrakto), o mažiausias 2 frakcijos (143,02 mg TE/g ekstrakto). Tarp 3 F ir 4 F ekstraktų antioksidacinio aktyvumo rezultatai buvo vienodi, o tai parodo, kad abi frakcijos pasižymi tokiu pačiu aktyvumu. Matyti, kad ekstrakto gauto iš 6 frakcijos antioksidacinis potencialas buvo daugiau nei 1,5 karto didesnis lyginant su 2 frakcija. Šie rezultatai parodo, kad 6 frakcijoje veikiausiai buvo daugiau fitocheminių junginių. Išanalizavus deguonies radikalų surišimo gebos (ORAC) rezultatus matyti kiek kitokia tendencija, o gautos vertės kito nuo 30,14 iki 58,81 mg TE/g ekstrakto. Didžiausiu aktyvumu pasižymėjo 5 frakcijos, o mažiausiu 4 frakcijos ekstraktai.

24 lentelė. Vyšnių liekanų gautų po ESS optimaliomis sąlygomis antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Bandinys	BFJK, mg GRE/g bandinio	BFJK, mg GRE/g SM	ABTS ⁺ , mg TE/g bandinio	ABTS ⁺ , mg TE/g SM	ORAC, mg TE/g bandinio	ORAC, mg TE/g SM
1 Frakcija	2,84 ± 0,11	0,65 ± 0,03	12,87 ± 0,69	2,94 ± 0,16	3,87 ± 0,22	0,88 ± 0,05
2 Frakcija	1,87 ± 0,10	0,26 ± 0,01	6,27 ± 0,21	0,87 ± 0,03	1,96 ± 0,14	0,27 ± 0,02
3 Frakcija	2,36 ± 0,11	0,44 ± 0,02	5,79 ± 0,20	1,08 ± 0,04	1,75 ± 0,02	0,33 ± 0,00
4 Frakcija	2,99 ± 0,09	0,36 ± 0,01	10,46 ± 0,57	1,27 ± 0,07	3,56 ± 0,05	0,43 ± 0,01
5 Frakcija	4,27 ± 0,22	1,03 ± 0,05	21,33 ± 1,01	5,13 ± 0,24	2,45 ± 0,22	0,59 ± 0,05
6 Frakcija	11,15 ± 0,79	2,64 ± 0,19	37,76 ± 0,00	8,94 ± 0,00	11,90 ± 1,03	2,82 ± 0,24

Nurodytos vidutinės penkių/šešių pakartojimų vertės ± SN.

Vyšnių išspaudų liekanose po ESS nustatytas antioksidacinis aktyvumas pritaikius Quencher procedūrą. Dalis junginių, pasižyminčių antioksidacinėmis savybėmis, sujungti stipriais ryšiais su įvairiais žaliavoje esančiais komponentais, todėl yra tikslinga atlikti skirtingas ekstrakcijas, naudoti skirtingus tirpiklius, siekiant išekstrahuoti šiuos junginius. Atliekant Quencher procedūrą prieš ir po ekstrakcijų galima įvertinti ekstrakcijų efektyvumą, išskiriant (išekstrahuojant) bioaktyvius junginius, pasižyminčius antioksidaciniu aktyvumu, iš žaliavos.

Atlikus ekstrakciją suspaustais skysčiais, naudojant etanolio/vandens mišinį, BFJK kiekis svyravo nuo 1,87–11,15 mg GRE/g bandinio, ABTS⁺ radikalo blukinimo metodu nustatytas antioksidacinis aktyvumas kito nuo 5,79 iki 37,76 mg TE/g bandinio, o ORAC metodu nuo 1,75 iki 11,90 mg TE/g bandinio. Po SKE–CO₂ ekstrakcijos, išskyrus lipofilinę frakciją iš vyšnių išspaudų frakcijų, antioksidacinis aktyvumas neženkliai, tačiau sumažėjo lyginant su pradinėmis žaliavomis (žr. 10 lentelė). Tačiau panaudojus kur kas poliškesnio tirpiklio mišinį pastebima, kad tiek BFJK kiekis,

tiesioginis antioksidacinis aktyvumas (ABTS^{•+} radikalo blukimo metodu bei deguonies radikalų surišimo gebos metodu) visų frakcijų liekanose ženkliai sumažėjo (apie 3 kartus). Taigi, ESS taikymas, pasirenkant tirpiklių mišinį parodė, kad toks būdas yra pats efektyviausias iš visų naudotų ekstrakcijos metodų, o mažos antioksidacinės gebos vertės liekanose rodo, kad šis metodas yra labai tinkamas, siekiant išskirti bioaktyvius junginius iš vyšnių išspaudų. Tačiau kaip matyti iš rezultatų (žr. 24 lentelė) liekanose vis dar lieka dalis bioaktyviųjų junginių, kurie galėtų būti išskirti panaudojus didesnio poliškumo tirpiklį ar pritaikius kitus metodus (pvz. fermentinę ekstrakciją), tačiau tai nebuvo įtrauktą į šio baigiamojo projekto tikslą.

Išvados

1. Vyšnių išspaudos buvo suskirstytos į 6 frakcijas pagal skirtingo dydžio sietus (0,8–10 mm). 1 F – stambiausia, kurioje daugiausiai nesusmulkintų kauliukų, 6 F – smulkiausia, kurią sudarė išspaudos ir tik labai maža dalis priemaišų. Vyšnių išspaudų dalelių pasiskirstymas vandens terpėje parodė, kad 2 frakcijos dalelės sudarė didžiausią intensyvumo lygį (6,15 %) lyginant su visomis šešiomis frakcijomis. 1–4-oje ir 6-oje frakcijose daugiausiai buvo 30–100 µm dydžio dalelių, tuo tarpu 5 frakcijoje vyravo 60–200 µm dalelės. Pagal nustatytus rezultatus (dalelių dydį bei jų pasiskirstymą vandenyje) matyti, kad buvo gautas heterogeninių dalelių mišinys. Vyšnių išspaudų frakcijų nustatyta cheminė sudėtis parodė, kad didžiausias baltymų ir riebalų kiekis buvo 5-oje frakcijoje, kai drėgmės kiekis buvo labai panašus tarp visų bandinių. Vertinant mineralinių medžiagų kiekį gauta, kad didžiausias kiekis buvo 6-oje frakcijoje, o mažiausias 3-oje. Tačiau apskaičiuotas angliavandenių kiekis parodė, kad daugiausiai jų aptikta 3-oje frakcijoje.
2. Atliekant Soksleto ekstrakciją su heksanu buvo gauta didesnė išeiga lyginant su SKE–CO₂ visose frakcijose. Didžiausia ekstrakcijos išeiga gauta 5-oje frakcijoje (12,16 ir 8,69 %) taikant abu ekstrakcijos metodus. Sudarytos kinetinės SKE–CO₂ kreivės buvo išreikštos ekstrakto išeigos priklausomybe nuo laiko. Iš rezultatų matyti, kad 1–4 F išeiga nustojo kilti praėjus 60 min., tačiau 5-os ir 6-os didžiausia išeigos vertė buvo pasiekta ties 90 min. Kadangi procesas laikomas baigtu tuomet, kai išeiga visiškai nusistovi, nustatyta, kad visų frakcijų išeiga nebekilo praėjus 180 min. Didesnis bendras karotinoidų kiekis (nuo 0,63 iki 1,12 mg β-karoteno/g ekstrakto) gautas atlikus SKE–CO₂ lyginant su Soksleto ekstrakcija. Gautuose aliejuose po SKE–CO₂ didžiąją dalį riebalų rūgščių sudarė nesočios riebalų rūgštys: linolo, oleino ir linoleno. Triacilglicerolių analizė parodė, kad pastaruosiuose ekstraktuose didžiausias kiekis buvo nustatytas LLLn, SLL, OLnL, OLL junginių. Triacilglicerolių sudėtyje nustatytos visos dominuojančios riebalų rūgštys. Gautuose ekstraktuose po SKE–CO₂ identifikuoti 55 lakieji junginiai, iš kurių didžiausia koncentracija buvo benzaldehido (8,16–22,78 %), β-mirceno (0,22–3,70 %), humuleno (0,31–0,87 %), 2E,4E-dedadienolio (0,05–0,50 %), vanilino (0,02–0,47 %), nonankarboksirūgšties (0,03–0,38 %) ir 2,3-butandiolis (0,11–0,27 %). Įvertinus lipofilinių vyšnių ekstraktų antioksidacinį potencialą buvo nustatyta, kad visų frakcijų Soksleto ekstraktai pasižymėjo didesniu BFJK (10,00–15,62 mg GRE/g ekstrakto) lyginant su SKE–CO₂, tačiau mažesniu aktyvumu, vertinant ABTS^{•+} ir ORAC metodais. Atlikus Soksleto ir SKE–CO₂ ekstrakcijas matyti, kad bendras fenolinių junginių kiekis 4 frakcijos vyšnių išspaudų liekanose buvo labai panašus ir atitinkamai siekė 11,84 ir 11,70 mg GRE/g bandinio.
3. Nustatyta temperatūros ir ekstrakcijos laiko įtaka nuriebalintoms vyšnių išspaudų liekanoms po SKE–CO₂, panaudojant ESS ekstrakciją. Ekstrakcijos sąlygos optimizuojamos pagal paviršiaus atsako metodą, siekiant gauti maksimalią išeigą ir didžiausią proantocianidinų kiekį. Optimalios ekstrakcijos sąlygos šiam eksperimentiniam modeliui buvo pasiūlytos dvi: 60 °C, 3x15 min. ir 120 °C, 3x10 min. Atsižvelgiant, kad antocianinai yra vyraujantys bei termolabilūs junginiai, atlikta šių junginių kokybinė ir kiekybinė analizė hidrofiliuose ekstraktuose. Optimaliomis sąlygomis 60 °C, 3x15 min. buvo identifikuoti 4 junginiai: cianidin-3-O-sophorozidas – 14,13, cianidin-3-O-gliukozil-rutinozidas – 21,36, cianidin-3-O-gliukozidas – 13,82 ir cianidin-3-O-rutinozidas – 20,11 mg CGE/100 g SM, o prie 120 °C, 3x10 min. nustatyti tik 2 junginiai (cianidin-3-O-gliukozil-rutinozidas – 16,30 ir cianidin-3-O-rutinozidas – 15,95 mg CGE/100 g

SM). Atsižvelgiant į šiuos rezultatus ESS optimaliomis sąlygomis buvo pasirinktos 60 °C, 3x15 min.

4. Hidrofiliniuose ekstraktuose nustatytas proantocianidinų kiekis kito 66,63–184,89 mg PAC/g SM intervale. Vyšnių išspaudų ekstraktai, apdoroti etanolio/vandens mišiniu, pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei lipofiliniai ekstraktai. Bendras fenolinių junginių kiekis vyšnių išspaudų ekstraktuose išgautuose ESS metodu (7,50–19,71 mg GRE/g SM) buvo daugiau nei 10 kartų didesnis lyginant su ekstraktais išgautais heksanu (0,75–1,22 mg GRE/g SM) ir beveik 30 kartų už ekstraktus išgautus su SKE–CO₂ (0,27–0,71 mg GRE/g SM). Lygiai tokia pati tendencija matyti įvertinus antioksidacinį aktyvumą ABTS^{•+} radikalo blukinimo ir deguonies radikalų surišimo gebos (ORAC) metodais. Taip pat buvo pritaikytas Quencher metodas vyšnių išspaudoms ir gautoms liekanoms po atliktų skirtingų ekstraktacijų, siekiant įvertinti procesų efektyvumą.
5. Pritaikius ir optimizavus biorafinavimo procesus aukšto slėgio metodais buvo gauti trys produktai: lipofilinis ekstraktas (aliejus), kuriame gausu polinesočių riebalų rūgščių, triacilglicerolių ir karotinoidų; hidrofilinis ekstraktas su jame esančiais antocianiniais, proantocianidiniais bei dideliu antioksidaciniu aktyvumu, kurį lemia išekstrahuoti fenoliniai junginiai, ir ląsteliena ar kitaip sakant skaidulinių medžiagų šaltinis. Antioksidacinės gebos tyrimai parodė, kad kietojoje liekanoje po ESS ekstrakcijos etanolio vandens mišiniu, aktyvumas ženkliai sumažėjo lyginant su pradinėmis vertėmis ir tai rodo didelį pritaikyto biorafinavimo proceso efektyvumą, kuomet nustatomas sąlyginai mažas bioaktyvių junginių kiekis jose.

Literatūros sąrašas

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. *Dietary intake of fruit and vegetables and risk of diabetes mellitus and cardiovascular diseases* [interaktyvus]. 2005. Prieiga per: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43146>
- [2] DILLARD, Cora J ir J Bruce GERMAN. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [interaktyvus]. 2000, **80**(12), 1744–1756. ISSN 0022-5142. Prieiga per: doi:10.1002/1097-0010(20000915)80:12<1744::AID-JSFA725>3.0.CO;2-W
- [3] SZAJDEK, Agnieszka ir E J BOROWSKA. Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition* [interaktyvus]. 2008, **63**(4), 147–156. ISSN 1573-9104. Prieiga per: doi:10.1007/s11130-008-0097-5
- [4] MICALI, Sabrina. *Agricultural and Food Biotechnologies of Olea europaea and Stone Fruit* [interaktyvus]. 2015. ISBN 978-1-68108-002-4. Prieiga per: doi:10.2174/97816080599351150101
- [5] SERRADILLA, Manuel Joaquín, Alejandro HERNÁNDEZ, Margarita LÓPEZ-CORRALES, Santiago RUIZ-MOYANO, María DE GUÍA CÓRDOBA ir Alberto MARTÍN. Composition of the Cherry (*Prunus avium* L. and *Prunus cerasus* L.; Rosaceae). *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* [interaktyvus]. 2016, 127–147. Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-12-408117-8.00006-4
- [6] FAOSTAT. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* [interaktyvus]. 2019. Prieiga per: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- [7] CAPANOGLU, Esra, Dilek BOYACIOGLU, Ric C H DE VOS, Robert D. HALL ir Jules BEEKWILDER. Procyanidins in fruit from Sour cherry (*Prunus cerasus*) differ strongly in chainlength from those in Laurel cherry (*Prunus lauracerasus*) and Cornelian cherry (*Cornus mas*). *Journal of Berry Research* [interaktyvus]. 2011, **1**(3), 137–146. ISSN 18785093. Prieiga per: doi:10.3233/BR-2011-015
- [8] YILMAZ, Fatih Mehmet, Ahmet GÖRGÜÇ, Mehmet KARAASLAN, Hasan VARDIN, Seda ERSUS BILEK, Özge UYGUN ir Cavit BIRCAN. Sour Cherry By-products: Compositions, Functional Properties and Recovery Potentials – A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [interaktyvus]. 2018, 1–15. ISSN 1040-8398. Prieiga per: doi:10.1080/10408398.2018.1496901
- [9] ISAJINAS, V. N. *Botanika*. 1964.
- [10] ALEKSANDRAVIČIŪTĖ, B., A. BAGDONAITĖ, S. BUTKIENĖ, V. BUTKUS, L. ČIBIRAS, V. GALINIS, R. JANKEVIČIENĖ, B. LABANAUSKAS, Ž. LAZDAUSKAITĖ ir A. LEKAVIČIUS. *Lietuvos TSR Flora IV*. 1971.
- [11] JANONIENĖ, S. ir I. ŠEREIKIENĖ. *Kaip pažinti augalus*. Kaunas: Šviesa, 2003. ISBN 5-430-02531-3.
- [12] PRESTON, Katherine. Apples: the ultimate everyday accessory. *The Botanist in the Kitchen where botany meets the cutting board* [interaktyvus]. 2014. Prieiga per: <https://botanistinthekitchen.blog/2014/11/24/apples-the-ultimate-everyday-accessory/>
- [13] ALBURQUERQUE, Nuria, Federico GARCÍA-MONTIEL, Antonio CARRILLO ir Lorenzo BURGOS. Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environmental and*

- Experimental Botany* [interaktyvus]. 2008, **64**(2), 162–170. ISSN 0098-8472. Prieiga per: doi:10.1016/J.ENVEXPBOT.2008.01.003
- [14] PURVINAS, E. ir V. SKIRGAILAITĖ. *Botanika*. 1975.
- [15] GHEJU, M, I BALCU ir P JURCHESCU. Removal of hexavalent chromium from aqueous solutions by use of chemically modified sour cherry stones. *Desalination and Water Treatment* [interaktyvus]. 2016, **57**(23), 10776–10789. ISSN 1944-3994. Prieiga per: doi:10.1080/19443994.2015.1040468
- [16] GRAFE, Christine ir Mirko SCHUSTER. *Physicochemical characterization of fruit quality traits in a German sour cherry collection* [interaktyvus]. 2014. Prieiga per: doi:10.1016/j.scienta.2014.09.047
- [17] KOSMALA, Monika, Joanna MILALA, Krzysztof KOŁODZIEJCZYK, Jarosław MARKOWSKI ir Monika MIESZCZAKOWSKA. Characterization of cell wall polysaccharides of cherry (*Prunus cerasus* var. Schattenmorelle) fruit and pomace. *Plant Foods for Human Nutrition* [interaktyvus]. 2009, **64**(4), 279–285. Prieiga per: doi:https://doi.org/10.1007/s11130-009-0134-z
- [18] ŠVARC-GAJIĆ, Jaroslava, Sabrina CLAVIJO, Ruth SUÁREZ, Aleksandra CVETANOVIĆ ir Víctor CERDÀ. Simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction derivatisation and gas chromatography mass spectrometry analysis of subcritical water extracts of sweet and sour cherry stems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [interaktyvus]. 2018, **410**(7), 1943–1953. ISSN 1618-2650. Prieiga per: doi:10.1007/s00216-018-0858-4
- [19] BEEKWILDER, Jules, Dilek BOYACIOGLU, Ric C.H. DE VOS, Senem KAMILOGLU, Esra CAPANOGLU, Gamze TOYDEMİR ir Robert D. HALL. Changes in sour cherry (*Prunus cerasus* L.) antioxidants during nectar processing and in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods* [interaktyvus]. 2013, **5**(3), 1402–1413. ISSN 17564646. Prieiga per: doi:10.1016/j.jff.2013.05.008
- [20] ANSES. *ANSES/Ciqual French food composition table version* [interaktyvus]. 2014. Prieiga per: https://ciqual.anses.fr/#/aliments/13008/cherry-pitted-raw
- [21] SELF NUTRITIONAL DATA. *Self Nutritional Data* [interaktyvus]. 2018. Prieiga per: https://nutritiondata.self.com/facts/fruits-and-fruit-juices/1861/2
- [22] MCCUNE, Letitia M., Chieri KUBOTA, Nicole R. STENDELL-HOLLIS ir Cynthia A. THOMSON. Cherries and health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [interaktyvus]. 2011, **51**(1), 1–12. ISSN 10408398. Prieiga per: doi:10.1080/10408390903001719
- [23] WANG, Siyuan, Ryan J. KOWALSKI, Yifei KANG, Alecia M. KISZONAS, Mei-Jun ZHU ir Girish M. GANJYAL. Impacts of the Particle Sizes and Levels of Inclusions of Cherry Pomace on the Physical and Structural Properties of Direct Expanded Corn Starch. *Food and Bioprocess Technology* [interaktyvus]. 2017, **10**(2), 394–406. Prieiga per: doi:http://dx.doi.org/10.1007%2Fs11947-016-1824-9
- [24] HROTKO, Karoly. Progress in cherry rootstock research. *Acta Horticulturae* [interaktyvus]. 2008, **795**, 171–178. Prieiga per: doi:10.17660/ActaHortic.2008.795.22
- [25] GONÇALVES, B., J MOUTINHO-PEREIRA, A SANTOS, A.P. SILVA, E BACELAR, C CORREIA ir E. ROSA. Scion-rootstock interactions affects the physiology and fruit quality of sweet cherry. *Tree Physiology* [interaktyvus]. 2006, **26**, 93–104. Prieiga per: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16203719

- [26] USENIK, Valentina, Nikita FAJT, Maja MIKULIC-PETKOVSEK, Ana SLATNAR, Franci STAMPAR ir Robert VEBERIC. Sweet Cherry Pomological and Biochemical Characteristics Influenced by Rootstock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2010, **58**(8), 4928–4933. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi:10.1021/jf903755b
- [27] BIENIEK, Anna, Zdzisław KAWECKI, Jan KOPYTOWSKI ir Jerzy ZIELENKIEWICZ. Yielding and fruit quality of Lithuanian sweet cherry cultivars grown under the climatic and soil conditions of Warmia. *Folia Horticulturae* [interaktyvus]. 2012, **23**(2), 101–106. ISSN 0867-1761. Prieiga per: doi:10.2478/v10245-011-0015-4
- [28] JÄNES, H, P ARDEL, K KAHU, K KELT ir A KIKAS. Some biological properties and fruit quality parameters of new sweet cherry cultivars and perspective selections. *Agronomy Research* [interaktyvus]. 2010, **8**(Special III), 583–588. ISSN 1406-894X. Prieiga per: <http://agronomy.emu.ee/vol08Spec3/p08s309.pdf>
- [29] SORINA, Sirbu, Otilia CHIRIȚĂ ir Niculaua MARIUS. Physico-chemical and antioxidant properties of new sweet cherry cultivars from Iași, Romania. *Agronomy Research* [interaktyvus]. 2012, **10**, 341–350. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/320083300_Physico-chemical_and_antioxidant_properties_of_new_sweet_cherry_cultivars_from_Iasi_Romania
- [30] GIRARD, B ir T G KOPP. Physicochemical Characteristics of Selected Sweet Cherry Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 1998, **46**(2), 471–476. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi:10.1021/jf970646j
- [31] GÜNDOĞDU, Müttalip ir Ugur BILGE. Determination of organics, phenolics, sugars and vitamin C contents of some cherry cultivars (*Prunus avium*). *International Journal of Agriculture and Biology* [interaktyvus]. 2012, **14**(4), 595–599. ISSN 15608530. Prieiga per: <https://search.proquest.com/openview/23d1254d765b31e4fadab253723b6d6f/1.pdf?pq-origsite=gscholar&cbl=616539>
- [32] USENIK, Valentina, Jerneja FABČIČ ir Franci ŠTAMPAR. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2008, **107**(1), 185–192. ISSN 03088146. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.004
- [33] ESTI, M., L. CINQUANTA, F. SINESIO, E. MONETA ir M. DI MATTEO. Physicochemical and sensory fruit characteristics of two sweet cherry cultivars after cool storage. *Food chemistry* [interaktyvus]. 2002, **76**(4), 399–405. Prieiga per: doi:10.1016/S0308-8146(01)00231-X
- [34] CRISOSTO, Carlos H., Gayle M. CRISOSTO ir Paul METHENEY. Consumer acceptance of „Brooks“ and „Bing“ cherries is mainly dependent on fruit SSC and visual skin color. *Postharvest Biology and Technology* [interaktyvus]. 2003, **28**(1), 159–167. ISSN 09255214. Prieiga per: doi:10.1016/S0925-5214(02)00173-4
- [35] SLOULIN, W. Cherry quality survey - status report. *Proceedings of the Washington State Horticultural Association*. 1990, **86**, 226–227.
- [36] PAPP, Nóra, Blanka SZILVÁSSY, László ABRANKÓ, Tibor SZABÓ, Péter PFEIFFER, Zoltán SZABÓ, József NYÉKI, Sezai ERCISLI, Éva STEFANOVITS-BÁNYAI ir Attila HEGEDÜS. Main quality attributes and antioxidants in Hungarian sour cherries: Identification of genotypes with enhanced functional properties. *International Journal of*

- Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2010, **45**(2), 395–402. ISSN 09505423. Prieiga per: doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02168.x
- [37] MILOŠEVIĆ, Tomo ir Nebojša MILOŠEVIĆ. Fruit Quality Attributes of Sour Cherry Cultivars. *ISRN Agronomy* [interaktyvus]. 2011, **2012**, 1–5. Prieiga per: doi:10.5402/2012/593981
- [38] ANSARI, M. ir G. H. DAVARYNEJAD. *Marked improvement of Hungarian sour cherries by cross-pollination II: Fruit quality* [interaktyvus]. 2008. ISSN 16823974. Prieiga per: doi:10.3923/ajps.2008.771.774
- [39] TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A. ir Juan Carlos ESPÍN. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [interaktyvus]. 2001, **81**(9), 853–876. ISSN 00225142. Prieiga per: doi:10.1002/jsfa.885
- [40] CHAOVANALIKIT, A. ir R. E. WROLSTAD. Anthocyanin and Polyphenolic Composition of Fresh and Processed Cherries. *Journal of Food Science* [interaktyvus]. 2004, **69**(1), 73–83. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17859.x>
- [41] KANG, S.Y., N.P. SEERAM, M.G. NAIR ir L.D. BOURQUIN. Tart cherry anthocyanins inhibit tumour development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Letters* [interaktyvus]. 2003, **194**(1), 13–19. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706854>
- [42] JACOB, R.A., G.M. SPINOZZI, V.A. SIMON, D.S. KELLEY, R.L. PRIOR, B. HESS-PIERCET ir A.A. KADERT. Consumption of cherries lowers plasma urate in healthy women. *The Journal of Nutrition* [interaktyvus]. 2003, **133**(6), 1826–1829. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771324>
- [43] SEERAM, N.P., R.A. MOMIN, M.G. NAIR ir L.D. BOURQUIN. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine* [interaktyvus]. 2001, **8**(5), 362–369. ISSN 0944-7113. Prieiga per: doi:10.1078/0944-7113-00053
- [44] KIM, Dae Ok, Jin Heo HO, Jun Kim YOUNG, Seuk Yang HYUN ir Chang Y. LEE. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2005, **53**(26), 9921–9927. ISSN 00218561. Prieiga per: doi:10.1021/jf0518599
- [45] PRIOR, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition* [interaktyvus]. 2003, **78**(3), 570S–578S. ISSN 0002-9165. Prieiga per: doi:<https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.570S>
- [46] FERRETTI, Gianna, Tiziana BACCHETTI, Alberto BELLEGGIA ir Davide NERI. Cherry antioxidants: From farm to table. *Molecules* [interaktyvus]. 2010, **15**(10), 6993–7005. ISSN 14203049. Prieiga per: doi:10.3390/molecules15106993
- [47] KARAASLAN, Mehmet, Fatih Mehmet YILMAZ, Asliye KARAASLAN ir Hasan VARDIN. Synthesis and accumulation of anthocyanins in sour cherries during ripening in accordance with antioxidant capacity development and chalcone synthase expression. *European Food Research and Technology* [interaktyvus]. 2016, **242**(2), 189–198. ISSN 14382385. Prieiga per: doi:10.1007/s00217-015-2530-y
- [48] IEZZONI, A., K.D. DOLAN, A.M. SEBOLT, R. RAVI, A. KHAN, M. SIDDIQ ir P. BREEN. Characterization of New Tart Cherry (*Prunus cerasus* L.): Selections Based on Fruit Quality, Total Anthocyanins, and Antioxidant Capacity. *International Journal of Food*

- Properties* [interaktyvus]. 2010, **14**(2), 471–480. ISSN 1094-2912. Prieiga per: doi:10.1080/10942910903277697
- [49] WOJDYŁO, Aneta, Adam FIGIEL, Krzysztof LECH, Paulina NOWICKA ir Jan OSZMIAŃSKI. Effect of Convective and Vacuum-Microwave Drying on the Bioactive Compounds, Color, and Antioxidant Capacity of Sour Cherries. *Food and Bioprocess Technology* [interaktyvus]. 2014, **7**(3), 829–841. ISSN 19355130. Prieiga per: doi:10.1007/s11947-013-1130-8
- [50] GONÇALVES, B., A.-K. LANDBO, D. KNUDSEN, A.P. SILVA, J. MOUTINHO-PEREIRA, E. ROSA ir A.S. MEYER. Effect of ripeness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2004, **52**(3), 523–530. Prieiga per: doi:https://doi.org/10.1021/jf030595s
- [51] VODOPIVEC, Branka, Polonca TREBSE, Marjan SIMČIČ ir Janez HRIBAR. Changes of anthocyanins and hydroxycinnamic acids affecting the skin colour during maturation of sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Lwt - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2004, **37**(1), 123–128. Prieiga per: doi:10.1016/S0023-6438(03)00143-9
- [52] VALERO, Daniel ir María SERRANO. *Postharvest Biology and Technology For Preserving Fruit Quality* [interaktyvus]. 2010. ISBN 978-1-4398-0266-3. Prieiga per: doi:10.1201/9781439802670
- [53] KOŁODZIEJCZYK, Krzysztof, Michał SÓJKA, Maribel ABADIAS, Inmaculada VIÑAS, Sylvain GUYOT ir Alain BARON. Polyphenol composition, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of the extracts obtained from industrial sour cherry pomace. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2013, **51**, 279–288. ISSN 0926-6690. Prieiga per: doi:10.1016/J.INDCROP.2013.09.030
- [54] WOŹNIAK, Łukasz, Krystian MARSZAŁEK ir Sylwia SKĄPSKA. Extraction of phenolic compounds from sour cherry pomace with supercritical carbon dioxide: Impact of process parameters on the composition and antioxidant properties of extracts. *Separation Science and Technology (Philadelphia)* [interaktyvus]. 2016, **51**(9), 1472–1479. ISSN 15205754. Prieiga per: doi:10.1080/01496395.2016.1165705
- [55] DÓKA, O., G. FICZEK, D. BICANIC, R. SPRUIJT, S. LUTEROTTI, M. TÓTH, J. G. BUIJNSTERS ir G. VÉGVÁRI. Direct photothermal techniques for rapid quantification of total anthocyanin content in sour cherry cultivars. *Talanta* [interaktyvus]. 2011, **84**, 341–346. Prieiga per: doi:https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.01.007
- [56] TUMBAS ŠAPONJAC, Vesna, Gordana ČETKOVIĆ, Jasna ČANADANOVIĆ-BRUNET, Biljana PAJIN, Sonja DJILAS, Jovana PETROVIĆ, Ivana LONČAREVIĆ, Slađana STAJČIĆ ir Jelena VULIĆ. Sour cherry pomace extract encapsulated in whey and soy proteins: Incorporation in cookies. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2016, **207**, 27–33. ISSN 0308-8146. Prieiga per: doi:10.1016/J.FOODCHEM.2016.03.082
- [57] SERRA, A.T., R.O. DUARTE, M.R. BRONZE ir C.M.M. DUARTE. Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry*. 2011, **125**(2), 318–325.
- [58] TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A, David RUIZ, Daniel VALERO, Diego RIVERA, Conchita OBÓN, Catalina SÁNCHEZ-ROCA ir María I GIL. *Health Benefits from Pomegranates and Stone Fruit, Including Plums, Peaches, Apricots and Cherries*

- [interaktyvus]. 2013. Wiley Online Books. ISBN 9781118635551. Prieiga per: doi:doi:10.1002/9781118635551.ch7
- [59] KHOO, Gaik Ming, Morten Rahr CLAUSEN, Bjarne Hjelmsted PEDERSEN ir Erik LARSEN. Bioactivity and total phenolic content of 34 sour cherry cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* [interaktyvus]. 2011, **24**, 772–776. ISSN 08891575. Prieiga per: doi:10.1016/j.jfca.2011.03.004
- [60] SERRANO, María, Huertas M DÍAZ-MULA, Pedro Javier ZAPATA, Salvador CASTILLO, Fabián GUILLÉN, Domingo MARTÍNEZ-ROMERO, Juan M VALVERDE ir Daniel VALERO. Maturity Stage at Harvest Determines the Fruit Quality and Antioxidant Potential after Storage of Sweet Cherry Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2009, **57**(8), 3240–3246. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi:10.1021/jf803949k
- [61] LEVAJ, Branka, Verica DRAGOVIĆ-UZELAC, Karmela DELONGA, Karin Kovačević GANIĆ, Mara BANOVIĆ ir Danijela Bursać KOVAČEVIĆ. Polyphenols and volatiles in fruits of two sour cherry cultivars, some berry fruits and their jams. *Food Technology and Biotechnology*. 2010, **48**(4), 538–547. ISSN 13309862.
- [62] GREIBY, Ibrahim, Dharmendra K. MISHRA, Kirk D. DOLAN ir Muhammad SIDDIQ. Inverse method to estimate anthocyanin degradation kinetic parameters in cherry pomace during non-isothermal heating. *Journal of Food Engineering* [interaktyvus]. 2017, **198**, 54–62. ISSN 0260-8774. Prieiga per: doi:10.1016/J.JFOODENG.2016.11.005
- [63] KIRAKOSYAN, Ara, E.M. SEYMOUR, Daniel E. Urcuyo LLANES, Peter B. KAUFMAN ir Steven F. BOLLING. Chemical profile and antioxidant capacities of tart cherry products. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2009, **115**(1), 20–25. ISSN 0308-8146. Prieiga per: doi:10.1016/J.FOODCHEM.2008.11.042
- [64] BAJERSKA, J., S. MILDNER-SZKUDLARZ, P. GÓRNAS ir D. SEGLIŃAC. Improved postprandial response and feeling of satiety after consumption of sour cherry pomace enriched muffins. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 2015.
- [65] SIMSEK, Meric, Gulum SUMNU ir Serpil SAHIN. Microwave Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sour Cherry Pomace. *Separation Science and Technology* [interaktyvus]. 2012, **47**(8), 1248–1254. ISSN 0149-6395. Prieiga per: doi:10.1080/01496395.2011.644616
- [66] NOWICKA, Paulina ir Aneta WOJDYŁO. Stability of phenolic compounds, antioxidant activity and colour through natural sweeteners addition during storage of sour cherry puree. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2016, **196**, 925–934. ISSN 0308-8146. Prieiga per: doi:10.1016/J.FOODCHEM.2015.10.019
- [67] YILMAZ, Fatih Mehmet, Mehmet KARAASLAN ir Hasan VARDIN. Optimization of extraction parameters on the isolation of phenolic compounds from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) pomace. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2015, **52**(5), 2851–2859. ISSN 09758402. Prieiga per: doi:10.1007/s13197-014-1345-3
- [68] GREIBY, Ibrahim, Dharmendra K. MISHRA ir Kirk D. DOLAN. Inverse method to sequentially estimate temperature-dependent thermal conductivity of cherry pomace during nonisothermal heating. *Journal of Food Engineering* [interaktyvus]. 2014, **127**, 16–23. ISSN 0260-8774. Prieiga per: doi:10.1016/J.JFOODENG.2013.10.039
- [69] GREIBY, Ibrahim, Muhammad SIDDIQ, Kirk D. DOLAN ir Shantanu KELKAR. Effect of non-isothermal processing and moisture content on the anthocyanin degradation and colour

- kinetics of cherry pomace. *International Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2013, **48**(5), 992–998. ISSN 09505423. Prieiga per: doi:10.1111/ijfs.12051
- [70] YILMAZ, Cemile ir Vural GÖKMEN. *Compositional characteristics of sour cherry kernel and its oil as influenced by different extraction and roasting conditions* [interaktyvus]. 2013. Prieiga per: doi:10.1016/j.indcrop.2013.04.048
- [71] KORLESKY, Nathan M., Lucas J. STOLP, Dharma R. KODALI, Robert GOLDSCHMIDT ir William C. BYRDWELL. Extraction and Characterization of Montmorency Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) Pit Oil. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* [interaktyvus]. 2016, **93**(7), 995–1005. ISSN 0003021X. Prieiga per: doi:10.1007/s11746-016-2835-4
- [72] POPA, Viorica-mirela, Corina MISCA, Despina BORDEAN, Diana-nicoleta RABA, D STEF ir Delia DUMBRAVA. Characterization of sour cherries (*Prunus cerasus*) kernel oil cultivars from Banat. *Journal of Agroalimentary Process and Technology* [interaktyvus]. 2011, **17**(4), 398–401. Prieiga per: https://www.journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/65051L10_Popa_Mirela_2_Vol.17_4_398-401.pdf
- [73] FARROHI, F. ir M. MEHRAN. Oil characteristics of sweet and sour cherry kernels. *Journal of the American Oil Chemists Society* [interaktyvus]. 1975, **52**(12), 520–521. ISSN 15589331. Prieiga per: doi:10.1007/BF02640745
- [74] BAK, Istvan, Istvan LEKLI, Bela JUHASZ, Norbert NAGY, Edit VARGA, Judit VARADI, Rudolf GESZTELYI, Gergo SZABO, Levente SZENDREI, Ildiko BACSKAY, Miklos VECSENYES, Miklos ANTAL, Laszlo FESUS, Francois BOUCHER, Joel DE LEIRIS ir Arpad TOSAKI. Cardioprotective mechanisms of *Prunus cerasus* (sour cherry) seed extract against ischemia-reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* [interaktyvus]. 2006, **291**(3), H1329–H1336. ISSN 0363-6135. Prieiga per: doi:10.1152/ajpheart.01243.2005
- [75] BAK, Istvan, Attila CZOMPA, Evelin CSEPANYI, Bela JUHASZ, Heibatullah KALANTARI, Khadija NAJM, Nasreen AGHEL, Balazs VARGA, David D HAINES ir Arpad TOSAKI. Evaluation of Systemic and Dermal Toxicity and Dermal Photoprotection by Sour Cherry Kernels. *Phytotherapy Research* [interaktyvus]. 2011, **25**(11), 1714–1720. ISSN 0951-418X. Prieiga per: doi:10.1002/ptr.3580
- [76] GÓRNAŚ, Paweł, Karina JUHŇEVIČA-RADENKOVA, Vitalijs RADENKOVŠ, Inga MIŠINA, Iveta PUGAJEVA, Arianne SOLIVEN ir Dalija SEGLIŅA. The impact of different baking conditions on the stability of the extractable polyphenols in muffins enriched by strawberry, sour cherry, raspberry or black currant pomace. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2016, **65**, 946–953. ISSN 0023-6438. Prieiga per: doi:10.1016/J.LWT.2015.09.029
- [77] BLANDO, Federica, Carmela GERARDI ir Isabella NICOLETTI. Sour cherry (*Prunus cerasus* L) anthocyanins as ingredients for functional foods. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [interaktyvus]. 2004, **2004**(5), 253–258. ISSN 11107243. Prieiga per: doi:10.1155/S1110724304404136
- [78] TSUDA, Takanori, Mie WATANABE, Katsumi OHSHIMA, Seiji NORINOBU, Sang-Won CHOI, Shunro KAWAKISHI ir Toshihiko OSAWA. Antioxidative Activity of the Anthocyanin Pigments Cyanidin 3-O-beta-D-Glucoside and Cyanidin. *Journal of Agricultural*

- and Food Chemistry* [interaktyvus]. 1994, **42**(11), 2407–2410. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi:10.1021/jf00047a009
- [79] TSUDA, Takanori, Fumihiko HORIO, Junzoh KITOH ir Toshihiko OSAWA. Protective Effects of Dietary Cyanidin 3-O- β -d-Glucoside on Liver Ischemia–Reperfusion Injury in Rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [interaktyvus]. 1999, **368**(2), 361–366. ISSN 0003-9861. Prieiga per: doi:10.1006/ABBI.1999.1311
- [80] HEINONEN, I Marina, Anne S MEYER ir Edwin N FRANKEL. Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 1998, **46**(10), 4107–4112. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi:10.1021/jf980181c
- [81] ŠARIĆ, Ana, Sandra SOBOČANEC, Tihomir BALOG, Borka KUŠIĆ, Višnja ŠVERKO, Verica DRAGOVIĆ-UZELAC, Branka LEVAJ, Zrinka ČOSIĆ, Željka MAČAK ŠAFRANKO ir Tatjana MAROTTI. Improved Antioxidant and Anti-inflammatory Potential in Mice Consuming Sour Cherry Juice (*Prunus Cerasus* cv. Maraska). *Plant Foods for Human Nutrition* [interaktyvus]. 2009, **64**(4), 231. ISSN 1573-9104. Prieiga per: doi:10.1007/s11130-009-0135-y
- [82] RASOOLY, Reuven, Robert A JACOB, Darshan S KELLEY, Adel A KADER ir Bruce E MACKEY. Consumption of Bing Sweet Cherries Lowers Circulating Concentrations of Inflammation Markers in Healthy Men and Women. *The Journal of Nutrition* [interaktyvus]. 2006, **136**(4), 981–986. ISSN 0022-3166. Prieiga per: doi:10.1093/jn/136.4.981
- [83] RIDKER, P M. *High-Sensitivity C-Reactive Protein: Potential Adjunct for Global Risk Assessment in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease* [interaktyvus]. 2001. Prieiga per: doi:10.1161/01.CIR.103.13.1813
- [84] SEYMOUR, E Mitchell, Andrew A M SINGER, Ara KIRAKOSYAN, Daniel E URCUYO-LLANES, Peter B KAUFMAN ir Steven F BOLLING. Altered Hyperlipidemia, Hepatic Steatosis, and Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Rats with Intake of Tart Cherry. *Journal of Medicinal Food* [interaktyvus]. 2008, **11**(2), 252–259. ISSN 1096-620X. Prieiga per: doi:10.1089/jmf.2007.658
- [85] SEYMOUR, E M, Sarah K LEWIS, Daniel E URCUYO-LLANES, Ignasia I TANONE, Ara KIRAKOSYAN, Peter B KAUFMAN ir Steven F BOLLING. Regular Tart Cherry Intake Alters Abdominal Adiposity, Adipose Gene Transcription, and Inflammation in Obesity-Prone Rats Fed a High Fat Diet. *Journal of Medicinal Food* [interaktyvus]. 2009, **12**(5), 935–942. ISSN 1096-620X. Prieiga per: doi:10.1089/jmf.2008.0270
- [86] BOBE, Gerd, Bing WANG, Navindra P SEERAM, Muraleedharan G NAIR ir Leslie D BOURQUIN. Dietary Anthocyanin-Rich Tart Cherry Extract Inhibits Intestinal Tumorigenesis in APCMin Mice Fed Suboptimal Levels of Sulindac. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2006, **54**(25), 9322–9328. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi:10.1021/jf0612169
- [87] OROIAN, Mircea ir Isabel ESCRICHE. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International* [interaktyvus]. 2015, **74**, 10–36. ISSN 0963-9969. Prieiga per: doi:10.1016/J.FOODRES.2015.04.018
- [88] FONTANA, Ariel R, Andrea ANTONIOLLI ir Ruben BOTTINI. Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and

- Biotechnological Applications of Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2013, **61**, 8987–9003. Prieiga per: doi:10.1021/jf402586f.
- [89] GONZÁLEZ-MONTELONGO, Rafaela, M. Gloria LOBO ir Mónica GONZÁLEZ. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Separation and Purification Technology* [interaktyvus]. 2010, **71**(3), 347–355. ISSN 1383-5866. Prieiga per: doi:10.1016/J.SEPPUR.2009.12.022
- [90] LUQUE DE CASTRO, M.D. ir F. PRIEGO-CAPOTE. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 2010, **1217**(16), 2383–2389. ISSN 0021-9673. Prieiga per: doi:10.1016/J.CHROMA.2009.11.027
- [91] WANG, Lijun ir Curtis L. WELLER. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2006, **17**(6), 300–312. ISSN 0924-2244. Prieiga per: doi:10.1016/J.TIFS.2005.12.004
- [92] MAMIDIPALLY, Pavan K ir Sean X LIU. First approach on rice bran oil extraction using limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology* [interaktyvus]. 2004, **106**(2), 122–125. ISSN 1438-7697. Prieiga per: doi:10.1002/ejlt.200300891
- [93] LI, Haizhou, Lester PORDESIMO ir Jochen WEISS. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International* [interaktyvus]. 2004, **37**(7), 731–738. ISSN 09639969. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodres.2004.02.016
- [94] LUQUE-GARCÍA, J.L ir M.D LUQUE DE CASTRO. Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 2004, **1034**(1–2), 237–242. ISSN 00219673. Prieiga per: doi:10.1016/j.chroma.2004.02.020
- [95] RAVENTÓS, M, S DUARTE ir R ALARCÓN. Application and Possibilities of Supercritical CO₂ Extraction in Food Processing Industry: An Overview. *Food Science and Technology International* [interaktyvus]. 2002, **8**(5), 269–284. ISSN 1082-0132. Prieiga per: doi:10.1106/108201302029451
- [96] HERRERO, Miguel, Alejandro CIFUENTES ir Elena IBAÑEZ. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2006, **98**(1), 136–148. ISSN 0308-8146. Prieiga per: doi:10.1016/J.FOODCHEM.2005.05.058
- [97] ZABOT, Giovani, Moyses MORAES ir M Angela MEIRELES. *Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Botanic Matrices: Experimental Data, Process Parameters and Economic Evaluation* [interaktyvus]. 2012. Prieiga per: doi:10.2174/187221212804583204
- [98] HERRERO, Miguel ir Andrea del Pilar SÁNCHEZ-CAMARGO. 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* [interaktyvus]. 2015, **71**, 26–38. ISSN 0165-9936. Prieiga per: doi:10.1016/J.TRAC.2015.01.018
- [99] SAPKALE, G.N., S.M. PATIL, U.S. SURWASE ir P.K BHATBHAGE. Supercritical fluid extraction - a review. *International Journal of Chemical Sciences* [interaktyvus]. 2010, **8**(2), 729–743. Prieiga per: doi:10.1111/j.1467-8306.1965.tb00516.x
- [100] AZMIR, J., I.S.M. ZAIDUL, M.M. RAHMAN, K.M. SHARIF, A. MOHAMED, F. SAHENA, M.H.A. JAHURUL, K. GHAFUOR, N.A.N. NORULAINI ir A.K.M. OMAR.

- Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* [interaktyvus]. 2013, **117**(4), 426–436. ISSN 0260-8774. Prieiga per: doi:10.1016/J.JFOODENG.2013.01.014
- [101] BALDURSDÓTTIR, Vordís, Kristin OLAFSDOTTIR, Rannveig HELGA BJÖRNSDÓTTIR, Mátis OHF GUNNLAUGSDÓTTIR ir Mátis OHF HRÖNN JÖRUNSDÓTTIR. Occurrence of different persistent organic pollutants in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in Icelandic waters [interaktyvus]. 2019. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/266056018_Occurrence_of_different_persistent_organic_pollutants_in_Atlantic_cod_Gadus_morhua_L_in_Icelandic_waters
- [102] WITEK-KROWIAK, Anna, Katarzyna CHOJNACKA, Daria PODSTAWCZYK, Anna DAWIEC ir Karol POKOMEDA. Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. *Bioresource Technology* [interaktyvus]. 2014, **160**, 150–160. ISSN 0960-8524. Prieiga per: doi:10.1016/J.BIORTECH.2014.01.021
- [103] BEZERRA, Marcos Almeida, Ricardo Erthal SANTELLI, Eliane Padua OLIVEIRA, Leonardo Silveira VILLAR ir Luciane Amélia ESCALEIRA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* [interaktyvus]. 2008, **76**(5), 965–977. ISSN 0039-9140. Prieiga per: doi:10.1016/J.TALANTA.2008.05.019
- [104] BELWAL, Tarun, Praveen DHYANI, Indra D. BHATT, Ranbeer Singh RAWAL ir Veena PANDE. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2016, **207**, 115–124. ISSN 0308-8146. Prieiga per: doi:10.1016/J.FOODCHEM.2016.03.081
- [105] DEPARTAMENTAS, Lietuvos standartizacijos. *LST ISO 751:2000. Vaisių ir daržovių gaminiai. Vandenyje netirpių sausųjų medžiagų nustatymas (tpt ISO 751:1998 [E])*. 2000
- [106] INTERNATIONAL, Official Methods of Analysis of AOAC. *International, Official Methods of Analysis of AOAC*. 2000
- [107] EISINAITE, Viktorija, Dovile JURAITE, Karin SCHROËN ir Daiva LESKAUSKAITE. Preparation of stable food-grade double emulsions with a hybrid premix membrane emulsification system. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2016, **206**, 59–66. ISSN 0308-8146. Prieiga per: doi:10.1016/J.FOODCHEM.2016.03.046
- [108] LUQUE DE CASTRO, M. D. ir L. E. GARCÍA-AYUSO. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*. 1998, **369**, 1–10.
- [109] HUANG, Dejian, Boxin OU ir Ronald PRIOR. *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays* [interaktyvus]. 2005. Prieiga per: doi:10.1021/jf030723c
- [110] SINGLETON, Vernon L., Rudolf ORTHOFER ir Rosa M. LAMUELA-RAVENTÓS. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* [interaktyvus]. 1999, **299**, 152–178. ISSN 0076-6879. Prieiga per: doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- [111] RE, Roberta, Nicoletta PELLEGRINI, Anna PROTEGGENTE, Ananth PANNALA, Min YANG ir Catherine RICE-EVANS. Antioxidant activity applying an improved ABTS

- radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* [interaktyvus]. 1999, **26**(9–10), 1231–1237. ISSN 0891-5849. Prieiga per: doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- [112] PRIOR, Ronald L, Ha HOANG, Liwei GU, Xianli WU, Mara BACCHIOCCA, Luke HOWARD, Maureen HAMPSCH-WOODILL, Dejian HUANG, Boxin OU ir Robert JACOB. 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* [interaktyvus]. 2003, **51**(11), 3273–3279. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi:10.1021/jf0262256
- [113] ZEB, Alam ir Michael MURKOVIC. Analysis of triacylglycerols in refined edible oils by isocratic HPLC-ESI-MS. *European Journal of Lipid Science and Technology* [interaktyvus]. 2010, **112**(8), 844–851. ISSN 1438-7697. Prieiga per: doi:10.1002/ejlt.201000064
- [114] KOPEC, Rachel E., Jessica L. COOPERSTONE, Morgan J. CICHON ir Steven J. SCHWARTZ. *Analysis Methods of Carotenoids* [interaktyvus]. 2012. ISBN 9780813823911. Prieiga per: doi:10.1002/9781118229378.ch4
- [115] ZYMONE, Kristina, Lina RAUDONE, Raimondas RAUDONIS, Mindaugas MARKSA, Liudas IVANAUSKAS ir Valdimaras JANULIS. Phytochemical Profiling of Fruit Powders of Twenty Sorbus L. Cultivars. *Molecules* [interaktyvus]. 2018, **23**(10), 2593. Prieiga per: doi:10.3390/molecules23102593
- [116] GRUNOVAITE, Lina, Milda PUKALSKIENE, Audrius PUKALSKAS ir Petras Rimantas VENSKUTONIS. 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* [interaktyvus]. 2016, **24**, 85–96. ISSN 17564646. Prieiga per: doi:10.1016/j.jff.2016.03.018
- [117] *Dried Red Tart Cherries* [interaktyvus]. Prieiga per: <https://www.eatthismuch.com/food/nutrition/dried-red-tart-cherries,165447/>
- [118] GÓRNAŚ, Paweł, Magdalena RUDZIŃSKA, Marianna RACZYK, Inga MIŠINA, Arianne SOLIVEN ir Dalija SEGLIŅA. Composition of bioactive compounds in kernel oils recovered from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) by-products: Impact of the cultivar on potential applications. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2016, **82**, 44–50. ISSN 09266690. Prieiga per: doi:10.1016/j.indcrop.2015.12.010
- [119] SERRA, Ana Teresa, Inês J. SEABRA, Mara E.M. BRAGA, M.R. BRONZE, Hermínio C. DE SOUSA ir Catarina M.M. DUARTE. Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. *The Journal of Supercritical Fluids* [interaktyvus]. 2010, **55**(1), 184–191. ISSN 0896-8446. Prieiga per: doi:10.1016/J.SUPFLU.2010.06.005
- [120] ADIL, Incinur Hasbay, M. Esra YENER ir Alev BAYINDIRLI. Extraction of total phenolics of sour cherry pomace by high pressure solvent and subcritical fluid and determination of the antioxidant activities of the extracts. *Separation Science and Technology* [interaktyvus]. 2008. ISSN 01496395. Prieiga per: doi:10.1080/01496390801888243
- [121] TOYDEMIR, Gamze, Esra CAPANOGLU, Maria VICTORIA, Gomez ROLDAN, Ric C H De VOS, Dilek BOYACIOGLU, Robert D HALL ir Jules BEEKWILDER. Industrial processing effects on phenolic compounds in sour cherry (*Prunus cerasus* L.) fruit.

- Food Research International* [interaktyvus]. 2013, **53**(1), 218–225. ISSN 0963-9969. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodres.2013.04.009
- [122] WOJDYŁO, Aneta, Paulina NOWICKA, Piotr LASKOWSKI ir Jan OSZMIĄŃSKI. Evaluation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) fruits for their polyphenol content, antioxidant properties, and nutritional components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2014, **62**(51), 12332–12345. ISSN 15205118. Prieiga per: doi:10.1021/jf504023z
- [123] COMES, F., M. FARINES, A. AUMELAS ir J. SOULIER. Fatty acids and triacylglycerols of cherry seed oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* [interaktyvus]. 1992, **69**(12), 1224–1227. ISSN 15589331. Prieiga per: doi:10.1007/BF02637685
- [124] SUN, Shu Yang, Wen Guang JIANG ir Yu Ping ZHAO. Characterization of the aroma-active compounds in five sweet cherry cultivars grown in Yantai (China). *Flavour and Fragrance Journal* [interaktyvus]. 2010, **25**(4), 206–213. ISSN 08825734. Prieiga per: doi:10.1002/ffj.1994
- [125] WATERMAN, Peter G. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy* [interaktyvus]. 2003. ISBN 9781932633214. Prieiga per: doi:10.1016/0305-1978(96)83708-2
- [126] OKAMOTO, Robert A, Barbara O ELLISON ir Richard E KEPNER. Volatile terpenes in *Sequoia sempervirens* foliage. Changes in composition during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 1981, **29**(2), 324–326. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi:10.1021/jf00104a026
- [127] MINYARD, James P, J H TUMLINSON, Alonzo Crawford. THOMPSON ir Paul A HEDIN. Constituents of the cotton bud. Carbonyl compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 1967, **15**(3), 517–524. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi:10.1021/jf60151a021
- [128] GRZYBOWSKI, J., H. LAMPARCZYK, A. NASAL ir A. RADECKI. Relationship between the retention indices of phenols on polar and non-polar stationary phases. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 1980. ISSN 00219673. Prieiga per: doi:10.1016/S0021-9673(00)80441-0
- [129] ZULAICA, J. ir G. GUIOCHON. Separation et identification de di-esters aliphatiques et aromatiques et de trimesters phosphoriques par chromatographie en phase gazeuse. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1963, **6**, 1242–1252.
- [130] KUHN, Eberhardt R. Selectivity vs. polarity: The fundamentals of chromatographic separation. *Journal of Separation Science* [interaktyvus]. 2001, **24**(6), 473–476. ISSN 1615-9306. Prieiga per: doi:10.1002/1615-9314(20010601)24:6<473::AID-JSSC473>3.0.CO;2-Y
- [131] OSZCZAPOWICZ, Janusz, Jerzy OSEK ir Ewa DOLECKA. Retention indices of dimethylformamidines, dimethylacetamidines and tetramethylguanidines on a non-polar column. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 1984, **315**, 95–100. ISSN 0021-9673. Prieiga per: doi:10.1016/S0021-9673(01)90727-7
- [132] VOELKEL, Adam. Retention indices and thermodynamic functions of solution for model non-ionic surfactants in standard stationary phases determined by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 1987. ISSN 00219673. Prieiga per: doi:10.1016/S0021-9673(01)94516-9

- [133] TOMORI, Eva, H. KALÁSZ, J. NAGY ir J. KNOLL. Gas chromatographic studies of derivatives of celluline-like substances. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 1974. ISSN 00219673. Prieiga per: doi:10.1016/S0021-9673(01)97890-2
- [134] ASHES, J. R. ir J. K. HAKEN. Gas chromatography of homologous esters. VI. Strucgure-retention increments of aliphatic esters. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 1974. ISSN 00219673. Prieiga per: doi:10.1016/S0021-9673(01)94737-5
- [135] BERNINGER, H ir M R MÖLLER. Retentionsindices zur gaschromatographischen Identifizierung von Arzneimitteln. *Archives of Toxicology* [interaktyvus]. 1977, **37**(4), 295–305. ISSN 1432-0738. Prieiga per: doi:10.1007/BF00330821
- [136] VIANI, R., F. MUGGLER-CHAVAN, D. REYMOND ir R.H. EGLI. Sur la composition de l'arome de cafe. *Helv. Chim. Acta.* 1965, **196**, 1809–1815.
- [137] BRANDER, C.F., R.E. KEPNER ir A.D. WEBB. Identification of Some Volatile Compounds of Wine of Vitis Vinifera Cultivar Pinot Noir. *Am. J. Enol. Vitic.* 1980, **31**(1), 69–75.
- [138] SZABOLCS, N., R. BENECKE ir H. THIEME. Termeszetes eredetu novenyi anyagok gazkromatografias retencios tulajdonsagai. I. A lavandula- es lavandinolaj fo kimponenseinek retencios indexei. *Acta Pharm. Hung.* 1985, **55**, 49–58.
- [139] BURNS, W.F. ir D.T. TINGEY. GC/MS Analysis of biogenic volatile hydrocarbons on a chemically-bonded fused silica column. *J. Chromatogr. Sci.* 1983, **21**, 341–345.
- [140] GERASIMENKO, V.A., A.V. KIRILENKO ir V.M. NABIVACH. Capillary gas chromatography of aromatic compounds found in coal tar fractions. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 1981, **208**(1), 9–16. ISSN 0021-9673. Prieiga per: doi:10.1016/S0021-9673(00)87953-4
- [141] TÓTH, T. Use of capillary gas chromatography in collecting retention and chemical information for the analysis of complex petrochemical mixtures. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 1983, **279**, 157–165. ISSN 0021-9673. Prieiga per: doi:10.1016/S0021-9673(01)93614-3
- [142] RAINA, V K, S K SRIVASTAVA, K K AGGARWAL, K V SYAMASUNDAR ir S P S KHANUJA. Essential oil composition of Cymbopogon martinii from different places in India. *Flavour and Fragrance Journal* [interaktyvus]. 2003, **18**(4), 312–315. ISSN 0882-5734. Prieiga per: doi:10.1002/ffj.1222
- [143] PALA-PAUL, J., A. VELASCO-NEGUERUELA, M.J. PEREZ-ALONSO ir J. SANZ. Analysis of the volatile components of Argyranthemum adauctum (Link.) Humphries by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2001, **923**, 295–298.
- [144] HOEKMAN, S.Kent. Improved gas chromatography procedure for speciated hydrocarbon measurements of vehicle emissions. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 1993, **639**(2), 239–253. ISSN 0021-9673. Prieiga per: doi:10.1016/0021-9673(93)80260-F
- [145] YAMAGUCHI, Kenji ir Takayuki SHIBAMOTO. Volatile constituents of green tea, Gyokuro (*Camellia sinensis* L. var Yabukita). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 1981, **29**(2), 366–370. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi:10.1021/jf00104a035
- [146] O. O. KORHONEN, Ilpo ir Juha KNUUTINEN. *Gas-liquid chromatographic analyses XXVII. Separation of chlorinated 4-hydroxybenzaldehydes on a capillary column*

- coated with non-polar SE30 stationary phase* [interaktyvus]. 1984. Prieiga per: doi:10.1016/S0021-9673(01)83614-1
- [147] TAKEOKA, Gary, Charles PERRINO ir Ron BUTTERY. Volatile Constituents of Used Frying Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 1996, **44**(3), 654–660. ISSN 0021-8561. Prieiga per: doi:10.1021/jf950430m
- [148] SHIBAMOTO, T., Y. KAMIYA ir S. MIHARA. Isolation and identification of volatile compounds in cooked meat: sukiyaki. *J. Agric. Food Chem.* 1981, **29**, 57–63.
- [149] SHASHKOVA, A.A., A.P. ZNAMENSKAIA ir L.Ya. PAS'KO. Investigation of esters of odd series halogenated acids with Kovats indices. *Gazovaya Khromatografiya*. 1969, **9**, 40–47.
- [150] MITRA, G. D., G. MOHAN ir A. SINHA. Advances in the utilization of the retention index system for characterizing hydrocarbons in complex mixtures by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 1974. ISSN 00219673. Prieiga per: doi:10.1016/S0021-9673(00)90857-4
- [151] BLANDO, Federica ir B. Dave OOMAH. Sweet and sour cherries: Origin, distribution, nutritional composition and health benefits. *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2019, **86**(February), 517–529. ISSN 09242244. Prieiga per: doi:10.1016/j.tifs.2019.02.052
- [152] NEMES, Andrea, Erzsébet SZOLLOSI, László STÜNDL, Attila BIRÓ, Judit Rita HOMOKI, Mária Magdolna SZARVAS, Péter BALOGH, Zoltán CZIÁKY ir Judit REMENYIK. Determination of flavonoid and proanthocyanidin profile of Hungarian sour cherry. *Molecules* [interaktyvus]. 2018, **23**(12). ISSN 14203049. Prieiga per: doi:10.3390/molecules23123278