



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Inovatyvus braškių išspaudų biorafinavimas į vertingus  
mitybos ingredientus ir jų sudėties bei savybių įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Simona Revinytė**

Projekto autorė

**Lekt., dr. Milda Pukalskienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Inovatyvus braškių išspaudų biorafinavimas į vertingus mitybos ingredientus ir jų sudėties bei savybių įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

---

**Simona Revinytė**

Projekto autorė

**Lekt., dr. Milda Pukalskienė**

Vadovė

**Dr. Ramunė Bobinaitė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Simona Revinytė

## **Inovatyvus braškių išspaudų biorafinavimas į vertingus mitybos ingredientus ir jų sudėties bei savybių įvertinimas**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Simonos Revinytės, baigiamasis projektas tema „Inovatyvus braškių išspaudų biorafinavimas į vertingus mitybos ingredientus ir jų sudėties bei savybių įvertinimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

---

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

---

(parašas)

Revinytė, Simona. Inovatyvus braškių išspaudų biorafinavimas į vertingus mitybos ingredientus ir jų sudėties bei savybių įvertinimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovė /lekt., dr. Milda Pukalskienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: braškių išspaudos, ekstrakcija, antioksidacinės savybės, fenoliniai junginiai, ekstraktai

Kaunas, 2019. 75 p.

## Santrauka

Braškės vienos iš populiariausių uogų, kurios vartojamos šviežios arba perdirbamos į įvairius maisto produktus, pavyzdžiui uogienes, džemus, tyres, vyną, arba iš jų spaudžiamos sultys. Po perdirbimo, lieka šalutinis produktas – išspaudos. Po sulčių spaudimo lieka apie 4–11 % braškių išspaudų [19, 20]. Braškių išspaudos yra žinomos kaip antrinių metabolinių junginių šaltinis, todėl gali būti panaudojamos, kaip funkcionaliojo maistui gamybai [6].

Šio darbo tikslas buvo išanalizuoti skirtingų ekstrakcijos metodų įtaką vertingų funkcionaliųjų komponentų išgavimui iš braškių (*Fragaria × ananassa*) išspaudų, taikant aukšto slėgio ir tradicinius ekstrakcijos metodus. Nustatyti gautų frakcijų/ekstraktų antioksidacines savybes, fenolinių bei aromato junginių sudėtį.

Tyrimo metu buvo nustatyta džiovintų braškių išspaudų cheminė sudėtis: drėgmės kiekis – 5,60 %, lipidų – 12,03 %, baltymų – 13,27 %, skaidulinių medžiagų – 32,5 % ir mineralinių medžiagų – 5,33 %. Atliktos 7 ekstrakcijos: maceracija purtant su etanoliu ir vandeniu, ekstrakcija padidintu slėgiu su etanoliu ir vandeniu bei daugiapakopė ekstrakcija: superkritinė ekstrakcija su CO<sub>2</sub>, jos metu gauta išspaudų liekana ekstrahuota padidintu slėgiu su etanoliu, vėliau gauta išspaudų liekana maceracuojiama vandeniu purtant. Atlikus ekstrakcijas, nustatyta, kad ekstraktas po daugiapakopės padidintu slėgiu ekstrakcijos su etanoliu turėjo didžiausią išeigą: 33,85 g/100 g SM. Taip pat atliktas superkritinės ekstrakcijos su CO<sub>2</sub> sąlygų optimizavimas: 36 MPa slėgis, 68 °C temperatūra ir 154 min ekstrakcijos dinaminis laikas.

Tyrimo metu, buvo nustatytos išspaudų, jų liekanų po ekstrakcijų ir gautų ekstraktų antioksidacinės savybės *Folin – Ciocalteu*’o, *ORAC*, *ABTS*<sup>•+</sup> ir *DDPH*<sup>•</sup> metodais. Nustatyta, kad ekstrahuojant padidintame slėgyje gauti ekstraktai pasižymėjo didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu ir bendru fenolinių junginių kiekiu. Išspaudose, likusiose po ekstrakcijų buvo 3,3–20 kartus mažesnis fenolinių junginių kiekis ir 1–2,4 kartus mažesnis antioksidacinis aktyvumas nei ekstraktuose.

Ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu, nustatyti kokybinė ir kiekybinė fenolinių junginių ir triacilgliceridų sudėtis tirtuose ekstraktuose. Lakiųjų junginių ir riebalų rūgščių sudėtis nustatyta dujų chromatografijos metodais. Vertinant antocianinų sudėtį tirtuose ekstraktuose, nustatyta, kad pelargonidin 3-gliukozidas buvo dominuojantis junginys. Identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti šie fenoliniai junginiai: elago ir p-kumaro rūgštis, kvercetin 3-gliukuronidas, tilirozidas, kampferol 3-gliukuronidas ir katechinas. Ekstrakte po superkritinės ekstrakcijos dominavo polinesočioji linolo riebalų rūgštis, o triacilgliceridas dilinolinoleatas. Nustatyta, kad braškių išspaudų ir gautų ekstraktų aromato pagrindą formuoja lakieji junginiai: γ-

dekalaktonas, etil heksadekanoatas,  $\gamma$ -dodekalaktonas, metil linoleatas, heksanalis, 1-heksanolis ir 1-penten-3-olis.

Revinytė, Simona. Innovative Biorefining of Strawberry Pomace into Valuable Nutritional Ingredients and Evaluation of their Composition and Properties. Master's Final Degree Project / supervisor lect., dr. Milda Pukalskienė; Chemical Technology Faculty, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: strawberries pomace, extraction, antioxidant properties, phenolic compounds, extracts.

Kaunas, 2019. 75.

### Summary

Strawberries are one of the most popular berries, usually used fresh or processed into various products: such as jams, puree, wine and juice. After juice processing a large amount of pomace is removed as a waste. Approximately about 4 to 11 % after juice production remains strawberry pomace [19, 20]. Strawberry pomace is known as a source of bioactive compounds, which could be used as an ingredient for functional food [6].

The aim of Master's project is to extract bioactive compounds from strawberries (*Fragaria × ananassa*) pomace using different extraction methods, such as multi-level extraction, accelerated solvent extraction (ASE) and supercritical carbon dioxide extraction. In addition Response Surface Methodology was used for the optimization of SFE parameters, pressure, time and temperature. High pressure extraction, to obtain maximum yield. Examine antioxidant properties, phenolic and aromatic compounds of obtained pomace fractions/extract after extraction. Evaluate proximate analysis of obtained pomace.

Proximate analysis showed, that dried strawberry pomace contain: moisture – 5,60 %, lipids – 12,03 %, proteins – 13,27 %, crude fiber – 32,5 % and minerals – 5,33 %. The highest yield was obtained after multistage pressurized extraction with ethanol (33,85 g/100 g DW). The maximum yield of CO<sub>2</sub> extract obtained using 40 MPa pressure, 70 °C temperature and 210 min dynamic time of extraction.

Antioxidant activity was determined by using the DPPH and ABTS<sup>•+</sup> radical cation methods and by applying ORAC method – oxygen radical absorbance capacity was determined. The *Folin Ciocalteu*'s method was used to measure the total phenolic compounds. The extracts were subjected to the traditional procedure and to solid fraction – QUENCHER procedure. Extracts obtained by pressurized liquid extraction with ethanol showed the highest antioxidant capacity and total phenolic content. Total phenolic content of pomace residue after various extractions was 3,3–20% lower than extracts. Antioxidant capacity of pomace residue was 1–2,4% lower than extracts.

In this study were identified and quantified triacylglycerols, anthocyanins and other phenolic compounds in different extracts by ultra efficient liquid chromatography – mass spectrometry. The composition of fatty acids and volatile compounds were analyzed by various gas chromatography methods. The major anthocyanin found in all analyzed extracts - pelargonidin 3-glucoside, the main phenolic acids and flavonoids were: ellagic, p-coumaric acids, quercetin 3-glucuronide and tiliroside. The polyunsaturated linoleic fatty acid was predominant in the supercritical CO<sub>2</sub> extract. The major identified aroma compounds in strawberry pomace and CO<sub>2</sub> extracts were:  $\gamma$ -

decalactone, ethyl hexadecanoate,  $\gamma$ -dodecalatone, methyl linoleate, hexanal, 1-hexanol and 1-penten-3-ol.

## TURINYS

Lentelių sąrašas .....	11
Paveikslų sąrašas .....	11
Santrumpų sąrašas .....	12
<b>ĮVADAS</b> .....	<b>13</b>
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....	<b>15</b>
1.1. Braškės ( <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> ), jų paplitimas ir panaudojimas.....	15
1.2. Braškių biocheminė sudėtis.....	16
1.2.1. Braškių biocheminė sudėtis po perdirbimo .....	20
1.3. Farmakologinis braškių poveikis .....	21
1.3.1. Antioksidacinės savybės.....	21
1.3.2. Poveikis sveikatai .....	22
1.4. Bioaktyviųjų junginių ekstrakcija.....	22
1.4.1. Tradiciniai ekstrakcijos būdai.....	23
1.4.2. Superkritinio skysčio ekstrakcija.....	25
1.4.3. Ekstrakcija padidintame slėgyje .....	27
1.4.4. Ekstrakcijos iš uogų išspaudų.....	28
<b>2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI</b> .....	<b>29</b>
2.1. Tyrimo objektas.....	29
2.2. Cheminiai reagentai ir medžiagos .....	31
2.3. Naudota įranga.....	31
2.4. Tyrimų metodai .....	32
2.4.1. Išspaudų cheminiai tyrimai.....	32
2.4.2. Ekstraktų gavimas .....	33
2.4.2.1. Maceracija .....	33
2.4.2.2. Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu.....	34
2.4.2.3. Ekstrakcija padidintame slėgyje .....	35
2.4.3. Antioksidacinių savybių įvertinimas .....	35
2.4.3.1. Bendras fenolinių junginių kiekis.....	35
2.4.3.2. ORAC nustatymas.....	36
2.4.3.3. ABTS <sup>+</sup> laisvųjų radikalų sujungimas .....	36
2.4.3.4. DPPH <sup>•</sup> radikalų sujungimas .....	37
2.4.4. Ultra efektyvioji skysčių chromatografija – masių spektrometrija.....	37
2.4.4.1. Antocianinų nustatymas .....	38
2.4.4.2. Trigliceridų sudėties nustatymas .....	38
2.4.5. Dujų chromatografija.....	39
2.4.5.1. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas .....	39
2.4.5.2. Lakiųjų junginių nustatymas .....	39
2.5. Duomenų matematinis ir statistinis įvertinimas .....	40
<b>3. TYRIMŲ REZULTATAI IR ANALIZĖ</b> .....	<b>41</b>
3.1. Braškių išspaudų cheminė sudėtis .....	41
3.2. SKE–CO <sub>2</sub> planavimas ir optimizavimas .....	41
3.3. Ekstraktų išeišgos.....	45
3.4. Ekstraktų antioksidacinis įvertinimas.....	45



3.5. Išspaudų ir jų liekanų po ekstrakcijų antioksidacinis įvertinimas .....	48
3.6. Organinių rūgščių ir fenolinių junginių kokybinė ir kiekybinė analizė .....	49
3.7. Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė .....	54
3.8. Riebalų rūgščių ir triacilglicerolių sudėties analizė.....	56
3.9. Lakiųjų junginių analizė .....	58
3.9.1. Lokieji junginiai braškių išspaudų SKE–CO <sub>2</sub> ekstrakte .....	58
3.9.2. Lokieji junginiai braškių išspaudose .....	59
<b>IŠVADOS .....</b>	<b>62</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS.....</b>	<b>63</b>
<b>PRIEDAI .....</b>	<b>75</b>
1 Mokslinė konferencija .....	75

## Lentelių sąrašas

<b>1 lentelė.</b> Tradicinių ekstraktų privalumai ir trūkumai.....	24
<b>2 lentelė.</b> Sąlygų vertės, projektuojant eksperimentines ekstraktas .....	34
<b>3 lentelė.</b> Braškių išspaudų cheminė sudėtis .....	41
<b>4 lentelė.</b> SKE–CO <sub>2</sub> plano dispersinė analizė .....	42
<b>5 lentelė.</b> Organinių rūgščių ir fenolinių junginių kokybinė analizė.....	52
<b>6 lentelė.</b> Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė braškių išspaudose ir jų ekstraktuose .....	55
<b>7 lentelė.</b> Riebalų rūgščių sudėtis braškių išspaudų SKE–CO <sub>2</sub> ekstrakto .....	56
<b>8 lentelė.</b> Trigliceridų sudėtis braškių išspaudų SKE–CO <sub>2</sub> ekstrakto.....	57
<b>9 lentelė.</b> Braškių išspaudų ekstrakto po SKE–CO <sub>2</sub> esantys lakieji junginiai .....	59
<b>10 lentelė.</b> Braškių išspaudose po SKE–CO <sub>2</sub> esantys lakieji junginiai .....	60

## Paveikslų sąrašas

<b>1 pav.</b> Fenolinių junginių struktūra .....	17
<b>2 pav.</b> Antocianidinų struktūra .....	18
<b>3 pav.</b> Elagitanino agrimonino molekulinė struktūra .....	18
<b>4 pav.</b> Furaneolio cheminė struktūra .....	19
<b>5 pav.</b> Soksleto ekstraktorius .....	24
<b>6 pav.</b> Medžiagos būsenos pokyčio priklausomumas nuo temperatūros ir slėgio .....	25
<b>7 pav.</b> SKE – CO <sub>2</sub> sistemos schema .....	26
<b>8 pav.</b> Išdžiovintos ir susmulkintos braškių išspaudos .....	29
<b>9 pav.</b> Tyrimų schema .....	30
<b>10 pav.</b> Faktinių ir prognozuojamų išeigų palyginimas, išgaunant SKE–CO <sub>2</sub> ekstraktą .....	43
<b>11 pav.</b> 3D ir kontūriniai grafikai, vaizduojantys SKE–CO <sub>2</sub> ekstrakto išeigos priklausomumą nuo ekstrakcijos sąlygų tarpusavio sąveikos .....	44
<b>12 pav.</b> Ekstraktų išgautų iš braškių išspaudų išeigos .....	45
<b>13 pav.</b> Bendras fenolinių junginių kiekis braškių išspaudų ekstraktuose .....	46
<b>14 pav.</b> Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumas ( <i>ORAC</i> ) braškių išspaudų ekstraktuose .....	47
<b>15 pav.</b> ABTS <sup>•+</sup> ir DPPH <sup>•</sup> radikalų sujungimas braškių išspaudų ekstraktuose .....	47
<b>16 pav.</b> Braškių išspaudų ir jų liekanų po ekstrakcijų bendras fenolinių junginių kiekis .....	49
<b>17 pav.</b> Braškių išspaudų ir jų liekanų po ekstrakcijų deguonies radikalų absorbcijos pajėgumas ( <i>ORAC</i> ) .....	49
<b>18 pav.</b> UESCh chromatograma, identifikuojant fenolinius junginius ekstraktuose .....	50
<b>19 pav.</b> Fenolinių junginių kiekybinė analizė braškių išspaudų ekstraktuose .....	53
<b>20 pav.</b> UESCh chromatograma, identifikuojant triglicerigų sudėtį braškių išspaudų SKE–CO <sub>2</sub> ekstrakto .....	57

## Santrumpų sąrašas

- AAPh – 2,2'-azobio (2-amidinpropano) dihidrochloridas;
- ABTS<sup>•+</sup> – 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties laisvieji radikalai ir jų surišimo nustatymo metodas;
- BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis;
- DCh – dujų chromatografija;
- DCh–MS – dujų chromatografija – masių spektrometrija;
- DPPH<sup>•</sup> – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilhidrato laisvieji radikalai ir jų surišimo nustatymo metodas;
- ekst. – po ekstrakcijos gautas ekstraktas;
- EPS – ekstrakcija padidintu slėgiu;
- EPS–ETOH – ekstrakcija padidintu slėgiu su etanoliu arba po jos gautas ekstraktas;
- EPS–H<sub>2</sub>O – ekstrakcija padidintu slėgiu su vandeniu arba po jos gautas ekstraktas;
- ESCh - efektyvioji skysčių chromatografija;
- ETOH – etanolis;
- GRE – galo rūgšties ekvivalentas;
- liek. – po ekstrakcijos gautų išspaudų liekana;
- MC – maceracija purtant;
- MC–ETOH – maceracija purtant etanoliu arba po šios ekstrakcijos gautas ekstraktas;
- MC–H<sub>2</sub>O – maceracija purtant su vandeniu arba po šios ekstrakcijos gautas ekstraktas;
- ORAC – deguonies radikalų absorbcijos pajėgumas;
- PBS – buferinis tirpalas antioksidaciniam aktyvumui nustatyti
- SKE – superkritinė ekstrakcija;
- SKE–CO<sub>2</sub> – superkritinė ekstrakcija su anglies dioksidu ir po jos gautas ekstraktas;
- SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH – po SKE–CO<sub>2</sub> gautų išspaudų liekanos ekstrakcija padidintu slėgiu su etanoliu ir gautas ekstraktas;
- SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH/H<sub>2</sub>O – po SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH gautų išspaudų liekanos maceracija purtant su vandeniu ir gautas ekstraktas;
- SM – sausa masė;
- SOK – soksleto ekstrakcija;
- TE – trolokso ekvivalentas;
- UESCh–MS – ultra efektyvioji skysčių chromatografija – masių spektrometrija.

## ĮVADAS

Braškės (lot. *Fragaria × ananassa*) yra vienos iš populiariausių uogų, vertinamos dėl savo skoninių savybių bei sudėtyje esančių bioaktyviųjų junginių: vitamino C, mineralinių medžiagų ir fenolinių junginių (elago rūgšties, antocianinų, kvercetino ir katechino) [1, 2]. Bioaktyvieji junginiai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, kurios yra svarbios įvairių ligų rizikos sumažinimui. Braškių fenoliniai junginiai turi antiuždegiminių, antimikrobinių, antikancerogeninių ir antihipertenzinių savybių [3]. Braškės dažniausiai valgomos šviežios, tačiau dėl savo trumpo galiojimo laiko yra perdirbamos. Iš braškių gaminamos uogienės, džemai, tyrės, vynas, spaudžiamos sultys. Gamybos metu susidaro nemažas kiekis šalutinių gamybos produktų – išspaudų.

Išspaudos – greitai gendantis produktas, todėl turi būti džiovinamas, vėliau sandėliuojamas ir transportuojamas, visa tai reikalauja papildomų išlaidų. Todėl dažniausiai išspaudos yra išmetamos arba naudojamos gyvulių pašarams ar trąšų gamyboje [4]. Tačiau augalinės išspaudos yra žinomos kaip antrinių metabolitų (fenolinių junginių) šaltinis. Ne retai šių bioaktyviųjų junginių (flavonolių, fenolinių rūgščių, flavononų, karotinoidų, antocianidinų, saponinų ar glikozidų) kiekis būna didesnis nei vaisių ar uogų minkštyme – iki 14 % [5, 6]. Išspaudose lieka visos augalų sėklos, kurios yra aliejingos (10–50 % aliejaus visos išspaudų masės) su jame esančiomis sočiosiomis ir nesočiosiomis riebalų rūgštimis [7]. Sėklose taip pat gausu baltymų. Baltymai ir amino rūgštys įvairiose išspaudose sudaro apie 7–13 %. [5]. Be to, išspaudos pasižymi dideliu skaidulinių medžiagų (celiuliozės, hemiceliuliozės, pektinų) kiekiu – iki 50 % [5, 7]. Todėl būtinas racionalus augalinių išspaudų, likusių po pramoninės gamybos, panaudojimas.

Braškių išspaudos gali būti naudojamos kaip ingredientas funkcionaliojo maisto gamyboje, papildant produktus bioaktyviais junginiais ir taip praturtint žmonių racioną papildomomis sveikata gerinančiom medžiagomis. Išspaudas galima panaudoti kepiniams, konditerijos gaminiams ar pieno produktams gaminti, taip produktą praturtinant papildomais komponentais bei suteikiant išskirtinio skonio savybes. Be to, ekstrakcijos būdu iš išspaudų gali būti išgauti konkretūs bioaktyvieji junginiai. Gauti ekstraktai taip pat naudojami produktų ar maisto papildų gamyboje.

**Darbo tikslas** – išanalizuoti skirtingų ekstrakcijos metodų įtaką vertingų funkcionaliųjų komponentų išgavimui iš braškių išspaudų (*Fragaria × ananassa*), taikant aukšto slėgio ir tradicinius ekstrakcijos metodus. Nustatyti gautų frakcijų/ekstraktų antioksidacines savybes, fenolinių bei aromato junginių sudėtį.

### **Darbo uždaviniai:**

1. nustatyti braškių išspaudų cheminę sudėtį (sausųjų medžiagų, riebalų, baltymų skaidulinių medžiagų, mineralinių medžiagų kiekį);
2. taikant paviršiaus atsako eksperimentinę planavimo metodiką sudaryti superkritinės ekstrakcijos su CO<sub>2</sub> (SKE – CO<sub>2</sub>) optimizavimo planą, kuriuo būtų galima nustatyti optimalias ekstrakcijos sąlygas, nustatant didžiausią ekstrakto išėigą optimizuojant laiko, slėgio, temperatūros parametrus.
3. išskirti braškių (*Fragaria × ananassa*) išspaudų ekstraktus, taikant padidinto slėgio bei tradicinius ekstrakcijos metodus;

4. įvertinti braškių išspaudų (kietos frakcijos) bei gautų ekstraktų, po skirtingų ekstrakcijos būdų antioksidacinį potencialą, taikant įvairius antioksidacinio aktyvumo *in vitro* metodus.
5. taikant šiuolaikiškus aukšto slėgio ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metodus, nustatyti skirtingų ekstraktų fenolinių junginių ir triacilglicerolių sudėtį;
6. nustatyti optimaliomis sąlygomis gautų SKE–CO<sub>2</sub> ekstraktų riebalų rūgščių sudėtį dujų chromatografijos metodu;
7. nustatyti optimaliomis sąlygomis gautų SKE–CO<sub>2</sub> ekstraktų lakiųjų junginių sudėtį dujų chromatografijos - masių spektrometrijos metodu;
8. nustatyti braškių išspaudų lakiųjų aromato junginių sudėtį statinės višerdvės kietafazės mikroekstrakcijos dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. Braškės (*Fragaria × ananassa*), jų paplitimas ir panaudojimas

Braškės priskiriamos erškėtinių (*Rosaceae*) šeimai, erškėtrožinių pošeimii (*Rosoideae*), žemuogių, braškių (*Fragaria* L.) genčiai. Populiariausios kultūrinės veislės daugiausiai kilusios iš stambiažiedžių žemuogių arba sodo žemuogių rūšių: *Fragaria grandiflora* Ehrh. ir sin. *Fragaria ananassa* Duch. [8].

Braškių augalai – daugiamečiai augalai su išsivysčiusiu šakniastiebiu (kereliu), kurio antžeminę dalį sudaro ūgliai ir lapai. Braškių žiedai – dvilyčiai ar vienalyčiai. Vieno augalo žydėjimas tęsiasi 10–23 dienas. Braškių augalų šaknys – kuokštinės, jaunų augalų jos būna baltos arba šviesiai rudos, o senesnių – rudos arba juodos. Braškių vaisiai – uogos, kurių paviršiuje yra riešutėliai su sėklomis. Uogos gali būti smulkios (iki 5 g), vidutinio stambumo (5–10 g) ir stambios (10 g ir daugiau). Prinokusių uogų spalva – nuo rožinės iki raudonos [8]. Braškių uogos – sultingos tekstūros, ryškaus aromato ir saldaus skonio [9].

Braškės gali augti įvairiomis aplinkos sąlygomis, todėl yra paplitusios visame pasaulyje. Intensyviausiai braškės auginamos Kinijoje, Europoje ir Šiaurės Amerikoje [10]. Išaugintų braškių kiekis pasaulyje vis didėja, 2017 metais jų derlius siekė 9,2 mln. tonų. Didžiausia augintoja pasaulyje yra Kinija, ji užaugina 40 % viso pasaulio braškių derliaus. Europoje daugiausiai braškių užauginama Ispanijoje (36 tūkst. tonų 2017 metais), tai sudaro apie 4 % viso pasaulio derliaus [11]. Lietuvoje užauginamų braškių kiekis pastaraisiais metais mažėja. Pagal Lietuvos statistikos departamento duomenis 2018 metais braškių derlius Lietuvoje buvo 2,4 tūkst. tonų [12].

Braškės pasižymi geromis skoninėmis savybėmis, todėl dažnai valgomos šviežios [13]. Tačiau ilgai jos negali išsilaikyti šviežios, todėl turi būti apdorojamos. Norit uogas išlaikyti ilgesnį laiką vartojamomis, didelė jų dalis yra šaldoma, taip pat perdirbama: spaudžiamos sultys, gaminami gaivieji gėrimai, nektarai, vynas, uogienės, džemai ir tyrės [14, 15]. Apie 21 % braškių yra panaudojamos sulčių ir uogienių gamyboje. Produktams pagaminti yra naudojami braškių koncentratas, kuris gaunamas išspaudžiant braškių minkštimą per specialius sietus [16].

Po pramoninio uogų perdirbimo lieka nemažai šalutinių produktų, t.y išspaudų, jas sudaro minkštimo, kotelių liekanos bei uogų sėklos [17]. Vidutiniškai braškių išspaudas sudaro apie 40 % sėklų ir 55 % braškių minkštimo [18]. Po sulčių spaudimo lieka apie 4–11 % braškių išspaudų [19, 20]. Braškių išspaudos yra žinomos kaip antrinių metabolinių junginių šaltinis, todėl gali būti naudojamos funkcionaliajam maistui gaminti [6].

Uogų išspaudos naudojamos kepinių gamyboje, kaip pridėtinis funkcionalusis ingredientas. Bandelėse praturtintose braškių išspaudomis buvo aptikta tokių fenolinių junginių, kurie randami ir šviežiose uogose. Pasirinkus trumpą kepimo laiką bei aukštą temperatūrą, bandelėse išliko didžioji dalis flavonolių glikozidų, deja antocianinai nėra tokie patvarūs, kepimo metu jų prarandama 36–97 %. Bandelės su braškių išspaudomis pasižymėjo geru skoniu bei bendru priimtinumu [21]. Džiovinotos braškių sėklos buvo panaudotos duonos be gliuteno gamyboje. Į duoną pridėjus 15 % sėklų, pastebėti teigiami duonos tekstūros pokyčiai. Kvapo ir skonio atžvilgiu duonos kokybė ir priimtumas pagerėjo. Be to, produkte padidėjo baltymų, skaidulinių medžiagų ir fenolinių junginių [22].

Moklinėje literatūroje yra duomenų apie skirtingų ekstraktų taikymą bioaktyviųjų junginių išgavimui iš uogų išspaudų [23, 24]. Gauti ekstraktai gali būti įkapsuliuojami, taip suteikiant juose esantiems bioaktyviesiems junginiams stabilumą ir apsaugą nuo aplinkos poveikio. Išimtiniais atvejais, ekstraktai gali būti įkapsuliuojami, norint užmaskuoti nepageidaujamas jų organoleptines savybes. Įkapsuliuojimas naudojamas maisto papildų gamyboje arba funkcionaliųjų maisto produktų praturtinimui bioaktyviaisiais junginiais [25].

## 1.2. Braškių biocheminė sudėtis

Braškių, kaip ir visų kitų uogų, biocheminė sudėtis priklauso nuo veislės, subrendimo laipsnio, augalo amžiaus ir aplinkos sąlygų, kuriomis buvo auginamos: klimato sąlygų, dirvožemio sudėties, temperatūros, pH, taip pat derliaus nuėmimo laiko ir laikymo sąlygų. Be to fenolinių junginių kiekis žaliavoje dažnai priklauso nuo tyrimo metodikos, kuria išekstrahuojami (organinių tirpiklių sudėtis) ir identifikuojami junginiai [20, 26, 27, 28, 29].

Uogos pasižymi mažu kalorijų ir riebalų kiekiu, tačiau savo sudėtyje turi daug cukrų (gliukozės, fruktozės) ir skaidulinių medžiagų (celiuliozės, hemiceliuliozės, pektino). Taip pat savo sudėtyje uogos turi nemažai fitocheminių medžiagų, kurios pasižymi antioksidacinėmis savybėmis – fenolinių junginių [29]. Braškės yra žinomos kaip vitamino C, organinių rūgščių [2, 28] ir antrinių metabolitų: antocianinų, flavonoidų ir taninų, šaltinis [30].

Šviežių braškių energetinė vertė – 32 kcal arba 134 kJ. Pagal maistinės vertės apibūdinimą, 100 g šviežių braškių yra 7,68 g angliavandenių, iš kurių 2,0 g yra skaidulinių medžiagų ir 4,89 g cukrų. Baltymų šviežiose braškėse – 0,7 g/100 g, riebalų – 0,3g/100 g [31]. Vandens kiekis šviežiose braškėse yra 90–93 %, o tirpių sausų medžiagų yra apie 8 % [30, 32].

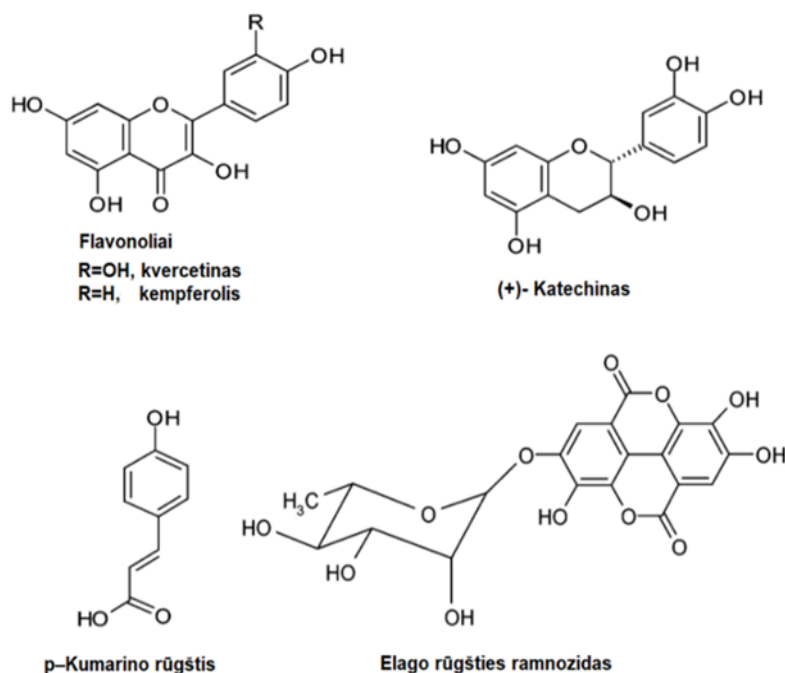
Kalis, kalcis ir magnis yra pagrindinės mineralinės medžiagos randamos šviežiose braškėse. Priklausomai nuo braškių veislės, kalio randama nuo 155 iki 253 mg/100 g, tai yra apie 4 % rekomenduojamos paros normos sveikam suaugusiam žmogui (RPN), kalcio – nuo 16 iki 29 mg/100 g (2 % RPN) ir magnio – nuo 11 iki 23 mg/100g (3 % RPN) [30, 31]. Taip pat randama 24 mg/100 g (2 % RPN) fosforo ir 0,4 mg/100 g (19 % RPN) mangano [31].

Cukrūs ir organinės rūgštys vaidina svarbų vaidmenį uogų sensorinėms savybėms. Cukrūs braškėms suteikia saldumą, taip pat svarbūs maistiniu požiūriu. Cukrų kiekis braškėse, lyginant su kitomis uogomis, yra didelis [33]. Cukraus kiekis, priklausomai nuo braškių veislės, yra apie 4–7 % [34]. Gliukozė, fruktozė ir sacharozė yra pagrindiniai cukrūs, esantys braškių biocheminėje sudėtyje, [27] ir jie sudaro daugiau nei 65 % visų cukrų, esančių šviežiose braškėse [34]. Gliukozės kiekis yra 19,7–27,3 g/kg, fruktozės – 21,3–30,2 g/kg, o sacharozės – 2,48–13,55 g/kg šviežių braškių [35]. Organinės rūgštys braškių sudėtyje sudaro nedidelę dalį [27]. Organinių rūgščių kiekis šviežiose braškėse yra 0,49–0,95 % [34]. Citrinų rūgštis yra pagrindinė organinė rūgštis, esanti šviežiose braškėse, jos kiekis – 8,5–13 g/kg šviežių braškių. Obuolių rūgštis yra apie 2,1–9,6 g/kg, gintaro rūgštis – 1,2–2,5 g/kg, fumaro rūgštis – apie 0,5 g/kg [34, 35, 36]. Cukrų ir organinių rūgščių santykis lemia uogų skonį. Daug cukraus turinčios uogos nebūtinai bus saldžios. Saldžioms uogoms būdingas mažas organinių rūgščių kiekis [37]. Lyginant su kitomis uogomis, šviežiose braškėse cukrų/organinių rūgščių santykis yra vidutinis, todėl braškes galima pavadinti saldžiarūgštėmis [35].



Askorbo rūgštis yra viena svarbiausių organinių rūgščių, esančių braškėse [38]. Vitaminas C arba askorbo rūgštis yra vandenyje tirpus vitaminas, turintis antioksidacinių savybių [39]. Askorbo rūgšties kiekis braškėse priklauso nuo uogų veislės ir laikymo sąlygų [28]. Askorbo rūgšties kiekis paprastai svyruoja nuo 5 iki 50 mg/100 g, kai kuriose veislėse randama net iki 80 mg/100 g šviežių braškių [28, 29]. Vitamino C kiekis šviežiose braškėse sudaro net 98 % RPN suaugusiam žmogui [31]. Sandėliavimas ir netinkamos laikymo sąlygos (pvz., per aukšta temperatūra) prisideda prie spartaus askorbo rūgšties sumažėjimo [29, 39, 40].

Fenoliniai junginiai – junginiai turintys vieną ar daugiau aromatinių žiedų su viena ar keliomis hidroksilo grupėmis (žr. 1 pav). Fenoliniai junginiai randami laisvoje arba konjuguotose formose su cukrumi arba rūgštimis [29].

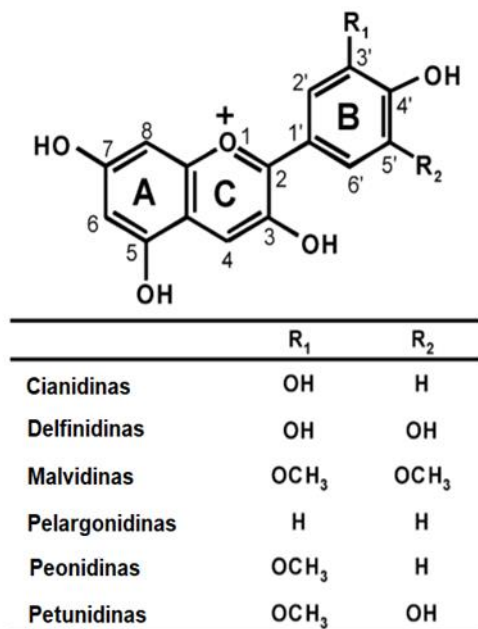


**1 pav.** Fenolinių junginių struktūra [41, 42]

Braškių uogose, lapuose ir šaknyse aptinkama apie 52 fenolinių junginių (procianidinų, elagitaninų, elago ir kitų fenolinių rūgščių, flavonolių darinių) [18, 43, 44].

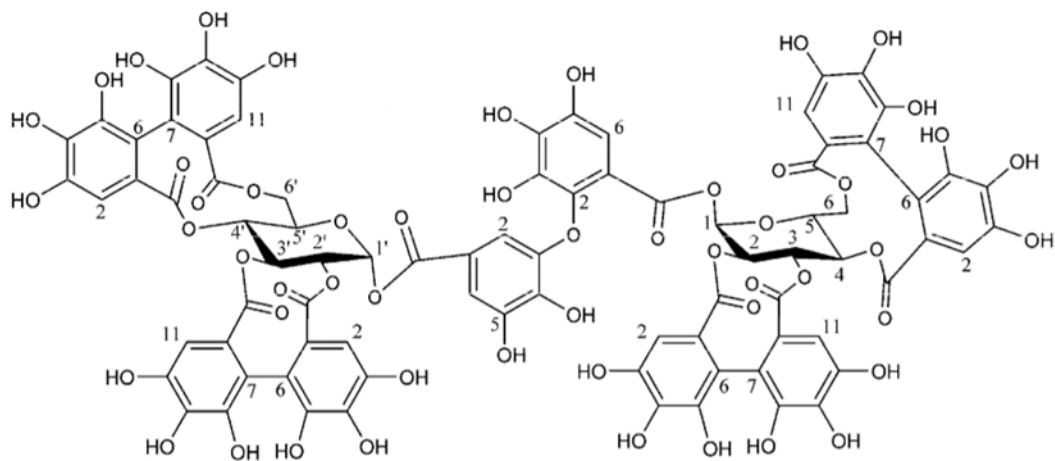
Antocianinai – tai vandenyje tirpūs, antocianidinų glikozidai, žinomi kaip augalų pigmentai [45, 46]. Antocianidinai turi tipinę flavonoidams būdingą struktūrą (žr. 2 pav.) [45]. Antocianinai – antocianidinai, kurių struktūroje nėra cukrų. Nuo antocianinų priklauso uogų spalva, kuri padeda įvertinti uogų brandumo laipsnį [30, 46]. Braškių raudona spalva rodo, kad antocianinai yra svarbūs fenoliniai junginiai, nulemiantys uogų spalvos pokyčius ir kokybę [46]. Šie junginiai sudaro 13–45 % visų fenolinių junginių kiekį šviežiose braškėse [47]. Bendras antocianinų kiekis svyruoja nuo 200 iki 935 mg/kg šviežių braškių [47, 48, 49]. Pelargonidin 3-gliukozidas yra pagrindinis antocianinas braškėse, jis sudaro 77–90 % visų antocianinų kiekio šviežiose braškėse (153–726 mg/kg šviežių braškių) [30, 48, 49, 50]. Taip pat braškėse aptinkama pelargonidin 3-rutinozido (apie 6–15 % visų antocianinų šviežiose braškėse) ir cianidin 3-gliukozido (apie 3–10 % visų

antocianinų šviežiose braškėse) [48, 49]. Mažesniais kiekiais taip pat randama pelargonidin 3(6-acetil)-gliukozido ir cianidin 3-galaktozido [50]. Kai kuriose braškių veislėse aptinkama ir kitokių antocianinų: pelargonidin 3-arabinozido, cianidin 3-rutinozido, pelargonidin digliukozido, taip pat acilintų antocianinų: pg 3-(6-malonil) gliukozido, pg 3-acetilgliukozido ir pg-sukcinilgliukozido [49, 51]. Braškių lapuose ir šaknyse antocianinų neaptinkama [43].



2 pav. Antocianidinų struktūra [45]

Braškės yra vienos iš nedaugelio uogų, kuriose gausu elagitaninų [44]. Elagitaninai yra labai plati fenolinių junginių grupė, tai didelės molekulinės masės monosacharidų esteriai [18]. Elagitaninai susideda iš daugelio struktūrinių blokų, pavyzdžiui glukožės, elago, galo ar heksahidroksidifeno rūgščių, kurie yra panašūs savo chemine struktūra. Dėl šios priežasties daugelio elagitaninų masių spektrai yra panašūs arba identiški, todėl yra sudėtinga juos identifikuoti pagal molekulinę masę [44]. Šviežiose braškėse aptinkama apie 80–184 mg/100 g elagitaninų [50, 52]. Pagrindinis elagitaninas braškėse yra agrimoninas (žr. 3 pav.), jo taip pat randama braškių lapuose ir žieduose [18, 44].



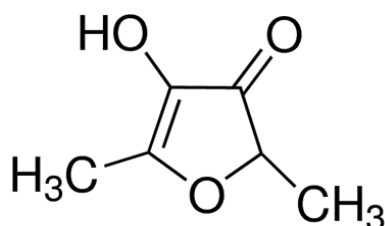
3 pav. Elagotano agrimonino molekulinė struktūra [44]

Dar vieni iš taninų, kurių nemažas kiekis randamas braškėse, yra proantocianidiniai [53, 54]. Tai sutrumpintos cheminės struktūros polimerai, sudaryti iš flavonoidų monomerų, kurių struktūroje nėra cukrų [55]. Dažnai proantocianidinų kiekis nebūna tinkamai įvertinamas, nes dažniausiai jie analizuojami kartu su kitais vandenyje tirpiaisiais fenoliniais junginiais, o metodikų nėra, kurios būtų skirtos tik šiems junginiams [56]. Proantocianidinų kiekis braškėse yra apie 6–10 mg/100 g šviežios masės [52, 58]. Procianidiniai – tai proantocianidinams priklausantys oligomerai, susidarantys iš katechino ir epikatechino monomerų [58]. Procianidino dimerų šviežiose braškėse randama 82–144 mg/kg, procianidinų trimerų – 28–172 mg/kg ir procianidinų tetramerų – 20–39 mg/kg [59].

Pagrindinis flavanolis, randamas šviežiose braškėse, yra (+)- katechinas, mažesniais kiekiais aptinkama epikatechino [30, 36, 50, 57, 59]. Bendras flavonolių kiekis braškėse yra apie 100 mg/100 g šviežios masės [59]. Braškės pasižymi flavonolių įvairove: kvercetino ir kampferolio glikozidais, hidroksicinamo rūgščių esteriais: p-kumaro rūgštimi, elago rūgštimi ir elago rūgšties glikozidais [18, 19, 47, 60]. Remiantis įvairiais šaltiniais, bendras kvercetino kiekis šviežiose braškėse svyruoja nuo 6 iki 57 mg/kg, o bendras kampferolio kiekis – nuo 5 iki 23 mg/kg šviežios masės [30, 61, 62]. Bendras flavonolių kiekis šviežiose braškėse yra 1,2–20 mg/100 g [36, 47, 52, 57, 61, 62].

Elago ir p-kumaro rūgštys yra dvi pagrindinės fenolinės rūgštys, vyraujančios braškėse [26]. Braškės yra vienos iš uogų, kuriose yra nemažas kiekis elago rūgšties (apie 51 % visų analizuojamų junginių braškėse) [63, 64]. Ši vandenyje netirpi fenolinė rūgštis augaluose randama laisvoje formoje, kaip elago rūgšties glikozidai arba kaip esterifikuoti elagotaininai. Tam, kad ją išlaisvinti turi būti vykdoma rūgštinė hidrolizė [30]. Braškių lapuose elago rūgšties aptinkama 4 kartus daugiau nei uogose, o p-kumaro rūgšties net 12 kartų daugiau [36]. Be elago ir p-kumaro rūgščių, taip pat šviežiose braškėse aptinkama galo rūgštis (1–44 mg/kg šviežios masės), p-hidroksibenzoinės rūgšties (10–36 mg/kg šviežios masės) [65] ir ferulo rūgšties (6–21 mg/kg šviežios masės) [53]. Bendras fenolinių rūgščių kiekis šviežiose braškėse svyruoja tarp 8 ir 67 mg/kg šviežios masės [53].

Braškių uogose aptinkama virš 360 lakiųjų aromatų. Kaip cukrūs ir rūgštys, lakieji junginiai taip pat yra svarbūs sensorinėms braškių savybėms [66]. Braškių aromatą nulemia sudėtingas lakiųjų junginių (esterių, laktonų, furanonų, terpenoidų, aldehidų, alkoholių ir sieros junginių) mišinys [67, 68]. Subrendusios, ryškiai raudonos spalvos uogos turi didžiausią kiekį lakiųjų junginių [69]. 2,5-dimetil-4-hidroksi-3(2H)-furanonas (furaneolis) (žr. 4 pav.) ir 2,5-dimetil-4-metoksi-3(2H)-furanonas (mezifuranas) yra furanonai, atliekantys esminį vaidmenį formuojant braškių aromatinę sudėtį [66, 69]. Jie suteikia braškėms būdingą saldžiai karamelinį, vaisių ir gėlių aromatą [67]. Bendras furanonų kiekis šviežiose sunokusiose braškėse yra apie 13,6–21,2 % [69].



4 pav. Furaneolio cheminė struktūra [70]

Esteriai – dar viena svarbi aromatinių junginių grupė, jie sudaro 25–90 % visų lakiųjų komponentų šviežiose braškėse [67]. Tokie esteriai kaip, metil ir etil butanoatai, metil ir etil heksanoatai, metil 2–metilbutanoatas, etil 2-metilbutanoatas, heksil ir (E)-heks-2-enil acetatai yra dažniausiai aptinkamai esteriai šviežiose braškėse [69, 71, 72]. Butanoatai ir heksanoatai sudaro apie 50–80% šviežiose braškėse esančių lakiųjų junginių. Esteriai susidaro tik subrendusių vaisių stadijoje [67].

Braškių aromatą taip pat formuoja terpenoidai: (E)-furan linalolio oksidai, (Z)-furan linalolio oksidai, linalolis ir nerolidolis. Terpenoidų kiekis subrendusiose šviežiose braškėse yra 0,7–1,4 %. Kita lakiųjų junginių grupė aptinkama nemažais kiekiais braškėse yra laktonai ( $\gamma$ -dekalaktonas,  $\gamma$ -heksalaktonas,  $\gamma$ -oktalaktonas ir  $\gamma$ -dodekalaktonas). Bendras laktonų kiekis šviežiose prinokusiose braškėse yra 4,7–8,7 % [67, 69, 71, 73].

Sieros junginiai, nors jų kiekiai nėra dideli, taip pat yra svarbūs braškių aromato formavime [67]. Metanetiolis, dimetilsulfidas, dimetildisulfidas, metiltiolio acetatas yra dažniausiai pasitaikantys sieros junginiai braškėse, ypač daug jų aptinkama senesnėse veislėse [74].

Nesubrendusiose, žaliose uogose daugiausiai aptinkama 6 anglies atomus turintys alkoholiai: heksanalis, (Z)-heks-3-enalis, (E)-heks-2-enalis, heksanolis, (Z)-heks-3-en-1-olis, (E)-2-heksen-1-olis, jų kiekiai uogai bręstant mažėja, subrendusiose uogose jų yra apie 2 % [69, 75].

Rūgštys, nedaro didelės įtakos braškių aromato susiformavimui, tačiau 2-metilbutano rūgštis laikoma svarbiausia rūgštimi nulemiančia braškių kvapą, taip pat aptinkama butano ir heksano rūgščių [69, 72].

### **1.2.1. Braškių biocheminė sudėtis po perdirbimo**

Apdorojimo metu, ląstelių struktūra suardoma ir uogos gali greičiau oksiduotis. Apdorojimo ir laikymo įtaka junginių kiekiui labai skiriasi ir priklauso nuo junginių jautrumo aplinkos poveikiui. Pavyzdžiui, askorbo rūgštis yra termiškai jautri, todėl šio rūgšties kiekis po apdorojimo smarkiai sumažėja. Taip pat pastebimas bendro fenolinių junginių kiekio sumažėjimas, tačiau kai kurių fenolinių junginių kiekiai po perdirbimo ar produktų laikymo nepasikeičia arba netgi gali padidėti [1, 15, 57].

Aaby ir kt. [57] nustatė, kad anocianinų kiekis, perdirbant uogas į tyrę, sumažėja apie 15 %, o perdirbtus produktus laikant ilgesnį laiką kambario temperatūroje, antocianinų kiekis sumažėjo net daugiau nei 90 %. Askorbo rūgšties kiekis braškių tyrėje buvo 18 % mažesnis nei šviežiose, laikymo metu šios rūgšties kiekis dar labiau sumažėjo arba visai nebuvo aptikta. Bendras fenolinių junginių kiekis po braškių apdorojimo sumažėjo apie 20 %. Tačiau rezultatai rodo, kad po terminio apdorojimo elago rūgšties glikozidų, p-kumarolglikozidų ir flavonolių kiekio sumažėjimas buvo nežymus, o proantocianidinų kiekis netgi buvo didesnis, padidėjo 23 %.

Šviežiai spaustose apdorotose braškių sultyse proantocianidiniai yra pagrindiniai junginiai. Drumstose sultyse su braškių minkštimu proantocianidinų kiekis 2–2,5 karto didesnis nei šviežiose uogose. Atliktas tyrimas parodė, kad po sulčių išspaudimo antocianinų kiekis sumažėjo, tačiau pastebėta, kad drumstose sultyse esantys pektinai slopino antocianinų skilimą, įvykusį dėl terminio apdorojimo. Kitų fenolinių junginių kiekiai žymiai nesiskyrė nuo pradinėje žaliavoje aptiktų. Laikymo metu patirti fenolinių junginių nuostoliai buvo ženkliai didesni nei po uogų apdorojimo [76]. Terminis apdorojimas askorbo rūgšties kiekį braškių sultyse sumažino apie 36 % [1].

Po sulčių spaudimo atsiradusiose braškių išspaudose lieka nemažas kiekis fenolinių junginių (apie 5,4 %). Išspaudose randamas didelis kiekis flavanolų ir elagotaninų, bendrai jų kiekis viršija 95 % visų fenolinių junginių aptiktų braškių išspaudose. Elagotaninas agrimoninas yra vienas iš pagrindinių flavonoidų esančių braškių išspaudose, jo kiekis – apie 1000 mg/100 g SM. Taip pat išspaudose aptinkamas nemažas kiekis proantocianidinų (1089–2140 mg/100 g SM). Tokie dideli proantocianidinų ir elagitaninų kiekiai paaiškinami tuo, kad šie junginiai būna prisijungę prie ląstelių sienelių, todėl spaudžiant sultis, jie dažniausiai lieka išspaudose [18]. Nustatyta, kad į braškių sultis patenka tik 20 % visų proantocianidinų esančių šviežiose braškėse [77]. Antocianinų kiekis išspaudose nėra didelis – 0,2 % visų fenolinių junginių išspaudose [18]. Didžioji dalis antocianinų patenka į sultis. Oszmianski ir kt. [76] nustatė, kad net 90 % antocianinų, esančių šviežiose braškėse, patenka į braškių sultis. Išspaudos taip pat yra skaidulinių medžiagų ir nesočiųjų riebalų rūgščių šaltinis [18]. Braškių sėklų aliejus pasižymi pageidautinu omega 6 ir omega 3 riebalų rūgščių santykiu [78]. Palmitino ir stearino rūgštys yra pagrindinės sočiosios riebalų rūgštys braškių sėklų aliejuje. Linolo ir  $\alpha$ -linoleno rūgštys yra pagrindinės nesočiosios riebalų rūgštys braškių išspaudų aliejuje [79].

### 1.3. Farmokologinis braškių poveikis

#### 1.3.1. Antioksidacinės savybės

Augalinės kilmės antioksidantai (vitaminai, flavonoidai, karotinoidai) silpnina oksidacijos reakcijas, veikia kaip laisvųjų radikalų ir peroksidų surišėjai bei fermentų inhibitoriai. Kitaip tariant turi konservuojančių ir apsaugančių ląsteles nuo aplinkos poveikio savybių [2, 82]. Laisvieji radikalai – nestabilūs, sužadinti atomai ir molekulės. Jie greitai ir lengvai reaguoja su kitais junginiais ir taip sustiprina savo stabilumą. Įvykstanti laisvųjų radikalų grandininė reakcija su ląstelėmis, paveikia organizmo biologines sistemas ir sukelia oksidacinį stresą, kartu skatinant ligų atsiradimą [83].

Fenolinių junginių antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo jų cheminės struktūros, ypač nuo hidroksilo grupių skaičiaus ir padėties bei aromatinių žiedų pobūdžio [41]. Askorbo rūgštis, elagitaninai ir antocianinai labiausiai lemia braškių antioksidacinį aktyvumą [84]. Askorbo rūgštis paprastai pripažįstama kaip viena iš pagrindinių, natūraliai atsirandančių antioksidantų vaisiuose, turinti apsauginį poveikį nuo įvairių ligų, kurias sukelia oksidacinis stresas [85].

Braškės pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu [86, 87, 88]. Guo ir kt. [89] nustatė, kad šviežių braškių antioksidacinis aktyvumas – 1,3 kartų didesnis už apelsinų, 2 kartus didesnis už raudonųjų vynuogių, 5 kartus didesnis už obuolių ir bananų, ir net 13 kartų didesnis už melionų. Antioksidantų aktyvumas labiausiai priklauso nuo braškių veislės ir laikymo sąlygų [2, 90]. Antioksidantų aktyvumui nustatyti dažniausiai yra apskaičiuojamas deguonies radikalų absorbcijos pajėgumas (angl. *ORAC*) ir 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS<sup>•+</sup>) laisvųjų radikalų sujungimas [90]. Šviežių subrendusių braškių *ORAC* yra 12–53  $\mu\text{mol}$  trolokso ekv. (TE)/g šviežiose braškėse [2, 91], o ABTS<sup>•+</sup> sujungimas šviežiose braškėse yra 3,1–3,6  $\mu\text{mol}$  TE/100 g SM [2]. Terminio apdoravimo ir laikymo metu antioksidantų aktyvumas sumažėja [1, 76, 92].

Lapai pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei uogos. Jaunuose braškių lapuose *ORAC* yra apie 136  $\mu\text{mol}$  TE/g šviežiuose lapuose, lapams senstant jų antioksidacinis aktyvumas sumažėja iki 95  $\mu\text{mol}$  TE/g šviežiuose lapuose [91].

### 1.3.2. Poveikis sveikatai

Braškių fenoliniai junginiai turi antiuždegiminių, antimikrobinių, antikancerogeninių savybių ir gali sumažinti kraujospūdį [93].

Atlikta nemažai tyrimų su gyvūnais ir žmonėmis, įrodančių braškių efektyvumą prieš įvairius uždegimus [93]. Tyrimo rezultatai su nutukusiomis pelėmis, parodė, kad reguliarus braškių vartojimas gali prisidėti prie tinkamo gliukozės kiekio kraujyje sureguliuavimo, bei reguliuoti uždegimines vietas [94]. Kitas tyrimas su pelėmis, parodo, kad braškės gali užkirsti kelią trombu susidarymui arterijose, taip sumažinant riziką aterosklerozės atsiradimui [95]. Braškėse gausu elagotaninų, kurie turi antimikrobinį poveikį žmogaus virškinamojo trakto potogeninėms bakterijoms (*Salmonella* ir *Staphylococcus*) [96, 97]. Antocianinai, esantys braškėse ir mėlynėse, sumažina hipertenzijos riziką suaugusiems žmonėms. 14 metų stebėjimai su žmonėmis parodė, kad riziką susirgti hipertenzija antocianinai sumažino 12 % [98]. Epidemiologiniai stebėjimai su žmonėmis taip pat rodo, kad braškės gali turėti teigiamą poveikį širdies ir kraujagyslių sistemai [99, 100]. Cassidy ir kt. [101] stebėjimai su žmonėmis parodė ryšys tarp didelio antocianinų (daugiausiai iš braškių ir mėlynių) vartojimo ir miokardo infarkto rizikos sumažėjimo.

Basu ir kt. [102] atliko tyrimą su moterimis, turinčiomis metabolinį sindromą, kurį apibūdina įvairūs sveikatos sutrikimai: nutukimas, aukštas kraujo spaudimas, didelis cukraus ir triacilglicerolių kiekis kraujyje. Rezultatai rodo, kad liofilizuotų braškių miltelių gėrimas sumažino bendrąjį ir LDL cholesterolius kraujyje. Taip pat pastebėtas lipidų peroksidacijos sumažėjimas. Kitame tyrime su pelėmis, kur taip pat mityboje buvo naudojami liofilizuoti braškių milteliai, nustatyta, kad naudojant šiuos miltelius, sumažino pelių nutukimas [103]. Pastarieji tyrimai rodo, kad braškės gali būti kaip mitybos priemonė, sumažinanti riziką su nutukimu susijusioms ligoms (pvz., II tipo cukriniu diabetu) [93, 102, 103].

Kiti epidemiologiniai tyrimai rodo, kad elago rūgštis, kurios gausu braškėse, pasižymi antimutageniniu ir antikancerogeniniu poveikiu [104, 105]. Taip pat braškėse esantys antioksidantai gali slopinti žmogaus vėžinių ląstelių (burnos, storosios žarnos, krūties ir prostatos) augimą *in vitro* sistemose [106, 107]. Tyrimai su žmonėmis parodė, kad didesnis *Rosaceae* šeimos uogų, įskaitant ir braškių, vartojimas susijęs su stemplės vėžinių ląstelių sumažėjimu [108, 109]. Taip pat nustatyta, kad braškių ekstraktai gali slopinti plaučių vėžio formavimą [110].

Tačiau braškių antioksidacinių junginių veiksmingumas nėra galutinai aiškus žmogaus organizmui. Daugelis tyrimų atliekami *in vitro* sistemose, todėl rezultatai gali neatitikti fiziologinių žmogaus organizmo mechanizmų [111]. Šiuo atveju būtini išsamesni tyrimai *in vivo*, nustatinėjant antioksidantų efektyvumą žmogaus mityboje [112].

### 1.4. Bioaktyviųjų junginių ekstrakcija

Aktyviųjų junginių ekstrahavimui naudojami tradiciniai būdai: maceracija organiniuose tirpikliuose, perkoliacija, mechaninis purtymas, soksletas, arba novatoriškesni būdai: aukšto slėgio superkritinių skysčių ar ekstrakcija padidintame slėgyje (angl. ASE), mikrobangų, ultragarso, impulsinio elektrinio lauko ar fermentinės ekstrakcijos. Tradicinėse ekstrakcijose naudojamas nemažas kiekis tirpiklių, todėl populiarėja pažangesnės technologijos, kurios sumažina ekstrakcijos proceso sąnaudas ir padidina intensyvumą [114].

Galimas ekstrakcijų kombinuotas metodas, pavyzdžiui, superkritinė skysčių ekstrakcija su ultrafiltravimu arba mikrobangų su ultragarsu ekstrakcija. Tokie metodai rodo geresnius ekstrahavimo rezultatus, išgaunamas maksimalus junginių kiekis per trumpesnę ekstrahavimo laiką, sunaudojamas mažesnis tirpiklio kiekis, užtikrinamos mažesnės proceso sąnaudos [114].

Aktyviųjų junginių išskyrimui iš augalinių žaliavų didelės įtakos turi nemažai sąlygų: ekstrakcijos laikas, temperatūra, tirpiklio tipas, tirpiklio kiekis, mėginio ir tirpiklio tarpusavio santykis, poliškumo savybės. Taip pat ekstrakcijos efektyvumui svarbus pirminis žaliavos paruošimas, drėgnumas ir dalelių dydis [114].

#### **1.4.1. Tradiciniai ekstrakcijos būdai**

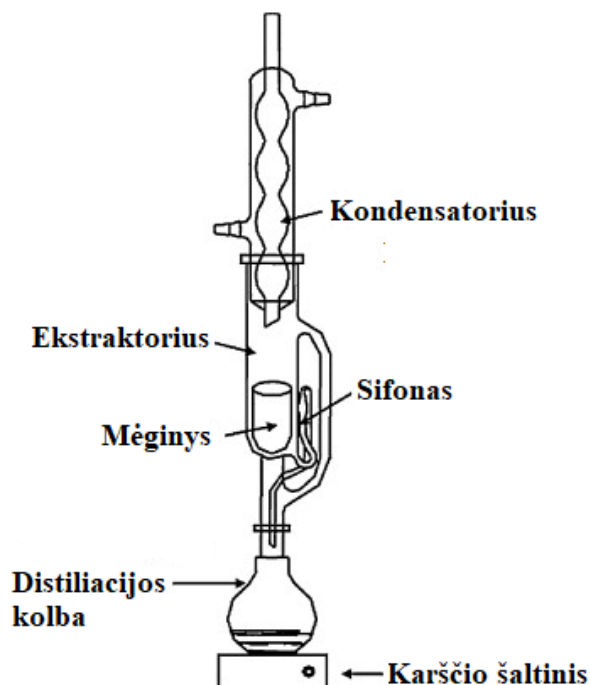
Ekstrahuojant įvairiais tirpikliais, vienas iš populiariausių ekstrahavimo būdų junginiams išskirti. Tirpiklis veikia kaip nešiklis, su kuriuo molekulės perkeliama į skirtingas fazes (kietą, skystą ar dujinę) [115]. Tirpikliams yra keliama keletas reikalavimų, visų pirma, jis turi būti chemiškai stabilus, kad nesureaguotų su išgaunamais junginiais. Taip pat tirpiklis turėtų būti selektyvus, kuris didžiąja dalimi tirpina konkrečias junginių grupes. Be to, tirpiklis turi pasižymėti mažu klampumu ir būtų lengvai regeneruojamas [113]. Būtina atsižvelgti į ekstrahuojamų junginių ir tirpiklio polinių savybių panašumus [115]. Poliniai tirpikliai (vanduo, etanolis, acto rūgštis) yra efektyviausi poliniams junginiams išskirti. Napoliniai tirpikliai (heksanas, benzinas, toluenas) geriausiai tirpina nepolinius junginius [114]. Paprasčiausia, nors mažiausiai efektyvi, ekstrakcija yra su vandeniu. Efektyvesnė ekstrakcija – su organiniais tirpikliais [116]. Etanolis yra vienas iš labiausiai naudojamų tirpiklių maisto pramonėje dėl savo mažos kainos, netoksiškumo ir daugkartinio panaudojimo [117]. Metanolis, nors pigus tirpiklis, tačiau nėra tinkamas naudoti maistui dėl savo didelio toksiškumo. Tokie tirpikliai kaip acetonas ir etilacetatas taip pat pasižymi dideliu toksiškumu. Jie puikiai tinka riebaluose tirpiems, silpnai poliniams ar nepoliniams junginiams ekstrahuoti, tačiau tokiu atveju tirpiklis turi būti visiškai pašalintas iš ekstrakto prieš naudojant jį maisto produktuose [118]. Padidinti tirpiklio efektyvumą galima jį sumaišant su vandeniu. Vandens ir organinių tirpiklių naudojimas kartu palengvina vandenyje ir organiniuose tirpikliuose tirpiųjų bioaktyviųjų junginių ekstrahavimą [119].

Tradicioniai bioaktyviųjų junginių ekstrahavimo būdai pagrįsti maceracija (intensyvus ar ne toks intensyvus maišymas) tirpiklyje [115]. Tai populiarī ekstrakcija dėl savo paprastumo, tinkama išgauti eterinius aliejus ir bioaktyviuosius junginius. Paprasčiausia maceracija susideda iš kelių etapų: pirmasis, kurio metu žaliava susmulkinama siekiant padidinti paviršiaus plotą, kad būtų efektyviau sumaišyta su tirpikliu. Antrasis etapas – ekstrakcija uždarame inde su tinkamu tirpikliu ir trečiasis etapas, kai atskiriama skystoji fazė nuo kietosios [120].

Bioaktyviųjų junginių ekstrakcija gali būti efektyvesnė didinant maišymosi intensyvumą ir keliant tirpiklio temperatūrą, dėl to didėja difuzijos koeficientas, taip pagerinant tirpiklio įsiskverbimą į žaliavą [113, 123]. Aukštesnė temperatūra sumažina tirpiklio klampumą, taip padidindama ekstrakcijos efektyvumą, o suintensyvėjusi maceracija sumažina ekstrakcijos laiką. Tradicinės ekstrakcijos su padidinta temperatūra pavyzdys – soksleto ekstrakcija [123].

Soksleto ekstrakcija naudojama kietos frakcijos medžiagoms ekstrahuoti skystais tirpikliais. Tradicinis soksleto įrenginys pavaizduotas 5 paveiksle. Mėginys įdedamas į ekstraktorių, kuris įstatomas į distiliavimo kolbą. Ekstrakcijos metu ekstraktorius palaipsniui pildomas tirpikliu. Kai

pasiekiamas ekstraktoriaus perpildymo lygis, tirpiklis iš jo pašalinamas per sifoną į distiliavimo kolbą. Taip tirpiklis perneša iš mėginio išekstrahuotus junginius. Procesas gali būti kartojamas, ekstraktorių užpilant šviežiu tirpikliu, kol galutinai išekstrahuojami junginiai [120]. Tirpiklis parenkamas priklausomai nuo to, koks junginys bus ekstrahuojamas. Kai norima išgauti aliejus iš augalinių žaliavų soksleto būdu, dažniausiai naudojamas heksanas [121].



5 pav. Soksleto ekstraktorius [122]

Ekstrakcijos metu mėginys pakartotinai liečiasi su naujai pripildomu tirpikliu, todėl padidėja galimybė išekstrahuoti daugiau junginių. Distiliacijos kolboje palaikoma aukšta temperatūra, tai taip pat suintensyvina ekstrakcijos procesą. Tačiau soksleto ekstraktorių sunku automatizuoti, ekstrakcijos metu nenaudojamas tirpiklio maišymas, kuris taip pat galėtų pagreitinti procesą [122].

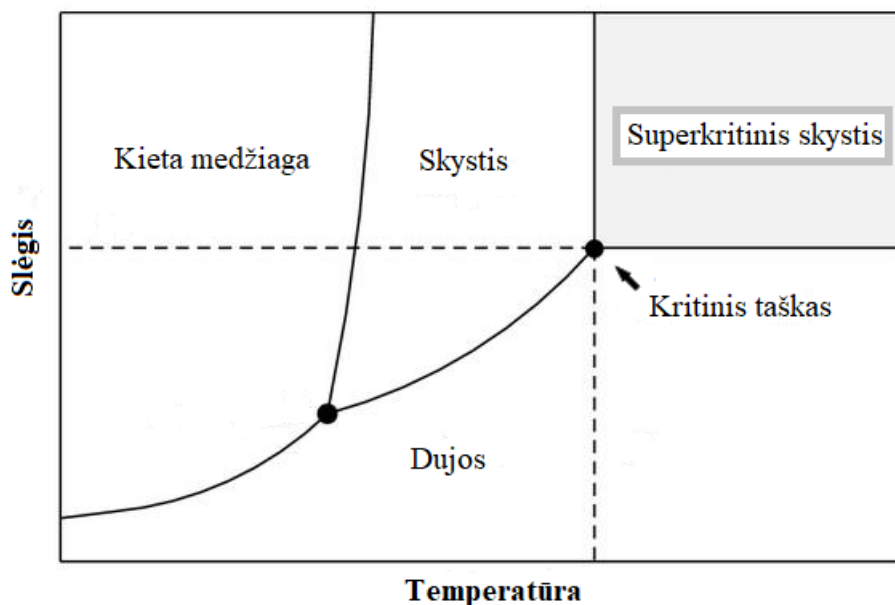
1 lentelė. Tradicinių ekstrakcijų privalumai ir trūkumai

Privalumai [123]	Trūkumai [123, 124]
Paprastas ekstrakcijos procesas	Ilgas ekstrakcijos laikas
Nebrangi įranga	Maža ekstrakcijos išeiga
Gali būti naudojami bet kokie tirpikliai ir jų kombinacijos	Organinių tirpiklių naudojimas, kurie dažniausiai būna toksiški
	Reikalingas didelis kiekis tirpiklio
	Nepilnas tirpiklių pašalinimas iš galutinio ekstrakto
	Galimas junginių terminis skilimas dėl naudojamos aukštos temperatūros



## 1.4.2. Superkritinio skysčio ekstrakcija

Medžiagos kritinis taškas yra termodinaminė savybė, kurią lemia temperatūra ir slėgis. Medžiaga esanti virš kritinio taško yra vadinama superkritiniu skysčiu, jei virš kritinio taško yra tik vienas iš parametru (temperatūra ar slėgis), tokiu atveju medžiaga yra subkritinio būvio (žr. 6 pav.) [114, 129]. Superkritinis skystis pasižymi tankumu, klampumu ir difuzinėmis savybėmis [130]. Superkritinio skysčio tirpumas gali kisti priklausomai nuo tankio [131]. Superkritinėmis sąlygomis (virš kritinio taško) pasikeitęs tirpiklio tankis, pakeičia ir jo difuzinės savybės. Taigi, padidėja junginių perdavimo intensyvumas tarp tirpinamos medžiagos ir tirpiklio. Superkritiniai skysčiai turi didelę tirpinimo galią ir kaip dujos neturi paviršiaus įtempimo. Superkritinėmis sąlygomis dujų tankis didėja, didėjant slėgiui ir tai padidina medžiagos tirpumą. Tai reiškia, kad skystis geba išlaikyti dujines ir skystas savybes arba dujos gali būti skysčio pavidalo kartu turėdamos ir dujinių savybių [129]. Esant tokioms sąlygoms, skystinis tirpiklis prasiskverbia į kietas daleles – kaip dujos ir tirpina aktyvius junginius – kaip skystis. Dujinis tirpiklis prasiskverbia į medžiagą ir tirpina ją savo skystinėmis savybėmis. Tai yra pagrindinis superkritinės ekstrakcijos principas ir labai svarbus išgaunant reikiamas medžiagas iš augalų. Nedideli temperatūros ir slėgio svyravimai gali sukelti reikšmingus superkritinio skysčio savybių pokyčius [114].



6 pav. Medžiagos būsenos pokyčio priklausomumas nuo temperatūros ir slėgio

Kritinis taškas priklauso nuo medžiagos savybių, todėl įvairių tirpiklių kritinių taškų reikšmės skiriasi. Vandens, metanolio, etanolio ir acetono kritinė temperatūra lyginat su kitais tirpikliais yra gana aukšta. Esant aukštos kritinės temperatūros tirpikliui, ekstrakcijai sunaudojama daugiau energijos, nes reikia padidinti tirpiklio temperatūrą virš kritinio taško. Be didelių energetinių sąnaudų, aukštos temperatūros tirpikliai gali sukelti žaliavos aktyviųjų junginių sumažėjimą. Dėl saugumo lengvai užsidegančių tirpiklių (propano) vengiama superkritinėje ekstrakcijoje. Nors savaiminio užsidegimo temperatūra gali būti gan aukšta, tačiau bet koks tirpiklio nutekėjimas iš sistemos gali sukelti gaisrą [114].

Superkritinių skysčių ekstrakcijos privalumai:

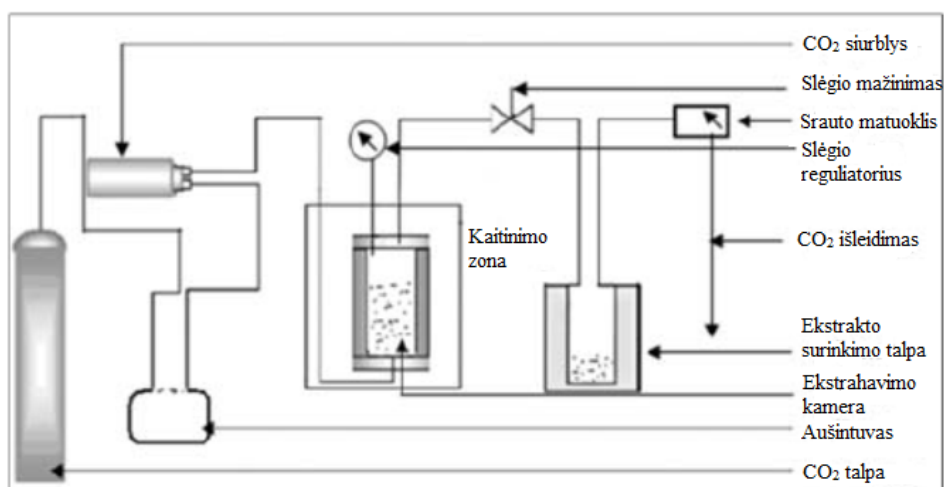
- lyginant su tradiciniais organiniais tirpikliais, superkritiniai skysčiai turi didesnę difuzinę koeficientą ir mažesnę klampumą, tai leidžia efektyviau pernešti ištirpusius junginius iš medžiagos (mėginio) [129];
- ekstrakcijos metu nėra paviršiaus įtempimo, tai leidžia greičiau tirpikliui įsiskverbti į kietas daleles – tai padidina ekstrakcijos efektyvumą [130];
- ekstrakcijos sąlygos lengvai kontroliuojamos keičiant slėgį ir temperatūrą [130].

Brangi įranga ir naudojamas pavojingas aukštas slėgis yra pagrindiniai superkritinės ekstrakcijos trūkumai [132].

Superkritinės ekstrakcijos efektyvumas priklauso nuo temperatūros, slėgio, tirpiklio tipo ir srauto greičio, taip pat nuo ekstrahuojamos medžiagos kilmės, cheminės sudėties, dalelių dydžio. Ekstrakcijos išeigai ir ekstrakto sudėčiai taip pat turi įtakos žaliavos apdorojimas ir laikymo sąlygos prieš ekstrakciją. Svarbu optimizuoti proceso parametrus, kad būtų užtikrintos maksimalios išeigos aukščiausios kokybės ekstraktas [132].

Dažniausiai maisto pramonėje naudojamas tirpiklis superkritinėje ekstrakcijoje yra anglies dioksidas ( $\text{CO}_2$ ) [114]. Jis priskiriamas nepoliniam lipofiliniam tirpikliui [132]. Superkritinėmis sąlygomis  $\text{CO}_2$  dujos yra paverčiamos tinkamu tirpikliu, galinčiu tirpinti medžiagas.  $\text{CO}_2$  yra netoksiškas, nedegus, chemiškai inertiškas ir pigus tirpiklis. Kritinė  $\text{CO}_2$  temperatūra yra artima aplinkos temperatūrai, t. y.  $31\text{ }^\circ\text{C}$ . Todėl norint pasiekti kritinę temperatūrą, procesas nereikalauja daug energijos.  $\text{CO}_2$  kritinis slėgis yra gana aukštas –  $73\text{ atm}$ , tačiau jis gali būti lengvai pasiekiamas [114]. Tokios sąlygos tinkamos išgaunant termiškai stabilus junginius [129]. Ekstrakcijos metu mėginio neveikia deguonis ir šviesa, todėl jis apsaugomas nuo oksidacijos. Taip pat  $\text{CO}_2$  lengvai pašalinamas iš ekstrakto, nes lengvai išgaruoja kambario sąlygomis ( $25\text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje,  $1\text{ atm}$ . slėgyje). o ekstrakcijos beveik grynas  $\text{CO}_2$  surenkamas ir gali būti perdirbamas [114].

Tradicinį superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginio (SKE- $\text{CO}_2$ ) įrenginį (žr. 7 pav.) sudaro  $\text{CO}_2$  siurblys, kamera skirta įdėti mėginį, slėgio reguliatorius, ekstrakto surinkimo talpa ir kaitinimo zona [129].



7 pav. SKE –  $\text{CO}_2$  sistemos schema [129]

SKE–CO<sub>2</sub> labiau tinka mažesnės molekulinės masės (< 250) junginiams arba silpnai polinių ir nepolinių junginių grupėms (lipidams, cholesteroliui, aldehydams, karotenoidams, esteriams ir ketonams) [131]. Polinių junginių (pvz.: polifenolių) ekstrakcijos efektyvumą galima padidinti į SKE–CO<sub>2</sub> procesą įterpiant organinius tirpiklius (dažniausiai etanolį ir metanolį), kurie veikia kaip modifikatoriai ir padidina tikslinių junginių tirpumą [133, 134]. Dažniausiai įterpiamas nedidelis kiekis organinio tirpiklio – iki 15 %. SKE derinami ir su kitais naujais ekstrahavimo metodais (ekstrakcijomis su mikrobangomis ar ultragarsu) taip padidinant ekstrakcijos efektyvumą ir ekstraktų išėigas [135].

SKE–CO<sub>2</sub> pagrindinis trūkumas tai, kad CO<sub>2</sub> dujų talpyklos ir ekstraktoriai turi būti tinkamai izoliuoti ir įrengti su reljefinėmis sistemomis, todėl įranga – brangi. Taip pat su CO<sub>2</sub> kaip tirpikliu negalima išgauti polinių junginių, todėl dažnai turi būti įterpiamas tirpiklis (pvz.: etanolis) [132].

### 1.4.3. Ekstrakcija padidintame slėgyje

Didelis slėgis sukelia ląstelių membranų modifikacijas, sumažina ląstelių pH ir ląstelių elektrolitų pusiausvyrą, o tai lemia aktyviųjų komponentų pasišalinimą iš augalų ląstelių ir jų membranų [125].

Ekstrakcija padidintame slėgyje (EPS) dar vadinama subkritinio skysčio ekstrakcija [126]. Šis metodas buvo sukurtas, kaip naujas būdas išgauti junginiams iš natūralių žaliavų, su galimybe lengvai keisti ekstrakcijos sąlygas, pritaikytas norint išgauti tam tikras junginių grupes [127].

EPS daug reikšmės turi temperatūra ir slėgis. Temperatūra ekstrakcijos metu yra proporcinga slėgiui, todėl keliant temperatūrą, didėja ir slėgis [114]. Ekstrakcija vyksta gana aukštoje 50–200 °C temperatūroje ir esant 10–15 MPa slėgiui. Slėgis turi būti pakankamas, norint išlaikyti tirpiklį skysčio fazėje [120]. Didinant ekstrakcijos temperatūrą aukščiau tirpiklių virimo taško, padidėja tirpumas ir masės perdavimo greitis tarp tirpiklio ir augalo ląstelių. Procesui vykstant, padidėja tirpiklio ir augalų matricos difuzija, kuri sukelia dar intensyvesnę ekstrakciją. Aukštesnė temperatūra sumažina medžiagos klampumą, dėl to padidėja žaliavos sumirkimas tirpikliu ir tai lemia didesnę tikslinių molekulių tirpumą. Ekstrakcijos temperatūra priklauso nuo naudojamo tirpiklio ir ekstrahuojamų junginių savybių. Naudojant labai aukštą temperatūrą, gali susidaryti nepageidaujami, netgi kenksmingi junginiai (Mailardo reakcijos junginiai) arba jautrūs temperatūrai junginiai – suskilti, todėl būtinas proceso reguliavimas ir atsargumas, didinant ekstrakcijos temperatūrą [126, 136].

Ekstrahavimui dažnai naudojami metanolis, acetonas, vanduo ir etanolis. Taip pat gali būti naudojami efektyvesni tirpiklių mišiniai (vandeninis etanolis, vandeninis metanolis) arba parūgštinti tirpikliai [114, 126].

Lyginant su tradicinėmis ekstrakcijomis tirpikliais, EPS procesas vyksta trumpesnę laiką, o proceso metu sunaudojamas mažesnis kiekis tirpiklio [114, 126]. EPS leidžia ekstrahuoti uždaroje, inertinėje aplinkoje, esant aukštam slėgiui ir temperatūrai. Tirpikliai išlieka skystos būsenos, net esant temperatūrai, kuri viršija jų virimo temperatūrą [128].

#### 1.4.4. Ekstrakcijos iš uogų išspaudų

Atlikus literatūrinę apžvalgą, nustatyta, kad dažniausiai ekstrakcijoms iš uogų išspaudų pasirenkama padidinto slėgio ir superkritinė ekstrakcijos [13, 127, 136, 137]. Taip pat, prieš ekstrahavimą būtina pasirinkti optimaliausią ekstrakcijos temperatūrą ir slėgį bei svarbu – tinkamas tirpiklis [136].

Nustatyta, kad didžiausią įtaką SKE–CO<sub>2</sub> iš aviečių išspaudų efektyvumui turėjo pasirinktas slėgis, o didžiausia ekstrakcijos išeiga nustatyta, esant didesniam CO<sub>2</sub> dujų suslėgimui. Tyrimas parodė, kad su SKE–CO<sub>2</sub> išgauti ekstraktai tinkami riebalų rūgščių sudėties nustatymui. Be to, šio paties tyrimo metu gauta išspaudų liekana po SKE–CO<sub>2</sub> buvo išekstrahuota su etanoliumi. Ekstraktas pasižymėjo geromis antioksidacinėmis savybėmis. Todėl galima teigti, kad dviejų pakopų ekstrahavimas aukštame slėgyje yra puikus metodas išgauti lipofilinius ir hidrofilinius bioaktyviuosius junginius [13].

Paes ir kt. [127] pastebėjo, kad į CO<sub>2</sub> dujų srautą įterpus 5 % vandens ar 5 % etanolio, ekstrakcijos efektyvumas žymiai padidėjo, gautos didesnės mėlynių išspaudų ekstraktų išeigos ir platesnė jo cheminė sudėtis – išsiekstrahavo labiau poliniai junginiai (antocianinai). Kitas tyrimas, ekstrahuojant šėivamedžio uogų išspaudas SKE su CO<sub>2</sub>/etanolio/H<sub>2</sub>O mišiniu įvairiais santykiais, taip pat parodė, kad tirpiklių įterpimas turi didelę įtaką ekstrakcijų išeigoms ir junginių kompozicijai. Ekstraktai daugiausiai turintys antocianinų buvo išgauti su 80/1/19 ir 60/8/32 (CO<sub>2</sub>/ETOH/H<sub>2</sub>O, %) tirpiklių mišiniais [137].

Mėlynių išspaudos buvo ekstrahuojamos trimis skirtingais būdais: soksletu, EPS ir SKE–CO<sub>2</sub>. Tyrimo rezultatai parodė, kad EPS su vandeniu ir (arba) etanoliumi buvo veiksmingiausia flavonoidų ir antocianinų išgavimui iš išspaudų. Taip pat gauti ekstraktai pasižymėjo geriausiu antioksidaciniu aktyvumu ir nemažomis ekstraktų išeigomis. Išspaudas ekstrahuojant soksletu buvo gauta didžiausia ekstrakto išeiga, tačiau jie nepasižymėjo dideliu antioksidantų kiekiu [127].

Derinant neterminius metodus (impulsinį elektrinį lauką ar ultragarsą) su kitomis ekstrakcijomis, galima padidinti proceso efektyvumą ir išgauti ekstraktus su termiškai stabilesniais junginiais [136]. Raudonųjų vynuogių išspaudų poveikimas elektriniu impulsiniu lauku prieš tradicinę terminę ekstrakciją, padidino antocianinų ekstrakto kiekį 60 % [138]. Kitas tyrimas, ekstrahuojant vynuogių odeles, parodė, kad žaliavą apdorojant impulsiniu lauku, polifenolių kiekis lyginat su ekstraktais gautais prieš tai žaliavos neapdorojant, padidėjo 10 % [139]. Šie tyrimai rodo, kad impulsinis elektrinis laukas yra veiksmingas pirminis apdorojimo būdas.

Bandytas suderinti SKE–CO<sub>2</sub> su ultragarsu (SKE–CO<sub>2</sub>/UG) ir tirpikliais (vandeniu ir etanoliumi) parodė gerus ekstrakcijos efektyvumo rezultatus. Geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis ir didžiausiu fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo gervuogių išspaudų ekstraktas išgautas 60 °C temperatūroje, 15 MPa slėgyje ir 200 W UG galios sąlygomis. Į procesą įterpus 10 % vandens, kuris veikė kaip tirpiklis, ekstrakcijos efektyvumas pagerėjo dar labiau ir parodė geresnius rezultatus nei pridėjus tokį patį kiekį etanolio. Tyrimo metu, lyginant SKE–CO<sub>2</sub>/UG, tradicines beslėgines maceracijas ir soksleto ekstrakcijas, rezultatai parodo, kad ekstraktai, išgauti SKE–CO<sub>2</sub>/UG, pasižymėjo 11 kartų didesniu fenolinių junginių kiekiu nei su soksletu ir 8 kartus didesniu fenolinių junginių kiekiu nei maceracija [140].

## 2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

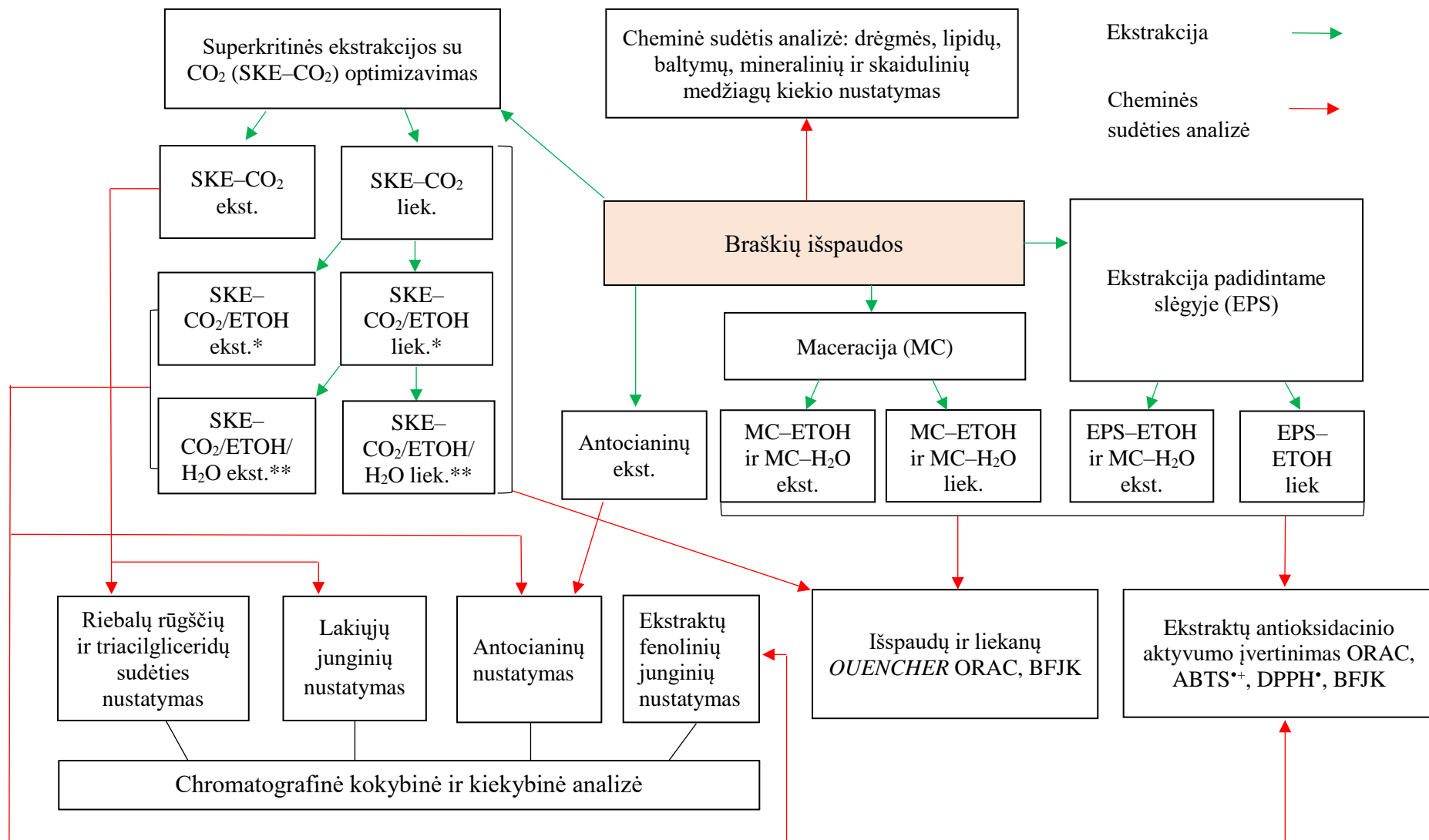
### 2.1. Tyrimo objektas

Šviežios braškių (lot. *Fragaria × ananassa*) išspaudos buvo gautos iš UAB „Anykščių vynu“, sušaldytos  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Tyrimams buvo naudojamos  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje išdžiovintos išspaudos. Išspaudas sudarė braškių minkštino liekanos, sėklos ir uogų koteliai. Žaliava (žr. 8 pav.) buvo susmulkinta laboratoriniame cikloniniame malūne, naudojant 1 mm smulkinimo sietą. Viso tyrimo metu žaliava buvo laikoma kambario temperatūroje, sausasai apsaugant ją nuo drėgmės.

Braškių išspaudų tyrimų schema pateikta 9 paveiksle.



**8 pav.** Išdžiovintos braškių išspaudos prieš ir po susmulkinimo



Pastaba: \* – ekstraktas ir išspaudų liekana po EPS su etanoliumi  
 \*\* – ekstraktas ir išspaudų liekana po MC su vandeniu

9 pav. Tyrimų schema

## 2.2. Cheminiai reagentai ir medžiagos

- Ekstraktams paruošti: analitinio grynumo etanolio alkoholis (MV Group Production, Lietuva), distiliuotas vanduo, diatomitinė žemė (100% SiO<sub>2</sub>, Dionex Corporation, JAV), CO<sub>2</sub> ir azoto dujos (AGA, Suomija), popieriniai filtrai (Thermo Scientific, JAV), vata (Bella, Lenkija);
- mėginių paruošimui, ne chromatografiniam cheminės sudėties ir antioksidacinėms savybėms nustatyti: analitinio grynumo n-heksanas, acetonas ir metanolis (Eurochemicals, Lietuva), analitinio grynumo etanolis (MV Group Production, Lietuva), distiliuotas vanduo, druskos rūgštis (Chempur, Lenkija), koncentruota sieros rūgštis (Chempur, Lenkija), katalizatoriaus tabletė (Sigma-Aldrich, JAV), natrio ššarmas (NaOH) (Chempur, Lenkija), bortrifluorido-metanol- kompleksas (Honeywell, Riedel-de Haën, JAV), boro rūgštis (Chempur, Lenkija), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilhidratas (DPPH<sup>•</sup>) (Sigma-Aldrich, JAV), galo rūgštis 99 % (Fluka, Lenkija), *Folin- Ciocalteau* reagentas (Sigma-Aldrich, JAV), natrio karbonatas 98 % (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, bevandenis) (Chempur, Lenkija), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis (troloksas) (Sigma-Aldrich, JAV), 2,2'-azobio (2-amidinpropano) dihidrochloridas (AAPH) (Sigma-Aldrich, JAV), 3',6'-dihidroksispiro (izobenzofuran-1(3H),9'(9H) ksanten)-3-onas (fluoresceinas) (Sigma-Aldrich, JAV), 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis (ABTS<sup>•+</sup>) (Sigma-Aldrich, JAV), natrio chloridas (NaCl) (Lach-Ner, Čekija), dihidrofosfatas (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Lach-Ner, Čekija), kalio chloridas (KCl) (Lach-Ner, Čekija), natriohidrofosfato-dihidratas Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, JAV), kalio persulfatas (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (Lach-Ner, Čekija), mikrokristalinė celiuliozė (20 μm) (Sigma-Aldrich, JAV);
- chromatografinėi analizei: metanolis LS-MS CHROMASOL V® ≥99,9 % (Honeywell, Fluka, JAV), acetonitrilas (Sigma-Aldrich, JAV), skruzdžių rūgštis ≥98 % (Honeywell, Fluka, JAV), acto rūgštis 99,8 % (Lach-Ner, Čekija), ultra švarus H<sub>2</sub>O (vandens gryninimo sistema), SPME 50/30 μm trisluoksnis (DVB/ CAR/ PDMS) pluoštas (Supelco, JAV), HIQ helio dujos 6.0 50 L (AGA, Suomija), standartai: (+)- katechinas, kamferol-3-O-gliukuronidas, kvercetin-3-O-gliukuronidas, p-kumaro rūgštis, tilirozidas (Exrasynthese, Genay Gedex, Prancūzija), elago rūgštis (BioChemika Fluka, JAV), cianidin 3-gliukozidas (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd., Kinija), 37 riebalų rūgščių kompleksas FAME Mix (Sigma-Aldrich, JAV), sočiųjų alkanų C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub> mišinys (Supelco, JAV).

## 2.3. Naudota įranga

- Laboratorinis malūnas ZM 200 (Retsch, Vokietija);
- maistinė džiovykla „Sencor“
- termostatas (TERMOCTAT, TC-80 M-2);
- analitinės svarstyklės KERN 770 (Goti, Kern&Sohn gmbh., Vokietija);
- purtyklė (Titer –Tek, Flow laboratorines, JAV);
- vibracinis purtytuvas „Red Rotor“ (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., JAV);
- vorteksas „Bio vortex V1 Bioscan“ (Ryga, Latvija);
- biuchnerio piltuvas;
- centrifuga „Velocity 14 Benchtop Centrifuge“ (Dynamica Pty Ltd, Australija);
- mufelinė krosnis (Lietuva);

- magnetinė maišyklė „Kavalier“;
- automatinis garintuvas „Turbo Vap® LV“ (Caliper/ Zymark, JAV);
- vandens distiliavimo aparatas;
- elektrinis kaitintuvas;
- soksleto aparatas EZ100H (Behr Labor-Technik, Vokietija);
- ultragarsinė vonelė „Ultrasonics“ (Astra-Son™, JAV);
- vakuuminis – rotacinis garintuvas (Biuchi labortechnik AG, Šveicarija);
- grįžtamasis šaldytuvas;
- vandens valymo sistema „Simplicity 185“ (Millipore, JAV);
- liofilizatorius (Maxi Dry Lyo, Danija);
- laboratorinė ekstrakcijos superkritiniais skysčiais „Helix“ sistema (Applied Separation, JAV);
- pagreitintos ekstrakcijos tirpikliais sistema ASE–350 (Thermo Scientific Dionex, JAV);
- spektrofotometras „GENESYS 8, 10 UV“ (Spetronic instruments, JAV);
- FLOUstar Omega skaitytuvas (BMG LABTECH GmbH, Vokietija);
- ANKOM2000 skaidulinių medžiagų analizatorius (Ankom Technology, JAV);
- dujų chromatografas HRGC 5300 su liepsnos jonizacijos detektoriumi (Mega Series, Carlo Erba, Italija);
- polinė kolonėlė SPTM – 2560, (20 µm, 0,25x100 mm) (Supelco, JAV);
- UESCh–MS sistema Waters® UltraPerformance LC® (UPLC) „Acquity“ (Waters Corporation, JAV);
- UESCh–MS Waters UPLC Acquity H Class sistema (Waters Corporation, JAV) su Xevo TQ-S masių detektoriumi;
- hibridinis masių spektrometras (Bruker Daltonic, Vokietija);
- kolonėlė Acquity UPLC® BEH C18 1,7 µm 2,1x100 mm (Waters, Milford, JAV);
- išmaniosios dujų chromatografijos sistema „Leco Pegasus“ 4D GCxGC–TOFMS (LECO Corporation, JAV);
- nepolinė kolonėlė BPX-5 (30 m×0,25 mm×0,25 µm) (SGE Analytical Science, Australija);
- polinė kolonėlė BPX-50 (1,8 m×0,10 mm×0,1 µm) (SGE Analytical Science, Australija).

## 2.4. Tyrimų metodai

### 2.4.1. Išspaudų cheminiai tyrimai

- Drėgmės kiekis nustatytas terminio džiovavimo būdu džiovavimo spintoje, remiantis standartizuota AOAC metodika [139]. Drėgmės kiekis išreiškiamas g/100 g SM;
- Lipidų kiekio nustatymas. Išspaudoms, kurios buvo naudotos drėgmės kiekiui nustatyti, atlikta soksleto ekstrakcija automatinio ekstraktoriu standartizuotu metodu [139]. Ekstrakcijai buvo naudotas tirpiklis heksanas. Riebalų kiekis apskaičiuojamas pagal tai, kiek ekstrakcijos metu iš mėginio buvo išekstrahuota lipidų ir išreiškiamas g/100 g SM [139];
- Baltymų kiekis nustatytas Kjeldalio metodu pagal standartizuotą AOAC metodiką [139]. Metodas pagrįstas organinių junginių mineralizavimu, nustatant azoto kiekį pagal susidariusį NH<sub>3</sub> kiekį mėginyje. Baltymų kiekis išreiškiamas g/100 g SM;
- Mineralinių medžiagų kiekis nustatytas deginant organines medžiagas tiriamajame mėginyje ir išreiškiamas pagal gautų pelenų masę g/100 g SM [139].



- Bendras skaidulinių medžiagų kiekio nustatymas: į filtravimo maišelį pasverama 0,95–1,0 g braškių išspaudų, maišelis užsandarinamas. Prieš atliekant analizę, mėginiai turi būti nuriebinami petrolio eteriu ir nusausinami. Taip paruošti mėginiai analizuojami ANKOM<sup>2000</sup> skaidulinių medžiagų analizatoriumi (ekstraktoriumi). Analizės ciklą sudaro šie etapai: 1) 40 min rūgštinė hidrolizė su H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M), 2) 40 min šarminė hidrolizė su NaOH (1 M), 3) 2 plovimai po 5 min rūgštinti, 4) 3 plovimai po 5 min šarmu. Po analizės maišeliai su mėginiu 3–5 min plaunami acetone, vėliau nusausinami ir išdžiovinami 102 °C temperatūroje. Vėliau mėginiai buvo 2 val. džiovunami 600 °C temperatūroje, kad nustatyti organinių medžiagų sumažėjimą. Bendras skaidulinių medžiagų kiekis apskaičiuojamas pagal formulę (1):

$$BSMK = \frac{100 \times (W_3 - (W_1 \times C_1))}{W_2}, \quad (1)$$

čia *BSMK* – bendras skaidulinių medžiagų kiekis, %  
*W*<sub>1</sub> – maišelio svoris  
*W*<sub>2</sub> – mėginio svoris  
*W*<sub>3</sub> – organinių medžiagų kiekis  
*C*<sub>1</sub> – kontrolinio mėginio (tuščio maišelio) pelenų kiekis

#### 2.4.2. Ekstraktų gavimas

Tolimesniems tyrimams atlikti, įvairiais ekstrakcijos būdais ir tirpikliais buvo ekstrahuojamos išdžiovintos ir susmulkintos išspaudos.

Iš viso tyrime buvo atliktos 8 skirtingos ekstrakcijos iš braškių išspaudų. Soksleto ekstrakcija atlikta nustatyti riebalų kiekiui žaliavoje. Visi kiti ekstraktai buvo naudojami jų cheminei sudėčiai tirti. Tyrimo metu buvo vykdyti trys ekstrakcijos metodai: maceracija purtant, ekstrakcija padidintame slėgyje ir superkritinė ekstrakcijos. Maceracija ir ekstrakcija padidintame slėgyje atlikta vandeniui ir etanoliumi, o superkritinė – CO<sub>2</sub> dujomis. Prieš atliekant superkritinę ekstrakciją (SKE–CO<sub>2</sub>) buvo sudarytas ekstrakcijos planas ir atliktas sąlygų (temperatūros, slėgio ir dinaminio laiko) optimizavimas. Superkritinė ekstrakcija buvo atlikta, norint išgauti lipofilinius ekstraktus, kurių sudėtyje yra nepolinių junginių: triacilgliceridų ir riebalų rūgščių. Be to, buvo atlikta daugiapakopė ekstrakcija: po SKE–CO<sub>2</sub> gauta išspaudų liekana (kietoji frakcija) buvo ekstrahuojama padidintu slėgiu su etanoliumi (SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH). Ekstrakcijos metu buvo išekstrahuoti išspaudose likę poliniai, hidrofiliniai junginiai (flavonoidai ir fenolinės rūgšys). Trečias daugiapakopės ekstrakcijos etapas – maceracija su H<sub>2</sub>O. Po SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH ekstrakcijos likusi išspaudų liekana buvo maceruojama. Maceracijos metu buvo išskirti dar pasilikę ir neišsekstrahavę hidrofiliniai junginiai.

Gauti ekstraktai laikomi tamsiuose sandariuose buteliukuose šaldiklyje. Išekstrahuotos išspaudos (liekana) – kambario temperatūroje, apsaugant nuo drėgmės.

##### 2.4.2.1. Maceracija

Maceracija (MC) buvo atlikta mechaniškai purtant 30 g išspaudas, kurios užpiltos tirpikliu: vandeniui (H<sub>2</sub>O) ar etanoliumi (ETOH) ir purtoma 24 val kambario temperatūroje. Bandiniai centrifuguojami 4500 rpm/min greičiu 10 min. Skystoji bandinio dalis nufiltruojama vakuuminiai

siurbliu, o kietoji – išdžiovinama džiovykloje (40 °C temperatūroje). Iš skystosios dalies išgarinamas etanolis vakuuminiu rotaciniu garintuvu 40 °C temperatūroje o vanduo pašalintas – liofilizatoriumi.

#### 2.4.2.2. Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu

SKE–CO<sub>2</sub> atlikta „Helix“ ekstrakcijos sistema, 25 g maltų išspaudų patalpinamos į 50 cm<sup>3</sup> tūrio ceļę, kurios galuose įspaudžiami absorbuojančios vatos gabalėliai. CO<sub>2</sub> srautas visos ekstrakcijos metu išlaikomas pastovus – 2 l/min, statinė ekstrakcija – 15 min. Pasibaigus statinei ekstrakcijai vykdoma dinaminė. Ekstraktai surenkami į stiklo buteliukus. Tam, kad būtų įvertinta maksimali ekstrakcijos išeiga, atliktas SKE–CO<sub>2</sub> optimizavimas.

Ekstrakcijos sąlygų planavimas ir optimizavimas buvo atliktas taikant paviršiaus atsako eksperimentų planavimo modelį, sumodeliuojant ekstrakcijų planą Design – expert 7.0. statistine programa (Stat–Ease Inc, Mineapolis, MN, JAV). Paviršiaus atsako metodas naudojamas, kai tiriamas objektas priklauso nuo kelių nepriklausomų kintamųjų, o tyrimo tikslas yra jį optimizuoti. Nepriklausomas kintamasis su mažiausiu atsako efektu laikomas centrinėje taško vertėje, o kitų dviejų kintamųjų lygiai eksperimento svyravimo metu keičiami.

Optimizuojant ekstrakciją, buvo keičiami trys ekstrakcijos parametrai: slėgis (A), temperatūra (B) ir laikas (C). Gauta 20 skirtingų ekstrakcijų variantų, keičiant slėgio, temperatūros ir laiko vertes tam tikrose ribose (žr. 2 lentelę).

2 lentelė. Sąlygų vertės, projektuojant eksperimentines ekstrakcijas

	A – slėgis, MPa	B – temperatūra, °C	C – laikas, min
Žemiausios vertės	15	30	120
Centrinės vertės	28	50	165
Aukščiausias vertės	40	70	210

Plano centrinių taškų parametrų vertės – 28 MPa slėgis, 50 °C temperatūra ir 165 min .

Ekstraktų išeiga (Y, %) apskaičiuojama pagal formulę (2):

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

čia  $b_0$  – laisvasis statistinio modelio narys;

$b_i$  – pagal ekperimento rezultatus apskaičiuoti pirmo laipsnio statistinio modelio koeficientai;

$b$  – lygties koeficientai įvertinantys porinės sąveikos efektus,  $i \neq j$ .

Naudojant Design – expert 7.0. programą įvertinama proceso kintamųjų (slėgio, temperatūros ir laiko) įtaka ekstrakcijos išeigai, nustatomos optimalios proceso kintamųjų vertės ir įvertinamas modelio priimtinumas pagal koeficientų reikšmingumą, regresijos koeficientą R<sup>2</sup> ir Fišerio kriterijų gautą ANOVA.

### 2.4.2.3. Ekstrakcija padidintame slėgyje

Ekstrakcija padidintame slėgyje atlikta Dionex ASE 350 sistema su ekstrahuojant vandeniu ir etanoliumi. 7,5–9 g išspaudų buvo sumaišyta su diatomitine žeme santykiu (1:1) patalpinta į tam pritaikytą celę. Celės galuose įstatomi celiuliozės filtrai ir užsukami fritai. Ekstrakcijos nepriklausomai nuo tirpiklio buvo vykdomos trimis ciklais, esant 100 bar slėgiui, 10 min statinė ekstrakcija, bei skirtingoms temperatūroms (70 °C ekstrahuojant etanoliumi; 110 °C ekstrahuojant vandeniu). Vanduo pašalintas liofilizatoriaus pagalba, etanolis iš ekstrakto pašalintas rotaciniu garintuvu 40 °C temperatūroje.

### 2.4.3. Antioksidacinių savybių įvertinimas

Prieš antioksidacinių savybių nustatymą ekstraktai tirpinami tirpikliuose (etanolyje, vandenyje, acetone ar jų mišiniuose) priklausomai nuo jų tirpumo savybių. Kietosios frakcijos (išspaudų) antioksidacinėms savybėms nustatyti buvo naudojama *Quencher* procedūra, todėl išspaudos maišomos su mikrokristaline celiulioze. Mėginiai ruošiami skirtingų koncentracijų, priklausomai nuo tyrimams pasirinktos modelinės sistemos.

#### 2.4.3.1. Bendras fenolinių junginių kiekis

Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) nustatomas pagal modifikuotą Singleton ir kt. [140] metodą.

Tirpalų paruošimas. *Folin – Ciocalteu*'s tirpalas: *Folin – Ciocalteu*'s reagentas sumaišomas su distiliuotu H<sub>2</sub>O 1:9 santykiu. N<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tirpalas 75 g/l dist. H<sub>2</sub>O.

150 μl ekstrakto arba etanolio (kontrolinis mėginys) sumaišoma su 750 μl *Folin – Ciocalteu*'s tirpalu, po to įpilama 600 μl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tirpalo. Paruošti mėginiai laikomi tamsoje 120 min.

*Kietoji frakcija Quencher sistema*: 10 mg išspaudų mišinio arba mikrokristalinės celiuliozės (kontrolinis mėginys) sumaišoma su 150 μl dist. H<sub>2</sub>O ir 750 μl *Folin – Ciocalteu*'s tirpalu, po to įpilama 600 μl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tirpalo. Mėginiai purtomi 120 min. tamsoje, centrifuguojami 5 min, 14000 aps./min.

Kalibracinei tiesinei priklausomybės lygčiai paruošti naudojama ta pati metodika, tačiau vietoj tiriamojo ekstrakto naudojamas galo rūgšties tirpalas įvairiomis koncentracijomis (0,025 – 0,08 mg/ml metanolio) arba etanolis (kontrolinis mėginys). *Quencher* procedūros metu vietoj išspaudų mišinio naudojama mikrokristalinė celiuliozė su GR tirpalu (0,05–0,25 mg/ml metanolio) arba dist. H<sub>2</sub>O (kontrolinis mėginys).

Mėginių absorbcija matuojama esant 760 nm bangos ilgiui. BFJK išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentais (mg GRE./g mėginio), pagal formulę (3):

$$C = \frac{c}{m}; \quad (3)$$

- čia  $C$  – fenolinių junginių kiekis, išreikštas GR ekvivalentais, mg/g;  
 $c$  – GR koncentracija pagal kalibracinę kreivę, mg GR ekv.;  
 $m$  – mėginio reaguojančios medžiagos kiekis, g.

#### 2.4.3.2. ORAC nustatymas

ORAC atliktas pagal modifikuotą Prior ir kt. [141] metodinį aprašymą. Metodas pagrįstas peroksido radikalų surišimu, kurį generuoja azobis (AAPH), slopinandamas fluoresceino fluorescentinį signalą. Antioksidacinį potencialą parodo stabilesnis fluorescentinis signalas.

Tirpalų paruošimas. Fosfatinio buferinio tirpalo buferinio (PBS) tirpalo ruošimas: 1 l matavimo kolboje ištirpinama 8,18 g NaCl, 0,27 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,15 g KCl, tirpalo pH – 7,4. Fluoresceino tirpalo ruošimas: S<sub>1</sub> tirpalas = 0,045 g (fluoresceino reagentas) ištirpinamas 100 ml PBS, S<sub>2</sub> tirpalas = 0,5 ml S<sub>1</sub> tirpalo skiedžiama su 100 ml PBS, S<sub>3</sub> = 0,8 ml S<sub>2</sub> tirpalo skiedžiama su 50 ml PBS. AAPH tirpalas ruošiamas prieš pat jį supilstant: 0,651 g AAPH ištirpinama 10 ml PBS tirpale.

25 µl ekstrakto arba PBS tirpalo (kontrolinis mėginys) ir 150 µl S<sub>3</sub> fluoresceino tirpalo supilstoma į 96 šulinėlių nepermatomą mikrolėkštelę.

*Kietoji frakcija Quencher sistema:* 10 mg išspaudų mišinio ar mikrokristalinės celiuliozės (kontrolinis mėginys) sumaišoma su 150 µl PBS tirpalu ir 900 µl S<sub>3</sub> fluoresceino tirpalo. Maišoma 10 s, purtoma 60 min tamsoje ir centrifuguojama 4500 rpm 5 min. 175 µl optiškai skaidraus skysčio supilama į 96 šulinėlių nepermatomą mikrolėkštelę.

Visi mėginiai inkubuojama 15 min 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos įpilama 25 µl AAPH tirpalo. Fluorescencija matuojama 120 arba 150 (*quencher* atveju) ciklų (ciklo trukmė 1,1 min). Fluorescencinis matavimas atliekamas FLUOstar Omega tipo spektrofotometru, esant sužadimui 485 nm bei emisijai 520 nm, 37 °C temperatūroje.

Kalibracinei kreivei paruošti naudojama ta pati metodiką, tačiau vietoj tiriamojo ekstrakto naudojamas trolokso tirpalas įvairiomis koncentracijomis (0,63–10 µg/ml metanolio). *Quencher* atveju, vietoj išspaudų mišinio naudojama mikrokristalinė celiuliozė su trolokso tirpalu (12,5–112,6 µg/ml metanolio) arba PBS tirpalu (kontrolinis mėginys).

Po kalibracine kreive esantis plotas (AUC) kiekvienam mėginiui apskaičiuojamas integruojant santykinę fluoresceino kreivę. AUC apskaičiuojamas pagal formulę (4):

$$AUC = 1,1 + \sum_{i=1,1}^{i=120;150} \frac{f_i}{f_0}; \quad (4)$$

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

Tikroji AUC<sub>net</sub> vertė apskaičiuojama atimant kontrolinį iš kiekvieno mėginio: AUC<sub>mėginio</sub> – AUC<sub>kontrolės</sub>. Antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas trolokso ekvivalentais (mg TE/g mėginio).

#### 2.4.3.3. ABTS<sup>•+</sup> laisvųjų radikalų sujungimas

ABTS<sup>•+</sup> laisvųjų radikalų sujungimas nustatytas pagal modifikuotą Re ir kt. [142] metodiką.

Tirpalų paruošimas: PBS buferinio tirpalo paruošimas aprašytas anksčiau (žr. sk. 2.4.3.2). Pradinis ABTS<sup>•+</sup> tirpalas: 0,0549 g ABTS<sup>•+</sup> reagentas ištirpinamas 50 ml PBS tirpale ir sumaišoma su 0,0038 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> druska ištirpinta 200 µl dist. H<sub>2</sub>O, laikoma tamsoje, kambario temperatūroje 15–16 val.

Darbinis ABTS<sup>•+</sup> tirpalas: pradinis ABTS<sup>•+</sup> tirpalas skiedžiamas PBS tirpalu, kol pasiekama absorbcija –  $0,8 \pm 0,01$  optinio tankio vnt., kai bangos ilgis 734 nm.

25  $\mu$ l ekstrakto arba etanolio (kontrolinis mėginys) sumaišoma su 1500  $\mu$ l darbinio ABTS<sup>•+</sup> tirpalo. Paruošti mėginiai laikoma 120 min tamsoje.

Kalibracinei kreivei paruošti naudojama ta pati metodiką, tačiau vietoj tiriamojo ekstrakto naudojamas trolokso tirpalas įvairiomis koncentracijomis (20–400  $\mu$ g/ml metanolio) arba etanolio (kontrolinis mėginys)

Mėginių absorbcija matuojama prie 734 nm bangos ilgio. ABTS<sup>•+</sup> laisvųjų radikalų sujungimas išreiškiamas trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu (mg TE/g mėginio). Laisvųjų radikalų sujungimas (%) apskaičiuojamas pagal formulę (5):

$$I = \frac{(AB-AA)}{AB} \times 100; \quad (5)$$

čia  $I$  – laisvųjų radikalų sujungimo aktyvumas, %;  
 $AB$  – kontrolinio bandinio optinis tankis;  
 $AA$  – tiriamojo bandinio optinis tankis.

#### 2.4.3.4. DPPH<sup>•</sup> radikalų sujungimas

DPPH<sup>•</sup> laisvųjų radikalų sujungimas nustatytas pagal modifikuotą Brand-Williams ir kt. [143] metodinį aprašymą.

500  $\mu$ l ekstrakto arba etanolio (kontrolinis bandinys) sumaišoma su 1000  $\mu$ l darbinio DPPH<sup>•</sup> tirpalu (897  $\mu$ mol/l DPPH metanolinis). Mėginiai laikomi 120 min tamsoje. Kalibracinei kreivei paruošti naudojama 500  $\mu$ l trolokso tirpalo įvairiomis koncentracijomis (1,25–10  $\mu$ g/ml metanolio) ir 1000  $\mu$ l darbinio DPPH<sup>•</sup> tirpalo. Mėginių absorbcija matuojama esant 517 nm bangos ilgiui. Antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas trolokso ekvivalentais (mg TE/g mėginio). Laisvųjų radikalų sujungimas (%) apskaičiuojamas pagal 5 formulę.

#### 2.4.4. Ultra efektyvioji skysčių chromatografija – masių spektrometrija

Ultra efektyvioji skysčių chromatografinė – masių spektrometrinė (UESCh–MS) analizė buvo atlikta, vertinant įvairių ekstraktų cheminės sudėties kokybinę ir kiekybinę sudėtį.

Kokybinė ekstraktų analizė atlikta UESCh Waters Acquity sistema, kuri buvo sujungta su hibridiniu kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru (angl. *Q-TOF*). Fenolinių junginių analizei naudojami 2 mg/(ml ESCh CH<sub>3</sub>OH) koncentracijos ekstraktai. Analizių skirstymas atliktas kolonėle Acquity UPLC® BEH C18 1,7  $\mu$ m, 2,1x100 mm. Eliuentų sistema: A – 1 % skruzdžių rūgštis (v/v), B – 100 % acetonitrilas. Eliucijos trukmė – 15 min. Gradiento kitimas: 0 min – 95 % A; 3 min – 85 % A; 7 min – 50 % A; 10 min. – 0 % A; 12 min – 0 % A. Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min., įleidžiamas tūris – 2  $\mu$ L. Iš kolonėlės išeinantys junginiai aptikti diodų matricos detektoriumi (DMD), esant 100–500 nm bangos ilgiui. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas neigiamos elektrinės jonizacijos režimu. Jonizacija buvo atlikta naudojant +4000 V įtampą, fragmentavimo celės įtampa 3 eV, azoto dujos buvo naudotos kaip išpurškiančios (slėgis 2 bar) ir džiovinančios dujos, kurių tėkmės greitis 10 l/min. Derinant pilno skanavimo ir MS/MS fragmentavimo modeliu buvo apskaičiuotos tikslios junginių molekulinės formulės intervale:

m/z 100–1500, kai skenavimo greitis buvo 2,0 Hz. MS/MS režimas buvo taikytas, kai įtampa fragmentavimo celėje buvo 30 eV. Junginiai buvo identifikuoti pagal smailių analitės, standartinių junginių masių spektrus, eliuacijos trukmės sutapimą, bei MS/MS režimu gautus fragmentus lyginant juos su literatūros duomenimis.

Kiekybinė analizė buvo atlikta UESCh Waters UPLC Acquity H Class sistema su Xevo TQ-S masių detektoriumi. Tyrimo metu buvo naudojama Acquity BEH, C18 kolonėlė (1,7 μm, 2,1x100 mm). Eliuento sistema ir gradiento kitimas buvo pasirinkti tokie kaip kokybinės analizės metu (UESCh-QTOF sistema). Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min., įleidžiamas tūris – 2 μL. Azotas buvo naudojamas kaip džiovinančios (1000 l/h ir išpurškiančios dujos (150 l/h), išpurškimo temperatūra 500 °C, kapiliaro įtampa 1,5 kV. Kiekybinė analizė buvo atlikta naudojant išorinius standartus (tilirozidą, elago ir p-kumaro rūgštis, kampferol 3-gliukuronidą, kvercetin 3-gliukuronidą, katechiną). Identifikuotų fenolinių junginių kiekiai ekstraktuose išreikšti mg/100 g SM.

#### **2.4.4.1. Antocianinų nustatymas**

Prieš chromatografinę išspaudų analizę įvykdyta antocianinų ekstrakcija: 2 g išspaudų ekstrahuojama etanolio/H<sub>2</sub>O/0,1 HCL (85:14:1) mišiniu 10 min ultragarso vonelėje ir intensyviai maišant magnetinėje maišyklėje 30 min. Mišinys filtruojamas per popierinį filtrą ir centrifuguojama 5000 rpm, 15 min, esant 4 °C temperatūrai. Liekana pakartotinai tuo pačiu būdu buvo ekstrahuojama 2 kartus. Gautas ekstraktas nufiltruojamas ir praskiedžiama 50 ml matavimo kolboje etanolio. Gautas mišinys buvo MS grynumo CH<sub>3</sub>OH ir perfiltruotas per PTFE filtrą.

Chromatografinė analizė atlikta UESCh–MS Waters Acquity sistema. Kolonėlės parametrai, termostato temperatūros, A ir B eliuentų, judrios fazės tėkmės greičio, injekcijos tūrio sąlygos aprašytos anksčiau (žr. 2.4.4. sk.). Detekcija buvo atlikta esant 220–550 nm bangos ilgiui. Taikytas šis gradiento kitimas: 0 min. – 1 % B; 7 min. – 15 % B; 8 min. – 100 % B; 10 min. – 50 % B; 12 min. – 1 % B. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas teigiamos elektrinės jonizacijos režimu. Masių spektrai užrašyti pilno skenavimo režime, intervale: m/z 100–800.

Identifikavimas buvo atliktas remiantis literatūros duomenimis. Kiekybinė analizė atlikta naudojant išorinius standartus. Standarto kalibracinė kreivė sudaryta pagal cianidin-3-gliukozido tirpalus skirtingomis koncentracijomis (5–250 μg/ml).

#### **2.4.4.2. Trigliceridų sudėties nustatymas**

Trigliceridų sudėtis nustatyta lipofiliniame (SKE–CO<sub>2</sub>) ekstrakte Waters Acquity sistema. Analizuojamas 0,1 mg/ml koncentracijos bandinys. Analizei buvo taikytas izokratinės sąlygos, analizės trukmė 8 min. Mobilis fazė sudaryta iš 18 % izopropanolio metanolyje, 0,1 % acto rūgšties ir 0,05 % amonio acetato. Tyrimo metu naudojama ACQUITY UPLC® BEH C18 1,7 μm, 2,1x100 mm kolonėlė, kolonėlės termostatui palaikoma 40 °C temperatūra. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas teigiamos elektrinės jonizacijos režimu. Masių spektrai užrašyti pilno skenavimo režime, intervale: m/z 100–800.

Trigliceridų sudėtis identifikuota preliminariai remiantis literatūros duomenimis ir taikant ervidinį formulį modeliavimą ChemSketch programa (Advanced Chemistry Development, Inc, Kanada),

taip pat tikslesniam identifikavimui buvo panaudotas MS/MS režimas, kai įtampa fragmentavimo celėje buvo 35 eV.

## **2.4.5. Dujų chromatografija**

### **2.4.5.1. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas**

Riebalų rūgščių sudėtis nustatyta lipofiliniame SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakto pagal Milink ir kt. [144] metodiką. Prieš atliekant chromatografinę analizę, ekstraktas peresterinamas ir riebalų rūgštys esterifikuojamos metilo alkoholiu: 0,5 g ekstrakto ir 4 ml metanolinio NaOH (0,5 N) supilama į apvaliadugnę kolbą, kuri kaitinama su grįžtamuju šaldytuvu, kol išnyksta riebalų fazė. Esterifikavus riebalus per šaldytuvo viršų įpilama 5 ml 24 % boro trifluorido/metanolio komplekso verdama 2 min, ir atšaldoma iki kambario temperatūros. Į mėginį įpilama 5 ml n-heksano ir suplakama, paliekama kol išsiskiria viršutinė heksano fazė. Analizei imama 100 µl heksano fazė, kuri praskiedžiama 900 µl heksanu.

Analizė atliekama dujų chromatografu naudojant liepsnos jonizacinį detektorių su poline SPTM–2560 kolonėle (0,25x100 m vidinio skersmens, adsorbento sluoksnis 0,20 µm). Riebalų rūgščių dujų chromatografija vykdoma standartizuotu metodu. Nustatomi riebalų rūgščių metilo esteriai, kurie turi 8 – 24 anglies atomus. Termostato temperatūra nuo 80 °C išlaikant 1 min keliama iki 240 °C kas 4 °C/min. Detektoriaus temperatūra – 240 °C, inžektoriaus – 220 °C. Įleisto mėginio kiekis – 1 µl.

Riebalų rūgščių metilo esteriai identifikuoti pagal sulaikymo laikus, lyginat su turimais 37 riebalų rūgščių standartais. Kiekybiškai (procentine sudėtimi) riebalų rūgštys įvertinamos apskaičiuojant smailių plotus lyginant su etaloniniais smailių plotais.

### **2.4.5.2. Lakiųjų junginių nustatymas**

Braškių SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakto ir išspaudų lakiųjų junginių analizė atlikta dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (DCh–TOF-MS). Braškių išspaudoms buvo atlikta statinės viršerdvės – kietafazė ekstrakcija (SV–KFME): svarstyklėmis į specialius 20 ml talpos chromatografinius buteliukus pasveriami po 2 g braškių išspaudų, buteliukai užsandarinami magnetiniais kamšteliais su PTFE tarpinėmis. Pusiausvyrai tarp išspaudų kietosios ir garų fazės (viršerdvės) pasiekti, buteliukas Gerstel autosampleriu nukreipiamas į MPS maišytuvą, kuriame jis išlaikomas 30 min 40 °C temperatūroje. Po to KFME chromatografiniu švirkštu, kuriame įmontuotas 1 cm ilgio kombinuotas divinilbenzeno/karbovaksas/polidimetilsiloksano polimerinis pluoštas atliekama SV–KFME analizė LECO Pegasus 4D GC ×GC–TOFMS chromatografu. Lakiųjų aromato junginių absorbcija vykdyta 15 min 40 °C temperatūroje, toliau pluoštas įleidžiamas į DCh–TOFMS inžektorių, kuriame vykdoma desorbcija 150° temperatūroje 3 min. Nėpolinės kolonėlės temperatūrinė programa nuo 40 °C (0,2 min) keliant 5 °C/min greičiu iki 220 °C (1 min) ir galiausiai keliant temperatūrą 20 °C/min greičiu iki 300 °C (1 min), antroje kolonėlėje atitinkamai palaikoma 15 °C aukštesnė temperatūra. SV–KFME integravimas pradėtas nuo 300 s

Braškių SKE-CO<sub>2</sub> ekstrakto ir išspaudų lakiųjų junginių sudėtis anлізуota su išsamiosios dujų chromatografijos įranga GCxGC–TOFMS LECO. Analizuojamų ekstraktų mėginių koncentracija 10 mg/ml pentane su vidiniu standartu. GCxGC–TOFMS įrenginyje yra instaliuotos dvi kolonėlės, turinčios skirtingą poliškumą – nėpolinė BPX-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) ir polinė BPX-50 (1,8

m × 0,10 mm × 0,1 μm). Pirminėje kolonėlėje temperatūra keliama 5 °C/min greičiu nuo 50 °C (0,2 min) iki 280 °C (10 min); antroje kolonėlėje atitinkamai palaikoma 15 °C aukštesnė temperatūra. Inžektoriaus temperatūra 280 °C, įleidžiama 1 μl bandinio be srauto paskirstymo, po 60 s atidaromas srauto paskirstymo ventilis santykiu 1:20, jonų šaltinyje palaikoma 250 °C temperatūra, o detektoriuje – 1550 V įtampa, 70 eV. Masių skenavimas vykdomas 10 spektrų/s greičiu 35–550 m/z intervale. Analizuojant ekstraktų mėginius naudotas 480 s tirpiklio smailės atmetimas. Kiekviena analizė buvo kartota po 3 kartus.

Junginių identifikavimas: lakiųjų junginių, atpalaiduotų iš išspaudų matricos į viršerdvę ir SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakto lakiųjų junginių sudėtis analizuota su LECO programine įranga (ChromaTOF v.4.22). Junginiai buvo identifikuoti NIST ir 3 kitomis masių spektrų bibliotekomis (sutapimas ne mažiau 700) ir eksperimentiškai, pagal *n*-alkanų C<sub>7</sub>–C<sub>30</sub> standartą nepolinėje kolonėlėje BPX-5, gautus Kovačo sulaikymo indeksus (KI) lyginant su lakiųjų junginių sulaikymo laikais bei literatūroje rastais duomenimis. Lakiųjų junginių kiekis išreikštas % nuo bendro DCh–TOFMS chromatogramos smailių ploto.

## **2.5. Duomenų matematinis ir statistinis įvertinimas**

Duomenų matematinė ir statistinė analizė atlikta naudojantis kompiuterinėmis programomis Design – expert 7.0 ir MS Excel 2010. Apskaičiuoti duomenų aritmetiniai vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai. SKE–CO<sub>2</sub> plano patikimumas įvertintas dispersine analize (ANOVA).



### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR ANALIZĖ

#### 3.1. Braškių išspaudų cheminė sudėtis

Šio tyrimo metu buvo nustatyta išdžiovintų ir susmulkintų braškių išspaudų cheminė sudėtis: drėgmės, riebalų, baltymų, skaidulinių ir mineralinių medžiagų kiekiai (žr. 3 lentelę).

**3 lentelė.** Braškių išspaudų cheminė sudėtis

Rodiklis	Kiekis, g/100 g SM
Drėgmės kiekis	5,60 ± 0,15
Riebalai	12,03 ± 0,43
Baltymai	13,27 ± 0,32
Skaidulinės medžiagos	32,5
Mineralinės medžiagos	5,33 ± 0,08

Drėgmė yra vienas iš svarbesnių rodiklių vertinant išspaudų kokybę, nes gali turėti įtakos mikrobiologiniam saugumui. Drėgnose išspaudose gali atsirasti pelėsių, kurie žaliavą padaro nekokybiška ir nesaugia tolimesniam perdirbimui. Kadangi, džiovintos išspaudos yra hidroskopiškos ir geba iš aplinkos sugerti drėgmę, todėl išspaudų kokybei – labai svarbios laikymo sąlygos. Džiovintos išspaudos turėtų būti laikomos sandariuose induose, apsaugančiuose nuo aplinkos drėgmės. Taip pat drėgmės kiekis gali priklausyti nuo uogos savybių ar džiovavimo sąlygų. Remiantis kitų mokslininkų tyrimais, džiovintų braškių išspaudų drėgmės kiekis vidutiniškai varijuoja apie 5,2 g/100 g SM [21].

Riebalai, baltymai, skaidulinės ir mineralinės medžiagos apibūdina bendrą produktų maistinę vertę. Šių medžiagų kiekiai gali priklausyti nuo įvairių veiksnių: braškių veislės, auginimo bei laikymo sąlygų. Didžiausias riebalų kiekis yra braškių sėklose, kurios po perdirbimo pasilieka išspaudose, todėl išspaudos yra naudingas riebalų rūgščių šaltinis. Skaidulinių medžiagų išspaudose aptinkama 3 kartus daugiau nei šviežiose braškėse [18]. Braškių išspaudų energetinė vertė yra 309 kcal/100 g, tai yra net 10 kartų didesnė nei šviežių braškių [81]. Tokią energetinę vertę lemia, tai kad braškių spaudimo metu, išspaudžiamas vanduo esantis uogose, o išspaudose lieka baltymai ir riebalai, kurie būdinga nemaža energetinė vertė [77]. Lyginat tyrimo rezultatus su kitų mokslininkų atliktais tyrimais, didelių skirtumų nematyti. Riebalų kiekis, įvairiuose mokliniuose straipsniuose varijuoja nuo 3 iki 12 g/100 g SM, baltymų: 7–17 g/100 g SM, o skaidulinių medžiagų: 34–60 g/100 g SM. Braškių išspaudose taip pat aptinkama nemažai mineralinių medžiagų: 4–6 g/100 g SM. Išspaudose didesniais kiekiais aptinkama kalio, geležies, cinko, kalcio, taip pat yra magnio ir natrio [18, 21, 145, 146]. Galima pastebėti, kad šiame tyrime tirtos braškių išspaudos pasižymi dideliu riebalų ir baltymų, bei mažesniu skaidulinių medžiagų kiekiu, lyginat su kitų mokslininkų gautais rezultatais.

#### 3.2. SKE–CO<sub>2</sub> planavimas ir optimizavimas

Naudojant paviršiaus atsako matematinį modelį buvo įvertinta proceso sąlygų įtaka išspaudų ekstraktų išeigai ir nustatytos optimalios ekstrakcijos sąlygų vertės.

SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakcijai optimizuoti buvo sudarytas 20 skirtingų variantų ekstrakcijų planas su 6 centriniais taškais. Buvo atliktos ekstrakcijos ir apskaičiuotos ekstraktų išeigos.

Gautame ekstrakcijos plane dominuoja šeši parametrai – A (slėgis), B (temperatūra), C (laikas),  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$  ir šių parametru tarpusavio santykiai: AB, AC, BC. Jais užrašomi ekstrakcijos plano rezultatai, išreiškiant juos daugianario modelio lygtimi:

$$I\text{šeiga (g/100 g išspaudų)} = 6,80 + 2,20A - 0,66B + 0,20C + 1,44AB - 0,22AC - 0,17BC - 2,18A^2 + 0,15B^2 + 0,23C^2;$$

Atlikta statistinė dispersinė analizė (ANOVA) parodė, kad sudarytas planas yra statistiškai reikšmingas. Plano Fišerio F-kriterijus – 35,03, o patikimumas reikšmė  $p < 0,0001$ , tai reiškia, kad planas yra statistiškai reikšmingas ir patikimas (žr. 4 lentelę).

Dispersinės analizės rezultatai rodo, kad didžiausią įtaką braškių išspaudų ekstrakto išeigai turi slėgio (A) ( $p < 0,0001$ ) ir temperatūros (B) ( $p = 0,0029$ ) rodikliai. Taip pat ekstrakcijai poveikį daro temperatūros ir slėgio tarpusavio sąveika (AB) ( $p < 0,0001$ ). Nuo ekstrakcijos laiko, gaunamo ekstrakto išeiga priklauso nereikšmingai ( $p = 0,2519$ ) (žr. 4 lentelę).

**4 lentelė.** SKE–CO<sub>2</sub> plano dispersinė analizė

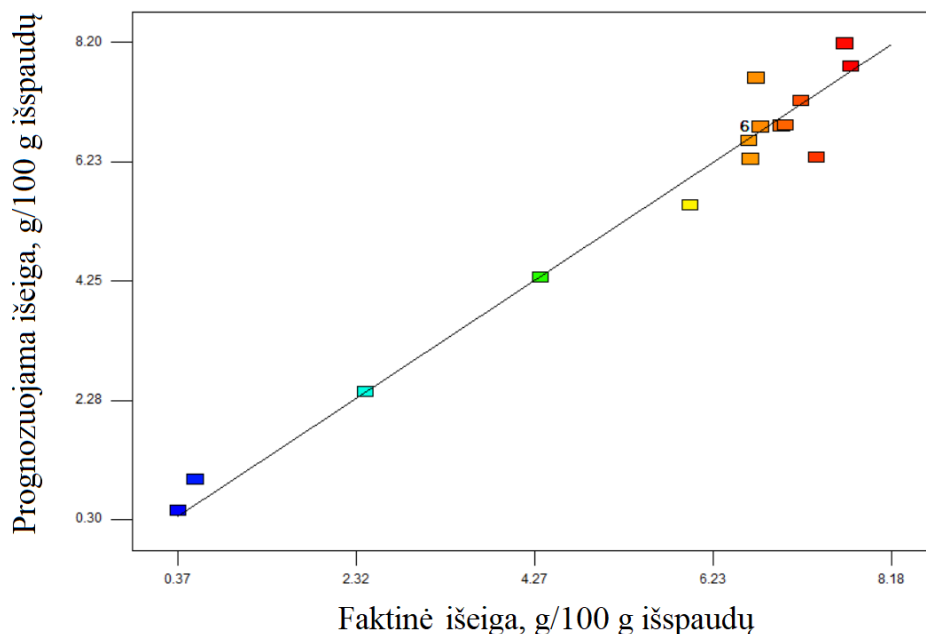
	Kvadratų suma	df	Kvadratų vidurkis	F–kriterijus	p reikšmė
Planas	89,58	9	9,95	35,03	< 0,0001*
A – slėgis	48,31	1	48,31	170,02	< 0,0001*
B – temperatūra	4,33	1	4,33	15,24	0,0029*
C - laikas	0,42	1	0,42	1,48	0,2519**
AB	16,65	1	16,65	58,58	< 0,0001*
AC	0,40	1	0,40	1,39	0,2651**
BC	0,23	1	0,23	0,81	0,3883**
$A^2$	13,01	1	13,01	45,80	< 0,0001*
$B^2$	0,066	1	0,066	0,23	0,6410**
$C^2$	0,14	1	0,14	0,51	0,4915**
Liekana	2,84	10	0,28		
Klaidos tikimybė	0,000	5	0,000		

Pastabos: \* – statistiškai reikšminga vertė, kai  $p \leq 0,05$

\* – statistiškai nereikšminga vertė, kai  $p \geq 0,1$

F – Fišerio kriterijus

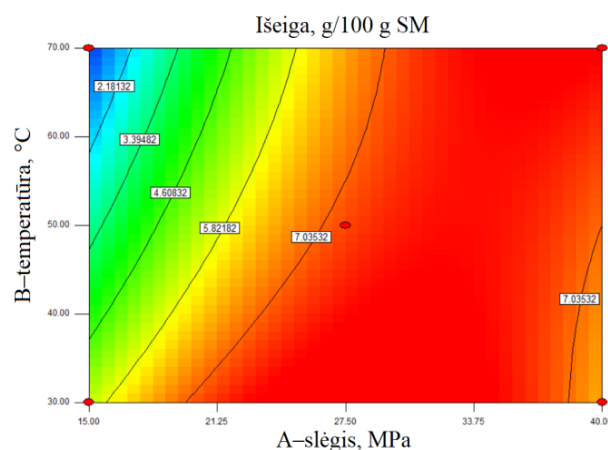
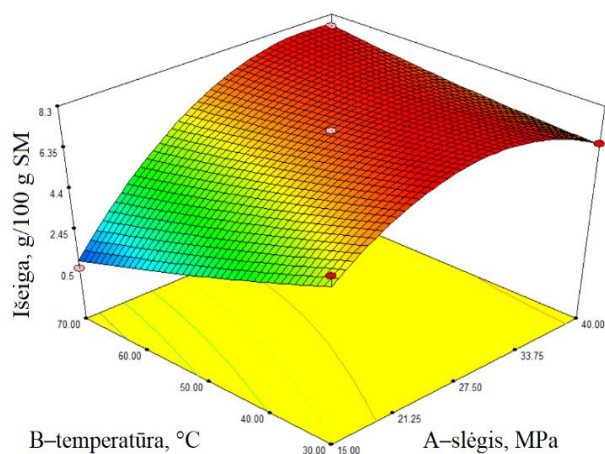
Atlikus ekstrakcijos sąlygų optimizavimą, nustatyta, kad optimaliausios sąlygos ekstrahuoti braškių išspaudas SKE–CO<sub>2</sub> metodu, esant 36 MPa slėgiui, 68 °C temperatūrai ir 154 min dinaminiam laikui. Šiomis sąlygomis gauto ekstrakto išeiga – 7,65 g/100 g išspaudų. Visos faktinės, tyrimo metu gautų ekstraktų, ir prognozuojamos išeigų vertės bei jų koreliacija pavaizduota 10 paveiksle.



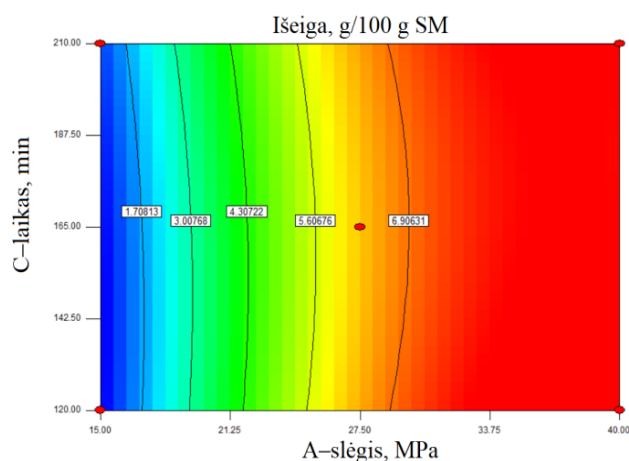
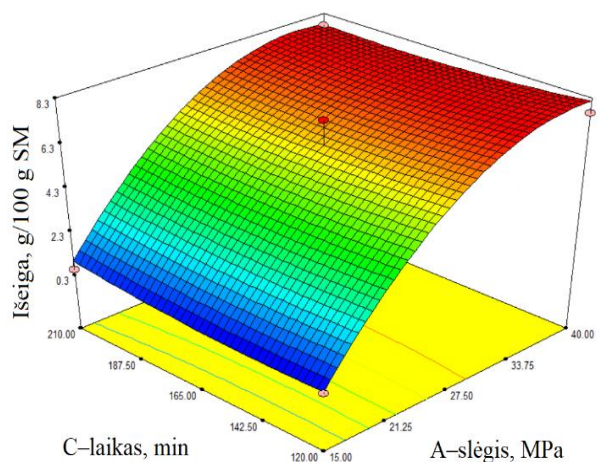
**10 pav.** Faktinių ir prognozuojamų išeigų palyginimas, išgaunant SKE–CO<sub>2</sub> ekstraktą

3D ir kontūriniai grafikai (žr. 11 pav.) parodo dviejų skirtingų parametų (temperatūros, slėgio ar laiko) tarpusavio sąveiką, kuri turi įtakos ekstrakto išeigai, pasirenkant vieną parametą kaip konstantą. Esant pastoviam laikui (210 min), temperatūros pakėlimas proceso metu nuo 30 iki 70 °C ekstrakto išeigą padidina apie 1,2 kartus, o padidintas ekstrakcijos slėgis nuo 15 iki 40 MPa ekstrakto išeigą padidina beveik 14 kartų. Todėl galima teigti, kad esant pastoviam ekstrakcijos laikui, slėgio padidėjimas turi didesnės įtakos ekstrakto išeigos padidėjimui, nei temperatūra (žr. 11A pav.). Esant pastoviai ekstrakcijos temperatūrai (70 °C), ekstrakto išeiga priklausė tik nuo slėgio pokyčio: pakilęs slėgis iki 40 MPa, ekstrakto išeiga padidina net 21 kartą. Ilgesnė ekstrakcija ekstrakto išeigai įtakos neturi (žr. 11B pav.). Esant pastoviam ekstrakcijos slėgiui (40 MPa) ir didinant jos temperatūrą, ekstrakto išeiga padidėjo apie 1,2 kartus, o ilginat ekstrakcijos laiką, išeigos pokytis buvo dar mažesnis (žr. 11C pav.). Šie rezultatai tik patvirtina įvertintą duomenų dispersinę analizę, kad didžiausią įtaką braškių išspaudų ekstrakcijos efektyvumui turi slėgis bei slėgio ir temperatūros tarpusavio sąveika.

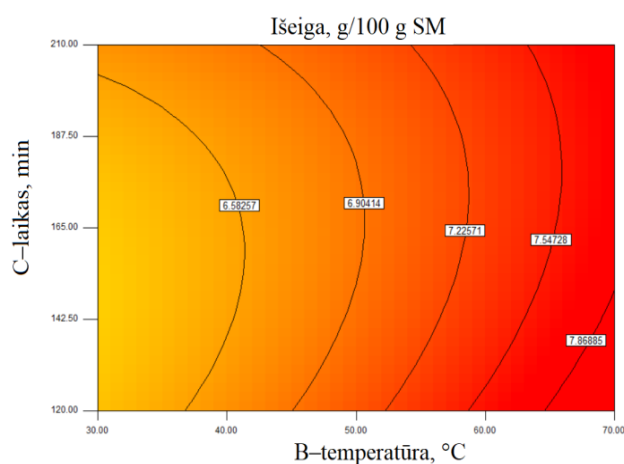
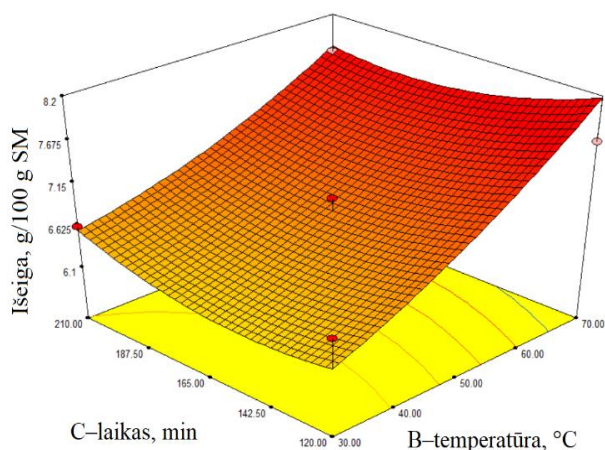
**A. Slėgio ir temperatūros sąveika, kai pastovus ekstrakcijos laikas (154 min)**



**B. Slėgio ir laiko sąveika, kai pastovi ekstrakcijos temperatūra (68 °C)**



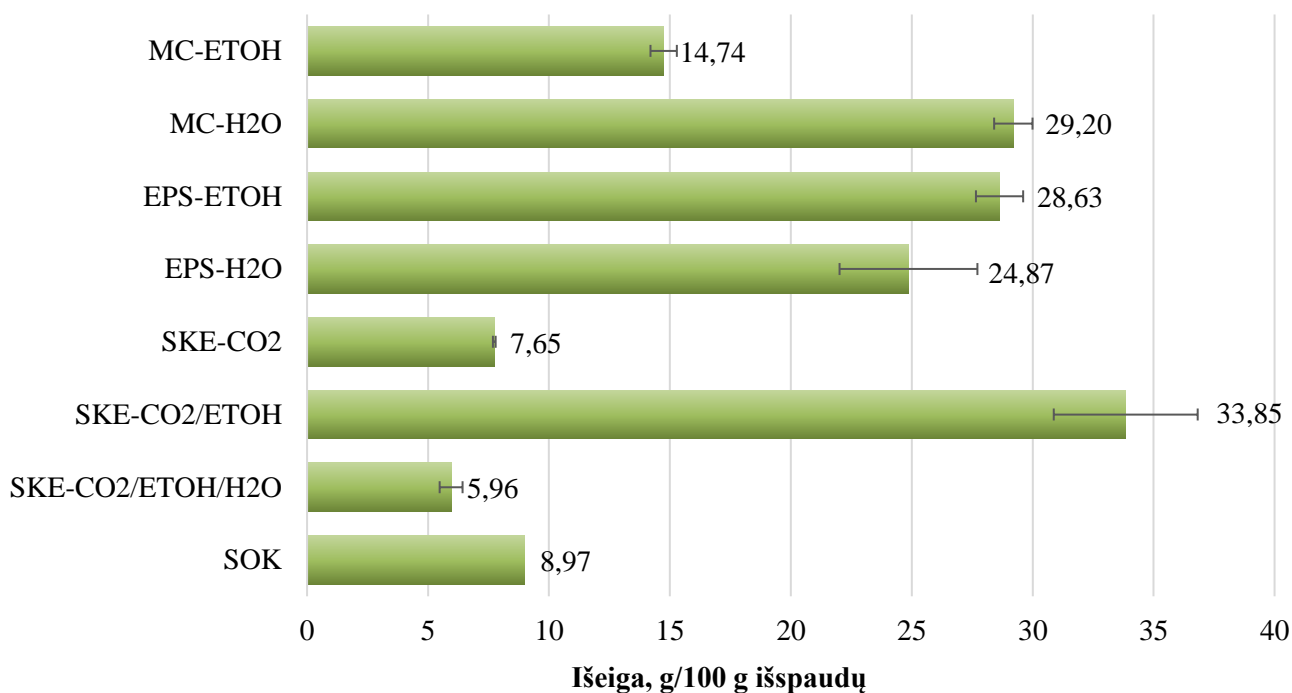
**C. Temperatūros ir laiko sąveika, kai pastovus ekstrakcijos slėgis (36 MPa)**



**11 pav.** 3D ir kontūriniai grafikai, vaizduojantys SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakto išeigos priklausomumą nuo parametų tarpusavio sąveikos

### 3.3. Ekstraktų išeigos

Bioaktyviųjų junginių išgavimui buvo taikyti skirtingi ekstrakcijos metodai. Iš gautų rezultatų matyti (žr. 12 pav.), kad efektyviausia buvo ekstrakcija padidintame slėgyje. Didesnį ekstrakcijos efektyvumą lemia aukštas slėgis ir aukšta temperatūra, tai sąlygoja mažesnę tirpiklio sunaudojimą. Šios ekstrakcijos metu žaliava yra veikiamą aukšto slėgio, naudojant temperatūrą. Visas procesas yra automatizuotas, todėl yra greitas ir efektyvus. Didelė ekstrakto išeiga buvo gauta ekstrahuojant etanoliu automatiniu ekstraktoriu padidintame slėgyje, išeiga – 28,63 g/100 g išspaudų. Tačiau didžiausia ekstrakto išeiga gauta ekstrahuojant liekaną likusią po superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos etanoliu automatiniu ekstraktoriu padidintame slėgyje, išeiga – 33,85 g/100 g išspaudų. Likusi liekana toliau buvo ekstrahuota vandeniu maceruojant ir purtant 24 val kambario temperatūroje, išeiga gauta – 5,96 g/100 g išspaudų. Mažesniais išeigomis pasižymėjo ekstraktai gauti tradiciniu ekstrakcijos būdu t.y. ekstrahuojamą žaliavą maceruojant ir purtant, kur gautų ekstraktų išeigos buvo: 14,74 g/100 g išspaudų, ekstrahuojant vandeniu ir 29,20 g/100 g išspaudų, ekstrahuojant etanoliu. Lyginat tirpiklių efektyvumą ekstrakcijų metu, galima pastebėti, kad vanduo labiau yra tinkamas maceruojant braškių išspaudas, o ekstrahuojant automatiniu ekstraktoriu padidintame slėgyje su etanoliu gautas didesnis efektyvumas.

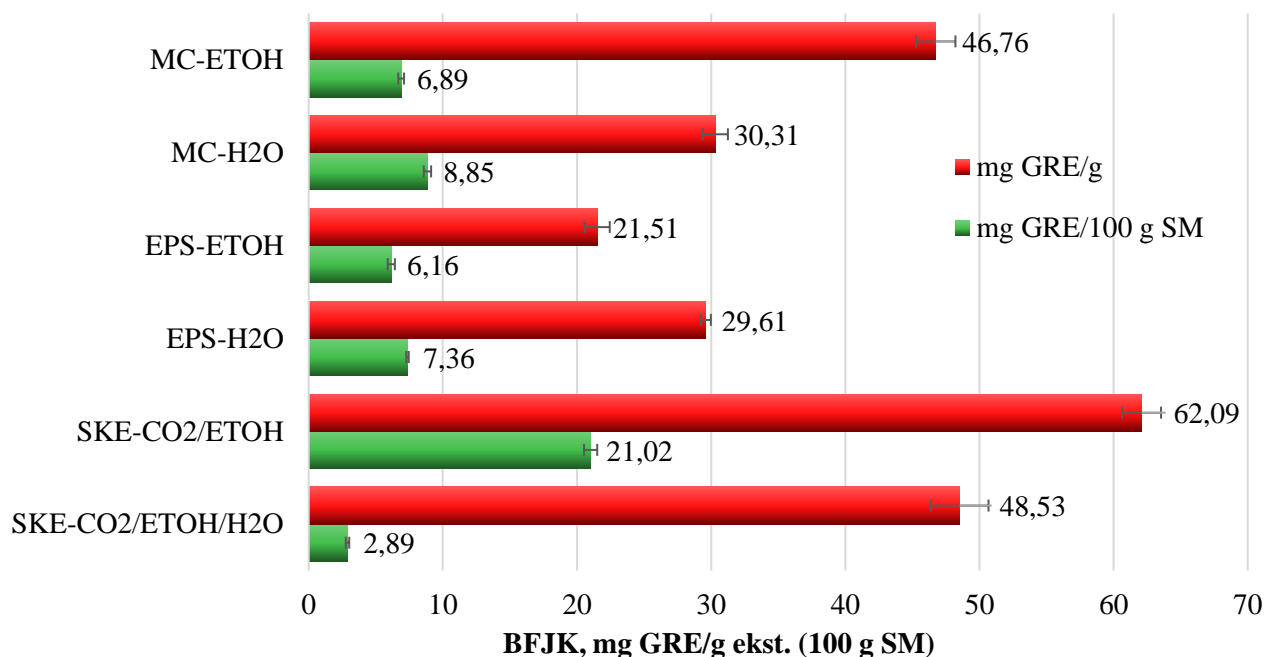


12 pav. Ekstraktų išgautų iš braškių išspaudų išeigos

### 3.4. Ekstraktų antioksidacinis įvertinimas

Antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo išspaudų cheminės sudėties. Bendras fenolinių junginių kiekis parodo išspaudų ir ekstraktų antioksidacinį potencialą. Ekstraktų išgautų iš braškių išspaudų BFJK pavaizduotas 13 paveiksle. Iš grafiko matyti, kad BFJK braškių išspaudų ekstraktuose varijuoja nuo 21,51 iki 62,09 mg GRE/g ekstrakto. Daugiausiai fenolinių junginių buvo rasta ekstrakto po daugiapakopės ekstrakcijos, SKE–CO<sub>2</sub> liekaną ekstrahuojant etanoliu (SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH) – 62,09 mg GRE/g ekstrakto. Mažiausias BFJK kiekis nustatytas ekstraktuose po

ekstrakcijų padidintu slėgiu (EPS): 29,61 mg GRE/g ekst. po ekstrakcijos su vandeniu ir 21,51 mg GRE/g ekst. po ekstrakcijos su etanoliumi (žr. 13 pav.).

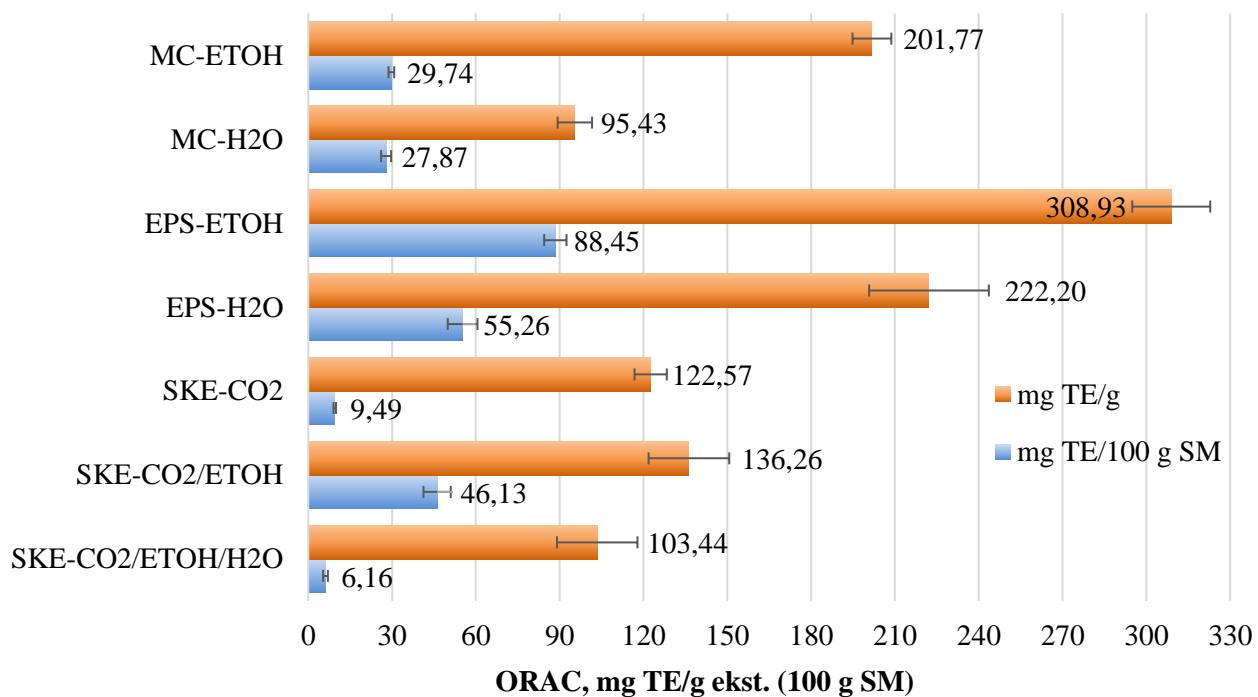


**13 pav.** Bendras fenolinių junginių kiekis braškių išspaudų ekstraktuose

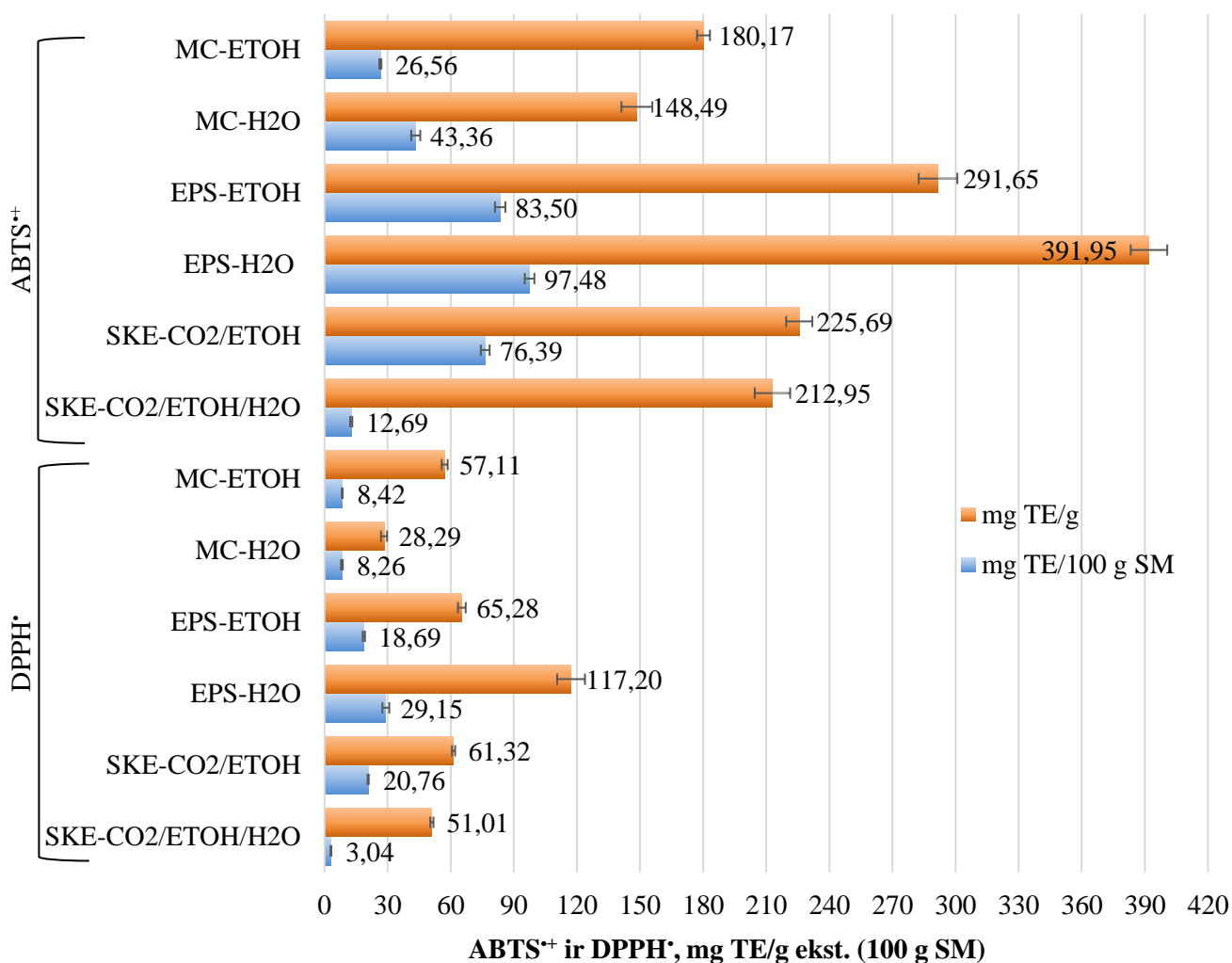
Radikalų surišimas – svarbus veiksnys, apibūdinat išspaudų antioksidacines savybes. Fenoliniai junginiai yra antioksidantai, kurie gali prisijungti radikalus ir sustabdyti jų oksidacinį poveikį [82].

Vertinat išspaudų ekstraktų deguonies radikalų sujungimo pajėgumą (*ORAC*) metodu matyti, kad ekstraktas po EPS–ETOH turi didžiausią radikalų surišimo gebą – 308,93 mg TE/g ekstrakto. Taip pat rezultatai rodo, kad etanoliniai ekstraktai, pasižymi didesniu deguonies radikalų surišimu nei vandeniniai. Ši tendencija matyti visuose ekstraktuose. Mažiausias *ORAC* nustatytas maceruotame vandeniniame ekstrakto (MC–H<sub>2</sub>O) – 95,43 mg TE/g ekstrakto. Po daugiapakopės ekstrakcijos, matyti, kad etanolinis ekstraktas (SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH) pasižymi didesne surišimo galia – 136,26 mg TE/g ekstrakto, lyginat su vandeniu ekstraktu gautu daugiapakopės ekstrakcijos būdu (SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH/H<sub>2</sub>O) – 103,44 mg TE/g ekstrakto (žr. 14 pav.).

Analizuojat ABTS<sup>•+</sup> ir DPPH<sup>•</sup> radikalų sujungimo gebą (žr. 15 pav), pastebima, kad vandeninis ekstraktas gautas automatiniumi ekstraktoriumi padidintame slėgyje (EPS–H<sub>2</sub>O) pasižymėjo didžiausia radikalų sujungimo geba (ABTS<sup>•+</sup> – 391,95, o DPPH<sup>•</sup> – 117,20 mg TE/g ekstrakto), o mažiausia sujungimo geba pasižymėjo vandeniniai ekstraktai išgauti maceruojant (MC–H<sub>2</sub>O) (ABTS<sup>•+</sup> – 148,49, o DPPH<sup>•</sup> – 28,29 mg TE/g ekstrakto).



14 pav. Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumas (ORAC) braškių išspaudų ekstraktuose



15 pav. ABTS<sup>+</sup> ir DPPH<sup>•</sup> radikalų sujungimas braškių išspaudų ekstraktuose

Taigi, bendrai verinant ekstraktų antioksidacinį aktyvumą, galima pastebėti, kad DPPH• metodu analizuoti ekstraktai pasižymi mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu, 2–4,7 kartų mažesniu už *ORAC* ir 3,2–5,2 kartų už ABTS•+ sujungimo metodu įvertintus ekstraktus. Antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių junginių kiekio, kuo efektyvesnė ekstrakcija, tuo didesnis antioksidacinis aktyvumas. Apibendrinat rezultatus, matyti, kad ekstrakcija vandeniu ir etanoliu padidintame slėgyje buvo efektyviausia išekstrahuojant antioksidantus. Lyginant ektrahavimui naudotus tirpiklius tarpusavyje nustatyta, kad daugiau antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių išsiekstrahuojama su etanoliu.

Pieszka ir kt. [145] taip pat tyrė braškių išspaudų antioksidacines savybes, tyrimo metu nustatyta, kad ekstraktas ekstrahuotas vandeniu pasižymėjo 6,1 mg TE/100 g SM bendru antioksidaciniu aktyvumu. Iš rezultatų matyti, kad šis braškių išspaudų ekstraktas buvo apie 8,7 kartus mažiau aktyvus nei dabartiniame tyrime gauti vandeniniai ekstraktai (MC–H<sub>2</sub>O ir EPS–H<sub>2</sub>O). Tokį rezultatą gali lemti skirtingi nustatymo metodai, taip pat braškių cheminė sudėtis ir kitos jų savybės.

Kitų mokslininkų atliktame tyrime, nustatyta, kad braškių išspaudas išekstrahavus acetonu, jų BFJK buvo 179–584 mg GRE/100 g ekstrakto, o *ORAC* – 2,75–9,76 mg TE/g ekstrakto. Šias pačias išspaudas išekstrahavus vandeniu, BFJK buvo 21–120 mg GRE/100 g ekstrakto ir *ORAC* – 0,75–1,5 mg TE/g. Iš šių tyrimų matyti, kad vandeniu išekstrahuoti išspaudų ekstraktai pasižymėjo silpnesnėmis antioksidacinėmis savybėmis nei išgauti organiniais tirpikliais [19]. Tokia tendencija taip pat matyti ir dabartiniame tyrime: etanoliu išekstrahuoti braškių išspaudų ekstraktai pasižymi didesniu BFJK ir antioksidaciniu aktyvumu. Be to, lyginat dviejų tyrimų rezultatus matyti, kad šių mokslininkų išekstrahuotos braškių išspaudos pasižymėjo didesniu BFJK, bet antioksidacinis aktyvumas (*ORAC*) buvo mažesnis.

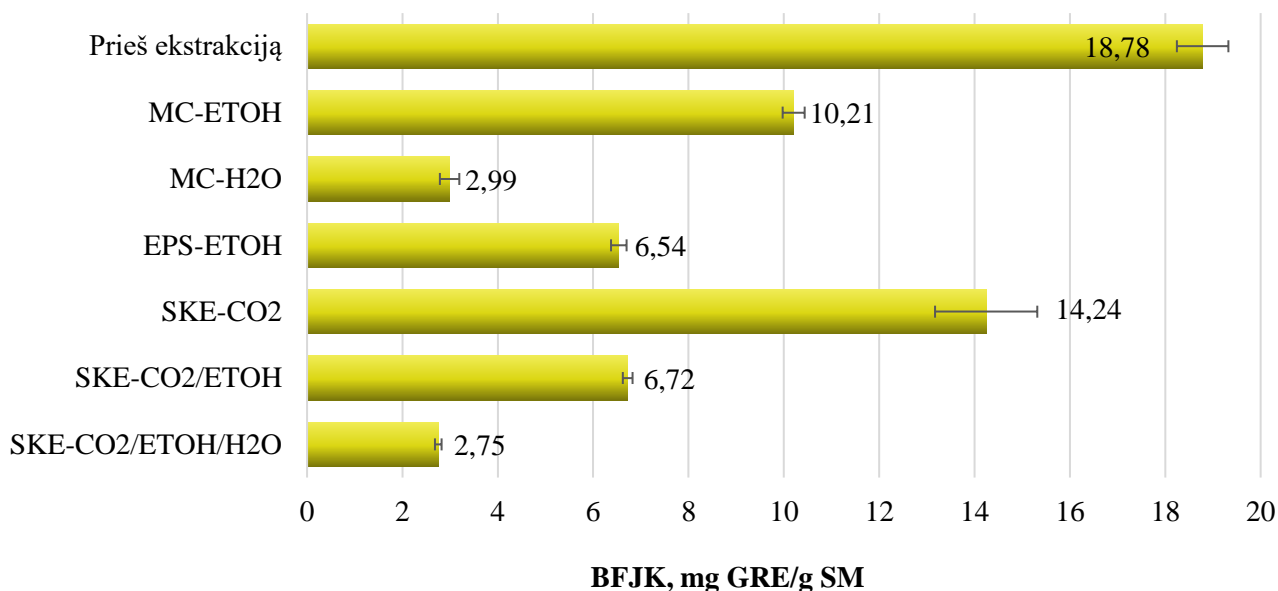
### **3.5. Išspaudų ir jų liekanų po ekstrakcijų antioksidacinis įvertinimas**

Nagrinėjant išspaudų liekanų po ekstrakcijų antioksidacines savybes (žr. 16 ir 17 pav.), matyti, kad išspaudų liekanų fenolinių junginių kiekis buvo mažesnis 3,3–20 kartų nei ekstraktuose, o antioksidacinis aktyvumas 1–2,4 kartų mažesnis nei ekstraktuose. Tai galima paaiškinti, tuo, kad dauguma bioaktyviųjų junginių išsiekstrahavo į ekstaktus ir ekstrakcija buvo sėkminga.

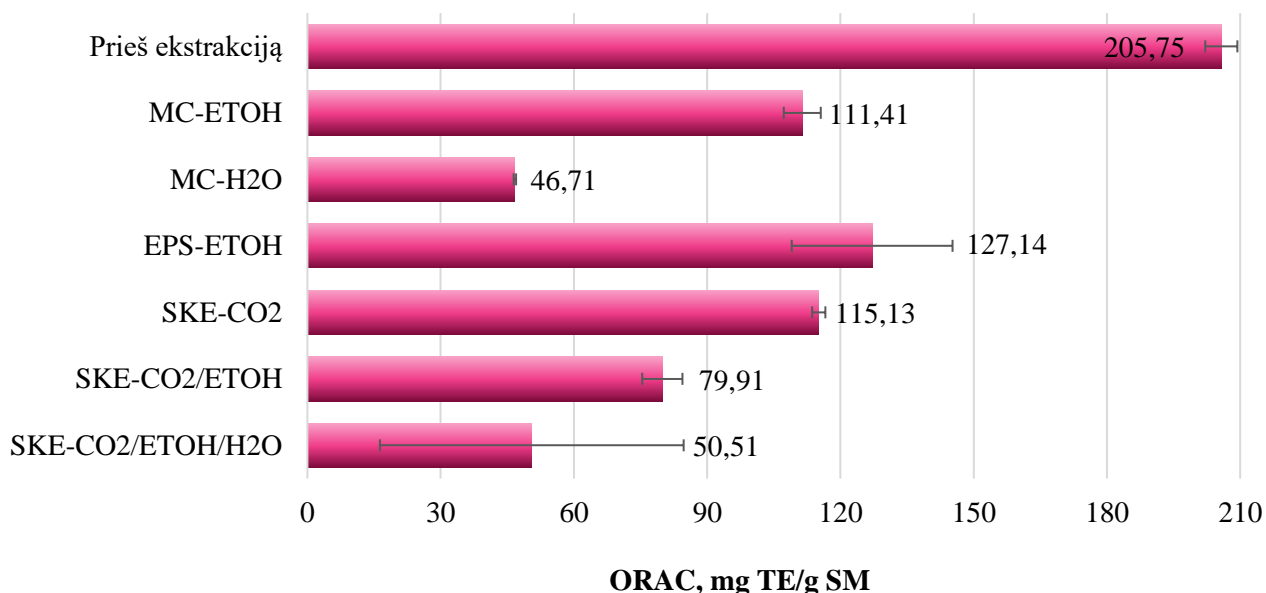
Išspaudos prieš ekstrakcijas pasižymėjo stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis nei išspaudos likusios po ekstrakcijų. Tyrimo rezultatai rodo, kad grynose išspaudose BFJK – 18,78 mg GRE/g SM, o *ORAC* – 205,75 mg TE/g SM (žr. 16 ir 17 pav.).

Įvykdžius daugiapakopės ekstrakcijos paskutinįjį etapą (SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH/H<sub>2</sub>O) išspaudų BFJK ir antioksidacinis aktyvumas sumažėjo net 6,8 kartus nuo pradinės žaliavos (2,75 mg GRE/g SM), o išspaudų antioksidacinis aktyvumas – 4 kartus (50,51 mg TE/g SM), toks ženklus pokytis manoma atsirado, dėl 3 kartus vykdytos ekstrakcijos su įvairiais tirpikliais. Taip pat nemažas skirtumas atsirado tarp pradinių išspaudų ir gautų po maceracijos purtant vandeniu. Išspaudų po ekstrakcijos BFJK (2,99 mg GRE/g SM) sumažėjo 6,3 kartus, lyginat su pradine žaliava, o antioksidacinis aktyvumas – 4,4 kartus (46,71 mg TE/g SM). Mažiausiai BFJK ir jų antioksidantiškumas pakito išspaudas išekstrahavus su SKE–CO<sub>2</sub>, nes ši ekstrakcija buvo atlikta, norint išekstrahuoti nepolinius junginius, todėl visi poliniai junginiai liko išspaudose. Lyginat su pradinėmis išspaudomis, po SKE–CO<sub>2</sub> likusių išspaudų BFJK (14,24 mg GRE/g SM) ir deguonies radikalų surišimas (115,13 mg TE/g SM) sumažėjo 1,3–1,8 kartus (žr. 16 ir 17 pav.).





**16 pav.** Braškių išspaudų ir jų liekanų po ekstrakcijų bendras fenolinių junginių kiekis



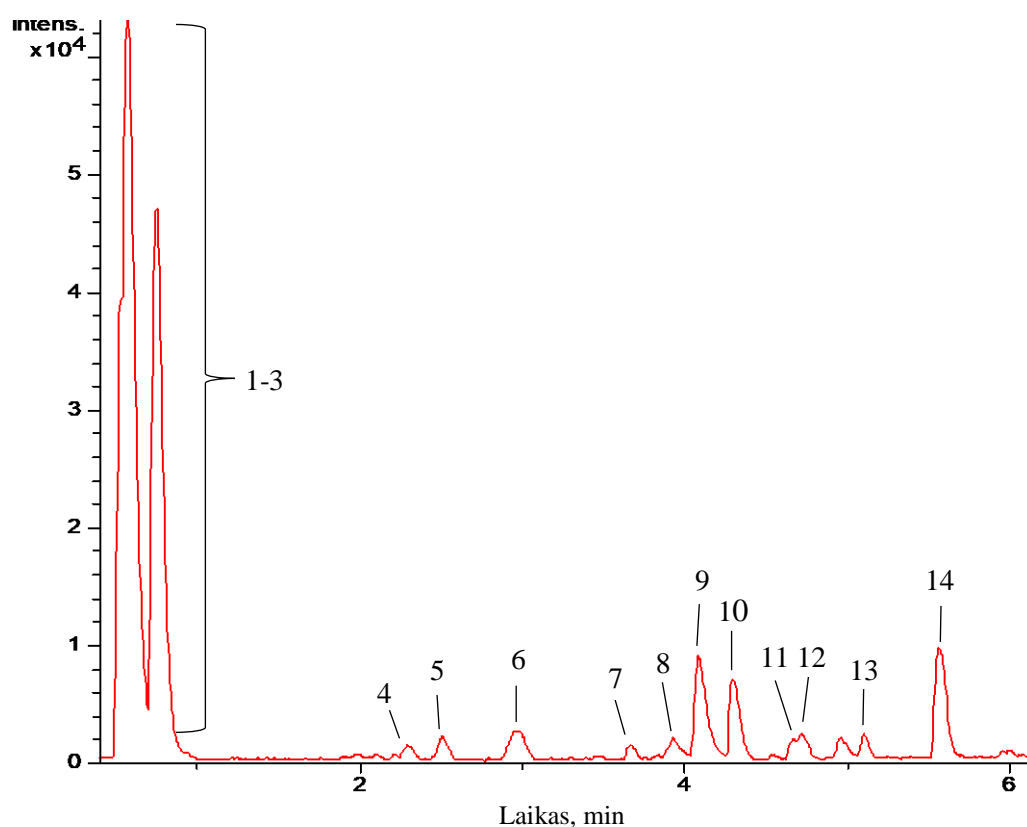
**17 pav.** Braškių išspaudų ir jų liekanų po ekstrakcijų deguonies radikalų absorbcijos pajėgumas (*ORAC*)

Atlikus kitų mokslininkų atliktų tyrimų, literatūrinę apžvalgą, rasta, kad braškių išspaudų antioksidacinis aktyvumas svyruoja nuo 68,34 iki 71,71 mmol TE/g SM, priklausomai nuo braškių veislės. Šis antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas ABTS<sup>•+</sup> radikalų surišimo metodu [20].

### 3.6. Organinių rūgščių ir fenolinių junginių kokybinė ir kiekybinė analizė

Iš viso braškių išspaudų tirtuose poliniuose ekstraktuose preliminariai, remiantis literatūroje rastais duomenimis, buvo identifikuota 14 junginių. Tiksliesniam junginių identifikavimui, kai kuriems junginiams buvo pritaikytas MS/MS fragmentavimas, tokiu atveju junginio molekulinė buvo suskaidyta į mažesnius fragmentus, pagal kuriuos vėliau buvo identifikuojami junginiai. Kokybinei junginių analizei atlikti buvo pasirinkti trys išspaudų ekstraktai: vandeninis ir etanolinis ekstraktai po maceracijos (MC–H<sub>2</sub>O ir MC–ETOH), bei etanolinis ekstraktas gautas automatiniai

ekstraktoriumi padidintame slėgyje. Iš gautų duomenų matyti (žr. 6 lentelę), kad junginiai nr. **4, 7, 9, 10, 12 ir 14** identifiukuoti gautas junginių smailes ir molekulinės formules lyginant su etaloniniais standartais. Junginiai 1–3 identifiukuoti kaip organinės rūgštys: obuolių, citrinų ir gintaro rūgštys. Junginiai nr. 4, 7, 9, 10, 12 ir 14 identifiukuoti kaip katechinas, p-kumaro ir elago rūgštys, kvercetin 3-gliukuronidas, kamferolio 3-gliukuronidas ir tilirozidas. Junginys nr. **6** identifiukuotas, kaip apegegin 7-gliukozidas, šis junginys identifiukuotas remiantis duomenų bazės ChemSpider pasiūlytais variantais ir MS/MS fragmentais. Šio junginio molekuliniam jonui  $[M-H]^-$   $m/z$  431,0979 buvo priskirta  $C_{21}H_{19}O_{10}$  molekulinė formulė, MS/MS fragmentavimo būdu gauti fragmentai (269,0448/ 147,0075/ 241,0498) atitiko apigenino molekulinę formulę. Gautas skirtumas 162 amv atitiko heksozės liekaną. Junginio **8** molekulinis jonas  $[M-H]^-$   $m/z$  447,0571 atitiko molekulinę formulę  $C_{20}H_{15}O_{12}$ , o MS/MS fragmentavimo metu gautas  $m/z$  300,9986 molekulinis jonas būdingas kvercetinui. Skirtumas tarp šių fragmentų buvo 146 amv, todėl remiantis literatūros duomenimis, ši liekana atitiko pentozės liekaną. Todėl, preliminariai galima teigti, kad šis junginys yra kvercetin 3-ramnozidas. Junginio **10** molekulinio jono  $[M-H]^-$   $m/z$  477,0674, kuris atitiko  $C_{14}H_{17}O_{13}$  molekulinę formulę, MS/MS režimu buvo gauti du fragmentai  $m/z$  301,0356 ir 151,0035. Atskilęs 301,0356 fragmentas rodo kvercetino liekaną. Skirtumas tarp 477 ir gauto 301,0356 fragmento buvo 176 amv, gautas skirtumas rodo gliukuronido liekaną, todėl galima teigti, kad šis junginys preliminariai identifiukuotas, kaip kvercetin 3-gliukuronidas. Junginys nr. **11** identifiukuotas kaip kamferolio heksozidas, remiantis komercine duomenų baze ChemSpider ir MS/MS fragmentavimo būdu gautais fragmentais. Šio junginio molekulinis jonas  $[M-H]^-$   $m/z$  447,0931 atitiko  $C_{21}H_{19}O_{11}$  molekulinę formulę, analizuojant MS/MS režimu gautas fragmentas 285,0374. Šis fragmentas atitiko kamferolio molekulinę formulę, gautas skirtumas 162 amv atitiko heksozės liekaną. MC–H<sub>2</sub>O ekstrakte nebuvo aptiktos smailės, kuriomis buvo identifiukuoti katechinas ir tilirozidas (žr. 6 lentelę).



**18 pav.** UESCh chromatograma, identifiukuojant fenolinius junginius ekstraktuose

Kiekybinė identifikuotų junginių analizė buvo atlikta visiems tyrimo metu gautiems poliniais tirpikliais išgautiems ekstraktams. Tirtuose ekstraktuose kiekybiškai buvo nustatyta elago rūgštis, kvercetin 3-gliukuronidas, tilirozidas, p-kumaro rūgštis, katechinas, kamferol 3-gliukuronidas. Elago rūgšties braškių išspaudų ekstraktuose buvo rasta daugiausiai: 0,56–72,46 mg/100 g SM, taip pat nemažas kiekis aptinkamas kvercetin 3-gliukuronido: 1,34–43,68 mg/100 g SM ir tilirozido: 0,10–35,11 mg/100 g SM, priklausomai nuo ekstrakcijos metodo ir naudoto ekstrakcijai tirpiklio. Kito flavonolio glikozido kamferol 3-gliukuronido aptinkama kur kas mažiau – 0,20–12,41 mg/100 g SM (žr. 19 pav.). Kitų mokslininkų darbuose elago rūgštis taip pat braškių išspaudose buvo viena iš dominuojančių junginių, jos aptinkama 35–99 mg/100 g SM [18, 20, 21, 147]. Flavonolių kvercetino ir kamferolio gliukozidų įvairiuose moksliniuose straipsniuose randami taip pat nemaži kiekiai: kvercetino darinių – 18,4–52 mg/100 g SM [18, 21, 147], o kamferolio darinių – 10,2–60 mg/100 g SM [18, 147]. Lyginat su kitų autorių darbais, matyti, kad junginių kiekiai vyrauja panašiuose intervaluose, tačiau kamferolio gliukozido aptinkama kur kas mažiau, tokiems rezultatų neatitinkamams įtakos galėjo turėti skirtingi kiekybinio nustatymo metodikos ypatumai. Mažiausiai šiame tyrime tirtuose ekstraktuose buvo nustatyta p-kumaro rūgštis (0,05–3,22 mg/100 g SM) (žr. 19 pav.). Kitų autorių straipsniuose p-kumaro rūgštis aptinkama didesniais kiekiais: 14–34 mg/100 g SM [20, 147]. Flavanolio katechino, lyginant su kitų mokslininkų atliktais braškių išspaudų kiekybiniais tyrimais, buvo taip pat gana mažesnis: 0,08–8,99 mg/100 g SM (žr. 19 pav.). Literatūroje rasta, kad katechino braškių išspaudų ekstraktuose yra 4,2–40 mg/100 g SM [18, 19].

Gornas ir kt. [21] savo tyrimo metu nustatė, kad braškių išspaudų ekstraktoje yra 47 g/kg SM citrinų, 27 g/kg SM obuolių ir 13 g/kg SM gintaro rūgščių. Dabartinio tyrimo atlikta chromatografinė ekstraktų kokybinės analizės, rodo, kad organinių rūgščių kiekiai taip pat ekstraktuose turėtų būti dideliais kiekiais, nes identifikuotos chromatogramos smailės užima nemažą plotą (žr. 18 pav.).

Vertinat kiekvieną ekstrakto sudėtį atskirai, gauti tyrimo rezultatai rodo, kad didžiausiu identifikuotų junginių kiekiu pasižymėjo daugiapakopės ekstrakcijos principu gautas ekstraktas (SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH), ekstrahuojant etanoliu gautą liekaną po superkritinės ekstrakcijos (165,32 mg/100 g SM), taip pat dideli kiekiai nustatyti EPS–ETOH (152,88 mg/100 g SM) ir EPS–H<sub>2</sub>O (126,81 mg/100 g SM) ekstraktuose. Po maceracijos purtant gautuose ekstraktuose nustatyta ženkliai mažiau tirtų junginių: MC–ETOH – 68,57 mg/100 g SM ir MC–H<sub>2</sub>O – 18,61 mg/100 g SM. Mažiausiai tirtų junginių nustatyta daugiapakopės ekstrakcijos būdu gautame vandeniame ekstraktoje (SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH/H<sub>2</sub>O), bendras kiekybiškai identifikuotų fenolinių junginių kiekis – 2,33 mg/100 g SM. Tačiau reikia pabrėžti, kad priešingai nei kituose ekstraktuose, šiame buvo gauta daugiau kvercetin 3-gliukuronido (1,34 mg/100 g SM), nei elago rūgšties (žr. 19 pav.).

Iš fenolinių junginių analizės ekstraktuose, galima daryti išvadą, kad efektyviausias ekstrakcijos būdas fenoliniams junginiams išgauti yra ekstrakcija padidintame slėgyje, o tinkamiausias tirpiklis – etanolis. Iš viso buvo identifikuoti 14 junginių: 3 organinės rūgštys, 4 fenolinės rūgštys ir 7 flavonoidai ir jų glikozidai. Įvertinus kiekybiškai, braškių išspaudų ekstraktuose elago rūgšties buvo rasta daugiausiai.

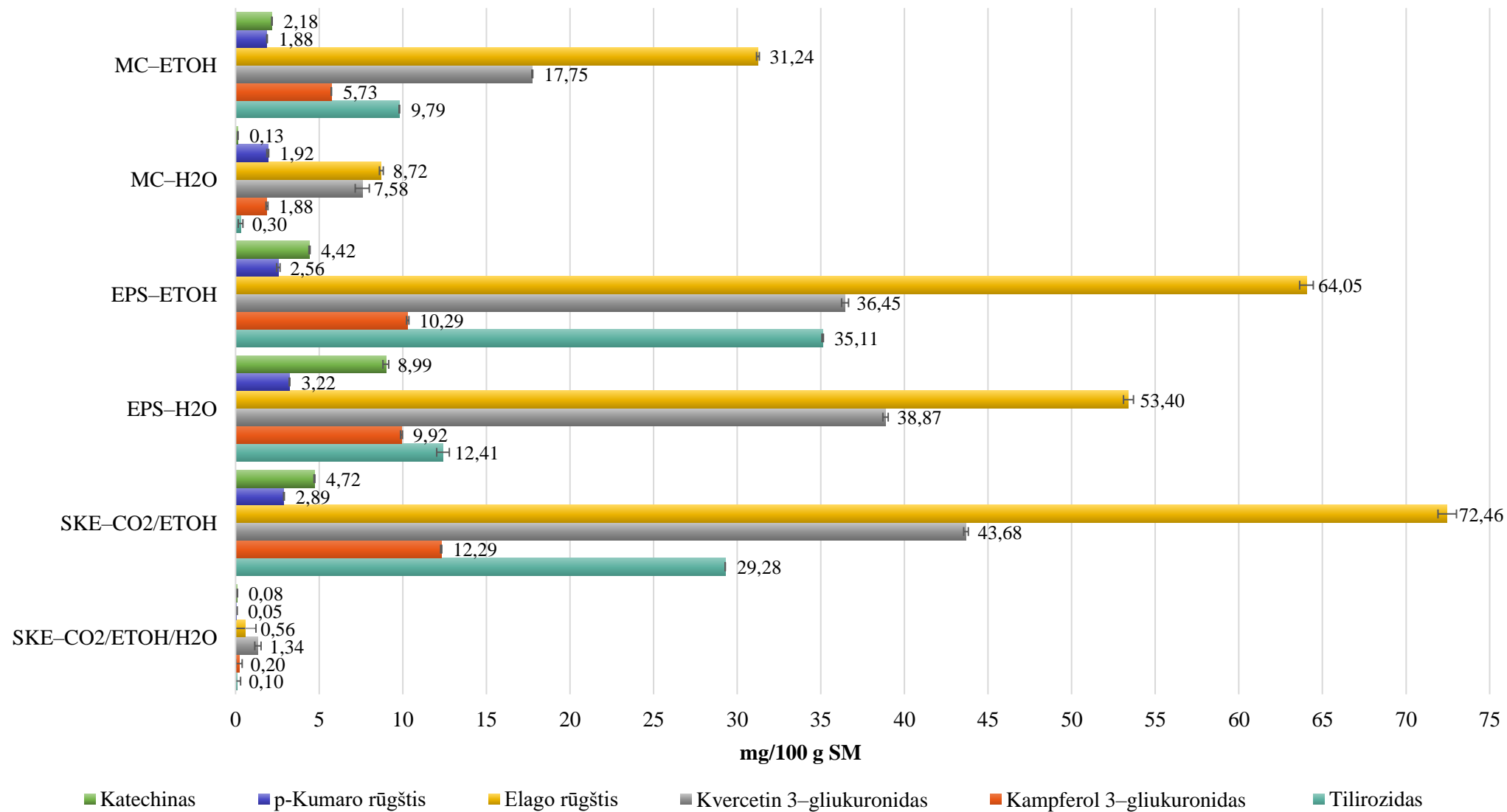
**5 lentelė.** Organinių rūgščių ir fenolinių junginių kokybinė analizė

Junginio Nr.	Sulaikymo laikas, min	Junginys	Molekulinė masė [M-H] <sup>-</sup>	Molekulinė formulė [M-H] <sup>-</sup>	MS/MS fragmentai	Ekstraktai		
						MC- ETOH	MC- H <sub>2</sub> O	EPS- ETOH
1	0,5–0,8	Obuolių rūgštis <sup>c</sup>	133,0144	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	–	+	+	+
2	0,5–0,8	Citrinų rūgštis <sup>c</sup>	179,0564	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	–	+	+	+
3	0,5–0,8	Gintaro rūgštis <sup>c</sup>	117,0193	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	–	+	+	+
4	2,35	Katechinas <sup>a</sup>	289,0716	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	–	+	–	+
5	2,55	p–Kumaro rūgšties heksozidas <sup>b, c</sup>	325,0925	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	145,029	+	+	+
6	2,95	Apegenin 7–gliukozidas <sup>b, c</sup>	431,0979	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	269,0448/ 147,0075/ 241,0498	+	+	+
7	3,65	p–Kumaro rūgštis <sup>a</sup>	163,0402	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	–	+	+	+
8	3,95	Kvercetin 3–ramnozidas <sup>b, c</sup>	447,0571	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> O <sub>12</sub>	300,9986	+	+	+
9	4,15	Elago rūgštis <sup>a</sup>	300,9987	C <sub>14</sub> H <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	–	+	+	+
10	4,35	Kvercetin 3–gliukuronidas <sup>a, b</sup>	477,0674	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> O <sub>13</sub>	301,0356/151,0035	+	+	+
11	4,75	Kampferol heksozidas <sup>b, c</sup>	447,0931	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	285,0374	+	+	+
12	4,75	Kampferol 3–gliukuronidas <sup>a, b</sup>	461,0726	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>12</sub>	315,9143	+	+	+
13	5,1	Hidroksibenzoinė rūgštis <sup>c</sup>	137,0243	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	–	+	+	+
14	5,65	Tilirozidas <sup>a, b</sup>	593,1297	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub>	145,0303/ 285,0420/ 447,0932	+	–	+

Pastaba: <sup>a</sup> – identifikuota pagal standartą;

<sup>b</sup> – identifikuota pagal MS/MS fragmentus;

<sup>c</sup> – identifikuota pagal literatūros duomenis ir ChemSpider duomenų bazę [153]



19 pav. Fenolinių junginių kiekybinė analizė braškių išspaudų ekstraktuose

### 3.7. Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė

Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė buvo atlikta braškių išspaudose, šiuos junginius ekstrahuojant parūgštintu etanoliu ir vandens mišiniu, ir visuose poliniuose ekstraktuose. Preliminariai identifikavus antocianinus, nustatyta, kad vyraujantys antocianinai yra pelargonidino gliukozidai: pelargonidin 3-gliukozidas, pelargonidin 3-rutinozidas ir pelargonidin 3-(6"-malonil)-gliukozidas. Taip pat randama ir cianidino darinių: cianidin 3-gliukozido ir cianidin 3-(6"-kumaroil)-gliukozido. Antocianinai yra fenoliniai junginiai, kurių kiekis braškių išspaudų ekstraktuose yra didžiausias (17,97–221,55 mg/100 g SM). Daugiausiai iš antocianinų randama pelargonidin 3-gliukozido (9,93–118,20 mg/100 g SM), jo yra visuose tirtuose ekstraktuose. Taip pat visuose ekstraktuose randama pelargonidin 3-rutinozido (3,83–20,82 mg/100 g SM). Analizuojant ekstraktus atskirai, matyti, kad po daugiapakopės ekstrakcijos padidintu slėgiu išgautas ekstraktas su etanoliu (SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH) turėjo daugiausiai antocianinų. Mažiausiai antocianinų randama po daugiapakopės ekstrakcijos gautas ekstraktas, ekstrahuojant SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH išspaudų liekaną. Tokį rezultatą galėjo lemti, tai kad išspaudos ekstrahuojamos daugiau nei vieną kartą, buvo labiau paveiktos išorinių veiksnių (pavyzdžiui aukštesnės temperatūros), todėl kai kurių antocianinų nebuvo rasta visai, o likusiųjų kiekis buvo mažiausias. Didelį antocianinų kiekį SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH ekstraktoje galima paaiškinti, tuo kad buvo pašalinta lifofilinė frakcija superkritinės ekstrakcijos CO<sub>2</sub> metu, todėl gauti sąlyginai didesni antocianinų kiekiai. Antocianinų mažesnius kiekius išspaudose nei kai kuriuose ekstraktuose gali lemti, neefektyvi jų ekstrakcija prieš pat analizę. Išspaudose iš viso aptinkama 157,26 mg/100 g SM antocianinų. Maceracijos būdu purtant gautuose ekstraktuose buvo nustatytas mažesnis antocianinų kiekis, lyginat su EPS ekstraktais. Taip pat maceracijos būdu purtant gautuose ekstraktuose nebuvo aptikta cianidino gliukozidų (žr. 6 lentelę). Apibendrinat, galima teigti, kad, taip pat kaip ir fenolinių junginių analizė parodė, antocianinus išgauti efektyviausias būdas yra EPS, o tirpiklis – etanolis.

Atlikus literatūrinę apžvalgą, galima pastebėti, kad bendras antocianinų kiekis įvairiuose šaltiniuose nagrinėjant braškių išspaudų ekstraktus svyruoja nuo 19 iki 93 mg/100 g SM [18, 145, 146, 148]. Kitų mokslininkų darbuose dažniausiai buvo identifikuojami pelargonidin 3-gliukozido, pelargonidin 3-rutinozido ir cianidin 3-gliukozido antocianinai [19]. Iš rezultatų matyti, kad atliktame tyrime antocianinų kiekis SKE–CO<sub>2</sub>/ETOH braškių išspaudų ekstraktoje buvo dvigubai didesnis (žr. 7 lentelę). Tokie rezultatų skirtumai, galėjo atsirasti dėl nevienodų taikytų tyrimų metodų ar atlikimo sąlygų, taip pat dėl skirtingų braškių veislių naudojimo tyrimuose. Kiti autoriai, Šaponjac ir kt. [20] savo tyrime nustatė, kad braškių išspaudose pelargonidin 3-gliukozido buvo aptikta 231–271 mg/100 g SM, o pelargonidin 3-malonil-gliukozido: 72–106 mg/100 g SM, priklausomai nuo braškių veislės. Lyginant su dabartinio tyrimo rezultatais, matyti, kad pradinėse braškių išspaudose šių antocianinų kiekiai buvo mažesni (atitinkamai: 118,20 mg/100 g SM ir 21,34 mg/100 g SM). Gauti mažesni kiekiai rodo, kad atlikta ekstrakcija prieš pat grynų išspaudų antocianinų analizę, galėjo buvo neefektyvi.

**6 lentelė.** Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė braškių išspaudose ir jų ekstraktuose

Sulaikymo laikas, min	Junginys	Molekulinė masė [M] <sup>+</sup>	Molekulinė formulė [M] <sup>+</sup>	Kiekis, mg/100 g SM						
				Išspaudos	Ekstraktai					
					MC-ETOH	MC-H <sub>2</sub> O	EPS-ETOH	EPS-H <sub>2</sub> O	SKE-CO <sub>2</sub> /ETOH	SKE-CO <sub>2</sub> /ETOH/H <sub>2</sub> O
5,5	Cianidin 3– gliukozidas	449,1071	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	4,95 ±0,29	8,69 ±0,11	16,10 ±0,41	16,95 ±0,13	14,41 ±0,05	20,21 ±0,01	–
6,2	Pelargonidin 3– gliukozidas	433,1132	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	118,20 ±1,73	49,13 ±0,74	55,45 ±0,02	78,87 ±0,85	60,12 ±1,25	112,69 ±1,95	9,93
6,4	Pelargonidin 3– rutinozidas	579,1696	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub>	5,42 ±0,14	9,10 ±0,04	17,63 ±0,72	16,94 ±0,10	14,75 ±0,18	20,83 ±0,07	3,83
7,6	Pelargonidin 3– (6"-malonil)– gliukozidas	519,1128	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> O <sub>13</sub>	21,34 ±0,66	–	–	20,11 ±0,66	16,63 ±0,13	26,44 ±0,32	4,21
8,1	Cianidin 3–(6"-kumaroil)– gliukozidas	595,1438	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub>	7,35 ±0,94	13,29 ±0,13	–	31,96 ±0,80	20,36 ±0,77	41,38 ±1,05	–
Iš viso:				157,26	80,21	89,18	164,83	125,97	221,55	17,97

### 3.8. Riebalų rūgščių ir triacilglicerolių sudėties analizė

Riebalai yra svarbūs ląstelių struktūriniai ir funkciniai komponentai. Uogų sėklose kaupiasi aliejai, kurie susideda iš trigliceridų [78]. Triacilgliceroliai – tai glicerolio ir prie jo prisijungusių trijų riebalų rūgščių esteriai, kurie įeina į aliejų sudėtis ir yra svarbūs, vertinant aliejų biologinę reikšmę [149].

Riebalų rūgščių ir triacilglicerolių sudėtis buvo nustatyta nepoliniame lipofiliniame optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis gautame SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakto. Dujų chromatografijos metodu buvo nustatyti riebalų rūgščių esteriai ekstrakto. Riebalų rūgščių sudėtis pavaizduota 7 lentelėje. Iš gautų rezultatų matyti, kad iš viso buvo identifikuotos 8 riebalų rūgštys. Braškių išspaudų ekstrakto vyrauja nesočiosios riebalų rūgštys, o 4 iš jų yra nepakeičiamos (oleino, linolo,  $\alpha$ - ir  $\gamma$ -linoleno). Daugiausiai SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakto randama linolo arba omega 6 riebalų rūgštis – 45,90 %,  $\alpha$ -linoleno arba omega 3 riebalų rūgštis – 26,22 % ir oleino arba omega 9 riebalų rūgštis – 14,12 %. Ekstrakte taip pat aptinkamos 3 sočiosios riebalų rūgštys: palmitino, stearino ir arachidino. Nemažas kiekis – 7,95 %, yra sočiosios palmitino rūgštis (žr. 7 lentelę).

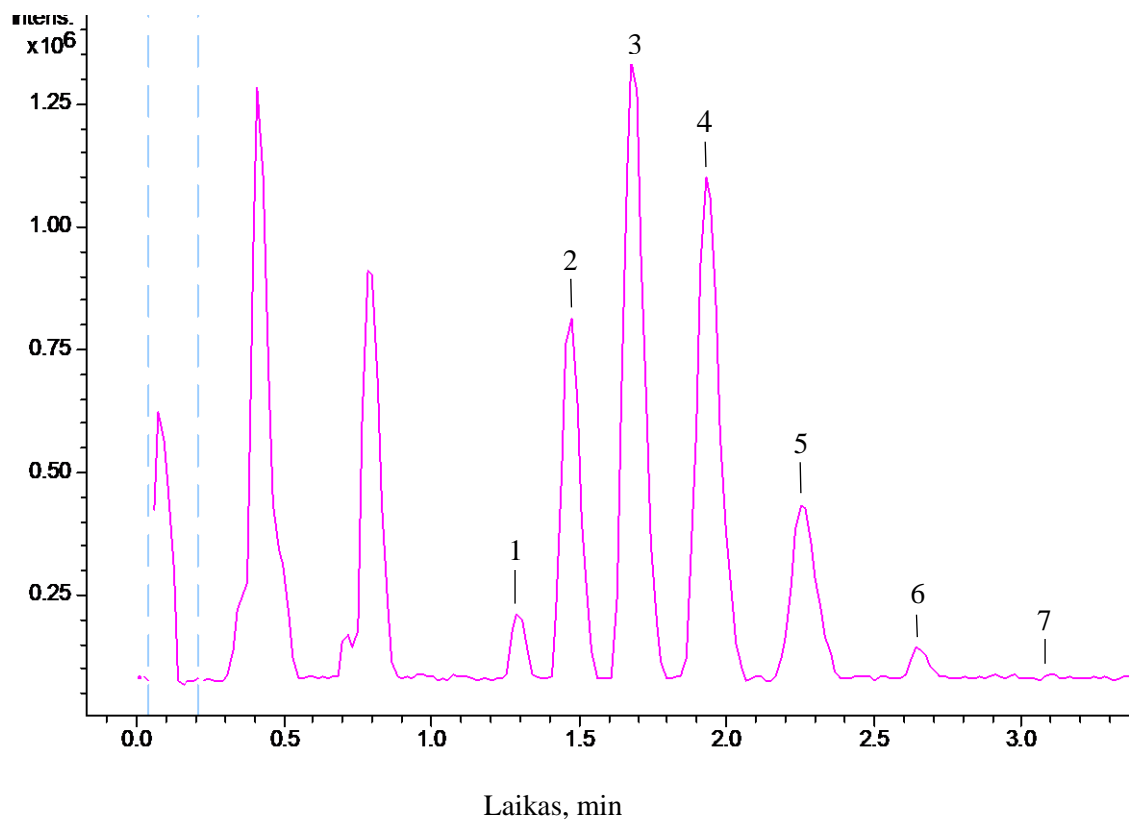
Kitų mokslininkų atliktame tyrime nustatyta, kad po superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos gautame braškių sėklų ekstrakto taip pat vyrauja nesočiosios riebalų rūgštys. Tyrimo metu nustatyta riebalų rūgščių sudėtis: linolo rūgštis – 41,2 %,  $\alpha$ -linoleno – 33,3 %, oleino – 17,8 %, palmitino – 4,5 %, palmitolio – 1,5 %, arachidino – 0,8 %, vakceno – 0,6 % [79].

**7 lentelė.** Riebalų rūgščių sudėtis braškių išspaudų SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakto

Sulaikymo laikas, min	Riebalų rūgštis	Atomų skaičiaus (C) ir dvigubų jungčių santykis molekulėje	Kiekis, %
40,33	Palmitino	16:0	7,95 ± 0,52
41,63	Palmitolio	16:1	0,17 ± 0,00
44,15	Stearino	18:0	1,78 ± 0,00
45,25	Oleino (omega 9)	18:1	14,12 ± 0,03
47,13	Linolo (omega 6)	18:2	45,90 ± 0,03
47,58	Arachidino	20:0	0,98 ± 0,04
48,31	$\gamma$ -Linoleno (omega 6)	18:3	0,09 ± 0,00
49,08	$\alpha$ -Linoleno (omega 3)	18:3	26,22 ± 0,10

Ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu, remiantis literatūros duomenimis ir gautais molekulių MS/MS fragmentais, taip pat nustatyti riebalų rūgštis, buvo preliminariai identifikuoti 7 triacilgliceroliai, esantys braškių išspaudų SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakto. Visus identifikuotus triacilglicerolius sudarė 3 braškių išspaudų ekstrakto vyraujančios riebalų rūgštys: linolo (L), linoleno (Ln) ir oleino (O). Iš chromatogramos matyti, kad didžiausią plotą, lyginat su kitomis chromatogramos smailėmis, užima smailė 3, kuri buvo identifikuota, kaip dilinolinoleatas (LLLn) ir smailė 4, kuri buvo identifikuota, kaip trilinoleatas. Mažiausią plotą užima smailė 7, kuri buvo identifikuota, kaip trioleatas (OOO) (žr. 20 pav.). Visi identifikuoti triacilgliceroliai nurodyti 8 lentelėje. Informacijos moksliniuose straipsniuose, kuriuose būtų nustatyti braškių išspaudų triacilgliceroliai, nebuvo rasta.





20 pav. UESCh chromatograma, identifikuojant triglicerigų sudėtį braškių išspaudų SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakte

8 lentelė. Trigliceridų sudėtis braškių išspaudų SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakte

Junginio Nr.	Sulaikymo laikas, min	Trigliceridas	Molekulinė masė [M] <sup>+</sup>	MS/MS fragmentai	Santykinisai ploto vnt.
1	1,3	LnLnLn	890	Ln 595	4,91 ± 1,05
2	1,5	LLnLn	892	LLn 597, LnLn 595	34,26 ± 4,76
3	1,7	LLLn	894	LL 599, LLn 597	65,18 ± 5,66
4	1,95	LLL	896	LL599	60,05 ± 6,44
5	2,3	OLL	898	OL 601, LL 599	23,31 ± 2,15
6	2,65	OOL	900	OO 603, OL 601	2,79 ± 0,62
7	3,1	OOO	902	OO 603	0,19 ± 0,05

Pastaba: L – linolo rūgštis, Ln – α–linoleno rūgštis, O – oleino rūgštis

### 3.9. Lakiųjų junginių analizė

#### 3.9.1. Lokieji junginiai braškių išspaudų SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakte

SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakte iš viso buvo identifikuota 76 organiniai lakieji junginiai, kurie sudarė 86,4 % visų ekstrakte esančių lakiųjų junginių. Pagrindiniai braškių išspaudų SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakte identifikuoti lakieji junginiai pateikiami 9 lentelėje. Didžiausią koncentraciją iš visų identifikuotų junginių sudarė laktonai:  $\gamma$ -dekalaktono (8,8 %) ir  $\gamma$ -dodekalaktono (7,4 %). Taip pat nustatyta didelė dalis esterių, rūgščių ir aldehydų: etil heksadekanoatas (8,4 %), metil linoleatas (5,4 %), 2,4-dekadienalis (2,0–4,0 %), 2,4-heptadienalis (2,9–3,5 %), metil linolenatas (3,2 %), heksano (3,0 %) ir heksadekano (1,5 %) rūgštys, 2-heptenalis (2,4 %), metil heksadekanoatas (1,8 %), etil oltadekanoatas (1,1 %) bei alkanai (0,4–4,2 %). Tyrimo rezultatai, patvirtina literatūros apžvalgoje aptartas pagrindines lakiųjų junginių grupes aptinkamas braškėse: laktonai ( $\gamma$ -dekalaktonas ir  $\gamma$ -dodekalaktonas), įvairūs metilo ir etilo esteriai (heksanoatai ir butanoatai) [67, 71, 73]. Taip pat, kaip ir literatūrinėje apžvalgoje minėta, heksano rūgštis yra viena iš pagrindinių rūgščių randamų braškėse [69, 72], ji gana dideliu kiekiu buvo aptikta ir tyrimo metu braškių išspaudų SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakte. Be to SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakte buvo aptikta skvaleno (1,6 %). Skvalenas yra natūralus antioksidantas, kuris plačiai vartojamas farmacijoje, yra naudojamas kaip vaistų nešiklis, detoksikatorius, turi antimikrobinį, anticholesterolinį, antikancerogeninį poveikį. Dažnai naudojamas maisto, farmacijos ir kosmetikos pramonėje, siekiant padidinti produkto biologinę vertę [150]. Taip pat tyrimo metu buvo aptiktas nedidelis kiekis  $\alpha$ -tokoferolio: 0,1 % arba 1,2 mg/kg SM. Braškių išspaudos, lyginat su kitomis uogomis, nepasižymi dideliu tokoferolių kiekiu [79]. Kitų mokslininkų atliktame tyrime, buvo nustatyta, kad braškių išspaudose  $\alpha$ -tokoferolio yra apie 10,23 mg/kg SM [145]. Tokoferoliai yra viena iš vitamino E formų aptinkamų gamtoje, žinomų kaip antioksidantai.  $\gamma$ -Tokoferolio forma yra labiausiai paplitusi augalų ir sėklų aliejuose,  $\alpha$ -tokoferolio augalinėje žaliavoje aptinkama rečiau ir mažesniais kiekiais [80].

**9 lentelė.** Braškių išspaudų SKE–CO<sub>2</sub> ekstrakto esantys lakieji junginiai

Junginys	KI <sub>TYR</sub>	KI <sub>LIT</sub>	Kiekis, %	Aromato apibūdinimas [151,152,153]
Nonanas	900	900	0,6 ± 0,1	–
(2E)–Heptenalis	961	954	2,4 ± 0,2	Migdolų, riebalų ir vaisių
Heksano rūgštis	976	973	3,0 ± 0,2	Rūgštus, aitrus, sūrio
(E,Z)–2,4–Heptadienalis	1004	999	3,5 ± 0,2	Riebalų, aliejaus, augalų
(2E,4E)–Heptadienalis	1014	1007	2,9 ± 0,1	Riebalų, aliejaus, augalų
Benzeno acetaldehidas	1051	1042	0,7 ± 0,1	–
(2E)–Okten–1–alis	1063	1054	0,4 ± 0,0	Kiaulpienių, žolės, prieskonių ir vaisių
Heptano rūgštis	1074	1062	0,4 ± 0,0	Rūgštus, abrikosų ir gėlių
Feniletilo alkoholis	1117	1108	0,4 ± 0,0	Švelnus, rožių ir medaus
Oktano rūgštis	1173	1171	1,0 ± 0,1	Riebalų, aliejaus, žolės ir sūrio
(2E)–Dekenalis	1278	1263	0,5 ± 0,0	Žuvies riebalų ir apelsino
(2E,4Z)–Dekadienalis	1314	1293	2,0 ± 0,2	Kalendros ir aliejaus
(2E,4E)–Dekadienalis	1340	1316	4,0 ± 0,3	Kalendros ir aliejaus
γ–Dekalaktonas	1496	1466	8,8 ± 0,3	Riebalų, vaisių ir persikų
(E)–Etil cinamatas	1498	1467	0,4 ± 0,0	Cinamono, gėlių, medaus ir vaisių
(E)–Nerolidolis	1575	1563	5,2 ± 0,2	Eglių ir pušų
γ–Dodekalaktonas	1709	1677	7,4 ± 0,2	Saldus, kokosų, persikų ir vaisių
Metil heksadekanoatas	1934	1921	1,8 ± 0,1	–
Heksadekano rūgštis	1967	1960	1,5 ± 0,1	Vaško, riebalų
Etil heksadekanoatas	2001	1993	8,4 ± 0,2	Vaško, vaisių, kreminis
Metil linoleatas	2097	2085	5,7 ± 0,8	Riebus, aliejingas, pieno
Metil oleatas	2112	2103	0,4 ± 0,0	Švelnus riebalų
Metil linolenatas	2115	2108	3,2 ± 0,1	Švelnus aliejaus
Fitolis	2125	2114	0,8 ± 0,3	Gėlių
Linolo rūgštis	2140	2133	0,7 ± 0,1	Riebalų ir pieno
Etil linolenatas	2175	2169	0,4 ± 0,0	–
Etil oltadekanoatas	2202	2196	1,1 ± 0,0	Švelnus vaško
Trikosanas	2301	2300	0,7 ± 0,0	Vaško
4,8,12,16–Tetrametilheptadekan–4–olidas	2370	2364	0,5 ± 0,0	–
Pentakosanas	2501	2500	0,6 ± 0,2	–
Heptakosanas	2700	2700	4,2 ± 0,4	–
Oktakosanas	2800	2800	0,4 ± 0,0	–
Skvalenas	2823	2823	1,6 ± 0,4	–
Nonakosanas	2900	2900	3,4 ± 0,5	–
Untriakontanas	3100	3100	2,4 ± 0,4	–
Iš viso identifikuota:			86,4	

Pastaba: KI<sub>TYR</sub> – Kovačo sulaikymo indeksas tyrimo metu

KI<sub>LIT</sub> - Kovačo sulaikymo indeksas nurodytas literatūroje [154]

### 3.9.2. Lakieji junginiai braškių išspaudose

Atlikus neekstrahuotų braškių išspaudų garų fazės lakiųjų junginių analizę, iš viso buvo identifikuota 112 lakiųjų junginių, kurie sudarė 94,9 % visų išspaudose esančių lakiųjų junginių. Pagrindiniai identifikuoti lakieji junginiai pateikti 10 lentelėje. Iš rezultatų matyti, kad braškių

išspaudose, kaip ir šviežiosiose uogose, vyrauja aldehidai, alkoholiai ir ketonai. Didžiausią kiekį sudaro aldehidas heksanalis – 26,8 % visų lakiųjų junginių esančių išspaudose. Alkoholių heksanolio braškių išspaudose aptinkama 13,5 % ir 1,3-pentenolio – 8,3 %, taip pat randama nemažas kiekis aldehidų pentanalis – 5,2 % ir 2-heksenolis – 2,7 %, bei ketono 2-butanol-3-onas – 2,8 %, ir 2-pentil furano – 4,0 % (žr. 10 lentelę). Be to analizės metu buvo aptiktas mezifuranas (0,2 %), kuris yra vienas iš pagrindinių braškių aromatą formuojančių junginių [66].

**10 Lentelė.** Braškių išspaudose esantys lakieji junginiai

Junginys	KI <sub>TYR</sub>	KI <sub>LIT</sub>	Kiekis, %	Aromato apibūdinimas [151,152,153]
Etil acetatas	637	633	0,1 ± 0,0	Aromatingas vynuogių
1-Butanolis	658	668	0,8 ± 0,1	Vaisių
3-Metil-butanalis	677	668	1,8 ± 0,1	Sūrio
1-Penten-3-olis	694	689	8,3 ± 0,1	Sviesto ir augalų
Etil propanoatas	705	716	0,5 ± 0,0	Obuolių, ananasų, romo ir braškių
2-Etil-furanas	706	702	0,7 ± 0,1	Karamelinis, sviesto
Pentanolis	707	706	5,2 ± 0,1	Migdolų, kartus, aitrus, salyklo, aliejaus
2-Butanol-3-onas	720	720	2,8 ± 0,2	Saldus abrikosų ir vaisių
3-Metil-1-butanolis	740	740	0,8 ± 0,1	Degintas kakavos, gėlių ir salyklo
2-Metil-1-butanolis	743	732	0,4 ± 0,0	Žuvies riebalų, salyklo, svogūnų ir vyno
(E)-3-Penten-2-onas	748	735	0,5 ± 0,0	Aštrus, acetono ir vaisių
(2E)-Penten-1-olis	766	754	0,6 ± 0,0	Vaisių, migdolų ir raudonųjų obuolių
Pentanolis	773	771	1,1 ± 0,2	Aitrus vaisių, augalų ir raugo
(Z)-2-Penten-1-olis	776	769	1,1 ± 0,1	Bananų ir augalų
Butano rūgštis	787	772	0,3 ± 0,0	Rūgštus, aitrus, sviesto, sūrio ir vaisių
Oktanas	800	800	0,2 ± 0,0	–
Etil butanoatas	805	804	0,1 ± 0,0	Sultingų, saldus vaisių ir ananasų
Heksanalis	810	801	26,8 ± 3,9	Gaivus obuolių, augalų, riebalų, aliejaus
2,3-Butanediolis	789	782	0,6 ± 0,1	Vaisinis, kreminis ir sviesto
Izovalerinė rūgštis	839	835	0,1 ± 0,0	Aštraus/rūgštaus sūrio
Furfuralis	840	836	0,4 ± 0,0	Migdolų, keptų bulvių ir duonos
Etil –metilbutanoatas	850	850	0,1 ± 0,0	Žaliųjų obuolių, kivių ir braškių
2-Metil-butano rūgštis	852	841	0,4 ± 0,1	Sviesto ir sūrio
Etil izovaleratas	856	858	0,1 ± 0,0	Rūgštus obuolių, vaisių ir ananasų
(2E)-Heksanalis	860	855	2,7 ± 0,2	Šviežių žalių vaisių, prieskoninių žolelių
1-Heksanolis	876	870	13,5 ± 1,3	Bananų, gėlių, žolės ir žolelių
Izopentil acetatas	881	876	0,1 ± 0,0	Obuolių, bananų ir kriaušių
2-Metil butil acetatas	882	881	0,1 ± 0,0	Prinokusių ir saldžių vaisių
Pentano rūgštis	887	884	0,3 ± 0,0	Aitrus sūrio
2-Heptanonas	899	892	1,0 ± 0,1	Sūrio, vaisių, riešutų ir prieskonių
Nonanas	900	900	0,2 ± 0,0	–
1,3,5,7-Ciklooktatetraenas	907	894	3,1 ± 0,3	–
(4Z)-Heptenolis	911	895	0,1 ± 0,0	Aliejaus, riebalų, augalų, kreminis
Heptanolis	912	902	1,1 ± 0,1	Citrusinių vaisių, augalų ir riešutų
Amil acetatas	918	914	0,1 ± 0,0	Bananų, kriaušių ir obuolių
Metil heksanoatas	930	927	0,4 ± 0,0	Šviežių vaisių ir ananasų
γ-Butirolaktonas	936	935	0,1 ± 0,0	Karamelės, sūrio ir skrudintų riešutų

(2E)–Heptenalis	959	954	0,1 ± 0,0	Migdolų, riebalų ir vaisių
2–Metil–nonanas	963	962	0,2 ± 0,0	–
(2E)–Heptenalis	965	954	0,4 ± 0,0	Migdolų, riebalų ir vaisių
Benzaldehidas	966	960	0,2 ± 0,0	Migdolų, deginto cukraus, vyšnių, skrudintų pipirų
1–Heptanolis	972	966	0,1 ± 0,0	Žolelių
Heksano rūgštis	976	973	1,3 ± 0,2	Aitrus/ rūgštus sūrio ir aliejaus
1–Octen–3–olis	984	979	1,3 ± 0,1	Agurkų, riebalų, gėlių ir grybų
6–Metil–5–hepten–2–onas	994	985	1,5 ± 0,1	Citrusinių vaisių, grybų, pipirų ir braškių
2–Pentil furanas	998	988	4,0 ± 0,4	Sviesto, gėlių, vaisių ir pupelių
2–Octanonas	999	991	0,1 ± 0,0	Aromatingas riebalų ir pelėsių
Dekanas	1000	1000	0,3 ± 0,0	–
Etil heksanoatas	1003	998	1,3 ± 0,2	Obuolių žievelių, brendžio, prinokusių vaisių
1–Octenalis	1006	998	0,2 ± 0,0	Citrusinių vaisių žievelių ir riebalų
(E,Z)–2,4–Heptadienalis	1008	999	0,3 ± 0,1	Riebalų, aliejaus ir augalų
(E)–2–(2–Pentenil) furanas	1013	1005	0,1 ± 0,0	–
Heksil acetatas	1017	1007	0,1 ± 0,0	Obuolių, bananų, žolės, kriaušių ir žolelių
(2E,4E)–Heptadienalis	1019	1009	1,7 ± 0,1	Riebalų, aliejaus, augalų
1,2,4–Trimetil benzenas	1033	1025	0,1 ± 0,0	–
Limonenas	1035	1029	0,1 ± 0,0	Saldus citrusinių vaisių
(3E)–Octen–2–onas	1040	1035	0,1 ± 0,0	Silpnas augalų, riešutų ir rožių
3,4–Dimetil–2,5–furanionas	1047	1038	0,2 ± 0,0	–
(2E)–Octen–1–al	1062	1054	0,1 ± 0,0	Kiaulpienių, riebalų, vaisių, žolės ir prieskonių
Mezifuranas	1065	1057	0,2 ± 0,0	Duonos plutos, sviesto, karamelės, gėlių ir vaisių
γ–Heksalaktonas	1077	1063	0,1 ± 0,0	Saldus ir kreminis žolelių
Z–Linalolio oksidas	1083	1072	0,1 ± 0,0	Saldus gėlių
(E,E)–3,5–Octadien–2–onas	1084	1072	0,8 ± 0,1	Vaisių ir žolės
Undekanas	1103	1100	0,1 ± 0,0	–
Linalolis	1109	1096	0,1 ± 0,0	Kalendros, gėlių, levandų, citrinų ir rožių
Nonanalis	1115	1100	0,3 ± 0,0	Riebalų, gėlių, augalų ir citrinų
Metil oktanoatas	1130	1127	0,1 ± 0,0	Vaisių, apelsinų, vaško ir vyno
(2Z)–Nonen–1–alis	1155	1149	0,1 ± 0,0	Saldus, riebalų, citrusinių vaisių ir meliono
Dodekanas	1199	1200	0,1 ± 0,0	–
Etil oktanoatas	1201	1204	0,1 ± 0,0	Abrikosų, brendžio, riebalų, gėlių ir ananasų
(2E,4E)–Nonadienalis	1216	1212	0,1 ± 0,0	Grūdų, riebalų, arbūzų, drėgnos vilnos
(2E)–Dekenalis	1267	1263	0,1 ± 0,0	Riebalų, žuvies ir apelsinų
(2E,4Z)–Dekadienalis	1302	1293	0,1 ± 0,0	Kalendros, riebalų ir aliejaus
(2E,4E)–Dekadienalis	1321	1316	0,2 ± 0,0	Kalendros, riebalų ir aliejaus
γ–Nonalaktonas	1367	1361	0,1 ± 0,0	Saldus, kreminis, kokosų, riebalų ir aliejaus
(2E)–Undekenalis	1370	1360	0,2 ± 0,0	Skrudintos vištienos/ mėsos ir mango
(E)–β–Farnesenas	1459	1456	0,1 ± 0,0	Žaliųjų obuolių
γ–Dekalaktonas	1495	1466	0,3 ± 0,0	Riebalų, vaisių ir persikų
E–Nerolidolis	1574	1563	0,1 ± 0,0	Eglių ir pušų
γ–Dodecalactone	1709	1677	0,1 ± 0,0	Saldus, kokosų, persikų ir vaisių
Iš viso identifikuota:			94,9	

Pastaba: KI<sub>TYR</sub> – Kovačo sulaikymo indeksas tyrimo metu

KI<sub>LIT</sub> - Kovačo sulaikymo indeksas nurodytas literatūroje [154]

## IŠVADOS

1. Įvertinus braškių išspaudų cheminę sudėtį, nustatyta, kad drėgmės kiekis braškių išspaudose – 5,60 %, riebalų – 12,03 %, baltymų – 13,27 %, skaidulinių medžiagų – 32,5 % ir mineralinių medžiagų – 5,33 %.
2. Nustatytos superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos optimalios sąlygos: 36 MPa slėgis, 68 °C temperatūra ir 154 dinaminis ekstrakcijos laikas.
3. Efektyviausia ekstrakcija iš braškių išspaudų yra daugiapakopė padidintu slėgiu, ekstrahuojant etanoliu po superkritinės ekstrakcijos gautą išspaudų kietąją fazę, gauta ekstrakto išėiga – 33,85 g/100 g išspaudų. Mažiausiai ekstrakto gauta daugiapakopės ekstrakcijos metu, kai buvo purtant maceruojama su vandeniu išspaudų liekana, gautą po daugiapakopės ekstrakcijos padidintu slėgiu, gauta išėiga – 5,96 g/100 g išspaudų.
4. Geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo ekstraktai gauti ekstrakcijos padidintame slėgyje būdu, radikalų surišimas, nepriklausomai nuo naudojamo tirpiklio, buvo 65,28–391,95 mg TE/g ekstrakto. Mažiausiu antioksidantiškumu pasižymėjo vandeninis maceracijos purtant būdu gautas ekstraktas (radikalų surišimas: 28,29–148,49 mg TE/g ekstrakto). Didžiausiu bendru fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo daugiapakope padidinto slėgio ekstrakcija su etanoliu išgautas ekstraktas (62,09 mg GRE/g ekstrakto), o mažiausiu – ekstraktas išgautas padidintame slėgyje, ekstrahuojant etanoliu (21,51 mg GRE/g ekstrakto).
5. Antioksidantų aktyvumas išspaudų liekanose po ekstrakcijų buvo mažesnis 1–2,4 kartus nei ekstraktuose. Išspaudos po ekstrakcijos padidintu slėgiu su etanoliu pasižymėjo didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu – 127,14 mg TE/g SM, o mažiausiu – išspaudos po maceracijos vandeniu (46,71 mg TE/g SM). Bendras fenolinių junginių kiekis išspaudose buvo 3–20 kartus mažesnis nei ekstraktuose. Daugiausiai fenolinių junginių liko superkritinės ekstrakcijos metu išgautuose ekstraktuose – 14,24 mg GRE/g SM, o mažiausiai – po daugiapakopės ekstrakcijos maceravimo būdu purtant su vandeniu (2,75 mg GRE/g SM). Išspaudose prieš ekstrakcijas bendras fenolinių junginių kiekis – 18,78 mg GRE/g SM, antioksidacinis aktyvumas – 205,75 mg TE/g SM.
6. Pagrindiniai fenoliniai junginiai braškių išspaudų ekstraktuose yra antocianinai. Pagrindinis antocianinas: pelargonidin 3-gliukozidas (9,93–112,69 mg/100 g SM). Taip pat braškių išspaudų ekstraktuose aptinkamas nemažas kiekis elago rūgšties (0,56–72,46 mg/100 g SM), kvercetin 3-gliukuronido (1,34–43,68 mg/100 g SM) ir tilirozido (0,10–35,11 mg/100 g SM). Daugiausiai fenolinių junginių aptikta po daugiapakopės ekstrakcijos padidintame slėgyje su etanoliu gautuose ekstraktuose, o mažiausias kiekis – po daugiapakopės ekstrakcijos maceruojant išspaudas vandeniu, ekstraktuose. Dilinolinoleatas yra pagrindinis triacilglicerolis, randamas nepoliniame ekstrakto po superkritinės su CO<sub>2</sub> ekstrakcijos .
7. Ekstrakte po superkritinės ekstrakcijos su CO<sub>2</sub> labiausiai vyravo polinesočiosios riebalų rūgštys. Linolo riebalų rūgštis yra pagrindinė aptinkama šiame ekstrakto .
8. Nepoliniame ekstrakto po superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos buvo identifikuoti 76 lakiieji junginiai, kurie sudarė 86,4 % visų lakiųjų junginių identifikuotų ekstrakto, pagrindiniai junginiai, nulemiantys braškių išspaudų ekstrakto aromatą:  $\gamma$ -dekalaktonas, etil heksadekanoatas,  $\gamma$ -dodekalaktonas ir metil linoleatas.
9. Braškių išspaudose buvo identifikuoti 112 lakiųjų junginių, kurie sudarė 94,9 % visų lakiųjų junginių esančių išspaudose. Pagrindiniai junginiai nusakantys išspaudų aromatą: heksanalis, 1-heksanolis ir 1-penten-3-olis.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. WANG, J ir kt. Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: Profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity and microstructure. *Food Control*, 2019, vol 96, 128–136 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.007>
2. BASU, A ir kt. Strawberry As a Functional Food: An Evidence-Based Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, vol 54, issue 6, 790–806 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.608174>
3. GIAMPIERI, F ir kt. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food Funct.*, 2015, 6, 1386–1398 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/C5FO00147A>
4. LOWE, E. D ir BUCKMASTER, D. R. Dewatering makes big difference in compost strategies. *Biocycle*, 1995, vol 36, 78–82
5. BANERJEE, J ir kt. Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry*, 2017, vol 225, 10–22 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093>
6. MINJARES-FUENTES, R ir kt. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. *Carbohydrate Polymers*, 2014, vol 106, 179–189 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.013>
7. LISICHKOV, K ir kt. Isolation of Tomato Seed Oil From Tomato Waste by Application of Supercritical Fluid CO<sub>2</sub> Extraction. *Quality of Life (Banja Luka)*, 2011, 2 (1–2), 5–12 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.7251/QOL1101005L>
8. USELIS, Nobertas. *Intensyvios uoginių augalų auginimo technologijos*. Baltai: Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės institutas, 2002. ISBN 9986–828–17–1.
9. SCHWIETERMAN, M. L. ir kt. Strawberry Flavor: Diverse Chemical Compositions, a Seasonal Influence, and Effects on Sensory Perception. *PLoS One*, 2017, 9(2) [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088446>
10. SKROVANKOVA, S ir kt. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16(10) [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
11. FAOSTAT Database, [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
12. Lietuvos statistikos departamentas. Duomenų bazė [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://osp.stat.gov.lt>
13. KRYŽEVIČIŪTĖ, N ir kt. Optimization of high pressure extraction processes for the separation of raspberry pomace into lipophilic and hydrophilic fractions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2016, vol 108, 61–68 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.10.025>
14. OSZMIANSKI, J ir WOJDYŁO, A. A Comparative study of phenolic content and antioxidant activity of strawberry puree, clear, and cloudy juices. *European Food Research and Technology*, 228(4), 623–631 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0971-2>
15. KLOPOTEK, Y ir kt. Processing Strawberries to Different Products Alters Contents of Vitamin C, Total Phenolics, Total Anthocyanins, and Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 5640–5646 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf047947v>

16. RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G ir kt. Thermally-treated strawberry extrudate: A rich source of antioxidant phenols and sugars. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2019, vol 51, 186–193 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.05.017>
17. YANG, B ir kt. Composition and antioxidative activities of supercritical CO<sub>2</sub>-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Research International*, 2011, vol 44, issue 7, 2009–2017 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.025>
18. SÓJKA, M ir kt. Nutrient and polyphenolic composition of industrial strawberry press cake. *European Food Research and Technology*, 2013, vol 237, Issue 6, 995–1007 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2070-2>
19. AABY, K ir kt. Phenolic Composition and Antioxidant Activities in Flesh and Achenes of Strawberries (*Fragaria ananassa*). *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4032–4040 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf048001o>
20. ŠAPONJAC, V. T ir kt. Chemical composition and potential bioactivity of strawberry pomace. *RSC Adv.*, 2015, 5, 5397–5405 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/C4RA14296A>
21. GORNAS, P ir kt. 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*, 2016, vol 65, 946–953 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.029>
22. KORUS, J ir kt. Defatted strawberry and blackcurrant seeds as functional ingredients of gluten-free bread. *Journal of Texture Studies*, 2011, volume 43, Issue 1, 29–39 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2011.00314.x>
23. WIJNGAARD, H ir kt. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, 2012, volume 46, Issue 2, 505–513 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.027>
24. LAROZE, L. E ir kt. Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. *European Food Research and Technology*, 2011, vol 231, issue 5, 669–677 513 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1320-9>
25. GALANAKIS, Ch. M. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, vol 26, issue 2, 68–87 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>
26. SKUPIEŃ, K ir OSZMIAŃSKI, J. Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *European Food Research and Technology*, 2004, vol 219, issue 1, 66–70 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0918-1>
27. GÜNDÜZ, K ir ÖZDEMİR, E. The effects of genotype and growing conditions on antioxidant capacity, phenolic compounds, organic acid and individual sugars of strawberry. *Food Chemistry*, 2014, vol 155, 298–303, [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.064>
28. HAKALA, M ir kt. Effects of varieties and cultivation conditions on the composition of strawberries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2003, vol 16, issue 1, 67–80 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(02\)00165-5](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(02)00165-5)



29. SKROVANKOVA, S ir kt. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16(10), 24673–24706 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
30. PINTO, M da S ir kt. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 2008, volume 107, Issue 4, 1629–1635 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.038>
31. US Department of Agriculture [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: [www.ndb.nal.usda.gov](http://www.ndb.nal.usda.gov)
32. ROSANA, B ir kt. Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 2581–2586 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf011421i>
33. JOUQUAND, C ir kt. A Sensory and Chemical Analysis of Fresh Strawberries Over Harvest Dates and Seasons Reveals Factors That Affect Eating Quality. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2008, vol 133, issue 6, 859–867 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.21273/JASHS.133.6.859>
34. WANG, S. Y ir kt. Cultural System Affects Fruit Quality and Antioxidant Capacity in Strawberries. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 6534–6542 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf020614i>
35. MIKULIC-PETKOVSEK, M ir kt. Composition of Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species. *Journal of Food Science*, 2012, volume 77, issue 10 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02896.x>
36. SKUPIEŃ, K ir OSZMIANŃSKI, J. Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *European Food Research and Technology*, 2004, vol 219, issue 1, 66–70 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0918-1>
37. PETKOVSEK, M. M ir kt. The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2-year period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, volume 90, issue 14, 2366–2378 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/jsfa.4093>
38. ORNELAS–PAZ, J de J ir kt. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry*, 2013, vol 138, issue 1, 372–381 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.006>
39. SAPEI, L ir HWA, L. Study on the Kinetics of Vitamin C Degradation in Fresh Strawberry Juices. *Procedia Chemistry*, volume 9, 2014, 62–68 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.05.008>
40. KALT, W ir kt. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 11, 4638–4644 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf990266t>
41. BALASUNDRAM, N ir kt. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 2006, vol 99, issue 1, 191–203 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
42. AABY, K ir kt. Polyphenol Composition and Antioxidant Activity in Strawberry Purees; Impact of Achene Level and Storage. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 5156–5166 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf070467u>

43. SIMIRGIOTIS, M. J ir kt. Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD–ESI-MS and free radical quenching techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, vol 23, issue, 545–553 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.020>
44. VRHOVSEK, U ir kt. Clarifying the Identity of the Main Ellagitannin in the Fruit of the Strawberry, *Fragaria vesca* and *Fragaria ananassa* Duch. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, 2507–2516 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf2052256>
45. OGAWA, K ir kt. Anthocyanin Composition and Antioxidant Activity of the Crowberry (*Empetrum nigrum*) and Other Berries. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, Vol. 56, No. 12, 4457–4462 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf800406v>
46. GÜNDÜZ, K ir ÖZDEMİR, E. The effects of genotype and growing conditions on antioxidant capacity, phenolic compounds, organic acid and individual sugars of strawberry. *Food Chemistry*, 2014, vol 155, 298–303 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.064>
47. BUENDÍ'A, B ir kt. HPLC-MS Analysis of Proanthocyanidin Oligomers and Other Phenolics in 15 Strawberry Cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 3916–3926 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf9030597>
48. GARCIA–VIGUERA, C, ZAFRILLA, P ir BARBERAN, F. A. T. The use of Acetone as an Extraction Solvent for Anthocyanins from Strawberry Fruit. *Phytochem. Anal.*, 1998, 9, 274–277 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199811/12\)9:6<274::AID-PCA416>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199811/12)9:6<274::AID-PCA416>3.0.CO;2-G)
49. LOPES da SILVA, F ir kt. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology*, 2007, vol 40, issue 2, 374–382 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>
50. CERESO, A. B ir kt. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chemistry*, 2010, vol 123, issue 3, 574–582 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.073>
51. LOPES da SILVA, F ir kt. Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *European Food Research and Technology*, 2002, vol 214, issue 3, 248–253 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0434-5>
52. KAHKONEN, M. P ir kt. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 4076–4082 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf010152t>
53. BUENDÍ'A, B ir kt. HPLC-MS Analysis of Proanthocyanidin Oligomers and Other Phenolics in 15 Strawberry Cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 3916–3926 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf9030597>
54. GU, L ir kt. Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 7513–7521 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf034815d>
55. BEECHER, G. R ir kt. Proanthocyanidins: Biological Activities Associated with Human Health. *Pharmaceutical Biology*, 2004, vol 42, 2–20 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3109/13880200490893474>

56. AABY, K ir kt. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry*, 2012, vol 132, issue 1, 86–97 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.037>
57. AABY, K ir kt. Polyphenol Composition and Antioxidant Activity in Strawberry Purees; Impact of Achene Level and Storage. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 5156–5166 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf070467u>
58. BAI, R ir kt. A semisynthetic approach for the simultaneous reaction of grape seed polymeric procyanidins with catechin and epicatechin to obtain oligomeric procyanidins in large scale. *Food Chemistry*, 2019, volume 278, 609–616 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.091>
59. WEBER, N ir kt. Alternative products against anthracnose affect selected primary and secondary metabolites in strawberry fruit. *Fruits*, 2016, vol. 71(6), 363–371 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1051/fruits/2016028>
60. MÄÄTTÄ-RIIHINEN, K. R ir kt. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae). *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 20, 6178–6187 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf049450r>
61. HAKKINEN, S. H. Ir kt. Content of the Flavonols Quercetin, Myricetin, and Kaempferol in 25 Edible Berries. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 2274–2279 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf9811065>
62. CORDENUNSI, B. R ir kt. Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 2581–2586 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf011421i>
63. TOMÁS-BARBERÁN, F. A. ir kt. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, volume 80, issue 7, 1024–1032 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1024::AID-JSFA567>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1024::AID-JSFA567>3.0.CO;2-S)
64. HÄKKINEN, S. H ir kt. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 2000, volume 33, issue 6, 517–524 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00086-7)
65. HÄKKINEN, S. Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products. Doctoral dissertation, Kuopio University, Finland, Publications D. Medical Sciences 221, 2000, 90 p
66. ULRICH, D ir kt. Analysis of strawberry flavour – discrimination of aroma types by quantification of volatile compounds. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 1997, 205, 218–223
67. JETTI, R. R ir kt. Quantification of Selected Aroma-Active Compounds in Strawberries by Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography and Correlation with Sensory Descriptive Analysis. *Journal of Food Science*, 2007, volume 72, issue 7, 487–496 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00445.x>
68. KARLUND, A ir kt. Nontargeted Metabolite Profiles and Sensory Properties of Strawberry Cultivars Grown both Organically and Conventionally. *J. Agric. Food Chem.*, 2015, 63, 1010–1019 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf505183j>
69. MENAGER, I ir kt. Changes in Physicochemical Characteristics and Volatile Constituents of Strawberry (Cv. Cigaline) during Maturation. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 1248–125 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf0350919>

70. SIGMA–ALDRICH. 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w317403?lang=en&region=LT>
71. JOUQUAND, C ir kt. A Sensory and Chemical Analysis of Fresh Strawberries Over Harvest Dates and Seasons Reveals Factors That Affect Eating Quality. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2008, vol 133, issue 6, 859–867 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.21273/JASHS.133.6.859>
72. ULRICH, D ir kt. Diversity of aroma patterns in wild and cultivated *Fragaria* accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2007, 54:1185 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s10722-006-9009-4>
73. DOUILLARD, C ir kt. Comparison by multidimensional analysis of concentrations of volatile compounds in fourteen frozen strawberry varieties (aroma, furaneol, mesifurane). *AGRIS*, 1989, vol 9, issue 1, 53–73 [žiūrēta 2019-05-29]. Prieiga per: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR8904037>
74. DIRINCK, P. J ir kt. Flavor quality of cultivated strawberries: the role of the sulfur compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1981, 29, 2, 316–321 [žiūrēta 2019-05-29]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf00104a024>
75. ZABETAKIS, I ir GRAMSHAW, J. W. 1,2-Propanediol in strawberries and its role as a flavour precursor. *Food Chemistry*, 1998, volume 61, issue 3, 351–354 [žiūrēta 2019-05-29]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00061-7)
76. OSZMIANŃSKI, J ir WOJDYŁO, A. Comparative study of phenolic content and antioxidant activity of strawberry puree, clear, and cloudy juices. *European Food Research and Technology*, 2009, vol 228, issue 4, 623–631 [žiūrēta 2019-05-29]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0971-2>
77. OSZMIANŃSKI, J. In polyphenols compounds changes in the industrial production process of concentrated strawberry juice. *AGRIS*, 2008, vol 14, issue 1, 94–104 [žiūrēta 2019-05-29]. Prieiga per: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PL2008000988>
78. JOHANSSON, A ir kt. Characterization of seed oils of wild, edible Finnish berries. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 1997, 204, 300–307 [žiūrēta 2019-05-29]. Prieiga per: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs002170050081.pdf>
79. YANG, B ir kt. Composition and antioxidative activities of supercritical CO<sub>2</sub>-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Research International*, 2011, vol 44, issue 7, 2009–2017 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.025>
80. JIANG, Q ir kt.  $\gamma$ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, volume 74, Issue 6, 714–722 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.6.714>
81. GIAMPIERI D. Sc., F ir kt. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 2012, vol 28, issue, 9–19 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>
82. LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 1988, vol 27, issue 4, 969–978 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80254-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80254-1)
83. GEMMA, C., J. VILA, A. BACHSTETTER, P. C. BICKFORD. Oxidative stress and the Aging Brain: from theory to prevention. *Aging Brain: Models, Methods, and Mechanisms. Frontiers in Neuroscience*, 2007, vol. 15, 355–373
84. AABY, K ir kt. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total

- antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.*, 2007, 55, 11, 4395–406 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf0702592>
85. OMAYE, S. T ir ZHANG P. Phytochemical interactions:  $\beta$ -carotene, tocopherol and ascorbic acid. *Phytochemicals*, 1998, 53–75
86. SUN, J ir kt. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 7449–7454 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf0207530>
87. WOLFE, K. L ir kt. Cellular antioxidant activity of common fruits. *J Agric Food Chem.*, 2008, 56, 18, 8418–8426 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf801381y>
88. PROTEGGENTE, A. R ir kt. The Antioxidant Activity of Regularly Consumed Fruit and Vegetables Reflects their Phenolic and Vitamin C Composition. *Free Radical Research*, 2002, vol 26, issue 2, 217–233 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/10715760290006484>
89. GUO, Ch ir kt. High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Coulometric Array Detection of Electroactive Components in Fruits and Vegetables: Relationship to Oxygen Radical Absorbance Capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, 1787–1796 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf960786d>
90. OLSSON, M. E ir kt. Antioxidants, Low Molecular Weight Carbohydrates, and Total Antioxidant Capacity in Strawberries (*Fragaria*  $\times$  *ananassa*): Effects of Cultivar, Ripening, and Storage. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 2490–2498 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf030461e>
91. WANG, S. Y ir LIN H. S. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 140–146 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf9908345>
92. ODRIOZOLA-SERRANO, I ir kt. Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *European Food Research and Technology*, 2008, 228–239 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0928-5>
93. GIAMPIERI, F ir kt. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food Funct.*, 2015, 6, 1386–1398 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/C5FO00147A>
94. PARELMAN, M. A r kt. Dietary strawberry powder reduces blood glucose concentrations in obese and lean C57BL/6 mice, and selectively lowers plasma C-reactive protein in lean mice. *Br J Nutr.*, 2012, 108, 10, 1789–1799 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1017/S0007114512000037>
95. ALARCÓN, M ir kt. Strawberry extract presents antiplatelet activity by inhibition of inflammatory mediator of atherosclerosis (sP-selectin, sCD40L, RANTES, and IL-1 $\beta$ ) and thrombus formation. *Platelets.*, 2015, 26, 3, 224–229. [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3109/09537104.2014.898747>
96. PUUPPONEN-PIMIÄ, R ir kt. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol.*, 2001, 90, 4, 494–507
97. PUUPPONEN-PIMIÄ, R ir kt. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, volume 98, issue 4, 991–1000 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02547.x>

98. CASSIDY, A ir kt. Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *Am J Clin Nutr.*, 2011, 93, 2, 338–347 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.006783>
99. MINK, P. J. Ir kt. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.*, 2007, 85, 3, 895–909 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.3.895>
100. SESSO, H. D ir kt. Strawberry Intake, Lipids, C-Reactive Protein, and the Risk of Cardiovascular Disease in Women. *Journal of the American College of Nutrition*, 2006, vol 26, issue 4, 303–310 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/07315724.2007.10719615>
101. CASSIDY, A ir kt. High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women. *Circulation.*, 2013, 127, 2, 188–196 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.122408>
102. BASU, A ir kt. Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutrition Journal*, 2009, 8:43 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1186/1475-2891-8-43>
103. PRIOR, R. L ir kt. Whole Berries versus Berry Anthocyanins: Interactions with Dietary Fat Levels in the C57BL/6J Mouse Model of Obesity. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 3647–3653 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf071993o>
104. CLIFFORD, M. N ir SCALBERT, A. Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, volume 80, issue 7, 1118–1125 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1118::AID-JSFA570>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1118::AID-JSFA570>3.0.CO;2-9)
105. HARTTIG, U ir kt. Organ specific, protocol dependent modulation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene carcinogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary ellagic acid. *Carcinogenesis*, 1996, 17(11), 2403–2409 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1093/carcin/17.11.2403>
106. SEERAM, N. P ir kt. Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 9329–9339 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf061750g>
107. ZHANG, Y ir kt. Isolation and Identification of Strawberry Phenolics with Antioxidant and Human Cancer Cell Antiproliferative Properties. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 670–675 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf061750g>
108. FREEDMAN, N. D ir kt. Fruit and vegetable intake and esophageal cancer in a large prospective cohort study. *Int J Cancer*. 2007, 121, 12: 2753–60 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/ijc.22993>
109. CHEN, T ir kt. Randomized phase II trial of lyophilized strawberries in patients with dysplastic precancerous lesions of the esophagus. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012, 5(1), 41–50 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0469>
110. BALANSKY, R ir kt. Inhibition of lung tumor development by berry extracts in mice exposed to cigarette smoke. *Int J Cancer.*, 2012, 131, 9, 1991–1997 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/ijc.27486>.
111. HALLIWELL, B ir kt. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *The American Journal of Clinical*

- Nutrition*, 2005, volume 81, issue 1, 268–276 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.268S>
- 112.SKROVANKOVA, S ir kt. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16(10), 24673–24706 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- 113.OROIAN, M ir ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 2015, volume 74, 10–36 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>
- 114.PANJA, P ir kt. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, 2018, vol 23, 73–82. [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>
- 115.GALANAKIS, Ch. M. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, volume 26, issue 2, 2012, 68–87 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>
- 116.KOSMALA, M ir kt. Chemical composition of polyphenols extracted from strawberry pomace and their effect on physiological properties of diets supplemented with different types of dietary fibre in rats. *Eur J Nutr.*, 2014, 53(2), 521–532 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0557-z>
- 117.CHEW, K. K ir kt. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 2011, vol 18, iss 4, 1427–1435
- 118.STRATI, I. F ir kt. Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, volume 46, issue 1, 23–29 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02496.x>
- 119.DO, Q. D ir kt. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2014, vol, iss 3, 296–302 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- 120.AZMIR, J ir kt. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 2013, vol 117, iss 4, 426–436 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- 121.WANG, L ir WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, vol 17, iss 6, 300–312 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- 122.LUQUE DE CASTRO, M. D ir kt. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 2010, Vol 1217, Issue 16, 2383–2389 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>
- 123.RENARD, C. M. G. C ir kt. Extraction of bioactives from fruit and vegetables: State of the art and perspectives. *LWT*, 2018, vol 93, p. 390-395 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.063>
- 124.ZAINAL-ABIDIN, M. H ir kt. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2017, vol 979, 1–23 [žiūrēta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.012>

- 125.ALEXANDRE, A. M. R. C ir kt. High-pressure CO<sub>2</sub> assisted extraction as a tool to increase phenolic content of strawberry-tree (*Arbutus unedo*) extracts. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 2018, vol 27, 73–80 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.07.002>
- 126.AMEER, K. ir kt. (2017). Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2017, vol 16, issue 2, 295–315 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>
- 127.PAES, J ir kt. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized liquids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2014, vol 95, 8–18 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.025>
- 128.SANTOS, D. T ir kt. Extraction, micronization and stabilization of functional pigments: construction of multipurpose unit for pressurized fluid process development. Disertacija, 2011. Estadual de Campinas universitetas, Brazilija
- 129.GANDHI, K. ir kt. Industrial applications of supercritical fluid extraction: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 5(3), 2018, 336–340
- 130.SHILPI, A ir kt. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Compounds with Antioxidant Activity from Fruits and Vegetables Waste -A Review. *FMFI*, 2013, volume, 2 issue 1, 43–62
- 131.RAVENTÓS, M. ir kt. Application and Possibilities of Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction in Food Processing Industry: An Overview. *Food Science and Technology International*, 2002, vol 8, issue 5, 269–284 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1106/108201302029451>
- 132.DÍAZ-REINOSO, B ir kt. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (7), 2006, 2441–2469 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf052858j>
- 133.REÁTEGUI, J. L. P ir kt. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus sp.*) bagasse using supercritical CO<sub>2</sub> assisted by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2014, vol 94, 223–233 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.019>
- 134.RIERA, E ir kt. Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2004, vol 11, iss 3–4, 241–244 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.01.019>
- 135.WIJNGAARD, H ir kt. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, 2012, vol 46, iss 2, 505–513 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.027>
- 136.SEABRA, I. J ir kt. Effect of solvent (CO<sub>2</sub>/ethanol/H<sub>2</sub>O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2010, vol 54, iss 2, 145–152 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.05.001>
- 137.CORRALES, M ir kt. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008, vol 9, iss 1, 85–91 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.06.002>
- 138.BOUSSETTA, N ir kt. Electrically Assisted Extraction of Soluble Matter from Chardonnay Grape Skins for Polyphenol Recovery, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 4, 1491–1497 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf802579x>



139. HELRICH, Kenneth. *Official Methods of Analysis*, 15 leidimas. The Association of Official Analytical Chemists, inc., Arlington, Virginia, JAV, 1990. ISBN 0-935584-42-0
140. SINGLETON, V. L ir kt. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, volume 299, 152–178 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
141. PRIOR, R. L ir kt. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem.*, 2003, 51 (11), 3273–3279 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf0262256>
142. RE, R ir kt. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, vol 26, iss 9–10, 1231–1237 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
143. BRAND–WILLIAMS, W ir kt. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 1995, vol 28, iss 1, 25–30 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
144. MILINSK, M. C ir kt. Comparative analysis of eight esterification methods in the quantitative determination of vegetable oil fatty acid methyl esters (FAME). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2008, vol 19, no 8, 1475–1483 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532008000800006>
145. PIESZKA, M ir kt. Valuable Components of Dried Pomaces of Chokeberry, Black Currant, Strawberry, Apple and Carrot as a Source of Natural Antioxidants and Nutraceuticals in the Animal Diet. *Ann. Anim. Sci.*, 2015, vol. 15, No. 2, 475–491 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.2478/aoas-2014-0072>
146. PIESZKA, M ir kt. The effect of dietary supplementation with dried fruit and vegetable pomaces on production parameters and meat quality in fattening pigs. *Meat Science*, 2017, vol 126, 1–10 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.11.016>
147. JAROSLAWSKA, J ir kt. Polyphenol-Rich Strawberry Pomace Reduces Serum and Liver Lipids and Alters Gastrointestinal Metabolite Formation in Fructose-Fed Rats. *American Society for Nutrition*, 2011, 1777–1783 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi:10.3945/jn.111.143677>
148. VULIĆ, J.J ir kt. Polyphenolic content and antioxidant activity of the four berry fruits pomace extracts. *APTEFF*, 42, 271–279 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.2298/APT1142271V>
149. ZEB, A ir MURKOVIC, M. Analysis of triacylglycerols in refined edible oils by isocratic HPLC-ESI-MS. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2010, volume 112, issue 8, 844–851 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000064>
150. RAMESHKUMAR, R ir kt. Production of squalene with promising antioxidant properties in callus cultures of *Nilgiranthus ciliatus*. *Industrial Crops and Products*, 2018, volume 126, 357–367 [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.031>
151. PUBCHEM, duomenų bazė [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
152. THE GOOD SCENTS COMPANY INFORMATION SYSTEM, duomenų bazė [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <http://www.thegoodscentscompany.com/>
153. CHEMSPIDER, duomenų bazė [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per: <http://www.chemspider.com/>

154.NIST CHEMISTRY WEBBOOK, duomenų bazė [žiūrėta 2019-05-28]. Prieiga per:  
<https://webbook.nist.gov/>

## PRIEDAI

### 1 Mokslinė konferencija

Tyrimų rezultatai pristatyti FOODBALT 2019 13th Baltic Conference on Food Science and Technology „FOOD. NUTRITION. WELL-BEING“, pranešimo pavadinimas: „Valorisation of strawberry (*Fragaria × ananassa*) pomabe using different extraction techniques“. 2019, Jalgava, Latvija, ISBN 978-9984-48-317-7, p. 68.