



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

***Lactobacillus plantarum* bakterijų ir šaltalankių (*Hippophae rhamnoides*) CO<sub>2</sub> ekstrakto įkapsuliavimas į alginato kapsules**

Baigiamasis magistro studijų projektas

---

**Greta Šlimaitė**

Projekto autorė

**doc. Aušra Šipailienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

***Lactobacillus plantarum* bakterijų ir šaltalankių (*Hippophae rhamnoides*) CO<sub>2</sub> ekstrakto įkapsuliavimas į alginato kapsules**

Baigiamasis magistro studijų projektas

Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

---

**Greta Šlimaitė**

Projekto autorė

**doc. Aušra Šipailienė**

Vadovė

**lekt. Viktorija Eisinaitė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės Technologijos Fakultetas

Greta Šlimaitė

## ***Lactobacillus plantarum* bakterijų ir šaltalankių (*Hippophae rhamnoides*) CO<sub>2</sub> ekstrakto įkapsuliavimas į alginato kapsules**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Gretos Šlimaitės, baigiamasis projektas tema „*Lactobacillus plantarum* bakterijų ir šaltalankių (*Hippophae rhamnoides*) CO<sub>2</sub> ekstrakto įkapsuliavimas į alginato kapsules“ 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)

Šlimaitė, Greta. *Lactobacillus plantarum* bakterijų ir šaltalankių (*Hippophae rhamnoides*) CO<sub>2</sub> ekstrakto įkapsuliavimas į alginato kapsules. Magistro studijų baigiamasis projektas / vadovė doc. Aušra Šipailienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: *Lactobacillus plantarum*, daugianarė emulsija, natrio alginatas, šaltalankių ekstraktas, įkapsuliavimas.

Kaunas, 2019. 69 p.

### Santrauka

Probiotinės bakterijos naudojamos funkcinių maisto produktų, farmacijos produktų gamyboje bei kosmetikoje. Jie atlieka svarbų vaidmenį palaikant gerą žmonių sveikatą. Siekiant užtikrinti naudą sveikatai, probiotikai turėtų išlikti gyvybingi produkto laikymo metu ir/ar virškinimo trakte. Dauguma atliktų tyrimų parodė, kad neįkapsuliuotų ar imobilizuotų probiotinių bakterijų gyvybingumas produktuose yra mažas. Todėl tiriamojo darbo užduotis buvo pirmiausia pagaminti stabilias daugianares emulsijas V<sub>1</sub>/A/V<sub>2</sub> su probiotiku ir prebiotiku V<sub>1</sub> fazėje, su augaliniu ekstraktu A fazėje ir natrio alginatu V<sub>2</sub> fazėje. Tada iš stabilių emulsijų gauti polisacharidines kapsules jas tinklinant kalcio chlorido tirpale. Taip pat įvertinti probiotikų atsipalaidavimą iš kapsulių bei daugianarių emulsijų imituotomis virškinimo sąlygomis *in vitro*.

Tyriamojo darbo metu buvo vertinama trijų skirtingų emulsiklių (Tween 80, Span 80, Lecitinas) bei jų koncentracijų įtaką vienasluoksnių vanduo-aliejuje (V/A), aliejus-vandenyje (A/V) emulsijų bei daugianarių vanduo-aliejuje-vandenyje (V/A/V) emulsijų stabilumui. Emulsijų stabilumas vertinamas pagal jų sudarančių fazių atsiskyrimą laikant jas statinėmis (laikymo) sąlygomis. Nustatyta, kad stabilios A/V emulsijos susidaro naudojant 0,5 % Tween 80, 0,5 % Tween 80 + lecitiną, 2 % lecitino arba 5 % Span 80 emulsiklius esant aliejaus-vandens santykiui 6:4. Tačiau esant aliejaus-vandens santykiui 7:3 stabilios emulsijos gautos tik su 0,5 % Tween 80, 0,5 % Tween 80 + Span 80 ir 10 % Span 80 emulsikliais. Ištyrus V/A emulsijų stabilumą, nustatyta, kad tik su 5 % ir 10 % Tween 80 + lecitino emulsikliais susidaro stabilios emulsijos esant vandens-aliejaus santykiui 6:4, o pakeitus vandens-aliejaus santykį į 7:3 stabilių emulsijų nesusidaro.

Kitame tyrimų etape buvo gaminamos daugianarės emulsijos iš gautų stabilių V/A (5 % ir 10 % Tween 80 + lecitinu) emulsijų. Pagamintos daugianarės emulsijos tarpusavyje skyrėsi skirtinga natrio alginato koncentracija (1 % ir 2 %) V<sub>2</sub> fazėje. Ištyrus daugianarių V<sub>1</sub>/A/V<sub>2</sub> emulsijų stabilumą, nustatyta, kad stabilios daugianarės emulsijos susidaro su 2 % alginato priedu išorinėje V<sub>2</sub> fazėje. Todėl į jas buvo įkapsuliuotos probiotinės bakterijos kartu su prebiotiku ir augaliniu ekstraktu. Prieš tai buvo vertinamas probiotinių bakterijų gyvybingumas po 48 val. kartu su skirtingais keturiais prebiotikais (inulinas, trehalozė, manitolis, gliukomananas), norint nustatyti, kurį prebiotiką pasirinkti įkapsuliavimui. Nustatyta, kad geriausiai bakterijos išgyvena su manitoliu bei trehaloze.

Tolimesniuose tyrimuose buvo įvertintas probiotikų gyvybingumas imituotose *in vitro* virškinimo sąlygose tiriant neįkapsuliuotų (kontrolė) ir įkapsuliuotų *Lactobacillus plantarum* bakterijų skaičių skirtingose virškinimo fazėse. Nustatyta, kad po imituoto *in vitro* virškinimo, bakterijos išgyvena geriau, kai jos yra įkapsuliuotos. Tada jos gali būti pristatytos į tikslinę vietą, tai yra žmogaus žarnyną.

Šlimaitė, Greta. Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* Bacteria and CO<sub>2</sub> Extract of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) in Alginate Capsules. Master's Final Degree Project supervisor doc. Aušra Šipailienė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, multiple emulsion, sodium alginate, sea buckthorn extract, encapsulation.

Kaunas, 2019. 69 p.

### Summary

Probiotic bacteria are used in the production of functional foods, pharmaceuticals and cosmetics. They play an important role in maintaining good human health. To ensure health benefits, probiotics should remain viable during storage and/or in the gastrointestinal tract. Most studies have shown that the non-encapsulated or immobilized probiotic bacteria have low viability in products. Therefore, the task of the study was to produce stable multiple emulsions  $V_1/A/V_2$  with probiotic and prebiotic in phase  $V_1$ , with plant extract in phase A and sodium alginate in phase  $V_2$ . Then obtain polysaccharide capsules from the stable emulsions by meshing them in calcium chloride solution. Also, the release of probiotics from capsules and multiple emulsions in simulated digestive conditions *in vitro* was also evaluated.

During the research work, the influence of three different emulsifiers (Tween 80, Span 80, Lecithin) and their concentrations on single-layer water-in-oil (V/A), oil-in-water (A/V) emulsions and multiple water-in-oil-in-water ( $V_1/A/V_2$ ) emulsions stability. The stability of the emulsions is evaluated by the separation of the phases forming it in static (storage) conditions. Stable A/V emulsions were found to be formed using 0,5 % Tween 80, 0,5 % Tween 80 + lecithin, 2 % lecithin or 5 % Span 80 emulsifiers at 6:4 oil/water ratio. However, in the oil-to-water ratio, 7:3 stable emulsions were obtained only with 0,5 % Tween 80, 0,5 % Tween 80 + Span 80 and 10 % Span 80 emulsifiers. The stability of V/A emulsions has been shown to be stable only with 5 % and 10 % Tween 80 + lecithin emulsions to form a water-to-oil ratio of 6:4, and water-to-oil ratio of 7:3 produces no stable emulsions.

At the next stage of the study, multiple emulsions were produced from the resulting stable V/A (5 % and 10 % Tween 80 + lecithin) emulsions. Different concentrations of sodium alginate (1 % and 2 %) in the  $V_2$  phase differed between the produced emulsions. The stability of multiple emulsion  $V_1/A/V_2$  was found to result in stable multiple emulsions with 2 % alginate additive in the outer phase  $V_2$ . Therefore, they were encapsulated with probiotic bacteria along with prebiotics and plant extract. Prior to that, the viability of probiotic bacteria was assessed after 48 hours with four different prebiotics (inulin, trehalose, mannitol, glucomannan) to determine which prebiotic to choose for encapsulation. Bacteria have been found to be best suited for mannitol and trehalose.

Further studies assessed the viability of probiotics in simulated *in vitro* digestive conditions by uncontrolled (control) and encapsulated *Lactobacillus plantarum* bacteria at different digestive stages. It has been found that after the simulated *in vitro* digestion, bacteria survive better when they are encapsulated. Then they can be delivered to the target site, that is, the human intestine.

## **Padėka**

Dėkoju Maisto mokslo ir technologijos katedrai ir savo darbo vadovei doc. Aušrai Šipailienei, doktorantei Sigitai Jeznienei už suteiktas darbo sąlygas ir pagalbą atliekant magistro baigiamąjį darbą „*Lactobacillus plantarum* bakterijų ir šaltalankių (*Hippophae rhamnoides*) CO<sub>2</sub> ekstrakto įkapsuliavimas į alginato kapsules“.

## Turinys

Lentelių sąrašas.....	9
Paveikslų sąrašas .....	10
Santrumpų ir terminų sąrašas.....	12
Įvadas .....	13
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA .....</b>	<b>15</b>
1.1. Probiotinės bakterijos .....	15
1.2. Prebiotikai.....	19
1.3. Antioksidantai .....	20
1.4. Probiotinių bakterijų įkapsuliavimas.....	20
1.5. Naudojami įkapsuliavimo metodai ir medžiagos.....	22
1.5.1. Emulsijos metodas.....	23
1.5.2. Įkapsuliavimui naudojamos medžiagos.....	27
<b>2. TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI .....</b>	<b>30</b>
2.1. Medžiagos.....	30
2.2. Pirminių V/A ir A/V emulsijų paruošimas su skirtingomis emulsiklių koncentracijomis .....	30
2.2.1. Pirminės V/A emulsijos paruošimas .....	30
2.2.2. Pirminės A/V emulsijos paruošimas .....	30
2.3. Daugianarių $V_1/A/V_2$ emulsijų stabilizuotų su skirtingomis emulsiklių koncentracijomis paruošimas.....	31
2.4. Vienasluoksnių ir daugianarių emulsijų su skirtingais emulsikliais gravitacinis stabilumo nustatymas .....	31
2.4.1. Terminio apdorojimo būdu .....	32
2.4.2. Užsaldymo-atšildymo ciklai .....	32
2.5. Daugianarių $V_1/A/V_2$ emulsijų charakterizavimas .....	32
2.5.1. Mikrotekstūros vertinimas .....	32
2.5.2. Klampos tyrimai.....	32
2.5.3. Dalelių dydis .....	33
2.6. Oksidacinis stabilumas .....	33
2.6.1. Peroksidų skaičiaus nustatymas .....	33
2.7. Probiotikų paruošimas .....	33
2.8. Probiotinių bakterijų augimas su prebiotikais .....	34
2.9. <i>L. plantarum</i> įkapsuliavimas į alginatines kapsules.....	34
2.10. Kapsulių kietumo analizė .....	34
2.11. Probiotikų gyvybingumas daugianarėse emulsijose bei alginatinėse kapsulėse .....	35
2.12. Virškinimas IN VITRO .....	35
2.13. Statistinė analizė .....	38
<b>3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....</b>	<b>39</b>
3.1. Emulsijų A/V paruošimas ir jų stabilumo vertinimas .....	39
3.2. V/A emulsijų stabilumo vertinimas .....	42
3.3. Daugianarių emulsijų $V_1/A/V_2$ paruošimas ir jų stabilumo vertinimas .....	44
3.4. Temperatūros įtaka dvigubų emulsijų stabilumui .....	47
3.5. Probiotikų gyvybingumas serijiniu praskiedimų metodu.....	48
3.6. Daugianarių emulsijų $V_1/A/V_2$ mikroskopinis vaizdas .....	51
3.7. Daugianarių emulsijų klampos nustatymas .....	51
3.8. Daugianarių emulsijų (A–F) reologiniai parametrai .....	54

3.9. Daugianarių emulsijų (A-F) oksidacinis stabilumas .....	55
3.10. <i>L. plantarum</i> bakterijų gyvybingumas laikymo metu A-F tipo daugianarėse emulsijose.....	57
3.11. Alginatinės kapsulės ir jų kietumas.....	59
3.12. Įkapsuliuotų <i>L. plantarum</i> bakterijų gyvybingumas kapsulėse laikymo metu .....	60
3.13. Kapsulių virškinimas <i>IN VITRO</i> . .....	60
Išvados.....	63
Literatūros sąrašas.....	64



## Lentelių sąrašas

<b>1 lentelė.</b> Probiotikų veikimo mechanizmas [13].....	16
<b>2 lentelė.</b> Mikroorganizmai, kurie naudojami kaip probiotikai [5] .....	17
<b>3 lentelė.</b> Darbinių ir bazinių virškinimo sulčių paruošimas .....	35
<b>4 lentelė.</b> Tulžies druskų, lipazės ir pepsino paruošimas .....	36
<b>5 lentelė.</b> Burnos virškinimo etapas.....	37
<b>6 lentelė.</b> Skrandžio virškinimo etapas .....	37
<b>7 lentelė.</b> Žarnyno virškinimo etapas.....	37
<b>8 lentelė.</b> A/V stabilių ir nestabilių emulsijų suvestinė .....	42
<b>9 lentelė.</b> Temperatūros įtaka emulsijos stabilumui .....	47
<b>10 lentelė.</b> <i>L. plantarum</i> ir <i>L. reuteri</i> prebiotikų veikimas MRS terpėje ir fiziologiniame tirpale ..	50
<b>11 lentelė.</b> Daugianarių emulsijų klampos konstantos .....	52
<b>12 lentelė.</b> A–F dvigubų emulsijų sudedamieji komponentai.....	53
<b>13 lentelė.</b> Daugianarių emulsijų A–F dalelių dydis ir reologinės charakteristikos.....	54

## Paveikslų sąrašas

<b>1 pav.</b> <i>L. reuteri</i> [15].....	18
<b>2 pav.</b> <i>L. plantarum</i> [17].....	18
<b>3 pav.</b> Įkapsuliavimo sistemos: (a) rezervuaro tipas, (b) matricos tipas, (c) padengtos matricos tipas [25].....	21
<b>4 pav.</b> Įvairios mikrokapsulių formos naudojamos maisto pramonėje [26] .....	22
<b>5 pav.</b> Probiotikų įkapsuliavimo technologijos: dydžio priklausomybė nuo kapsuliavimo metodo [25] .....	22
<b>6 pav.</b> Bakterijų įkapsuliavimo srautų schema emulsijos metodais .....	23
<b>7 pav.</b> Daugianarės emulsijos: (a) V / A / V, (b) A / V / A [31].....	24
<b>8 pav.</b> Scheminis daugianarės emulsijos V <sub>1</sub> /A/V <sub>2</sub> pateikimas [33].....	25
<b>9 pav.</b> Daugianarių emulsijų tipai [30] .....	26
<b>10 pav.</b> Emulsijų nestabilumo pavyzdžiai .....	26
<b>11 pav.</b> Alginato struktūra: (a) grandinės konformacija ir (b) blokinis pasiskirstymas [13].....	27
<b>12 pav.</b> Alginato struktūrinė schema [39].....	28
<b>13 pav.</b> Guar gumos struktūrinė formulė.....	29
<b>14 pav.</b> Principinė V <sub>1</sub> /A/V <sub>2</sub> schema .....	31
<b>15 pav.</b> Kapsulių gamybos schema .....	34
<b>16 pav.</b> Kapsulės suspaudimo jėga (F) .....	35
<b>17 pav.</b> Emulsijų A/V gravitacinio stabilumo rezultatai vandens ir aliejaus santykiu 6:4 (plakta su magnetine maišykle) .....	39
<b>18 pav.</b> Emulsijų A/V gravitacinio stabilumo rezultatai vandens ir aliejaus santykiu 7:3 (plakta su magnetine maišykle) .....	40
<b>19 pav.</b> Emulsijų A/V gravitacinio stabilumo rezultatai vandens ir aliejaus santykiu 6:4 (plakta su homogenizatoriumi) .....	41
<b>20 pav.</b> Emulsijų A/V gravitacinio stabilumo rezultatai vandens ir aliejaus santykiu 7:3 (plakta su homogenizatoriumi) .....	41
<b>21 pav.</b> V/A emulsijos plaktos su Tween 80 emulsikliu. ....	43
<b>22 pav.</b> Emulsijų V/A gravitacinio stabilumo rezultatai aliejaus ir vandens santykiu 6:4 .....	43
<b>23 pav.</b> Emulsijų V/A gravitacinio stabilumo rezultatai aliejaus ir vandens santykiu 7:3 .....	44
<b>24 pav.</b> Daugianarių emulsijų gravitacinio stabilumo rezultatai santykiu 6:4 (V <sub>2</sub> :V/A).....	45
<b>25 pav.</b> Daugianarių emulsijų gravitacinio stabilumo rezultatai santykiu 6:4 (V <sub>2</sub> :V <sub>1</sub> /A) ir 5 % emulsiklių (Tween 80 + lecitinas) koncentracija.....	46
<b>26 pav.</b> Daugianarių emulsijų gravitacinio stabilumo rezultatai santykiu 6:4 (V <sub>2</sub> :V <sub>1</sub> /A) ir 10 % emulsiklių (Tween 80 + lecitinas) koncentracija.....	46
<b>27 pav.</b> Temperatūros įtaka emulsinių sistemų stabilumui.....	47
<b>28 pav.</b> Daugianarių emulsijų stabilumas po terminio apdorojimo (70 °C).....	48
<b>29 pav.</b> <i>L. plantarum</i> augimo kreivė su prebiotikais .....	48
<b>30 pav.</b> <i>L. reuteri</i> augimo kreivė su prebiotikais.....	49
<b>31 pav.</b> Probiotikų gyvybingumas daugianarės emulsijos gamybos metu .....	50
<b>32 pav.</b> Daugianarių emulsijų ×100 mikroskopinis vaizdas .....	51
<b>33 pav.</b> Daugianarių emulsijų klampa su <i>L. plantarum</i> .....	52
<b>34 pav.</b> Daugianarių emulsijų klampa su <i>L. reuteri</i> .....	53
<b>35 pav.</b> Dalelių dydžio pasiskirstymo kreivės daugianarėse (A–F) emulsijose.....	55

<b>36 pav.</b> Peroksidų skaičius rapsų aliejuje ir aliejuje su 5 % šaltalankių ekstraktu laikymo metu (KT ir 37 °C).....	56
<b>37 pav.</b> Peroksidų skaičius daugianarėse (A–F) emulsijose laikymo metu (kambario temperatūroje) .....	56
<b>38 pav.</b> Peroksidų skaičius daugianarėse (A–F) emulsijose laikymo metu (37 °C) .....	57
<b>39 pav.</b> <i>L. plantarum</i> augimo kreivės emulsijose A-F laikymo metu KT .....	58
<b>40 pav.</b> <i>L. plantarum</i> augimo kreivės emulsijose A-F laikymo metu 37 °C temperatūroje .....	58
<b>41 pav.</b> Alginatinės kapsulės su <i>L. plantarum</i> probiotiku .....	59
<b>42 pav.</b> Kapsulių kietumas .....	59
<b>43 pav.</b> <i>L. plantarum</i> gyvybingumas alginatinėse kapsulėse laikymo metu .....	60
<b>44 pav.</b> <i>L. plantarum</i> gyvybingumas imituotose skrandžio sultyse (SGF) .....	61
<b>45 pav.</b> <i>L. plantarum</i> gyvybingumas imituotose žarnyno sultyse (SIF).....	61

## Santrumpų ir terminų sąrašas

### Santrumpos:

% – procentai

°C – laipsniai pagal Celcijų

min. – minutė

ml – mililitrai

µm - mikrometrai

A/V – aliejus vandenyje tipo emulsija

V/A – vanduo aliejuje tipo emulsija

t.y – tai yra

pvz. – pavyzdžiui

pH – vandenilio jonų ( $H^+$ ) koncentracijos matas

Pa·s – paskaliai per sekundę

pav. – paveikslas

rpm – (angl. revolutions per minute) apsisukimai per minutę

HLB – hidrofilinis–lipofilinis balansas

p – statistinio reikšmingumo rodmuo

pH – vandenilio potencialas

KT – kambario temperatūra

PS – peroksidų skaičius

Span 80 – sorbitano monooleatas

Tween 80 – polioksietilen(20)-sorbitano monooleatas

HOM – homogenizatorius

MM – magnetinė maišyklė

### Terminai:

**Emulsija** – dviejų nesimaišančių skysčių dispersinė sistema.

**Emulsiklis** – medžiaga, kuri padeda susidaryti dviejų nesimaišančių tarpusavyje skysčių emulsijai ir ją stabilizuoja.

## Įvadas

Žmogaus žarnyne yra trilijonai mikrobu (bendrai vadinami mikrobiotais arba mikrobiomais), kurie atlieka svarbų vaidmenį žmonių sveikatai. Atliekant savo funkcijas jie reguliuoja įvairius fiziologinius procesus, įskaitant energijos ir riebalų metabolizmą, imuninės sistemos vystymąsi, siekia užkirsti kelią patogenų invazijai ir kolonizacijai. Dabar gerai žinoma, kad daugelis lėtinių ligų, tokių kaip nutukimas, 2 tipo diabetas ir uždegiminės žarnyno ligos yra susijusios su mikrobiotos disbioze [1].

Per pastaruosius 20 metų didėja susidomėjimas probiotinių bakterijų vaidmeniu žmonių sveikatai. Probiotikai – gyvi mikroorganizmai, kuriuos vartojant reikiamais kiekiais gali suteikti naudos žmogaus organizmui. Susiję su probiotikais yra prebiotikai, kurie yra nevirškinami angliavandeniai ir jie selektyviai skatina probiotikų augimą. Probiotikų ir prebiotikų kompleksas sudaro simbiotikus.

Dėl šios priežasties pramonės šakos sutelkė dėmesį į šių probiotinių bakterijų panaudojimą ir kuria naujos kartos „sveikuoliškus“ maisto produktus. Tačiau tyrimai rodo, kad bakterijų gyvybingumas žymiai sumažėja, kai patenka į skrandžio-žarnyno traktą. Siekiant užtikrinti naudą sveikatai, turėtų būti tam tikras gyvybingų probiotinių bakterijų skaičius per visą produkto laikymo laiką, ir išlikti virškinimo trakto. Daugelis pranešimų parodė, kad probiotinių bakterijų išlikimas yra prastas produktų, kuriuose yra laisvos probiotinės ląstelės [2]. Todėl atsirado poreikis surasti būdą, kaip apsaugoti probiotikus nuo jas nepalankiai veikiančių sąlygų, kad virškinimo metu jų reikiamas kiekis pasiektų žarnyną.

Pastaruoju metu, mokslinėje literatūroje didelis dėmesys yra skiriamas daugianarėms emulsijoms, kurios naudojamos kaip vandenyje tirpių bioaktyvių medžiagų pernešėjos, gebančios jas apsaugoti nuo nepalankių aplinkos sąlygų ir atpalaiduoti jas tada, kai to reikia. Emulsija – sudėtinga dispersinė sistema, sudaryta iš mažų vandens lašelių su bioaktyviu junginiu ( $V_1$ ), tolygiai paskirstytų didesniuose aliejaus lašeliuose (A), kurie yra pasiskirstę išorinėje vandeninėje fazėje ( $V_2$ ). Aprašyta daug sėkmingų eksperimentų, kurių metu į tokias emulsijas įkapsuliuojami junginiai išliko aktyvūs, o ląstelės – gyvybingos net virškinimo metu [3].

Norint tinkamai apsaugoti įkapsuliuotas probiotines bakterijas, svarbu yra padidinti daugianarių emulsijų stabilumą. Pastebėta, kad įvairių polisacharidų panaudojimas vidinėje  $V_1$  ir išorinėje  $V_2$  fazėje leidžia pagaminti gerokai stabilesnes emulsijas bei padidinti probiotikų įkapsuliuojimo efektyvumą. Ši daugianarė emulsija lašinama į kalcio chlorido tirpalą sudarė kapsules, kuriose probiotikai sėkmingai išgyveno laikymo metu. Taip pat skirtingas tinklinimo laikas veikė skirtingai bakterijų gyvybingumą. Nustatyta, kad ilgesnis tinklinimo laikas užtikrina didesnę bakterijų skaičių kapsulėse laikymo metu.

## DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

### Darbo tikslas

Naudojant skirtingus emulsiklius bei prebiotikus pagaminti stabilias daugianares emulsijas su *Lactobacillus plantarum* bakterijomis ir šaltalankių (*Hippophae rhamnoides*) CO<sub>2</sub> ekstraktu ir jas įkapsuliuoti į alginato kapsules.

### Darbo uždaviniai

1. Pagaminti stabilias vienasluoksnes ir daugianares emulsijas su skirtingais emulsikliais (Tween 80, Span 80, lecitinas), polimerais (Guargum 5000, Thixogum, celiuliozė) su jų skirtingomis koncentracijomis (0,5 %, 1 %, 2 %, 5 % ir 10 %) ir įvertinti jų stabilumą.
2. Įvertinti daugianarių emulsijų reologines savybes.
3. Nustatyti šaltalankio CO<sub>2</sub> ekstrakto įtaką daugianarių emulsijų oksidacijai, nustatant peroksidų skaičių.
4. Įkapsuliuoti probiotikus į daugianares emulsijas kartu su prebiotikais bei augaliniu ekstraktu ir įvertinti įkapsuliavimo efektyvumą.
5. Nustatyti probiotikų gyvybingumą kartu su prebiotikais ir augaliniu ekstraktu daugianarėse emulsijose bei kapsulėse.
6. Įvertinti daugianarių emulsijų, kapsulių virškinamumą ir įkapsuliuotų probiotikų aktyvumą virškinimo metu *in vitro* sąlygomis.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Probiotinės bakterijos

Probiotikus XX amžiaus pradžioje, pirmasis išsamiai tyrinėjo Rusijos mokslininkas, Nobelio premijos laureatas Ilja Mečnikovas, dirbęs Pastero institute, Paryžiuje. I. Mečnikovas pirmasis pastebėjo, jog kai kuriuose maisto produktuose (rūgpienyje ir kt.) esantys mikroorganizmai gali būti naudingi žmogui, nes normalizuoja žarnyno mikroflorą – padeda pašalinti bloguosius, kenksmingus mikroorganizmus ir juos pakeičia geraisiais. Kai kurios bakterijos atrastos dar anksčiau nei XX amžiaus pradžioje, tačiau nebuvo žinoma, kad jos gali turėti naudos sveikatai [4].

Sveiko suaugusio žmogaus žarnyne *Bifidobacteria* genties bakterijos sudaro iki 25 %, o su maistu patenkantys oligosacharidai yra kaip maisto šaltinis šioms bakterijoms augti ir vystytis. Oligosacharidai, kaip sunkiai virškinamos maisto medžiagos, pasiekę storąją žarną, iš dalies fermentuojami į keletą metabolitų. Fermentacijos metu susidaro vandenilis, anglies dioksidas, metanas ir kitos dujos bei trumpųjų grandinių riebalų rūgštys – acto, propiono bei sviesto. Šių rūgščių kiekio padidėjimas sumažina žarnyno pH. Mažas pH gali užkirsti kelią potencialiai žalingos mikrofloros augimui [5].

Yra žinomas keletas mechanizmų kaip probiotinės bakterijos gali turėti teigiamą poveikį. Kai kurios bakterijos gali išskirti medžiagas, naikinančias mikroorganizmus (antimikrobines medžiagas), kitos – dėl maistinių medžiagų arba dėl adhezijos vietos žarnyno sienelėse (su žarnyno sienelių receptoriais) konkuruoja su patogeninėmis bakterijomis ir, galiausiai, kai kurios bakterijos, galimai, skatina imuninės sistemos veiklą [6].

Dėl jų naudos sveikatai probiotikai naudojami maisto, farmacijos ir kosmetikos pramonėje, taip pat ir žemės ūkio sektoriuose. Pastaraisiais dešimtmečiais šios bakterijos vis plačiau naudojamos jogurtų ir fermentuotų pieno produktų gamyboje. Norint pagerinti žmogaus sveikatą, koreguojama virškinamojo trakto veikla ir mikroorganizmų sistema. Populiarėja moksliniais tyrimais pagrįsta koncepcija, kad tinkama žarnyno mikroflora bei jos palaikymas gali apsaugoti nuo virškinamojo trakto sutrikimų, įskaitant virškinamojo trakto infekcijas, uždegimines žarnyno ligas ir netgi vėžį. Probiotinių bakterijų naudojimas skatina pageidaujamų mikroorganizmų augimą, konkuruoja su potencialiai kenksmingais mikroorganizmais varžydami dėl vietos ir maisto medžiagų virškinamajame trakte. Žarnyno epitelis pasidengia plonu sluoksniu naudingųjų bakterijų, kurios konkuruoja su patogeninėmis bakterijomis, taip trukdydamos joms prisitvirtinti ir daugintis virškinamajame trakte. Taip pat stiprina imuninę sistemą, gerina žarnyno peristaltiką ir apsaugo ją nuo infekcijų [7].

Žmogaus žarnyne yra daugiau nei 400 rūšių bakterijų. Viename grame storųjų žarnų turinio gyvena 10–1000 milijardų bakterijų. Sudėtingoje biocenozėje kiekviena bakterijų rūšis atlieka tam tikrą vaidmenį, o jų santykis turi įtakos sveikatai. Priklausomai nuo to, kokios rūšys dominuoja, priklauso ir mūsų sveikata. Paprastai vietinės bakterijos taip gerai prisitaikysios prie esamų sąlygų, kad svetimos bakterijos turi labai mažai galimybių čia apsistoti. Neseniai patekusios bakterijos dažniausiai pašalinamos kartu su žarnyno turiniu [8].

Probiotikų apibūdinimui, jų funkcinių savybių žmonių bei gyvūnų organizmuose apibrėžimui buvo naudojamos įvairiausios sąvokos. Tačiau 2002 m. Pasaulio sveikatos organizacija kartu su Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacija (angl. WHO/FAO) yra paskelbusios oficialų probiotikų

apibrėžimą: „Probiotikai – tai gyvi mikroorganizmai, kurie, vartojami tinkamais kiekiais, naudingi vartotojo sveikatai“ [9]. Šios bakterijos sacharolitinės (skaido cukrus), gramteigiamos, lazdelės arba rutulinės formos (kokai) ir gyvena storojoje žarnoje. Kad probiotikas teiktų naudą sveikatai, svarbu, kad jis būtų gyvybingas bei būtų žinomas jo kiekis vartojimo momentu. Probiotikai praranda savo gyvybingumą, kai patenka į skrandį, ten praeidami pro žemą skrandžio pH [10].

Pieno rūgšties bakterijos, kurios gali būti naudojamos kaip probiotikai turi atitikti šiuos kriterijus:

- daryti teigiamą poveikį šeimininko ląstelėms;
- adhezija prie žarnyno epitelinių audinių;
- būti nepatogeniškos ir nekancerogeniškos;
- eliminuoti patogenus arba sumažinti jų įsisavinimo galimybes;
- gaminti organines rūgštis, vandenilio peroksidą ir bakteriocinus;
- gaminti antimikrobines medžiagas;
- gebėti išlaikyti gyvybingumą ir stabilumą;
- turi būti atsparios technologiniams procesams;
- teigiamai veikti žmogaus imuninę sistemą [11, 12].

Probiotikai gali gydyti ir palengvinti žmogaus organizme pasireiškusius klinikinius simptomus. Šios probiotinės bakterijos palengvina šiuos simptomus ir apsaugo nuo viduriavimo, gastroenterito, dirgliosios žarnos sindromo ir uždegiminės žarnyno ligos (pvz., Krono liga ir opinis kolitas), vėžio, depresijos, nepakankamo laktazės virškinimo, kūdikių alergijos, kepenų ligų [11].

Dažniausiai probiotikų veikimas supaprastinamas ir dažnai įvardijamas, kaip teikiantis naudą žarnyno mikrobiotos balanso atkūrimui. Tačiau, jų veikimas kur kas sudėtingesnis. Nustatyta, kad kiekvienas mikroorganizmas gali turėti tik jam būdingą veikimo mechanizmą. Plačiausiai moksliniuose tyrimuose tyrinėtos pienarūgštės bakterijos: laktobacilos ir bifidobakterijos. Šios bakterijos gamina pieno, acto ir propiono rūgštis, kurios sumažina žarnyno pH, taip pat slopina patogeninių bakterijų augimą [13].

Probiotikų poveikio veiksmingumas priklauso nuo jų tvirto prikibimo žmogaus žarnyne ir jų kolonizacijos. Šis mechanizmas dar tiriamas, tačiau nustatyta, kad *L. plantarum*299v turi specifinę manozės adheziją, dėl kurios bakterijos laikosi prie žmogaus žarnyno ląstelių. Kai probiotikai prikimba prie ląstelės, vyksta įvairūs biologiniai veiksniai, kurie pirmiausia apima citokinų ir chemokininų išsiskyrimą. Tada jie atlieka antrinę veiklą, stimuliuoja gleivinę ir imunitetą [14]. 1 lentelėje yra pateikti probiotikų veikimo mechanizmai, įvertinant probiotikų poveikį.

**1 lentelė.** Probiotikų veikimo mechanizmas [13]

<b>Poveikis</b>	<b>Mechanizmas</b>
Slopina patogenines enterines bakterijas	Mažina žarnyno pH
	Išskiria baktericidinius baltymus
	Kolonizuoja šeimininko organizmą
	Blokuoja epitelinius ryšius
Pagerina epitelio ir gleivinės barjerines savybes	Gamina trumpų grandinių riebalų rūgštis
	Pagerina gleivių gamybą
	Padidina barjero vientisumą



Poveikis	Mechanizmas
Modifikuoja imunologinį reguliavimą	Padidina IL-10 (interleukinas-10) ir TGF- $\beta$ (transformuojantis augimo faktorius- $\beta$ ) ir mažina TNF- $\alpha$ (naviko nekrozės faktorius- $\alpha$ )
	Padidina imunoglobino A gamybą

Perdirbant ir saugant maisto produktus, probiotiniai mikroorganizmai gali būti veikiami aukšta temperatūra, žemu pH, dideliu osmosiniu slėgiu ir dideliu deguonies kiekiu. Šie veiksniai gali turėti žalingą poveikį probiotikams. Probiotinių bakterijų gyvybingumą taip pat veikia skrandžio rūgštys ir tulžies druska [15]. Probiotinių bakterijų teigiamas poveikis atsiranda, kai tinkamas šių gyvybingų bakterijų kiekis patenka į žarnyną, tačiau paminėta tai, kad turi išgyventi anksčiau minėtus nepalankius aplinkos veiksnius. Kad būtų pasiekama probiotikų nauda turi būti suvartojamas minimalus probiotikų biologinės vertės (MBV) indeksas. Tarptautinė pieno federacija (angl. IDF) rekomenduoja, kad šis indeksas turėtų būti daugiau arba lygus  $10^7$  ksv/g [16].

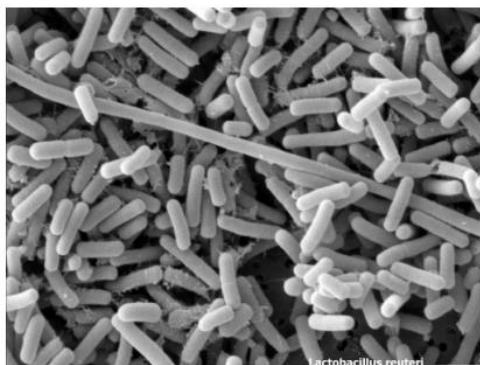
Probiotikai gali paskatinti bei pagreitinti virškinamajame trakte metabolinius procesus, kurie teigiamai veikia organizmo sveikatą. Dažniausiai probiotikus sudaro *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus* ir *Streptococcus* genčių bakterijų kamienai. Probiotikų mikroorganizmai pateikti 2 lentelėje [5].

**2 lentelė.** Mikroorganizmai, kurie naudojami kaip probiotikai [5]

Gentis	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
Bakterijų rūšis	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. cellobiosus</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. brevis</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. lactis</i>	<i>B. bifidum</i> <i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. infatis</i> <i>B. thermophilum</i> <i>B. longum</i>	<i>Ent. faecalis</i> <i>Ent. faecium</i>	<i>S. cremoris</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. diacetylactis</i> <i>S. intermedius</i>

### ***Lactobacillus reuteri***

*L. reuteri* yra gramteigiama, heterofermentacinė bakterija ( 1 pav.) ir yra laikoma viena iš nedaugelio *Lactobacillus* rūšių, kurios nustatomos žmonėse ir gyvūnuose. Dabar yra pagrindžiančių įrodymų, kad pasirinktos *L. reuteri* padermės turi probiotinių savybių ir gali suteikti naudos jų šeiminių sveikatai [17]. Ši bakterija gamina stiprią mažos molekulinės masės ne peptidinę antimikrobinę medžiagą ( $\beta$ -hidroksipropionaldehidą arba reuteriną) anaerobinio glicerolio metabolizmo metu. Reuterinas turi platų aktyvumo spektrą tiek prieš gramteigiamas, tiek prieš gramneigiamas bakterijas [18].



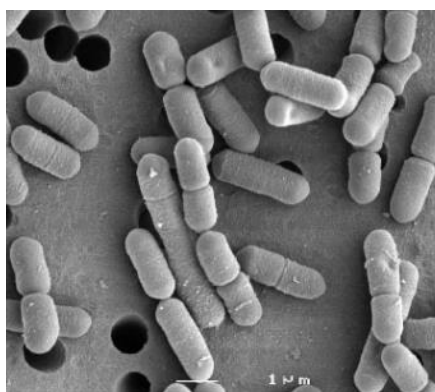
**1 pav.** *L. reuteri* [18]

Šių bakterijų suteikiamas teigiamas poveikis žmonėms – sutrumpina rotaviruso sukeltą viduriavimą vaikams, gydo vaikų ūminį viduriavimą, šios padermės bakterijos yra saugios ir gerai toleruojamos ŽIV užsikrėtusiems žmonėms. *L. reuteri* priklauso mažiausiai šešios padermės, išskirtos iš raugo. Būtina paminėti, kad ši rūšis gali būti dominuojanti rauge šalia kitų kultūrų [7].

Daugelis *L. reuteri* padermių yra atsparios žemam pH ir tulžies druskoms. Manoma, kad šis atsparumas iš dalies priklauso nuo jų gebėjimo sudaryti bioplėveles [19].

### ***Lactobacillus plantarum***

*Lactobacillus plantarum* (2 pav.) yra plačiai paplitęs *Lactobacillus* genties atstovas ir sudaro vieną didžiausią pieno rūgšties bakterijų genomą, dažniausiai randamas daugybėje fermentuotų maisto produktų, taip pat yra seilėse (iš kurių jis buvo pirmą kartą išskirtas) [20]. Tai vienos iš labiausiai universalių pieno rūgščių bakterijų rūšių, kurios vidutiniškai toleruoja rūgštį, vykdo fakultatyvini heterofermentinį metabolizmą ir yra vertinama kaip saugi bakterija. Atsižvelgiant į tai, kelios *L. plantarum* padermės maisto produktuose naudojamos kaip probiotikai [21]. *L. plantarum* geba augti plačiose temperatūrų ribose – nuo 15 iki 45 °C ir pH gali svyruoti tarp 3,2 ir 8,8 [20].



**2 pav.** *L. plantarum* [22]

*L. plantarum* apima *L. plantarum* var. *plantarum*, *L. plantarum* var. *argentoratensis*, *Lactobacillus paraplantarum* ir *Lactobacillus pentosus*. Šios rūšys ir porūšiai randami daugelyje maisto produktų (pienas, mėsa, daržovės). *L. plantarum* paprastai randama žmogaus virškinimo trakte, kas įrodo, jog ši rūšis išgyvena nepalankias sąlygas ir kolonizuoja žarnyną [7].

## 1.2. Prebiotikai

Prebiotikai yra funkciniai maisto komponentai, kurie natūraliai yra augaliniuose maisto produktuose arba sintetinami gamyboje, fermentinio cukraus konversijos metu. Šie junginiai yra angliavandenių struktūros, kurie žmogaus arba gyvūno organizme neskaidomi, nes nėra atitinkamų fermentų. Jie nesihidrolizuoja ir nepasisavinami plonosiose žarnose, todėl nepakitusios formos pasiekia storąją žarną. Čia juos skaido mikroflora, kuri yra žarnose. Tai bifidobakterijos, gaminančios fermentą hidrolazę, o jų skilimo produktus CO<sub>2</sub> ir organines rūgštis panaudoja kaip energijos šaltinį. Prebiotikai turi įtakos tam tikrų mikroorganizmų paplitimui bei teigiamai veikia makroorganizmą, todėl juos galima vadinti probiotikų stimulatoriais [23].

Šiuo metu plačiausiai naudojami prebiotikai yra nevirškinami oligosacharidai ir polisacharidai. Ne visi nevirškinami oligosacharidai yra priskiriami prebiotikams – jie turi atitikti kelis pagrindinius reikalavimus: turi būti atsparūs virškinamojo trakto rūgštingumui ir hidrolizei; būti fermentuojami žarnyno mikroorganizmų ir selektyviai stimuliuoti sveikatai naudingų mikroorganizmų augimą ir aktyvumą. Geriausiai ištirti nevirškinami oligosacharidai yra fruktooligosacharidai, oligofruktozė, inulinas, mananooligosacharidai, galaktooligosacharidai, ksilooligosacharidai, laktulozė, ir sojų oligosacharidai. Oligosacharidai nėra toksiški organizmui ir nesukelia jokių šalutinių reakcijų. Jie skatina žarnyno pageidaujamos mikrofloros augimą. Augdamos naudingos žarnyno bakterijos išskiria fermentus, kurie skaido prebiotikus į rūgštis, o šios slopina ligas sukeliančių bakterijų dauginimąsi. Yra žinoma, kad patogeniniai mikroorganizmai neišskiria prebiotikus skaldančių fermentų [24].

Išskirtinę vietą tarp visų biologiškai vertingų maisto komponentų užima skaidulinės medžiagos – prebiotikai. Prebiotikus pirmasis apibūdino R. Gibsonas 1995 metais, jiems priskirdamas žmogaus žarnyne neabsorbuojamas, bet naudingų žarnyno mikrofloros atstovų augimą skatinančias ir jų metabolizmą aktyvinančias medžiagas [25].

Prebiotinės maistinės skaidulos, stimuliuodamos probiotikų veiklą, organizmui teikia ir daugybę kitų teigiamų efektų, iš esmės gerinančių sveikatą ir charakterizuojančių jas kaip biologiškai aktyvias substancijas. Prebiotinės maistinės skaidulos stimuliuoja mineralinių medžiagų absorbciją bei sustiprina kaulus, slopina toksiškų medžiagų susidarymą ir pagreitina toksinių metabolitų pašalinimą, trukdo susidaryti antrinėms tulžies rūgštims, pasižymi antikancerogeniniu efektu [25]. Probiotikų ir prebiotikų kompleksas vadinamas sinbiotiku [24].

Prebiotikai gali būti išskiriami iš augalų. Natūraliai jų randama cikorijose, rugiuose, piene, meduje, svogūnuose, miežiuose ir kt., kuriuose prebiotinė koncentracija svyruoja nuo 0,3 % iki 6 % šviežio svorio. Dumblių polisacharidai ir oligosacharidai yra geresni oligosacharidai nei kiti prebiotikų gamybos šaltiniai, nes jie gali būti panaudoti maisto pramonėje, pašarų gamyboje [26]. Taip pat gali būti sintetinami cheminiu būdu: iš mono arba disacharidų (transglikozilinimo reakcijos metu, naudojant bakterinės kilmės glikoziltransferazes) arba iš polisacharidų, juos skaldant fiziniiais veiksniais ar naudojant bakterinės kilmės fermentus [23].

**Inulinas** yra vienas iš geriausiai ištirtų nevirškinamų oligosacharidų, priklausantis fruktanų grupei. Atliktuose moksliniuose tyrimuose patvirtinamas jo kaip prebiotiko veiksmingumas. Tai linijinis polimeras, sudarytas iš D-fruktozės monomerų, sujungtų β(2→1)-glikozidiniais ryšiais. Inulinas priskiriamas ilgos grandinės fruktooligosacharidas, bet komerciškai dažniausiai gaminami inulinų mišiniai. Jis yra aptinkamas įvairiuose augaluose. Daugiausia aptinkama cikorijų (*Cichorium intybus*)

šaknyse, česnakuose, svogūnuose, poruose ir kituose augaluose. Inulinas paprastai susideda iš fruktozės ir gliukozės [27].

Inulinas yra atsparus metabolizmui šeimininko viršutiniame virškinimo trakte, bet yra fermentuojamas bakterijų storojoje žarnoje, ir tokiu būdu skatina naudingųjų ir slopina patogeninių bakterijų proliferaciją. Literatūroje aprašyta plati inulino teikiama nauda sveikatai. Parodyta, kad jis stimuliuoja imuninę sistemą; mažina patogeninių bakterijų kiekį žarnyne; slopina patogeninių bakterijų sukeltą viduriavimą; pagerina mineralų (Ca, Mg), absorbciją žarnyne (mažina osteoporozės riziką); cholesterolio kiekį kraujyje; mažina nutukimą, neutralizuoja toksinus bei sumažina storosios žarnos vėžio riziką. Literatūroje yra duomenų, rodančių, kad inulinas gali skatinti ir kai kurių *Lactobacillus spp.* bei *Lactococcus spp.* augimą, o taip pat – stimuliuoti bakteriocinų sekreciją [28].

### 1.3. Antioksidantai

Antioksidantai – junginiai, kurie neleidžia susidaryti arba neutralizuoja jau susidariusius laisvuosius radikalus, užkerta kitų molekulių oksidaciją, slopindami grandininės reakcijos oksidacijos pradžią arba sklidimą. Antioksidantai atlieka svarbų vaidmenį, apsaugant organizmą nuo oksidacinio streso, slopindami arba atidėdami oksidacinius procesus [29].

Antioksidantai klasifikuojami atsižvelgiant į jų veikimo mechanizmą, jie gali būti skirstomi į pirminius antioksidantus, sinergistinius ir antrinius antioksidantus. Kai kurios medžiagos pasižymi antioksidantiniu poveikiu: askorbo rūgštis, tokoferoliai, kai kurie fermentai, karotinoidai ir biologiškai aktyvūs augaliniai fenoliai. Natūralūs antioksidantai, kuriems priskiriami fenoliniai junginiai (tokoferoliai, flavonoidai ir fenolinės rūgštys), azoto junginiai (alkaloidai, chlorofilo dariniai, amino rūgštys ir aminorai), yra randami vaisiuose ir daržovėse. Vitaminai ir polifenoliai, kurie yra randami vaisiuose ir daržovėse, yra naudingi žmogaus sveikatai. Viena iš fitomedžiagų kategorijų yra fenoliniai junginiai, kurie pasižymi stipriomis antioksidantinėmis savybėmis ir laisvųjų radikalų surišimo geba, slopina fermentus, atsakingus už reaktyvių deguonies formų atsiradimą [29].

Vaistažolių preparatai jau daugelį metų yra naudojami ne tik kaip terapiniai, bet ir kaip profilaktiniai sveikatos skatinimo agentai. Šaltalankis (*Hippophae rhamnoides*) – daugiametis lapuotis, vaisius vedantis krūmas kilęs iš Europos ir Azijos. Jis unikalus ir vertingas, kuris neseniai atkreipė pasaulinį dėmesį, daugiausia dėl savo vaistinio ir mitybinio potencialo. Tai išstvermingas augalas, atsparus sausroms ir šalčiams. Visos šio augalo dalys laikomos gerais šaltiniais daugelio bioaktyvių medžiagų, pvz., Vitaminų (A, C, E, K, riboflavino, folio rūgštis), karotinoidų ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ -karotino, likopeno, liuteino), fitosterolių, organinių rūgščių (obuolių rūgštis, oksalo rūgštis), polinesočiųjų riebalų rūgščių, esminių amino rūgščių ir mineralinių medžiagų. Nepaisant to, reikšmingiausia augalo dalis yra vaisiai, kurie turi antioksidaciniu poveikiu pasižyminčius junginius [30].

### 1.4. Probiotinių bakterijų įkapsuliavimas

Kadangi probiotinės bakterijos yra jautrios aplinkos veiksniams, mokslininkus paskatino ieškoti būdų kaip jas apsaugoti nuo neigiamo aplinkos poveikio, kurios buvo minėtos anksčiau. Todėl atsirado vienas iš naujausių ir veiksmingiausių metodų apsaugoti jas – uždaryti probiotines bakterijas į kapsules. Ši kapsulė pirminio virškinimo burnoje ir skrandyje metu turėtų būti tarsi „užrakinta“ ir išlaikyti didesnę bakterijų gyvybingumą tol, kol jos išsilaisvins plonajame žarnyne [16].

Įkapsuliavimas apibrėžiamas kaip specializuotų jautrių medžiagų apvilimo procesas į pusiau pralaidžias polimerines membranas, kurios suformuoja kapsules. Įkapsuliavimas gali apsaugoti jautrias probiotines kultūras, pagerinti jų stabilumą ir gyvybingumą, bei tikslingai nukreipti į virškinimo traktą [31].

Įkapsuliavimas gali būti atliktas:

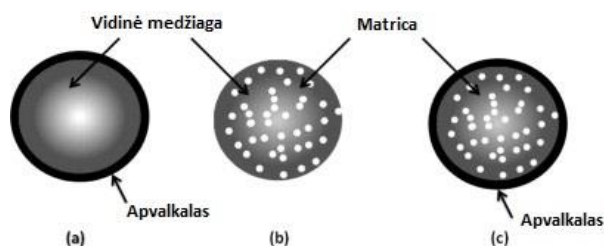
1. Siekiant apsaugoti jautrias medžiagas nuo išorės aplinkos veiksnių;
2. Norint maskuoti organoleptines savybes, pavyzdžiui, spalvą, skonį, medžiagos kvapą;
3. Norint saugiai kontroliuoti toksines medžiagas;
4. Siekiant vaistų atsipalaidavimą tam tikroje organizmo vietoje;
5. Norint išvengti neigiamo poveikio nuo vaistų pvz. aspirinas yra pirmas vaistas, vartojamas siekiant išvengti skrandžio sudirginimo [32].

Mikroorganizmams, kurie yra jautrūs aplinkos veiksniams, įkapsuliuoti, yra naudojamos įvairios sistemos. Galima įkapsuliuoti į kapsules, koloidosomas, liposomas ir t.t. Tačiau plačiausiai naudojama sistema – įkapsuliavimas į kapsules [12]. Taip pat yra įkapsuliuojama ir keliais skirtingais būdais: ekstruzijos, emulsijos, purkštuvinio džiovavimo, liofilizacijos ir kt. metodais. Pagrindinis įkapsuliavimo tikslas yra apsaugoti bakterijų ląsteles nuo neigiamų aplinkos veiksnių ir gyvybingų bakterijų išsaugojimas iki kol jos pasieks virškinimo traktą. Bakterijos gali įsikapsuliuoti natūraliu būdu, kai bakterijos ląstelės auga ir gamina egzo-polisacharidus [33].

Kapsulę sudaro pusiau pralaidi, sferinė, plona ir stipri membrana, kuri supa aplink kietą arba skystą branduolį. Sienele apsaugo įkapsuliuojamą medžiagą ir gali reguliuoti jos tikslingą atsipalaidavimą plonojoje ir storiojoje žarnose. Kapsulės skersmuo svyruoja nuo kelių mikrometrų iki kelių milimetrų dydžio [34].

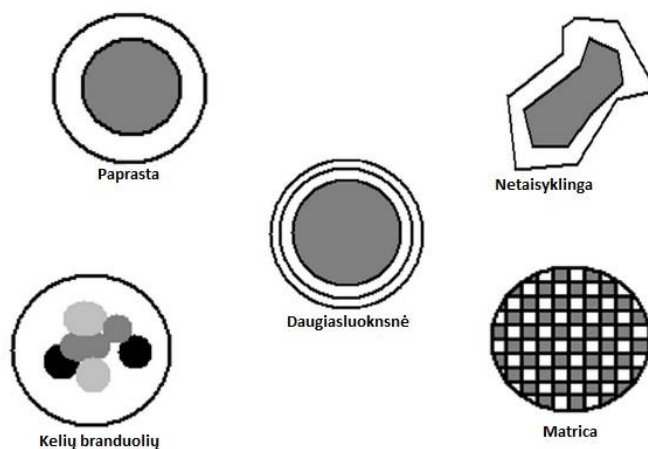
Mikrokapsuliavimui naudojamos medžiagos yra natūraliai atsirandantys polisacharidai ir baltymai, kurie dažniausiai neturi citotoksinio poveikio ir papildomai nereikia naudoti organinių tirpiklių mikrokapsulei gaminti [10]. Dažniausiai naudojami maistinių medžiagų polimerai, tokie kaip alginatas, chitozanas, karboksimetilceliuliozė, karageninas, želatina ir pektinas [34].

Pateiktame 3 paveikslėlyje galima matyti, kad yra skirtingos įkapsuliavimo sistemos, rezervuaro tipo ir matricos tipo. Rezervuaro tipo atveju išorinės fazės sluoksnis yra aplink vidinės fazės sluoksnį. Matricos tipo atveju aktyvus agentas yra disperguotas ant nešiklio medžiagos ir gali būti ant matricos paviršiaus. Šių dviejų tipų derinys sudaro trečios rūšies kapsulę: padengtą matricą, kurioje yra aktyvus agentas [35].



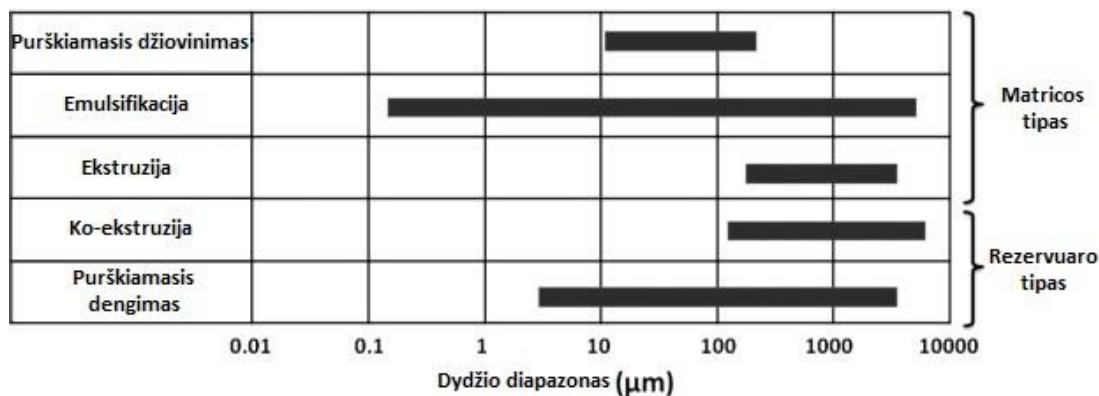
**3 pav.** Įkapsuliavimo sistemos: (a) rezervuaro tipas, (b) matricos tipas, (c) padengtos matricos tipas [35]

Kapsulės gaminamos su natrio alginatu sudaro kapsules su lygiais paviršiais [36]. Skirtingos kapsulių formos pateiktos 4 paveiksle.



4 pav. Įvairios mikroapsulių formos naudojamos maisto pramonėje [36]

Prieš įkapsuliavimą probiotikams keliami du reikalavimai: jų dydžiui (paprastai nuo 1 iki 5  $\mu\text{m}$  skersmens) bei jie turi būti gyvi. Probiotikų įkapsuliavimui taikomos kelios technologijos, nuo kurių priklauso gautų dalelių ir kapsulės dydis (5 pav.). Pavyzdžiui, emulsijos metodu gautos dalelės labai skiriasi dydžiu – nuo 0,2 iki 5000  $\mu\text{m}$ , o ekstruzijos metodu gaunamos vienodesnio dydžio kapsulės [35].



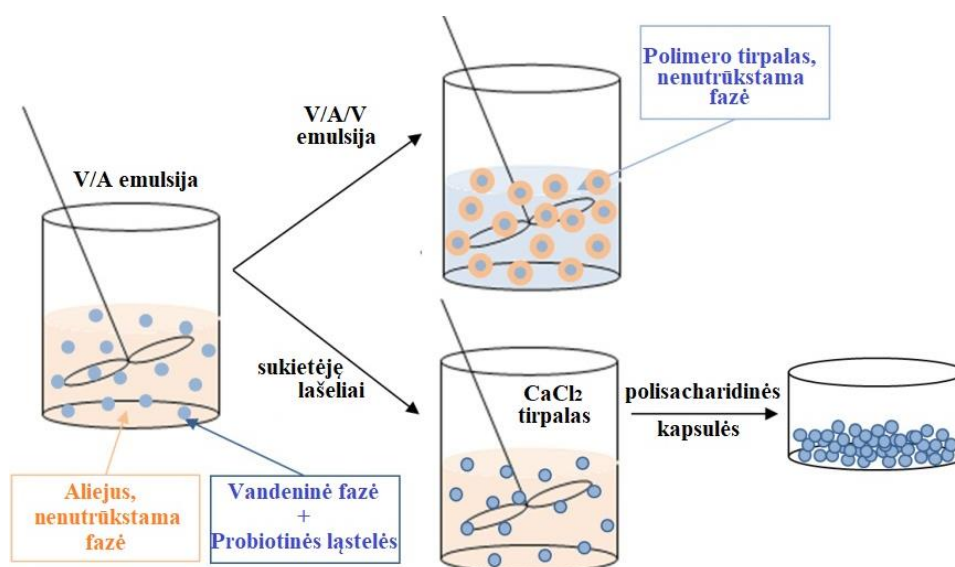
5 pav. Probiotikų įkapsuliavimo technologijos: dydžio priklausomybė nuo kapsuliavimo metodo [35]

### 1.5. Naudojami įkapsuliavimo metodai ir medžiagos

Pasirinkus geriausias probiotikų įkapsuliavimo technologijas, reikia atsižvelgti į daugelį kitų aspektų, kad būtų užtikrintas bakterijų gyvybingumas kapsuliavimo, laikymo ir vartojimo metu, bei būtų kontroliuojamas jų pateikimas į konkretų žarnyno plotą [37]. Laisvos bakterijos produktuose nėra apsaugotos nuo aplinkos veiksnių ir dėl to gali būti mažas jų gyvybingumas, todėl jos įkapsuliuojamos į hidrokolidines kapsules, kurios suteikia apsaugą nuo aplinkos veiksnių taip padidindamos probiotinių bakterijų gyvybingumą [38].

### 1.5.1. Emulsijos metodas

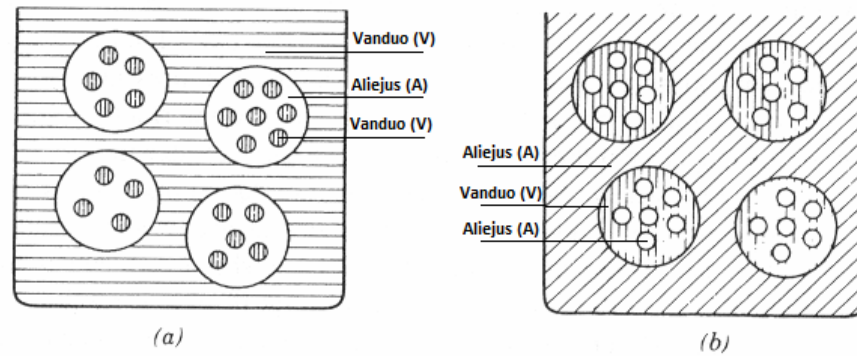
Vienas iš naudojamų įkapsuliavimo metodų yra emulsijos metodas. Šis metodas padidina probiotinių bakterijų išlikimą iki 80 – 90 % [38]. Emulsifikavimo metodu į aliejinę fazę (augaliniai aliejai: sojos, saulėgrąžų, kukurūzų ir t.t.) pridedama ląstelių / polimerų suspensijos (disperguota fazė). Alginato/vandens aliejuje emulsija susidaro maišant magnetine maišykle arba homogenizuojant homogenizatoriumi. Alginato kapsulės susidaro lėtai lašinant emulsiją į besimaišantį kalcio chloridą (6 pav.). Šachas ir Ravula (2000) nustatė, kad kalcio alginato kapsulės, kurios yra gautos naudojant emulsijos metodą pagerina probiotikų organizmų gyvybingumą [15]. Emulsikliai leidžia išlaikyti dviejų ar daugiau nesimaišančių fazių dispersijos fizikines ir chemines savybes ir užkerta kelią fazių atsiskyrimui. Emulsikliai suteikia emulsijų sistemai stabilumą. Tai paviršinio aktyvumo medžiagos, mažinančios paviršiaus įtempius, taip pat padidinančios klampą bei lašelių migraciją, įvedamos į vidinę ir/arba išorinę fazę. Dažniausiai naudojami emulsikliai daugianrių emulsijų gamybos procese yra Tween 80 ir Span 80 [39]. Literatūroje yra rekomenduojama naudoti 2 % emulsiklio Tween 80 koncentracija. Naudojant emulsiklius, formuojasi kapsulės su mažesniu skersmeniu, nes šie komponentai sumažina vandens ir aliejaus fazių įtempį [34].



6 pav. Bakterijų įkapsuliavimo srautų schema emulsijos metodu [37]

### Daugianarės emulsijos

Daugianarės emulsijos (DE) pradėtos tirti išsamiau 1970-ųjų pabaigoje. Tai yra sudėtinga sistema, nes emulsijos rutulėliuose telpa mažesni rutulėliai, dėl to vadinama „emulsijų emulsija“. Daugianarės emulsijos lašeliai dažniausiai yra polidispersiniai. Kai kuriais atvejais lašeliai yra pakankamai dideli, kad juose tilptų 50-100 mažų kitos fazės lašelių. Kitu atveju būna maži lašeliai, kuriuose telpa tik vienas ar keli lašeliai. Daugianarės emulsijos gali būti dviejų tipų: aliejus-vandenyje-aliejuje (A / V / A) ir vanduo-aliejuje-vandenyje (V / A / V) (7 pav.) [39].



7 pav. Daugianarės emulsijos: (a) V / A / V, (b) A / V / A [40]

Daugianarės emulsijos paprastai yra paruošiamos dviem etapais ir naudojamos dvi atskiros paviršinio aktyvumo medžiagos (lipofilinės ir hidrofilinės). Pavyzdžiui, pirmiausiai paruošiama V/A arba A/V emulsija. Tada naujai pagaminta V/A arba A/V emulsija yra dar kartą emulguojama su vandeninės arba aliejinės fazės pertekliumi. Galutinė gauta emulsija atitinkamai gali būti V/A/V arba A/V/A daugianarė emulsija [41].

Daugianarės emulsijos „vanduo-aliejuje-vandenyje“ ( $V_1/A/V_2$ ) susideda iš disperguotų aliejaus lašelių, kurių sudėtyje yra mažesnių vandens lašelių. Schematiškai daugianarė emulsija ( $V_1/A/V_2$ ) pateikta 7 paveikslėlyje. Atsižvelgiant į jų dvigubos (daugialypės) sekcijos struktūrą, didėjantis susidomėjimas buvo skirtas daugianarėms emulsijoms, nes jas galima laikyti medžiagų rezervuarais. Daugianarės emulsijos paprastai yra pagamintos su dvejomis skirtingo tirpumo paviršinio aktyvumo medžiagomis (emulsikliais). Norint gauti emulsiją  $V_1/A/V_2$ , pirmiausia aliejuje ištirpinama hidrofobinė paviršiaus aktyvioji medžiaga, tai yra paviršinio aktyvumo medžiaga su žemu hidrofiliniu–lipofiliniu balansu ( $HLB < 10$ ). Tada vanduo pilamas į aliejinę fazę ir taip sudaroma emulsija. Tada sistema vėl emulsuojama paviršinio aktyvumo medžiagos vandeniniame tirpale, turinčiame aukštą HLB balansą ( $> 10$ ), kad gautų daugianarę emulsiją  $V_1/A/V_2$ . Abi paviršinio aktyvumo medžiagos sumaišomos vandens/aliejaus tarpfazėje ir daugianarių emulsijų stabilumo savybės priklauso nuo dvejopos paviršinio aktyvumo medžiagos mišinio sudėties [42].

Emulsiklis yra tipiška paviršinio aktyvumo medžiaga, paprastai naudojama sudaryti emulsijai (nesimaišančių skysčių mišinys). Emulsikliai paprastai pasižymi hidrofobiniu ir hidrofiliniu molekulės galu. Jie apgaubia aliejaus fazę (arba kitą nesimaišančią fazę) ir sudaro apsauginį sluoksnį, kad aliejaus molekulės negalėtų susijungti kartu. Taip emulsikliai sumažina įtempius tarp dviejų nesimaišančių fazių. Šis veiksmas padeda išlaikyti disperguotą fazę mažuose lašeliuose ir taip yra gaunama emulsija [40]. Emulsikliai yra klasifikuojami į tris pagrindines medžiagų grupes: anijonus, katijonus ir nejonogenus. Didžiausiu toksiškumu pasižymi katijoniniai emulsikliai, todėl jų naudojimas yra labai kontroliuojamas. Tinkamas PAM kiekių parinkimas yra svarbus veiksnys, lemiantis emulsijų stabilumą. Esant per mažai emulsiklio koncentracijai gali įvykti aliejaus lašelių aglomeracija. Tuo tarpu parinkus per didelį kiekį įvyksta greita flokuliacija [43].

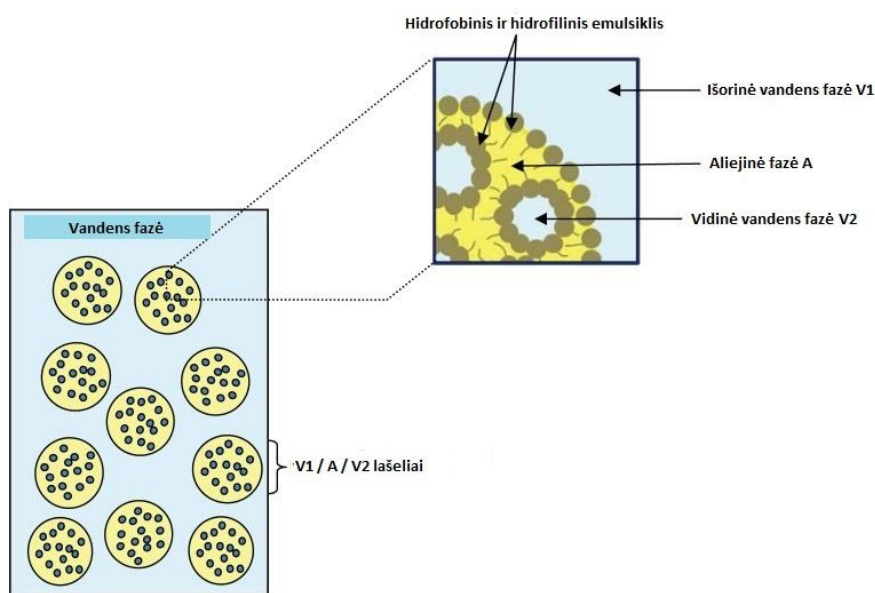
**Tween 80** – hidrofilinė, nejoninė paviršinio aktyvumo medžiaga, turinti didelį paviršiaus aktyvumą ir mažą toksiškumą, todėl dažnai naudojamas maisto produktuose ir kosmetikoje. Šis sintetinis junginys yra sorbitolio ir riebiųjų rūgščių polioksietileno mišinys, klampus, vandenyje tirpus geltonas skystis. Jis mažos molekulinės masės ir turi aukštą hidrofilinį–lipofilinį balanso (HLB) skaičių – 15. Jei šis nejonogeninis emulsiklis yra naudojamas vienas, jis veikia kaip emulsijų



aliejus/vandenyje (A/V) emulsiklis. Emulsijos stabilumą jis padidina sumažindamas paviršiaus įtempimą ant lašelių paviršiaus [44].

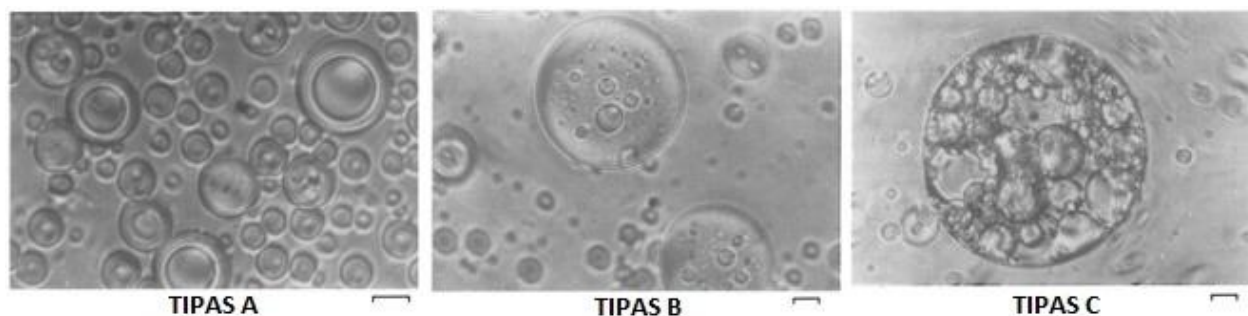
**Span 80** – priskiriamas nejonogeniniams, hidrofobiniams emulsikliams, kurie naudojami emulsijų stabilizavimui dėl savo mažo toksiskumo, gero suderinamumo su kitomis medžiagomis, emulsikliais ir yra mažiau jautrus pH reikšmės svyravimui. Span 80 yra sorbitano riebiųjų rūgščių esteris, gaunamas esterifikacijos reakcijos metu, dehidratuojant sorbitolį. Jis turi žemą HLB skaičių – 4,3. HLB skaičius mažėja didėjant esterifikacijos laipsniui, o jam didėjant gerėja tirpumas lipofilinėse medžiagose. Kaip nejonogeninis emulsiklis, Span 80 pasižymi daugybe privalumų, lyginant su jonogeniniais. Jis yra stabilus esant įvairioms pH reikšmėms, nereaguoja su elektrolitais ir jonogeninėmis medžiagomis, derinant su kitais emulsikliais įvairiu santykiu, galima pasiekti skirtingų reikšmių HLB skaičių ir tokiu būdu suemulguoti daugumą aliejų. Be to, Span 80 yra geras tirpiklis, drėkiklis ir dispergavimo agentas [45].

**Lecitinas** – gelsvai rusvos spalvos klampus skystis, netirpus vandenyje. Gerai tirpsta alkoholyje, augaliniuose aliejuose. Gaunamas iš kiaušinių arba sojų. Yra duomenų, kad sojų pupelių lecitinas turi teigiamą riebalų apykaitą veikiančią ir cholesterolio kiekį kraujyje mažinančią poveikį. Kai kiaušinio trynio lecitinas, priešingai – cholesterolio kiekį didina. Maisto pramonėje naudojamas kaip emulsiklis. Vandenyje gali suformuoti micles, liposomas. Tai natūralus emulsiklis, susidedantis iš glikolipidų, trigliceridų ir fosfolipidų. Biologiškai aktyvi medžiaga, įeinanti į ląstelių membranų sudėtį. Turi savybę sugerti vandenį [46].



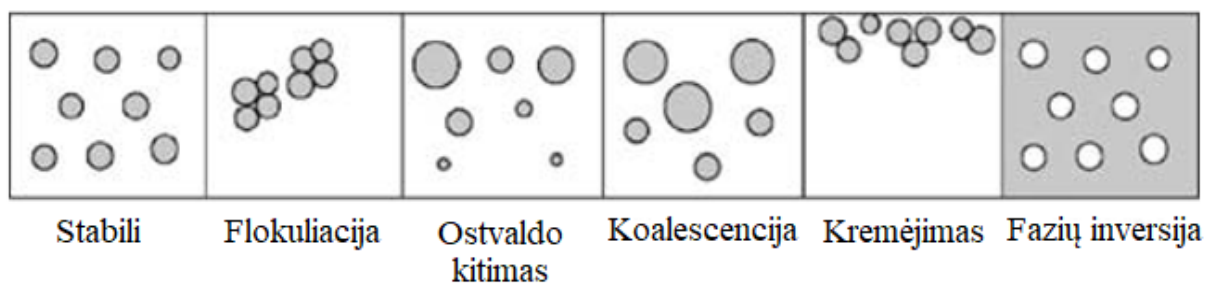
**8 pav.** Scheminis daugianarės emulsijos  $V_1/A/V_2$  pateikimas [42]

Mokslininkai Florence ir Whitehill (1981) nustatė, kad daugianarės emulsijos lašeliai gali būti trijų tipų (9 pav.). A tipas yra paprasčiausia sistema, sudaryta emulsijos lašelio į kurią yra įsiterpęs vienas didelis lašas. B emulsijos tipo lašas yra sudarytas kai į jį yra įsiterpę daug smulkių vidinių emulsijos lašelių. C tipo sistema sudėtingiausia, kai į emulsijos lašelį įsiterpę daug mažų vidinių emulsijos lašelių, kurie būna susitelkę vienoje vietoje, vienas šalia kito [47].



9 pav. Daugianarių emulsijų tipai [39]

Stabilumas yra pagrindinė daugianarių emulsijų problema. Emulsijos stabilumas yra reiškinys, kuris priklauso nuo vandens, aliejaus ir paviršinio aktyvumo medžiagų pusiausvyros. Galimi emulsijų nestabilumo pavyzdžiai (10 pav.): 1)koalescencija; 2)flokuliacija; 3)sedimentacija; 4)fazių inversija; 5)pokytis pagal Ostvaldą [48, 49].



10 pav. Emulsijų nestabilumo pavyzdžiai [50]

Emulsijų susidarymo metu visada sugerama mechaninė energija. Susidaręs paviršiaus plotas pasižymi turintis didesnę paviršiaus įtempties energiją, kuri priklauso nuo paviršiaus ploto ir tarpfazinės paviršiaus įtempties. Juo didesnis paviršiaus plotas tarp fazių, tuo didesnė laisvoji energija fazių pasiskirstymo paviršiuje. Emulsijos tampa agregatiškai nepatvarios dėl didelio sąlyčio su paviršiumi, susidaro laisvosios energijos perteklius, dėl kurio dispersinės fazės lašeliai susijungia į stambesnius lašelius – agregatus. Literatūroje šis procesas įvardijamas kaip koalescencija, todėl įvyksta visiškasis fazių atsiskyrimas. Jei susidaro stambesni emulsijos lašeliai, tokiu atveju įvyksta flokuliacija. Dėl flokuliacijos pasikeičia emulsijos patvarumas ir reologinės savybės. Kitas emulsijoms būdingas reiškinys yra emulsijos inversija, tai yra fazių apsikeitimas kurios metu emulsijos dispersinė fazė apsikeičia su dispersine terpe. Šis metodas dažnai taikomas emulsijų technologiniame gamybos etape [50, 51]. Kai emulsijos fazės nėra iki galo tinkamai sumaišytos ir yra labai skirtingi lašelių dydžiai, vyksta disproporcionavimas, kitaip vadinamas „Ostvaldo pokyčiu“. Tai priklauso nuo dispersinės fazės molekulių difuzijos iš mažesnių į didesnius lašelius per dispersinę terpę, kurios metu vieni lašeliai gali didėti, kiti mažėti arba visai išnykti [52].

Būdai padidinti daugianarių emulsijų stabilumą:

- Stabilizuoti vidinę V/A tipo emulsiją mechaniškai arba pridėti geresnių emulsiklių, sumažinančių lašelių dydį;
- Pakeisti aliejinės fazės prigimtį padidinant lipumą;
- Pridėti kompleksinių medžiagų į aliejų;

- Stabilizuoti vidinę ir išorinę emulsiją naudojant polimerinius emulsiklius, baltymus, polisacharidus ar koloidinius tirpalus [48, 49].

### 1.5.2. Įkapsuliavimui naudojamos medžiagos

Įkapsuliavimui naudojamos pagalbinės medžiagos, kurios užtikrina sistemų stabilumą didinant jų klampą ir tankį. Tai gali būti  $\kappa$ -karageninas, saldžiavaisio pupmedžio dervos mišinys, celiuliozės acetato ftalatas, alginatas, chitozanas ir želatina [38].

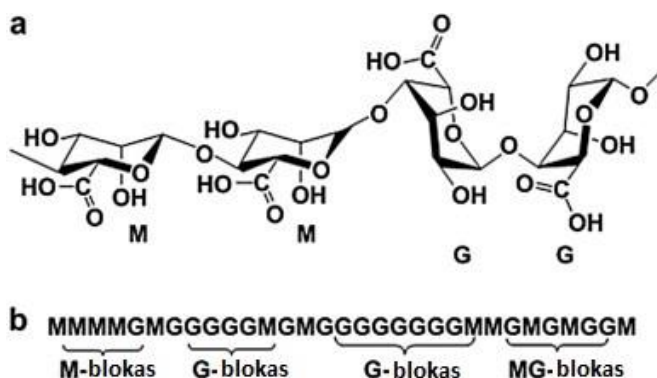
Polisacharidai naudojami kaip emulsijos stabilizatoriai, išplėsdami tam tikrą tinklą dispersinėje terpėje, kuri tampa klampi ir net gali susiformuoti gelį. Juos galima suskirstyti pagal jų kilmės šaltinį (natūralius ar sintetinius), hidrofobiškumą (hidrofobinį ar hidrofilinį) ir molekulinę masę (mažą arba didelę). Remiantis kilmės šaltiniu, dervos klasifikuojamos į: a) augalų eksudato gumą (įskaitant karaya gumą, arabišką gumą); b) sėklų gumą (įskaitant guaro gumą, saldžiavaisio pupmedžio gumą ir tamarindo dervą); c) mikrobinę gumą (kurią sudaro ksantano gumą, gelio gumą ir dekstrano gumą) ir d) jūrų dervos [53].

Bet kokia medžiaga, natūrali ar nenatūrali, kuri liečiasi su gyva struktūra yra skirta veikti kartu su biologine sistema. Tai apima natūralius ir sintetinius polimerus, kurie tiesiogiai liečiasi su gyvomis ląstelėmis, todėl jie turi būti biologiškai suderinami ir biologiškai skaidomi. Probiotikų įkapsuliavimas biologiškai skaidomoje polimero matricoje turi daug privalumų. Krio- ir osmosoprotektantai kaip apsaugos priemonė gali būti įtraukti į matricos sudėtį, taip padidinant ląstelių gyvybingumą saugojimo ir apdorojimo metu. Galiausiai kapsulės džiovinamos, paviršiaus danga keičia estetine ir sensorines produkto savybes ir užtikrina aukštą ląstelių apsaugą. Tai padeda ilgiau išlaikyti ląsteles kapsulės viduje bei prailginamas biomolekulių atsipalaidavimas [36].

Probiotinių mikroorganizmų įkapsuliavimas į polimerines sistemas yra nesunkus laboratorinis procesas, siekiant apsaugoti probiotikus nuo žemo pH ir didelės tulžies koncentracijos. Efektyvus kapsulės dangalas pagerina įkapsuliuotų medžiagų fizikines ir chemines savybes [54].

### Alginatas

Alginatas yra linijinis heteropolisacharidas, ekstrahuotas iš įvairių rūšių dumblių. Jis turi du struktūrinius vienetus, susidedančius iš dviejų monosacharidų:  $\alpha$ -L-gulurono rūgšties (G) ir  $\beta$ -D-manurono rūgšties (M), jos susietos su  $\beta$ -(1-4) glikozidiniais ryšiais (11 pav.). Alginatas yra plačiausiai naudojamas probiotinių bakterijų įkapsuliavimui, dažniausiai 0,5–4 % koncentracijų intervale [16].



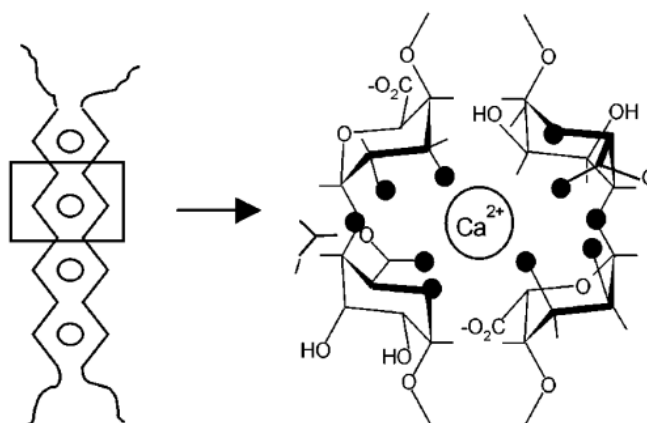
11 pav. Alginato struktūra: (a) grandinės konformacija ir (b) blokinis pasiskirstymas [16]

Pageidautina, kad alginata būtų kuo daugiau G-blokų, kurie užtikrina didesnę kapsulių mechaninį stabilumą. Jis yra netoksiškas įkapsuliuotoms ląstelėms ir priimtinas maisto pramonėje [38].

Alginato kapsulės privalumai:

1. lengvai suformuoja želatinines matricas aplink bakterijų ląsteles;
2. nėra toksiškas organizmui (saugūs ir biologiškai suderinami);
3. nebrangus
4. švelnios proceso sąlygos (pvzd. temperatūra);
5. lengvai pagaminamos;
6. ląstelės lengvai išlaisvinamos žarnyne [16].

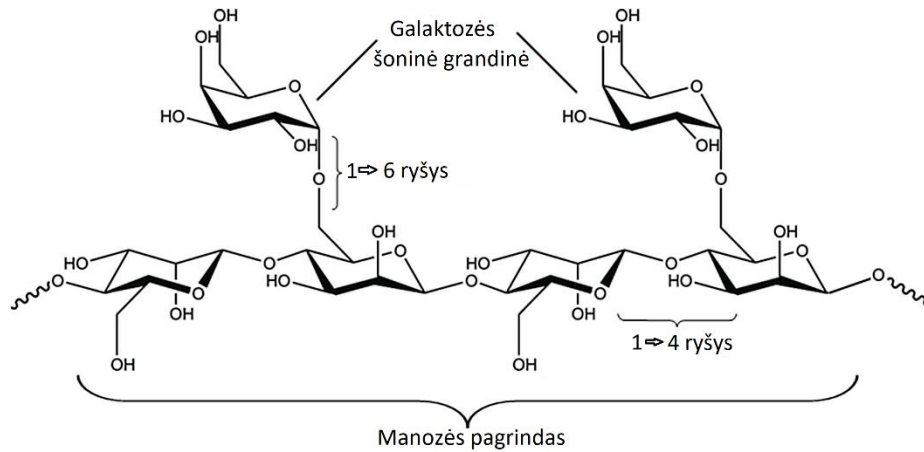
Alginato gelis susidaro dalyvaujant divalentiems jonams (kalcio jonas –  $\text{Ca}^{2+}$ ) (12 pav.) bei priklauso nuo blokų išsidėstymo. Dažniausiai divalentiniai jonai jungiasi su GG blokais, todėl įkapsuliavimui naudojamas alginatas, kuris turi didesnę kiekį guluroninės rūgšties. Jo vientisumas pablogėja kai yra veikiamas monovalentinių jonų, kurie absorbuoja kalcio jonus [35]. Esant didesnėms natrio alginato koncentracijoms, pasiekama geresnė bakterijų ląstelių apsauga. Biopolimerų (natrio alginato) koncentracijos didinimas, didina  $\text{Ca}^{2+}$  jonų jungimosi vietų skaičių, kuris užtikrina didesnę įkapsuliuojamų probiotinių bakterijų gyvybingumą. Alginatinės kapsulės gali būti naudojamos kaip saugi ir apsauginė terpė gyvybingų probiotinių bakterijų įkapsuliavimui [56].



12 pav. Alginato struktūrinė schema [57]

### ***Kiti polisacharidai***

Guaro derva – augalinės kilmės, guaro (*liet.* kampuotosios pupenės) guma yra polisacharidas, išgaunamas iš guaro krūmo (*Cyamopsis tetragonolobus*) sėklų. Guaro augalas yra iki metro aukščio, paprastai nuo 0,6 m iki 5–12,5 cm ilgio. Ją daugiausia sudaro manozės vienetai sujungti  $\beta$ -1,4 jungtimis, kurios prijungtos prie  $\alpha$ -1,6 galaktozės liekanų, kitaip dar žinomas kaip galaktomannanas [58]. Struktūrinė guaro gumos formulė pateikta 13 paveikslėlyje.



**13 pav.** Guaro gumos struktūrinė formulė [59]

Guaro derva yra didelės molekulinės masės, baltos arba gelsvos spalvos, bekvapė [53].

Daugumoje organinių tirpiklių, tokių kaip angliavandeniliai, riebalai, alkoholiai, esteriai ir ketonai netirpdo guaro gumos, ir tik keli ją tirpdo (pvz., formamidas). Vienintelis svarbus guaro gumos tirpiklis yra vanduo [53].

Guaro derva pasižymi dideliu tirpumu tik vandenyje. Vandeninėje fazėje manozės vienetuose esantys galaktozės vienetai sąveikauja su vandens molekulėmis ir sudaro molekulinės grandinės išsišakojimą, kuris padeda sutirštinti ir didinti tirpalo klampumą. Net ir 1 % guaro gumos gali padidinti kambario temperatūros vandeninio tirpalo klampumą. Guaro guma sudaro klampų koloidinį tirpalą. Tirpalas susidaro disperguojant guaro gumą karštame arba šaltame vandenyje panaudojant net labai mažus jos kiekius. Koncentracija, dispersija, pH ir temperatūros buvimas yra labiausiai įtakojantys kintamieji, turintys įtakos guaro dervos klampumui ir hidratacijos greičiui [53].

## 2. TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

Emulsijų gamybai naudotos medžiagos:

- distiliuotas vanduo;
- rafinuotas rapsų aliejus (Rukola, UAB „Vilnius“, Lietuva);
- Trigliceridai („Making Cosmetics“, USA);
- Emulsikliai: Tween 80 (Firma Chempur, Lenkija);
- Span 80 (Tokyo chemical industry, Japonija);
- Lecitinas (iš sojos pupelių), (Tokyo chemical industry, Japonija);
- Natrio alginatas (Sigma–Aldrich, Vokietija);
- Guar gum 5000 („Eligita“, Lietuva), Thixogum (Sigma–Aldrich, Vokietija), celiuliozė (Sigma–Aldrich, Vokietija);
- Probiotikai: *Lactobacillus plantarum F1*, *Lactobacillus reuteri 182* (Maisto mokslo ir technologijos katedra, Kauno technologijos universitetas, Lietuva);
- Prebiotikai: manitolis (Sigma–Aldrich, Vokietija), trehalozė (Sigma–Aldrich, Vokietija), inulinas („Myprotein“, Anglija), gliukomananas („Myprotein“, Anglija);
- Antioksidantas (šaltalankių (*Hippophae rhamnoides*) ekstraktas po CO<sub>2</sub>, 350 bar, 60 °C, 4 val. Maisto institutas, Kauno technologijos universitetas, Lietuva);
- Terpės: MRS Broth su Tween 80 („Biolife“, Italija);
- MRS Agar su Tween 80 („Biolife“, Italija).
- Kalio jodidas (KJ) (UAB „Eurochemicals“, Lietuva);

### 2.2. Pirminių V/A ir A/V emulsijų paruošimas su skirtingomis emulsiklių koncentracijomis

#### 2.2.1. Pirminės V/A emulsijos paruošimas

Emulsijai vanduo – aliejuje (V/A) atskirai paruošiamos vandeninės ir aliejinės fazės, t. y. jose ištirpinami emulsikliai. Kambario temperatūros (~20 °C) distiliuotame vandenyje ištirpinamas hirdofilinis emulsiklis Tween 80 (0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %) ir yra gaunama vandeninė fazė (V). Kambario temperatūros rapsų aliejuje tirpinami lipofiliniai emulsikliai Span 80 arba Lecitinas (0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %) – gaunama fazė (A). Abi fazės šildomos 40 °C vandens vonelėje („Witeg“ WSB-18, Vokietija). Tada į A fazę, nuolat maišant, labai lėtai lašinama V fazė, santykiu 6:4 (aliejus:vanduo) arba 7:3 (aliejus:vanduo). Emulsijų paruošimas buvo atliekamas su dvejais skirtingais įrenginiais, naudojant magnetinę maišyklę (MM) (*Stirr*) arba *Ultra Turrax IKA T-18 Basic* homogenizatorių (HOM) (Štraufenas, Vokietija). Maišymas truko 15 minučių esant 9000 aps/min., o homogenizacija 10 minučių esant 13000 aps/min.

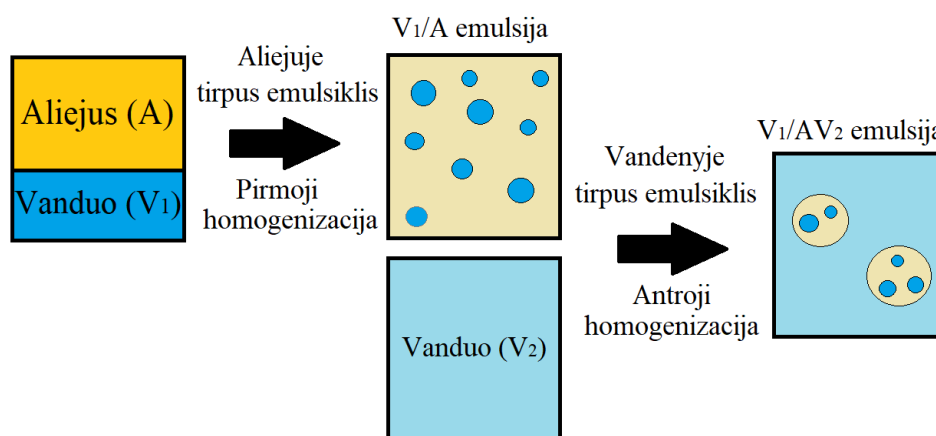
#### 2.2.2. Pirminės A/V emulsijos paruošimas

Emulsija aliejus-vandenyje (A/V) ruošiama analogiškai kaip ir V/A emulsija (2.2.1.) išskyrus tai, kad suvienodinus A ir V fazių temperatūras, A fazė lašinama į V fazę.

### 2.3. Daugianarių $V_1/A/V_2$ emulsijų stabilizuotų su skirtingomis emulsiklių koncentracijomis paruošimas

Atlikus vienasluoksnių emulsijų stabilumo tyrimus gravitaciniu metodu buvo įvertintos stabiliausios emulsijos ir su jomis ruošiamos daugianarės emulsijos. Daugianarių emulsijų gamyba susideda iš kelių etapų. Pradžioje yra paruošiamos atskiros vandens ( $V_1$  ir  $V_2$ ) fazės ir aliejaus (A) fazė.  $V_1$  fazė ruošiamą distiliuotame vandenyje ištirpinant 0,5 % polisacharidą (Guargum 5000, Thixogum arba celiuliozę) ir vandenyje tirpų (hidrofilinis) emulsiklį Tween 80 (0,5 %, 1 %, 2 %, 5 % arba 10 %). Lygiagrečiai ruošiamą A fazė ištirpinant lipofilinius emulsiklius Span 80 arba lecitiną (0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %) rapsų aliejuje.  $V_2$  fazei alginatas (1 % arba 2 %) brinkinamas distiliuotame vandenyje ant magnetinės maišyklės nuolat maišant ir alginato tirpalas paliekamas brinkti per naktį. Visos paruoštos fazės yra šildomos 40 °C temperatūros vandens vonelėje, kol susivienodina jų temperatūra.

Formuojant daugianarę emulsinę sistemą pirminei emulsijai turėtų būti taikomas didesnis maišymo greitis nei antro etapo metu [60]. Pirminės emulsijos  $V_1/A$  (vanduo-aliejuje) ruošimo metu į A fazę labai lėtai lašinama  $V_1$  fazė, kur A ir  $V_1$  fazių svorių santykis atitinkamai yra 6:4 ir 7:3, tada homogenizuojama su HOM 10 min. 13000 rpm greičiu.  $V_1/A/V_2$  emulsija ruošiamą, kai gauta vienasluoksnė emulsija iš lėto lašinama į  $V_2$  fazę santykiu 6:4 (išorinė vandens fazė :  $V_1/A$  emulsija). Daugianarė emulsija homogenizuojama su HOM 5 min. esant 8000 rpm greičiui. Principinė  $V_1/A/V_2$  schema pateikta 14 paveikslėlyje.



14 pav. Principinė  $V_1/A/V_2$  schema

### 2.4. Vienasluoksnių ir daugianarių emulsijų su skirtingais emulsikliais gravitacinis stabilumo nustatymas

Emulsijų gravitacinis stabilumas vertinamas pagal ją sudarančių fazių atsiskyrimą laikant jas statinėmis (laikymo) sąlygomis. Bandiniai po homogenizavimo ar maišymo buvo iškart supilti į sugraduotus 30 ml mėgintuvėlius, užkemšami kamščiais ir sudedami lygiagrečiai į stovą. Mėgintuvėliai laikyti kambario temperatūroje (~20 °C) ir stebimi numatytą laiką (2 paras). Praėjus numatytam laiko intervalui, sistemos stabilumas vertinamas pagal vandeninės ir aliejinės fazių atsiskyrimą, kuris išreiškiamas procentais nuo viso emulsijos tūrio. Emulsijų stabilumas buvo skaičiuojamas remiantis formule (1). Kuo mažesnis pirminės emulsijos išsisluksniavimas, tuo ji yra stabilesnė.

Visų emulsijų stabilumas buvo vertinamas po du pakartojimus.

$$C = 100 - \left( \frac{a-v}{100} \right), \% \quad (1)$$

čia:  $c$  – stabilumas, %;  $a$  – vandeninės ir aliejinės fazių atsiskyrimas, ml;  $v$  – paimto mėginio tirti kiekis, ml.

#### 2.4.1. Terminio apdoravimo būdu

Terminio stabilumo vertinimo pasiruošimas buvo atliekamas identiška kaip nurodyta 2.3. punkte, tačiau po paruošimo, daugianarės emulsijos buvo supilamos į 10 ml sugraduotus mėgintuvėlius. Šie sudėti į 70 °C vandens vonią ir laikyti 30 min. Mėgintuvėliai atvėsinti iki kambario temperatūros ir vertinamas atsiskyrusių fazių tūris, kuris išreiškiamas procentais nuo viso emulsijos tūrio.

#### 2.4.2. Užšaldymo-atšildymo ciklai

Bet koks užšaldymo ir atšildymo ciklas susideda iš užšalimo fazės ir atšildymo fazės. Įšaldymo procese dvigubos emulsijos buvo supiltos į sugraduotus mėgintuvėlius (vidinis skersmuo = 12 mm; aukštis = 100 mm), kurie buvo laikomi šaldiklyje 24 val.  $-20 \pm 2$  °C temperatūroje. Tada užšaldyti mėginiai buvo perkelti į termostatą, kurio temperatūra buvo 30 °C ir ten laikomi 2 valandas, kol sušaldytos fazės buvo visiškai atšildytos. Užšaldyti ir atšildyti mėginiai buvo gražinti į šaldiklį kitam šaldymo ir atšildymo ciklams, kol bus pasiektas bendras 3 ciklų skaičius [61]. Tarp kiekvieno ciklo užšaldytos ir atšildytos emulsijos buvo apibūdintos pagal stabilumą.

### 2.5. Daugianarių $V_1/A/V_2$ emulsijų charakterizavimas

#### 2.5.1. Mikrotekstūros vertinimas

Dvigubų emulsijų mikroskopinis stebėjimas atliktas (*Motic B1*, Vokietija) mikroskopu. Nedidelis lašelis dvigubos emulsijos paimamas su stikline lazdele ir uždedamas ant mikroskopinio objektyvio stiklelio. Bandinys imamas kaip galima atsargiau, norint išvengti dvigubos emulsijos struktūros suardymo. Mėginiai buvo švelniai uždengiami dengiamaisiais stikleliais ir mikroskopuojami per  $\times 100$  didinimo okuliarą. Sufokusuota emulsijų mikrostruktūra užfiksuota naudojant telefono skaitmeninę kamerą (iPhone X).

#### 2.5.2. Klampos tyrimai

Dvigubų emulsijų klampos matavimai atlikti 20 °C kambario temperatūroje su reometru (Physica MCR 301, Antron Paar GmbH, Graz, Austrija) naudojant cilindrinį kūną – kūgį. Besisukančio kūgio skersmuo 24,974 mm, jo pasvirimo kampas 1,997°. Prieš bandymą dvigubos emulsijos gerai išmaišomos stikline lazdele ir  $\sim 5$  g bandinio dedama ant darbinio paviršiaus tarp plokštelės ir kūgio. Gauti rezultatai pateikiami klampos priklausomybe nuo poslinkio greičio, kuris buvo didinamas nuo 10 iki 100  $s^{-1}$  [62].

Gautos Daugianarių emulsijų tekėjimo kreivės išreikštos reogramomis, kurios yra poslinkio įtempio priklausomybė nuo poslinkio deformacijos greičio, esant paprastam poslinkiui. Matavimai kiekvienam bandiniui buvo atliekami 3 kartus.

Tekėjimo kreivės buvo įvertintos pagal Ostwald de Waele jėgos dėsnio modelio lygtį (2):

$$\tau = k \dot{\gamma}^n \quad (2)$$



čia:  $\tau$  - šlyties įtempis, Pa;  $\gamma$  - deformacijos greitis,  $s^{-1}$ ;  $k$  – konsistencijos koeficientas, kuris yra klampos rodiklis;  $n$  – tekėjimo indeksas, kuris yra nuokrypio nuo niutoniniam skysčiams būdingų savybių rodiklis.

### 2.5.3. Dalelių dydis

Dalelių dydžio pasiskirstymas buvo nustatytas naudojant integruotą šviesos sklaidą lazeriniu difrakciniu spektrofotometru *Malvern Mastersizer 2000* (Malvern Instrument, Vusteršyras, Didžioji Britanija). Emulsijos buvo analizuojamos iš karto po paruošimo dviem pakartojimais. Prietaisas matuoja pagal Fraunhoferio difrakcijos principą, kai lygiagrečios monochromatinės lazerio šviesos spindulys (raudona šviesa  $\lambda = 633$  nm) apšviečia emulsiją. Emulsinių lašelių išsklaidyta šviesa suteikia stacionarų difrakcijos raštą, nepriklausomai nuo dalelių judėjimo. Kai dalelės patenka į apšviestą plotą ir iš jo išeina, difrakcijos modelis keičiasi ir visada atspindi momentinį dydžio pasiskirstymą apšviestoje srityje [62]. Dalelių skersmens diapazonas, specifinis paviršiaus plotas ir vidutinio skersmens matavimai buvo atlikti kambario temperatūroje. Kiekvienas bandinys buvo disperguotas distiliuotame vandenyje 1400 aps/min greičiu. Parametrai: rutulėlių absorbcija – 0,01, dispersinės fazės ir tirpiklio refrakciniai indeksai buvo atitinkamai 1,465 ir 1,33. Vidutinis aliejaus lašelių dydis išreikštas vidutiniu paviršiaus skersmeniu (atitinkamai pagal tūrį ir pagal paviršiaus plotą).

## 2.6. Oksidacinis stabilumas

### 2.6.1. Peroksidų skaičiaus nustatymas

Peroksidų skaičius (PS) parodo, kiek riebaluose yra junginių (peroksidų ar į juos panašių riebalų oksidacijos produktų), kuriuose analizės sąlygose oksidina jodidas. Tai svarbus riebalų kokybės rodiklis, iš jo sprendžiama apie riebalų sugedimo laipsnį.

Į 100 ml Erlenmejerio kolbą pasveriami maždaug 1 g mėginio, po to pridedama 25 ml 3:2 ledinės acto rūgšties : chloroformo tirpalo ir 0,5 ml prisotinto kalio jodido tirpalo. Laikoma 5 min tamsoje. Po to įpilama 75 ml distiliuoto vandens ir 0,5 ml 1% krakmolo indikatoriaus tirpalo ir mišinys titruojamas naudojant 0,001 N  $Na_2S_2O_3$  (natrio tiosulfatą) standartinį tirpalą. PS apskaičiuota pagal šią lygtį (3):

$$PS = \frac{(V_1 - V_0) \cdot c}{m} \cdot 1000, \frac{mekv}{kg} \quad (3)$$

Kur  $V_1$  – mėginio titravimui sunaudotas  $Na_2S_2O_3$  tūris,  $V_0$  – tuščiam bandiniui sunaudojamas  $Na_2S_2O_3$  tūris,  $c$  –  $Na_2S_2O_3$  koncentracija (mol/l) ir  $m$  – mėginio masė gramais.

## 2.7. Probiotikų paruošimas

*L. plantarum* ir *L. reuteri* probiotikų kultūros auginamos mėgintuvėliuose ant nuožulnios standžios terpės (MRS Broth su agar) ir laikomos termostatuose, tada mėgintuvėliai perkeliama į +4 °C šaldytuvą ir kas 6 savaites kultūros persėjamos į naujus mėgintuvėlius.

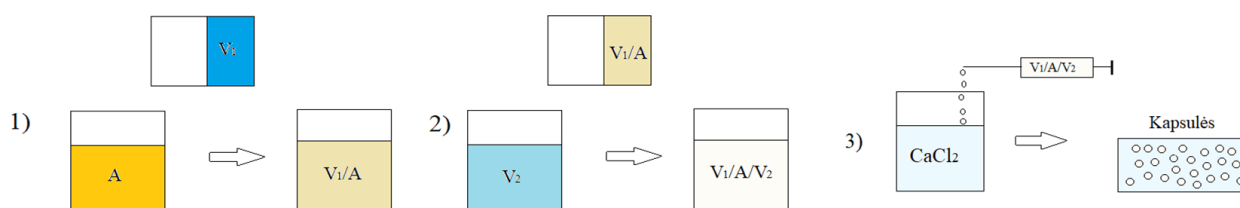
Bakterijos įnokuliuojamos į skystą terpę (MRS Broth su Tween 80) ir laikomos 30 °C (*L. plantarum*) ir 37 °C (*L. reuteri*) temperatūrose termostatuose 24 valandas. Ląstelės +4 °C temperatūroje centrifuguojamos steriliuose plastikiniuose mėgintuvėliuose centrifuga (*Centrifuge MPW-260RH*) 6000 rpm greičiu 10 min. Surinktos kultūros plaunamos steriliu distiliuotu vandeniu ir naudojamos tolimesniems tyrimams, kurie aprašyti kituose skyriuose.

## 2.8. Probiotinių bakterijų augimas su prebiotikais

Likus 24 val. iki tyrimo pradžios bakterijos persėjamos nuo standžios terpės į skystą terpę ir laikomos 30 °C (*L. plantarum*) ar 37 °C (*L. reuteri*) temperatūros termostatuose. Probiotinių bakterijų augimas kartu su prebiotikais fiksuojamas po 0 val., 6 val., 12 val., 24 val ir po 48 val. Ląstelių augimas buvo skaičiuojamas pagal standartinį lėkštelių metodą. 1 ml mėginio buvo pilama į 9 ml 0,85 % NaCl druskos tirpalą (skiediklį) ir tada serijiniu būdu daromi skiedimai. Iš kelių paskutinių skiedimų po 1 ml mėginio perkeliama į petri lėkšteles ir užpilama MRS Agar Broth terpe. Lėkštelės inkubuojamos 30 °C ir 37 °C temperatūrose ir po 48 val. skaičiuojamos užaugusios kolonijos išreikštos, kaip KVS/ml.

## 2.9. *L. plantarum* įkapsuliavimas į alginatines kapsules

Kapsulės buvo paruoštos naudojant kombinuotą metodą – emulsinimą ir ekstruziją. Pirmiausiai buvo sudarytos stabilios daugianarės emulsijos (2.3.) su ląstelėmis, prebiotikais ir augalų ekstraktais. Tada daugianarė emulsija buvo lašinama į 1 % kalcio chlorido ( $\text{CaCl}_2$ ) tirpalą (15 pav.) ir taip susidaro alginatinės kapsulės. Kalcio chlorido koncentracijos didinimas nėra svarbus didinant kapsulių ląstelių gyvybingumą [56], todėl parenkamas 1 % koncentracija. Kapsulės kalcio chlorido tirpale buvo tinklinamos 5 min, 10 min, 20 min ir 30 min.



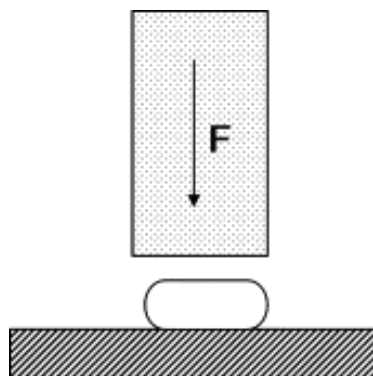
15 pav. Kapsulių gamybos schema

Gautos kapsulės turi skystą šerdį su vandens lašeliais, kuriuose yra prebiotiko ir probiotiko mišinys, šie lašeliai disperguojami aliejuje su augalų ekstraktu. Ir visa tai yra apsupta polisacharidinės (alginatas) membranos. Kapsulės gali būti didelės (> 1 mm skersmens) ir mikrokapsulės (< 0,2 mm skersmens) [64]. Didesnės alginato (1–3 mm) kapsulės geba geriau apsaugoti bakterijų ląsteles [65].

Kalcio alginato kapsuliaciją gali būti veikiami įvairių veiksnių, pvz., kapsulės dydis, alginato koncentracija ir kietėjimo laikas kalcio chlorido tirpale [66].

## 2.10. Kapsulių kietumo analizė

Kapsulių kietumo analizė buvo atliekama iškart po kapsulių gamybos kambario temperatūroje (20±2 °C). Kietumas matojamas 5 min, 10 min ir 30 min laiko tinklintoms kapsulėms. Kapsulių mechaninės savybės tiriamos naudojant tekstūros analizatorių *Instron 5564* (Godlmingas, Jungtinė Karalystė). Analizuotų kapsulių skersmuo – 2 mm; suspaudimas Y ašies kryptimi 30 % nuo pradinio mėginio aukščio; prietaisas turi 30 kg apkrovos elementą; greitis matavimo metu – 1 mm/s (16 pav.) [67]. Gauti rezultatai išreikšti kapsulių kietumu (N). Vieno mėginio matavimai atlikti penkis kartus.



16 pav. Kapsulės suspaudimo jėga (F)

### 2.11. Probiotikų gyvybingumas daugianarėse emulsijose bei alginatinėse kapsulėse

Probiotikų gyvybingumas buvo nustatomas kiekviename daugianarių emulsijų paruošimo etape (grynos kultūros suspensijos, po viengubos emulsijos ir daugianarės emulsijos homogenizavimo).

Taip pat gyvybingų bakterijų skaičius buvo nustatomas polisacharidinėse (alginatinėse) kapsulėse laikymo metu. Tikėtasi, kad skirtingas tinklinimo laikas turi įtakos probiotinių bakterijų gyvybingumui.

Ląstelių gyvybingumas buvo skaičiuojamas pagal standartinį lėkštelių metodą, kuris aprašytas 2.7. punkte.

### 2.12. Virškinimas IN VITRO

Įkapsuliuotų probiotikų gyvybingumas buvo vertinamas *in vitro* imituotose virškinimo trakto sąlygose pagal Minekus ir kt. (2014) metodiką. [68].

Darbo eiga:

#### Sulčių ir fermentų paruošimas

– Baziniai ir darbiniai tirpalai:

SSF – Simuliuotos Seilių Sultys (Simulated salivary fluid);

SGF – Simuliuotos Skrandžio Sultys (Simulated Gastric Fluid);

SIF – Simuliuotos Žarnyno Sultys (Simulated Intestinal Fluid).

Sulčių ruošimo eiga nurodyta 3 lentelėje.

3 lentelė. Darbinių ir bazinių virškinimo sulčių paruošimas

			Darbiniai Virškinimo Tirpalai		
			SSF (pH=7) Burnos fazė	SGF (pH=3) Skrandžio fazė	SIF (pH=7) Žarnyno fazė
Druskų baziniai tirpalai (DBT)	DBT konc. (g/l)	DBT konc. (M)	DBT kiekiai, ml	DBT kiekiai, ml	DBT kiekiai, ml
KCl	46,7	0,6	10	28	5,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	0,5	20	0,9	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	84	1	4	6,5* (2M)	42,5* (0,5M)

			Darbiniai Virškinimo Tirpalai		
			SSF (pH=7) Burnos fazė	SGF (pH=3) Skrandžio fazė	SIF (pH=7) Žarnyno fazė
NaCl	116	2	1	10	8
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30,5	0,15	1	2	1,1
<b>pH koregavimui</b>					
NaOH	39,99	1	4	-	0,5
HCl	36,46	1	1	3	0,3
Tirpalai praskiedžiami iki 500 ml ir užšaldomi -20 °C					

\*Naudojama tokia druskų bazinių tirpalų koncentracija, kokia parašyta skliausteliuose

Pastaba: M Minekus et al. (2014) virškinimo protokole pH koregavimui naudojami 1 mol/l NaOH ir 6 mol/l HCl tirpalai.

- Tulžies druskų, fermentų, CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> paruošimas:

Kadangi darbiniai virškinimo tirpalai skiedžiami iki 500 ml, todėl fermentai ir druska turi būti tirpinama virškinimo sultyse, o ne distiliuotame vandenyje.

Ruošimo eiga nurodoma 4 lentelėje.

**4 lentelė.** Tulžies druskų, lipazės ir pepsino paruošimas

	Tulžies drusk.	Lipazė	Pepsinas	CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	Pankreatinas
Tirpalo konc.	10 mM	1000 U/ml	2000 U/ml	588 g/L	100 U/ml
Kur tirpinama	SIF	SIF	SGF	Dist. H <sub>2</sub> O	SIF
Kiek atsverinama	0,108 g	4 g	1,143 g	29,4 g	2,72 g

Pastaba: Prieš sveriant medžiagos kiekį, norint pasiekti reikiamą koncentraciją, būtina nustatyti tulžies druskos koncentraciją, lipazės, pepsino ir pankreatino aktyvumą pagal nurodymus. Gautus rezultatus proporciškai apskaičiuojame reikiamui tirplai gaminti.

### Produkto paruošimas virškinimui *in vitro*

Virškinimas atliekamas su ląstelių suspensija (*L. reuteri*), dviguba emulsija ir kapsulėmis. Virškinamiems produktams papildomo paruošimo nereikia. Kiekvienam bandiniui reikalingi po 2 užsukamus stiklainiukus, kiekviename iš jų turi būti po 5 g virškinamo produkto.

### Virškinimo etapai

Mėginiai paruošiami virškinimui. Kiekviename mėgintuvėlyje turi būti po 5 g tiriamojo mėginio ir po 2 g tiklinių rutuliukų (~5 vnt.). Mėginiai pažymimi sutartiniais ženklais, nurodančiais produkto pavadinimą, ir išėmimo etapais.

- Burnos virškinimo etapas

Virškinimo metu fermentai nėra dedami dėl nedidelio angliavandenių skaičiaus mėginiuose, tačiau burnos fazė imituojama, pilamas SSF ir virškinimas šiame etape vyksta 2 min. Burnos fazė imituojama visuose mėginiuose. Tirpalų supylimo eiga nurodyta 5 lentelėje.

**5 lentelė.** Burnos virškinimo etapas

Žingsnis	Medžiaga	Kiekis	Komentaras
1	Tiriamasis mėginys	5 g	-
2	SSF elektrolitų tirpalas	4,9975 ml	Tirpalas turi būti pašildytas iki 37 °C
3	CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2,5 µl	-
Galutinis tūris 10 ml			
4	Inkubuojama 2 min. 37 °C vandens vonelėje 150 rpm		

– Skrandžio virškinimo etapas

Skrandžio fazė imituojama visuose mėginiuose. Tirpalų supylimo eiga nurodyta 6 lentelėje.

**6 lentelė.** Skrandžio virškinimo etapas

Žingsnis	Medžiaga	Kiekis	Komentaras
1	SGF elektrolitų tirpalas	8 ml	Tirpalas turi būti pašildytas iki 37 °C
2	CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0,15 µl	-
3	6 M HCl	Fiksuoti kiekį užrašuose	pH koreguojamas iki 2-3
4	Pepsinas	1 ml	1 mililitre turi būti toks fermento kiekis, kad visame tūryje t. y. 20 ml būtų 2000 U/ml
5	SGF elektrolitų tirpalas	Praskiedžiama iki 20 ml	Reikiamas kiekis perskaičiuojamas ir įpilama tiek tirpalo, kad galutinis tūris būtų 20 ml.
6	Virškinimas skrandžio fazėje vyksta 120 min. 37 °C vandens vonelėje 150 rpm		

– Žarnyno virškinimo etapas

Žarnyno fazė imituojama likusiuose mėginiuose. Tirpalų supylimo eiga nurodyta 7 lentelėje.

**7 lentelė.** Žarnyno virškinimo etapas

Žingsnis	Medžiaga	Kiekis	Komentaras
1	SIF elektrolitų tirpalas	7 ml	Tirpalas turi būti pašildytas iki 37 °C
2	1 M NaHCO <sub>3</sub>	Fiksuoti kiekį užrašuose	pH koreguojamas iki 7 Rekomenduojama didesnė konc., kad bendras galutinis tūris neviršytų 40 ml
3	CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3 µl	-
4	Tulžies druskos		1 mililitre turi būti tokia koncentracija, kuri visame tūryje t. y. 40 ml būtų 10 mM
5	Lipazė	1 ml	1 mililitre turi būti toks fermento aktyvumas, kad visame tūryje t. y. 40 ml būtų 2000 U/ml
6	Pankreatinas	1 ml	-
7	SIF elektrolitų tirpalas	Praskiedžiama iki 40 ml	Reikiamas kiekis paskaičiuojamas ir įpilama tiek tirpalo, kad galutinis tūris būtų 40 ml
8	Virškinimas žarnyno fazėje vyksta 120 min. 37 °C vandens vonelėje 150 rpm		

Visi tyrimai buvo atlikti po du pakartojimus.

### **2.13. Statistinė analizė**

Tyrimų metu gauti duomenys buvo apdoroti naudojant programinį statistinį duomenų paketą „Statistica 8.0.550“ ir „Microsoft® Office Excel 2016“ programą. Visi bandymai kartoti po du kartus, o rezultatai pateikti kaip vidutinė reikšmė su standartiniais nuokrypiais  $\pm$ , kai statistinis patikimumas ( $p < 0,05$ ). Skirtumai reikšmingi ir laikomi patikimais, kai  $p < 0,05$ .

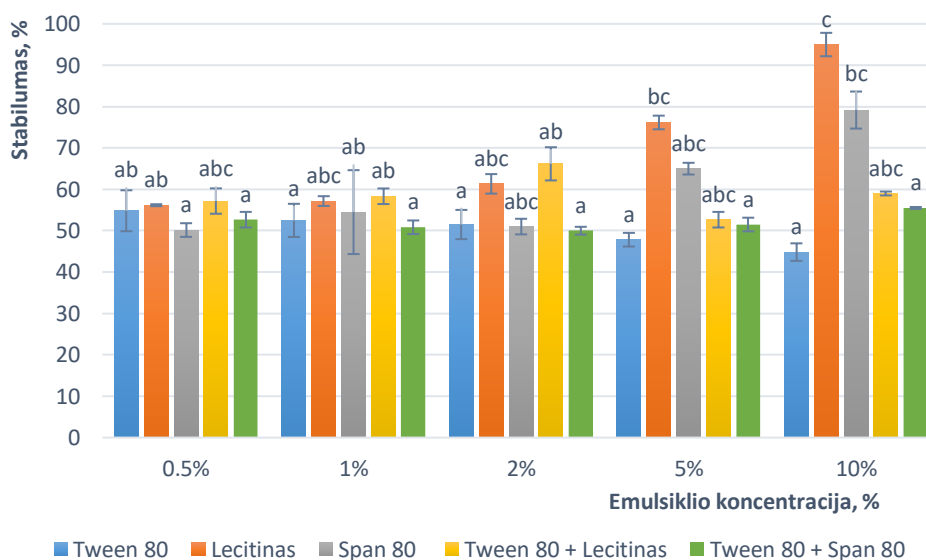
### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Emulsijų A/V paruošimas ir jų stabilumo vertinimas

Darbo tikslas buvo įvertinti skirtingų emulsiklių bei skirtingų fazių santykių įtaką V/A ir A/V emulsijų stabilumui. Taip pat įvertinti skirtingus maišymo greičio intensyvumus. Darbo eigoje buvo naudotas Tween 80, Span 80, Lecitinas, Tween 80 + lecitinas bei Tween 80 + Span 80 emulsikliai. Emulsijų nestabilumas gali pasireikšti dėl laisvos energijos pertekliaus [69]. Stabilumas priklauso nuo naudojamo lipofilinio (aliejinėje fazėje) ir hidrofilinio (vandens fazėje) emulsiklių prigimties ir jų koncentracijos [70], todėl labai svarbu parinkti tinkamus emulsiklius bei jų koncentracijas.

Tirtų emulsijų stabilumas buvo vertinamas gravitaciniu metodu. Emulsijų A/V gravitacinis stabilumo vertinimas buvo atliktas jas plakant su MM ir HOM.

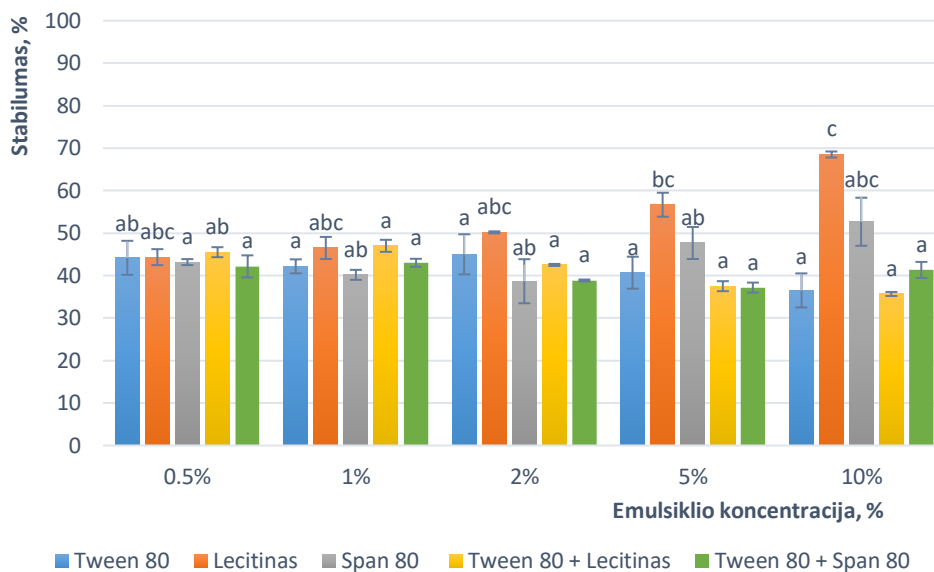
Pirmiausiai buvo atliktas A/V emulsijų, pagamintų naudojant MM, gravitacinio stabilumo vertinimas 6:4 santykiu (vanduo:aliejus). Gauti rezultatai pateikti 17 pav.



**17 pav.** Emulsijų A/V gravitacinio stabilumo rezultatai vandens ir aliejaus santykiu 6:4 (plakta su magnetine maišykle)

Kaip matyti iš pateiktų rezultatų, buvo nustatyta, kad su magnetine maišykle plakus emulsijas vandens ir aliejaus 6:4 fazių santykiu, stabiliausios emulsijos buvo gautos su lecitino emulsikliu. Didinant emulsiklio koncentraciją, emulsijų stabilumas taip pat didėjo: esant 0,5 % lecitino, emulsijos stabilumas siekė 54,17 %, o su 10 % emulsiklio priedu – net 95 %. Atitinkamai emulsijų stabilumas didėjo ir su Span 80 emulsikliu, didinant jo koncentraciją, emulsijų stabilumas didėjo. Emulsijos su emulsikliu Tween 80 stabilumas sumažėjo 10 %, kai emulsiklių koncentracija didėjo nuo 0,5 % iki 10 %. Per didelis emulsiklio koncentracijos kiekis gali turėti neigiamą poveikį emulsijos stabilumui [71]. Emulsijų stabilumas su dviejų skirtingų emulsiklių mišiniu, Tween 80 + lecitinas ir Tween 80 + Span 80, didėjo nuo 0,5 % iki 2 %, o didinant šių emulsiklių koncentracijas nuo 5 % – 10 %, jų stabilumas mažėjo. Statistiškai didžiausią reikšingumą turėjo ( $p < 0,05$ ) emulsija pagaminta su 10 % lecitino emulsikliu.

Taip pat buvo atliktas A/V emulsijų gravitacinio stabilumo vertinimas naudojant vandens ir aliejaus 7:3 fazių santykį. Jų gauti rezultatai pateikti (18 pav.) stulpelinėje diagramoje.



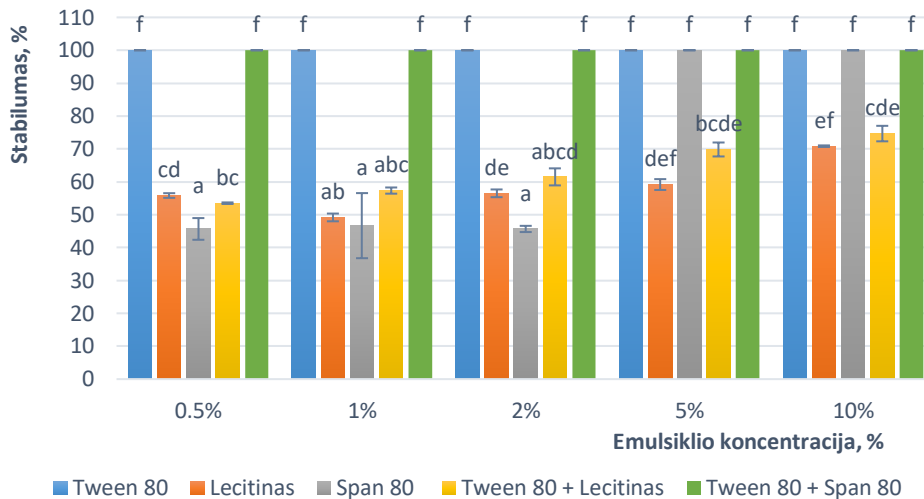
**18 pav.** Emulsijų A/V gravitacinio stabilumo rezultatai vandens ir aliejaus santykiu 7:3 (plakta su magnetine maišykle)

Nustatytas didžiausias emulsijų stabilumas su lecitinu, kai jo koncentracija yra 10 %, tada emulsijos stabilumas siekia 68,5 %. Emulsijų stabilumas priklauso nuo naudojamo emulsiklio koncentracijos, tai yra didėjant lecitino, Span 80 bei Tween 80 + Span 80 emulsiklių koncentracijai didėja ir emulsijų stabilumas. Emulsijos su lecitinu stabilumas padidėjo 24,17 % koncentracijų intervale nuo 0,5 % iki 10 %, o Span 80 padidėjo 14 %. Tween 80 + Span 80 – padidėjo 2,83 % intervale nuo 0,5 % iki 5 %, kai šių emulsiklių koncentracija buvo 10 %, tai emulsijos stabilumas sumažėjo 4,16 %. Emulsijų stabilumas mažėjo, kai buvo naudojamas Tween 80, bei Tween 80 + lecitinu. Su Tween 80 stabilumas sumažėjo 8,5 % nuo 0,5 % iki 10 % koncentracijos, o su Tween 80 + lecitinas – 11,33 %. Statistiškai reikšminga ( $p < 0,05$ ) emulsija gauta su lecitino emulsikliu, kai naudojama koncentracija buvo 10 %.

Lyginant emulsijų su skirtingais vanduo:aliejus santykiais gravitacinį stabilumą, nustatyta, kad emulsijos, kuriose vandens:aliejaus santykis buvo 6:4 buvo stabilesnės. Tai yra kuomet vandens:aliejaus santykis buvo 6:4 gauta stabiliausia emulsija 95 %, o prie 7:3 santykio – 68,5 %.

Emulsijų A/V gravitacinis stabilumo vertinimas buvo atliktas jas plakant su HOM. Gauti rezultatai pateikti 19 pav.

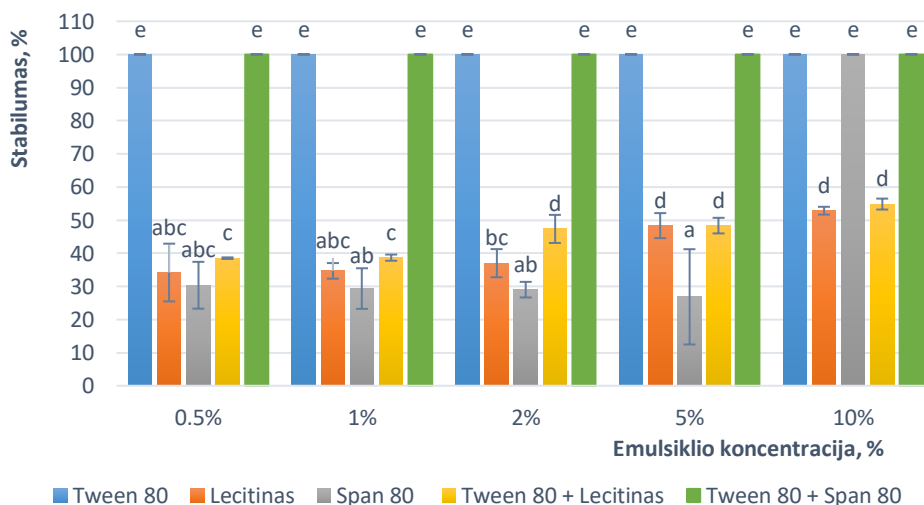




**19 pav.** Emulsijų A/V gravitacinio stabilumo rezultatai vandens ir aliejaus santykiu 6:4 (plakta su homogenizatoriumi)

Kaip matyti iš pateiktų rezultatų visiškai stabilios emulsijos (kuomet fazių santykis buvo 6:4) gavosi naudojant Tween 80 emulsiklį ir Tween 80 + Span 80 – emulsijų stabilumas buvo 100 % ( $p < 0,05$ ). Span 80 pridėjimas į emulsijas kartu su Tween 80 išliko nepakitęs, nors Span 80 emulsiklis linkęs sudaryti V/A tipo emulsijas [72]. Emulsijos visiškai neišsisluoksniavo. Didinant lecitino koncentraciją nuo 0,5 % iki 1 % emulsijų stabilumas didėjo (49,17 %, 55,83 %), o pasiekus nuo 2 % iki 10 % koncentraciją, emulsijos taip pat gavosi 100 % stabilios. Didinant Span 80 koncentraciją nuo 0,5 % iki 2 % emulsijų stabilumas taip pat didėjo (atitinkamai 44 %, 45 % ir 47,33 %). Padidėjus Span 80 emulsiklio koncentracijai iki 5 % ir 10 % emulsijos taip pat tapo visiškai stabilios. Naudojant Tween 80 + lecitino emulsiklius visiškai stabilių emulsijų išgauti nepavyko, tačiau didinant šių emulsiklių koncentracijas nuo 0,5 % iki 10 %, emulsijų stabilumas padidėjo 21,17 %.

Taip pat buvo plaktos emulsijos su homogenizatoriumi, santykiu 7:3 (vanduo:aliejus). Ir atliktas emulsijų gravitacinis stabilumas. Gauti rezultatai pateikti 20 pav.



**20 pav.** Emulsijų A/V gravitacinio stabilumo rezultatai vandens ir aliejaus santykiu 7:3 (plakta su homogenizatoriumi)

Emulsijų stabilumas didėjo keliant lecitino ir Tween 80 + lecitino emulsiklių koncentracijas, tačiau stabilių emulsijų gauta nebuvo. Emulsijos su Span 80 taip pat stabilumas didėjo esant didesnei emulsiklio koncentracijai. Didinant Span 80 koncentraciją iki 10 % emulsija tapo visiškai stabili. Pilnai stabilios emulsijos gavosi naudojant Tween 80 bei Tween 80 + lecitino emulsiklius ( $p < 0,05$ ). Jokio atsiskuoksnio nebuvo matyti. Emulsijos, pagamintos naudojant Tween 80, turi didesnį stabilumą nei naudojant Span 80 ar Lecitiną ir todėl gali būti naudojamos produktuose, kuriems reikalingas didelis stabilumas [70].

Emulsijų su lecitinu stabilumas priklausė nuo jo koncentracijos. Žinoma, kad dėl didesnio maišymo intensyvumo (greitis per minutę) ir didesnės emulsiklio koncentracijos susidaro mažesni lašeliai, stabilesnės emulsijos ir inversijos intervalai, turintys tą patį kiekį disperguotos fazės. Maišymas didelius lašelius paverčia mažesniais ir taip padaro emulsiją stabilesne ir homogeniškesne [70]. Lyginant emulsijas tarpusavyje plaktas su HOM, daugiau stabilių emulsijų gavosi naudojant vandens ir aliejaus 6:4 santykį. Tad parinkus tinkamus komponentų kiekius bei santykius galima gauti stabilias emulsijas. A/V stabilių ir nestabilių emulsijų suvestinė, kurios homogenizuotos su HOM, pateikta 8 lentelėje.

**8 lentelė.** A/V stabilių ir nestabilių emulsijų suvestinė

Fazių santykis Koncentracija	6:4					7:3				
	0,5 %	1 %	2 %	5 %	10 %	0,5 %	1 %	2 %	5 %	10 %
Emulsiklis										
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecitinas	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Span 80	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Tween 80 + Lecitinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80 + Span 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ žymimi mėginiai, kuriuose fazių atsiskyrimas nepasireiškė

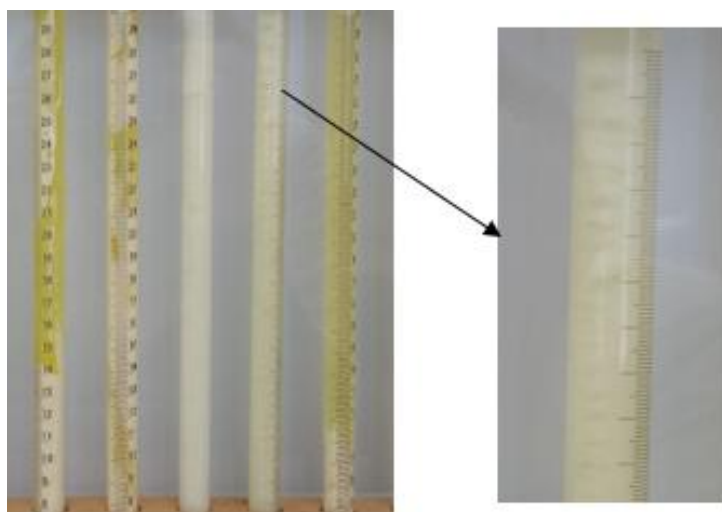
- žymimi mėginiai, kuriuose fazių atsiskyrimas pasireiškė

Atsižvelgiant į gautus rezultatus, mano atliktuose tyrimuose nustatyta, kad emulsijų stabilumas priklauso ne tik nuo naudojamo emulsiklio bei jo koncentracijos parinkimo, bet ir nuo maišymo mechaninės jėgos bei parinktų aliejaus ir vandens santykių. Lyginant HOM ir MM – emulsijos yra stabilesnės plakant su HOM. Plakant su MM nebuvo gauta nei viena 100 % stabili A/V emulsija, priešingai nei su HOM.

### 3.2. V/A emulsijų stabilumo vertinimas

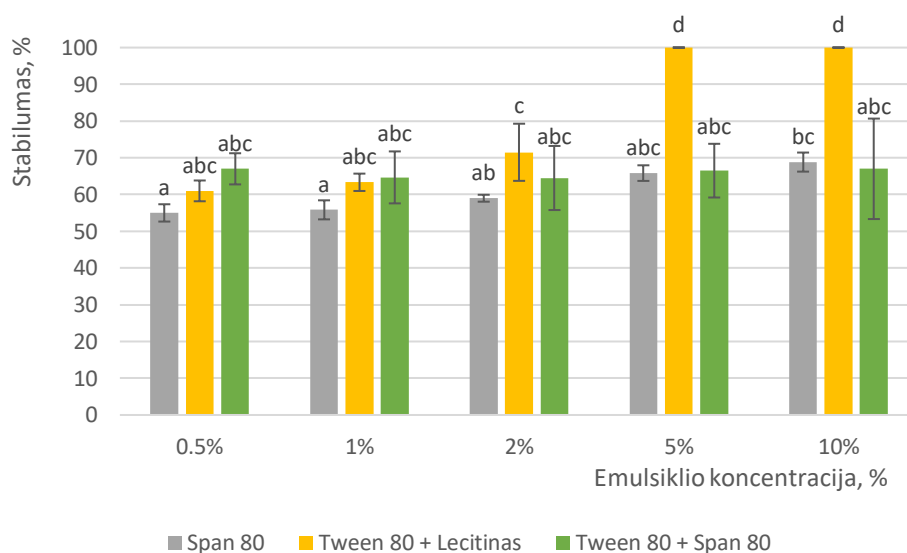
Kadangi su magnetine maišykle stabilių A/V emulsijų nebuvo išgauta, tad V/A emulsijos buvo plaktos tik su homogenizatoriumi.

Kai emulsikliai Tween 80 ir Lecitinas naudojami atskirai, emulsijų su jais suplakti nepavyko. Emulsijos nebuvo vienodos struktūros, aiškiai matėsi, kad išsisluoksnio sudarydamos dribsnius. 21 paveikslėlyje parodyta V/A emulsijos plaktos su skirtingomis Tween 80 emulsiklio koncentracijomis (0,5 %, 1 %, 2 %, 5 % ir 10 %).



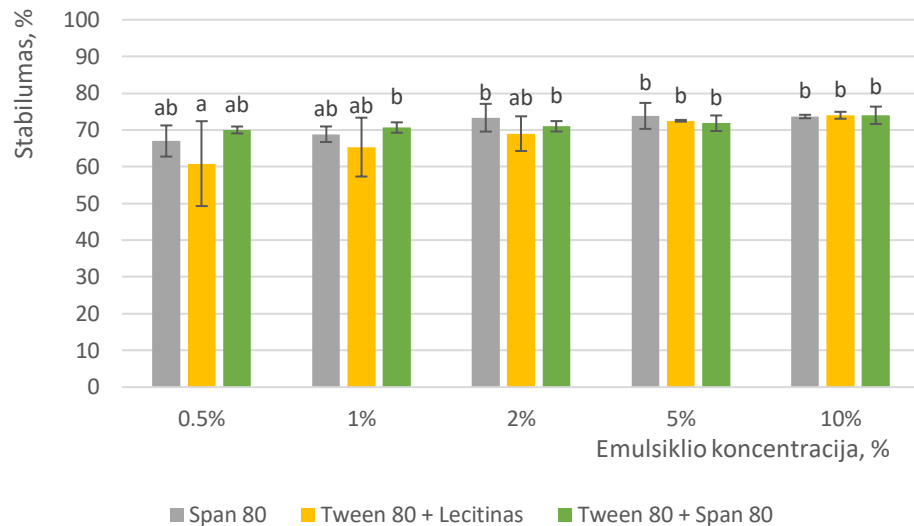
**21 pav.** V/A emulsijos plaktos su Tween 80 emulsikliu.

22 ir 23 pav. pateikti rezultatai, kai V/A emulsijos plaktos atitinkamai 6:4 ir 7:3 (aliejus:vanduo) santykiais.



**22 pav.** Emulsijų V/A gravitacinio stabilumo rezultatai aliejaus ir vandens santykiu 6:4

Nustatyta, kad emulsijų stabilumas priklausė nuo emulsiklio koncentracijos, tai yra kuo didesnė emulsiklių koncentraciją, tuo emulsijos stabilesnės. Didinant Tween 80 + lecinino emulsiklių koncentraciją nuo 0,5 % iki 2 %, emulsijų stabilumas padidėjo 10,5 %, o 5 % ir 10 % koncentracijos po 2 parų buvo stabilios, išsisluoksniavimo nebuvo. Tween 80 ir lecitinas nėra efektyvūs emulsikliai, kai jie naudojami atskirai (21 pav.), tačiau Tween 80 + lecitino mišinys yra tinkamas plakant tiek A/V, tiek V/A emulsijas. Naudojami kartu sudaro stabilias emulsijas 5 % ir 10 % koncentracijose ( $p < 0,05$ ), dėl žemo paviršiaus įtempio kai emulsiklių uodegėlės glaudžiai susimaišo [73].



**23 pav.** Emulsijų V/A gravitacinio stabilumo rezultatai aliejaus ir vandens santykiu 7:3

Emulsijos su Span 80 stabilumas taip pat didėjo didinant emulsiklio koncentraciją, tačiau stabilių V/A emulsijų nebuvo gauta. Emulsijų, pagamintų su Tween 80 + Span 80 emulsiklių mišiniu, stabilumas siekė 64 – 65 % nepriklausomai nuo jų panaudotos koncentracijos emulsijoje, tai yra stabilių emulsijų nebuvo gauta. Statistiškai gautos emulsijos reikšmingumo neturėjo ( $p < 0,05$ ).

Pagal gautus rezultatus galima teigti, kad 100 % visiškai stabilių emulsijų nebuvo gauta. Po 2 parų visos emulsijos išsisluko ir atsiskyrė vandeningą fazę nuo aliejinės fazės. Naudojant Span 80 emulsiklį stabiliausia V/A emulsija gavo, kai buvo naudojama jo 5 % koncentracija, stabilumas siekė 73,8 %. Naudojant 10 % koncentracijas Tween 80 + Span 80 ir Tween 80 + Lecitinas abejais atvejais stabilumas siekė 74 %.

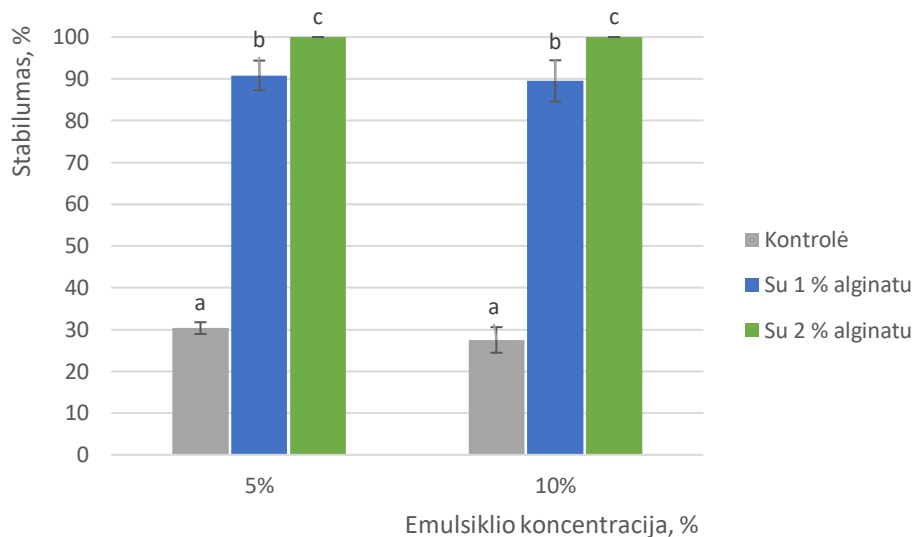
Rezultatai parodė, kad Tween 80 emulsiklis sudaro stabilesnes A/V emulsijas, o lecitinas su Span 80 – V/A emulsijas. Lecitinas naudojamas atskirai užtikrina žemą A/V emulsijų stabilumą dėl žemo HLB ir dėl tirpumo aliejuje, tai ir skatina V/A emulsijų susidarymą, o ne A/V remiantis Bankrofto taisykle [73]. Ši taisyklė teigia, kad fazė, kurioje emulsiklis yra labiau tirpus, yra nuolatinė fazė. Vandenyje tirpūs emulsikliai linkę sudaryti A/V emulsijas, o aliejuje tirpūs emulsikliai – V/A emulsijas. Todėl naudojami kartu emulsikliai su skirtingais HLB sudaro patvaresnes ir stabilesnes emulsijas [74].

Emulsijų stabilumas priklauso nuo mechaninės jėgos, naudojamų emulsiklių bei nuo parinktų aliejaus ir vandens santykių.

### 3.3. Daugianarių emulsijų $V_1/A/V_2$ paruošimas ir jų stabilumo vertinimas

Daugianarėms  $V_1/A/V_2$  ( vanduo-aliejuje-vandenyje) emulsijoms suplakti reikalingos stabilios V/A (vanduo-aliejuje) emulsijos. Po V/A emulsijų stabilumo vertinimo buvo atrinktos stabiliausios emulsijos ir iš jų plakamos daugianarės emulsijos. Iš anksčiau atliktų tyrimų matyti, kad stabilios gavo V/A emulsijos, santykiu 6:4, kai buvo naudojami kartu maišyti emulsikliai Tween 80 + lecitinas, kurių koncentracijos buvo 5 % bei 10 %.

Buvo pagaminti 3 mėginiai, pirmas – kontrolė, kai  $V_2$  fazėje yra distiliuotas vanduo, į kitų dviejų  $V_2$  fazę buvo pridėtas 1 % bei 2 % alginatas. Pridėjus šio polisacharido, daugianarės emulsijos tapo stabiliomis. Daugianarių emulsijų stabilumas po 2 dienų su Tween 80 + lecitino emulsikliais ir ( $V_2:V_1/A$ ) 6:4 santykio kitimas pateiktas 24 pav.

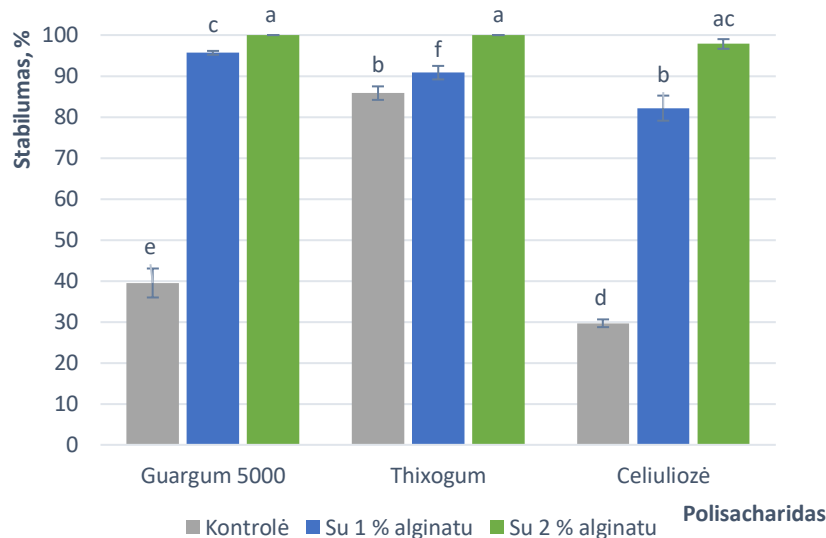


**24 pav.** Daugianarių emulsijų gravitacinio stabilumo rezultatai santykiu 6:4 ( $V_2:V/A$ )

Kaip matyti iš pateiktų rezultatų, daugianarių emulsijų stabilumas nepriklauso nuo emulsiklių (Tween 80 + lecitinas) koncentracijos. Tačiau pridėjus į  $V_2$  fazę alginato, daugianarės emulsijos tapo žymiai stabilesnės, nei kontrolinės emulsijos. Esant 5 % ir 10 % Tween 80 + lecitino emulsiklių mišinio koncentracijai ir 1 % alginato tirpalo išorinėje fazėje, po 2 dienų emulsijų fazės atsiskyrė. Tačiau padidinus alginato tirpalo koncentraciją iki 2 %  $V_2$  fazėje esant tiek 5 %, tiek 10 % emulsiklių koncentracijoms, gautos stabilios daugianarės emulsijos ( $p < 0,05$ ), tai yra stabilumas siekė 100 % laikant jas kambario temperatūroje 2 paras.

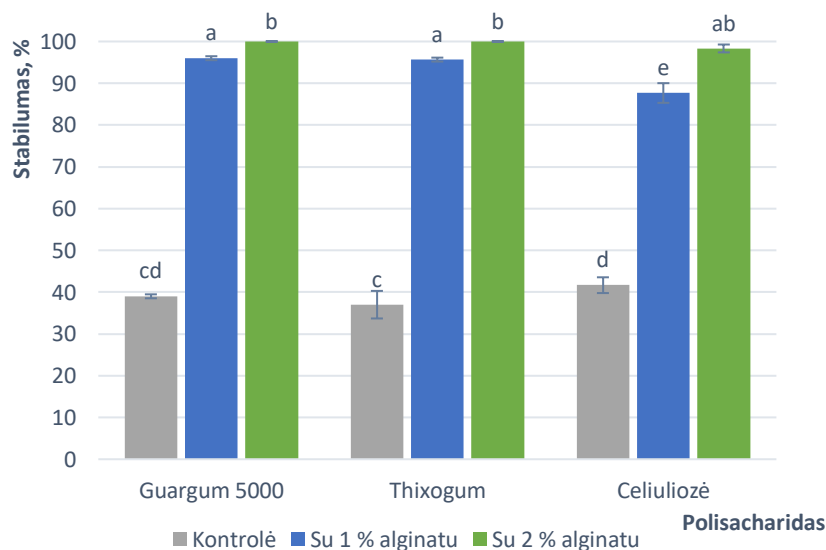
Norint dar labiau padidinti daugianarių emulsijų stabilumą, į vidinę  $V_1$  fazę buvo pridėta polisacharido. Jie paprastai naudojami mažiau nei 1 % koncentracijos. Pasirinktinai buvo naudojami trys polisacharidai po 0,5 % [75] – Guargum 5000, Thixogum arba celiuliozė. Naudojami polisacharidai labiau pasižymi kaip stabilizatoriai, o ne emulsikliai, todėl net nedidelė jų koncentracija stabilizuoja emulsijas [76].

25 pav. pateikti duomenys, kai buvo naudota 5 % emulsiklių (Tween 80 + lecitinas) koncentracija ir 6:4 santykis ( $V_2 : V_1/A$ ). Pagal gautus rezultatus galima teigti, kad stabiliausias emulsijos gavosi naudojant Guargum 5000 ir Thixogum. Stabilumas padidėjo dėl nepertraukiamos vandens fazės klampumo padidėjimo, kuri sulėtino lašelių judėjimą ir jų susidūrimą bei sumažino paviršiaus įtempį [63]. Naudojant celiuliozė dvigubų emulsijų stabilumas sumažėjo lyginant emulsijas nenaudojant jokio tirštiklio. Su 1 % alginatu sumažėjo 10 %, o su 2 % alginatu 5 %. Pagal tai galima spręsti, kad celiuliozė nesuteikia stabilumo daugianarėms emulsijoms.



**25 pav.** Daugianarių emulsijų gravitacinio stabilumo rezultatai santykiu 6:4 ( $V_2:V_1/A$ ) ir 5 % emulsiklių (Tween 80 + lecitinas) koncentracija

20 pav. pateikti analogiški tyrimų duomenys, kai buvo naudota tik 10 % emulsiklių (Tween 80 + lecitinas) koncentracija.



**26 pav.** Daugianarių emulsijų gravitacinio stabilumo rezultatai santykiu 6:4 ( $V_2:V_1/A$ ) ir 10 % emulsiklių (Tween 80 + lecitinas) koncentracija

Pagal šiuos duomenis galim daryti išvadas, kad celiuliozė šių daugianarių emulsijų stabilumą taip pat mažino. Tačiau lyginant 5 % ir 10 % suplaktas daugianares emulsijas, kaip matyti iš pateiktų rezultatų, su 10 % Tween 80 + lecitino emulsiklių mišiniu ir 1 % alginatu išorinėje fazėje dvigubos emulsijos stabilesnės tiek su Guargum 5000, tiek su Thixogum. Su Guargum 5000 stabilumas padidėjo 6,7 %, o su Thixogum 16,7 %.

Atlikus daugianarių emulsijų stabilumo vertinimą matosi, kad stabilios 100 % emulsijos gavosi (Guargum 5000, Thixogum) ( $p < 0,05$ ), tik kai yra naudojamas 2 % alginatas  $V_2$  fazėje.

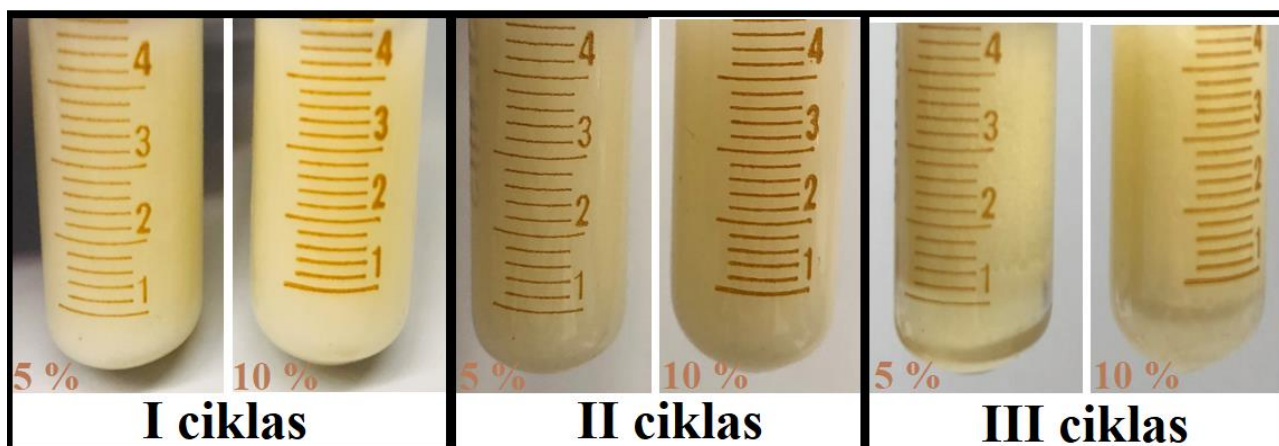
### 3.4. Temperatūros įtaka dvigubų emulsijų stabilumui

Atliktame bandyme buvo nustatoma sušaldymo-atšildymo ciklų metu kintančios temperatūros įtaka daugianarėms emulsijoms su 5 % ir 10 % emulsiklių (Tween 80 +lecitinas) koncentracijomis, 0,5 % Guargum 5000 (V<sub>1</sub>) ir 2 % alginatu (V<sub>2</sub>). Mėginiai buvo tiriami atlikus 3 sušaldymo-atšildymo ciklus, laikant mėginius 24 h (-20 ± 2 °C) šaldiklyje, po to 24h (30 °C) termostate. Gauti duomenys pateikti 9 lentelėje.

9 lentelė. Temperatūros įtaka emulsijos stabilumui

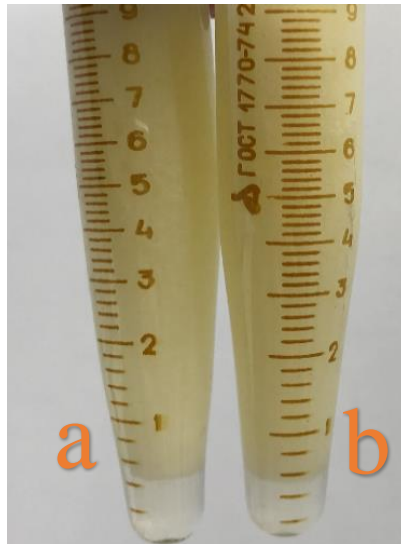
Emulsiklio koncentracija	Lipofilinė fazė	Sušaldymo-atšildymo ciklas		
		1	2	3
5 %	Aliejus	Stabili	Stabili	Nestabili
10 %	Aliejus	Stabili	Stabili	Nestabili

Emulsijos plaktos su 5 % ir 10 % (Tween 80 + lecitinas) emulsikliais buvo stabilios prieš pirmąjį ciklą, po pirmojo ir antrojo, tačiau po trečiojo sušaldymo-atšildymo ciklo emulsijos tapo nestabilios (27 pav.). Emulsijų riebalų fazė išlieka beveik skysta, terminiai pokyčiai vyksta emulsijų vandeninėje fazėje. Emulsijos destabilizavimo reiškinys siejamas su ledo susidarymo sušaldymo-atšildymo metu [61].



27 pav. Temperatūros įtaka emulsinių sistemų stabilumui

Taip pat šios 5 % ir 10 % daugianarės emulsijos buvo termiškai apdorotos 70 °C 30 min. Jos buvo vertinamos prieš terminį apdorojimą, iškart po terminio apdoravimo bei praėjus 7 dienoms po terminio apdoravimo. Prieš terminį apdorojimą daugianarės emulsijos buvo matinės, balkšvos spalvos, stabilios, tipinės išvaizdos. Šios 5 % (28 pav. a) ir 10 % (28 pav. b) daugianarės emulsijos tiek iš kart po terminio apdoravimo tiek praėjus 7 dienoms tapo nestabilios.

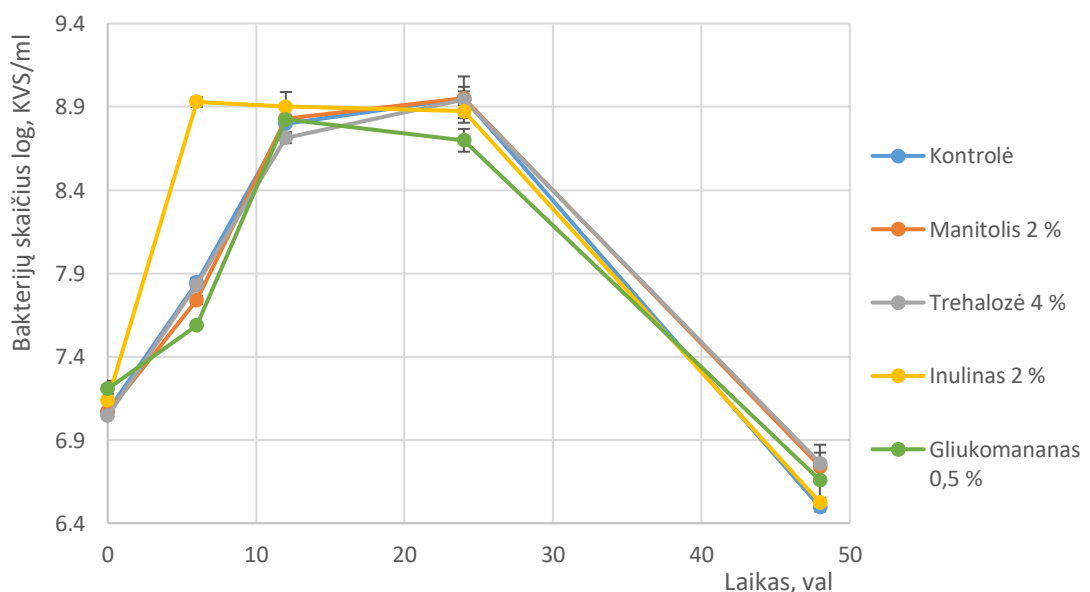


28 pav. Daugianarių emulsijų stabilumas po terminio apdorojimo (70 °C)

### 3.5. Probiotikų gyvybingumas serijiniu praskiedimų metodu

Prebiotikai – nevirškinami oligosacharidai, kurie „maitina“ gerąsias bakterijas, todėl šios gali augti ir klestėti, o tai lemia gerą žmogaus sveikatą, nes žarnyno bakterijos atlieka gyvybiškai svarbų vaidmenį. Kiekvienas prebiotikas yra skirtingas ir skirtingai veikia skirtingas bakterijas, todėl norint sužinoti, kurie prebiotikai daro didžiausią teigiamą įtaką probiotinių bakterijų gyvybingumui buvo vertinami mikrobiologiniais metodais. Probiotiko kartu su prebiotiku gyvybingumas buvo vertinamas laikymo metu. Taip pat vertinamas gyvybingumas skirtingose daugianarių emulsijų gamybos etapuose

Tyrimams buvo parinkti dviejų skirtingų rūšių probiotikai (*L. plantarum* ir *L. reuteri*) ir keturi skirtingi prebiotikai (manitolis, trehalozė, inulinas bei gliukomananas). Tirta ar prebiotikai turi įtakos bakterijų kolonijas sudarančių ląstelių skaičiui. Tyrimo rezultatai pateikti 29, 30 paveikslėliuose.



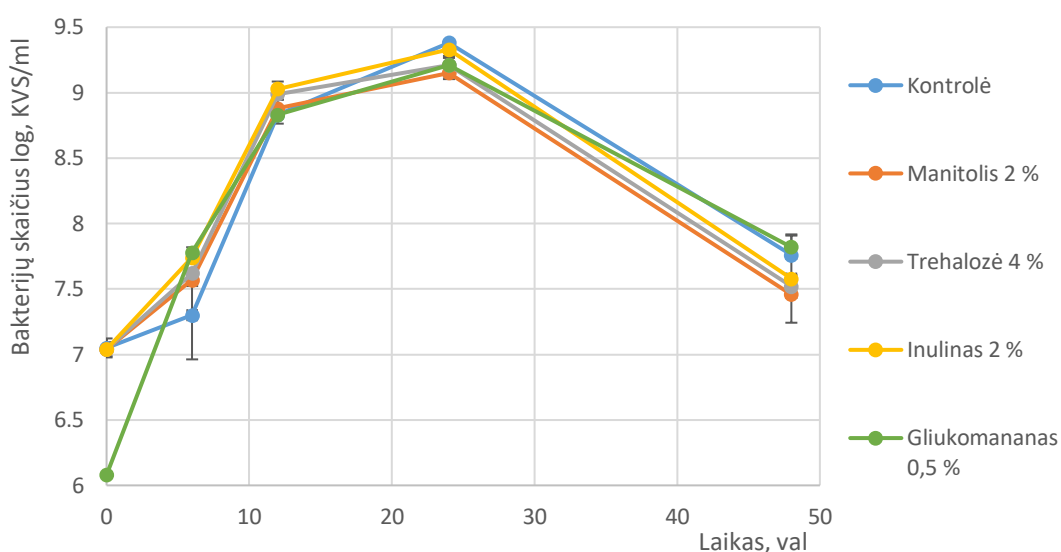
29 pav. *L. plantarum* augimo kreivė su prebiotikais



Po 6 valandų laikymo trukmės gyvybingų *L. plantarum* mikroorganizmų skaičius (KSV/ml) labiausiai padidėjo su inulynu 1,54 KSV/ml. Inulino pridėjimas skatina starterinių bakterijų metabolinę veiklą ir gerina rūgštingumą. Bakterijų skaičius padidėjo, dėl galimo oligofruktozės prebiotinio inulino poveikio. Esant 2 % inulinas daro geriausia poveikį bakterijų gyvybingumui [77].

Tuo tarpu mažiausiai padidėjo su gliukomananu 0,38 KSV/ml. Mikroorganizmų skaičius apytiksliai didėjo iki 18 val. laikymo tada iš grafiko matoma, kad nuo 18 val. iki 21 val. buvo stacionari fazė, pradėjo trūkti maistinių medžiagų. Augimo greitis sulėtėjo ir to pasėkoje miršančių ląstelių skaičius tampa lygus naujai atsirandančių ląstelių skaičius. Nuo 21 val. prasidėjo mirties fazė dar kitaip vadinama eksponentine mažėjimo faze [78].

Ties stacionaria faze mikroorganizmų skaičius didžiausias naudojant manitolio prebiotiką. Statistiškai reikšmingo skirtumo neturėjo kontrolė, manitolis bei trehalozė ( $p < 0,05$ ).



30 pav. *L. reuteri* augimo kreivė su prebiotikais

*L. reuteri* gyvybingumas padidėjo po 6 valandų per 0,42 KSV/ml, o daugiausiai su gliukomananu 1,70 KSV/ml. Stacionari fazė *L. reuteri* augimo kreivėje prasidėjo keliomis valandomis vėliau nei su *L. plantarum*. Reikšmingai vienodai gyvybingumą didino trehalozė ir inulinas ( $p < 0,05$ ). Ši fazė baigėsi ties 22 val ir tada taipogi prasidėjo eksponentinė mažėjimo fazė. *L. reuteri* bakterijai prebiotikai turėjo mažesnės įtakos augimui palyginus su *L. plantarum* augimo kreive.

Palyginus *L. plantarum* ir *L. reuteri* su ir be prebiotikais matosi, kad prebiotikai nors ir nežymiai, tačiau vis dėlto didino bakterijų gyvybingumą. Išskyrus su gliukomananu, šie prebiotikai atvirkščiai, ne didino, o mažino mikroorganizmų skaičių.

Norint atrinkti prebiotikus, kurie didina bakterijų gyvybingumą (*L. plantarum* ir *L. reuteri*) ir toliau su jais bus tęsti tyrimai, buvo pakartotinai stebėtas bakterijų gyvybingumas mitybinėje MRS terpėje ir fiziologiniame tirpale. Bakterijų gyvybingumas buvo matuojamas 2 kartus: 0 val. ir po 48 val. Pagal gautus rezultatus, kurie pateikti 10 lentelėje matosi, kad bakterijas prebiotikai veikė nevienodai.

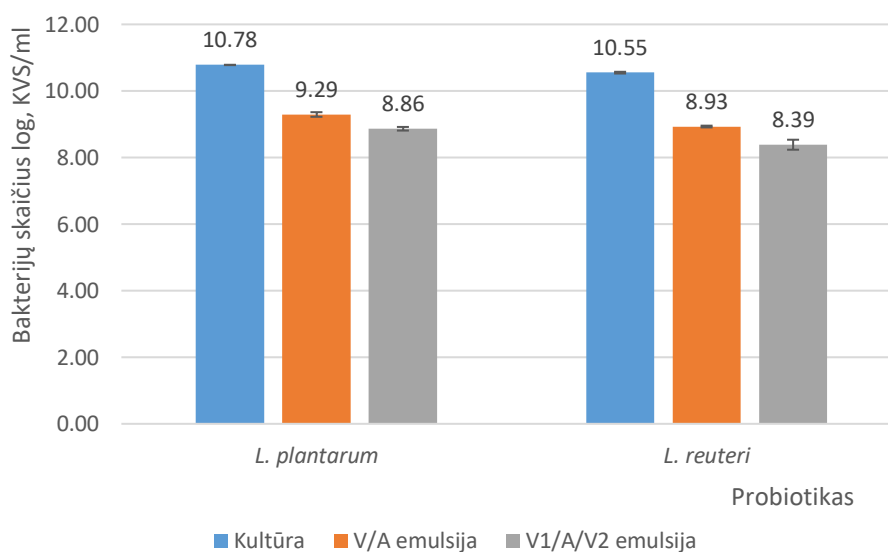
**10 lentelė.** *L. plantarum* ir *L. reuteri* prebiotikų veikimas MRS terpėje ir fiziologiniame tirpale

Probiotikas	<i>L. plantarum</i>		<i>L. reuteri</i>	
	0	48	0	48
<b>Prebiotikas</b>	<b>MRS terpė</b>			
Kontrolė	4,90±0,08 <sup>a</sup>	8,82±0,06 <sup>b</sup>	6,71±0,08 <sup>ab</sup>	8,27±0,01 <sup>cd</sup>
Manitolis 2 %	4,78±0,25 <sup>a</sup>	8,79±0,09 <sup>b</sup>	6,77±0,05 <sup>a</sup>	8,32±0,05 <sup>d</sup>
Trehalozė 4 %	4,89±0,16 <sup>a</sup>	8,94±0,07 <sup>b</sup>	6,66±0,04 <sup>b</sup>	7,85±0,01 <sup>e</sup>
Inulinas 2 %	4,75±0,21 <sup>a</sup>	8,74±0,07 <sup>b</sup>	6,78±0,00 <sup>a</sup>	8,21±0,03 <sup>c</sup>
Gliukomananas 0,5 %	5,29±0,02 <sup>c</sup>	8,34±0,12 <sup>d</sup>	7,16±0,03 <sup>e</sup>	7,69±0,05 <sup>f</sup>
<b>Prebiotikas</b>	<b>Fiziologinis tirpalas</b>			
Kontrolė	4,85±0,21 <sup>b</sup>	6,99±0,05 <sup>ac</sup>	6,88±0,07 <sup>a</sup>	6,53±0,10 <sup>c</sup>
Manitolis 2 %	4,98±0,19 <sup>b</sup>	7,07±0,07 <sup>a</sup>	6,87±0,02 <sup>a</sup>	6,16±0,02 <sup>b</sup>
Trehalozė 4 %	4,90±0,00 <sup>b</sup>	7,02±0,01 <sup>a</sup>	6,85±0,04 <sup>a</sup>	6,28±0,11 <sup>b</sup>
Inulinas 2 %	5,19±0,02 <sup>d</sup>	6,79±0,01 <sup>c</sup>	6,87±0,08 <sup>a</sup>	6,51±0,10 <sup>c</sup>
Gliukomananas 0,5 %	5,24±0,05 <sup>e</sup>	6,92±0,00 <sup>ac</sup>	7,15±0,04 <sup>d</sup>	6,93±0,09 <sup>a</sup>

Rezultatai pateikti kaip vidurkiai su standartiniais nuokrypiais. Mažosios raidės parodo statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp daigianarių emulsijų.

Palyginus gautus rezultatus su mitybine terpe ir su fiziologiniu tirpalu, prebiotikų veikimui skirtingos terpės įtakos neturėjo. *L. plantarum* ir *L. reuteri* bakterijas prebiotikai veikė skirtingai. *L. plantarum* teigiamai veikė manitolis bei trehalozė, o *L. reuteri* inulinas ir trehalozė. Gliukomananas, priešingai nei kiti prebiotikai, veikė neigiamai ( $p < 0,05$ ) abi *Lactobacillus* genties bakterijas.

Taip pat prebiotikų gyvybingumas buvo stebėtas daigianarių emulsijų plakimo metu (31 pav). Stebėtas koks bakterijų gyvybingumas po kiekvieno daigianarių emulsijų plakimo etapo, tai yra grynos kultūros, V/A emulsijoje bei V/A/V daigianarėje emulsijoje.



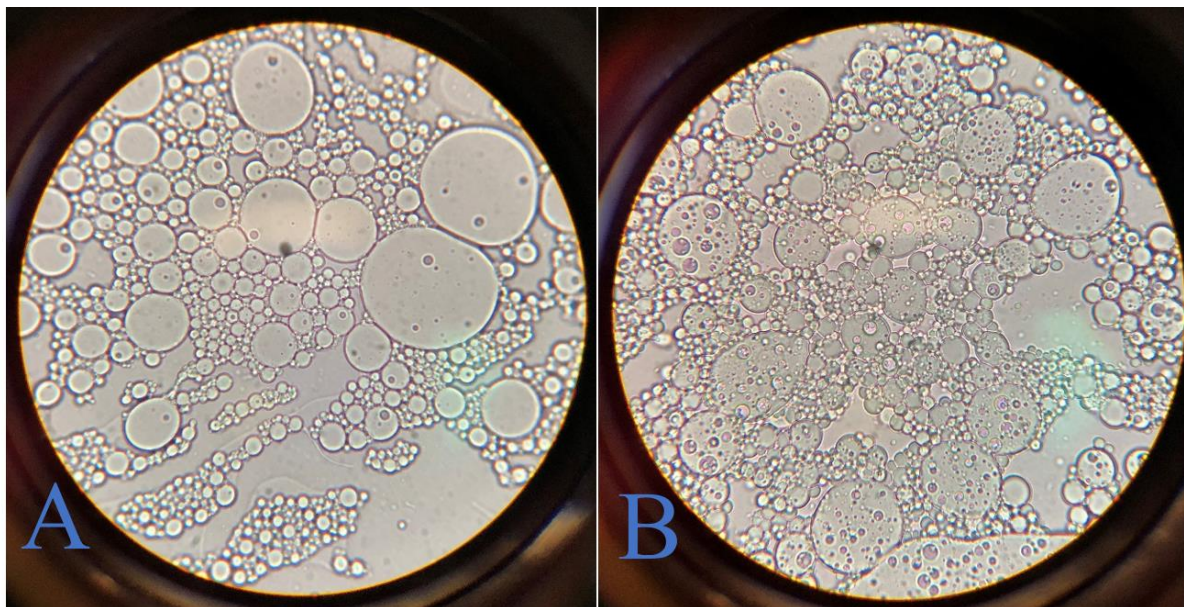
**31 pav.** Probiotikų gyvybingumas daigianarės emulsijos gamybos metu

Rezultatai parodė, kad bakterijų kiekis daugianarėje emulsijoje mažėjo apylygiai. *L. plantarum* kultūros bakterijų skaičius prieš plakant emulsijas buvo 10,78 KVS/ml, o galutiniame gamybos etape – 8,86 KVS/ml. Tai bakterijų skaičius sumažėjo 1,92 KVS/ml.

Plakant daugianarės emulsijas su *L. reuteri* bakterijų skaičius kultūroje buvo 10,55 KVS/ml, o daugianarėje emulsijoje – 8,39 KVS/ml, taigi *L. reuteri* bakterijų skaičius sumažėjo 2,16 KVS/ml. Bakterijų kiekis mažėjęs, nes mechaninis maišymo stresas gali sukelti tolesnį bakterijų skaičiaus sumažėjimą [77].

### 3.6. Daugianarių emulsijų $V_1/A/V_2$ mikroskopinis vaizdas

Mikroskopuojamos dvigubos emulsijos su mikroskopu per  $\times 100$  didinamą objektyvą. Mikroskopinė nuotrauka, kuri pateikta 32 paveikslėlyje yra daugianarių emulsijų su 5 % (Tween 80 + lecitinas) ir su 10 % (Tween 80 + lecitinas) emulsiklių koncentracijomis. Emulsijos plaktos su rapsų aliejumi. Vidinė vandens fazė su Tween 80, aliejinė fazė su lecitinu, o išorinė fazė su 2 % alginato tirpalu.



32 pav. Daugianarių emulsijų  $\times 100$  mikroskopinis vaizdas

Mikroskopiniame vaizde (A) 5 % daugianarės emulsijos; (B) 10 % daugianarės emulsijos. Mikroskopinėse nuotraukose matosi lašeliai lašeliuose, tai yra vidiniai vandens lašeliai pasiskirstę aliejaus lašeliuose, o šie visi pasiskirstę išorinėje vandens fazėje, šiuo atveju natrio alginato tirpale.

### 3.7. Daugianarių emulsijų klampos nustatymas

Buvo nustatyta stabilų emulsinių sistemų klampa, nes klampa yra vienas iš pagrindinių parametru, darančių įtaką emulsijos stabilumui [79].

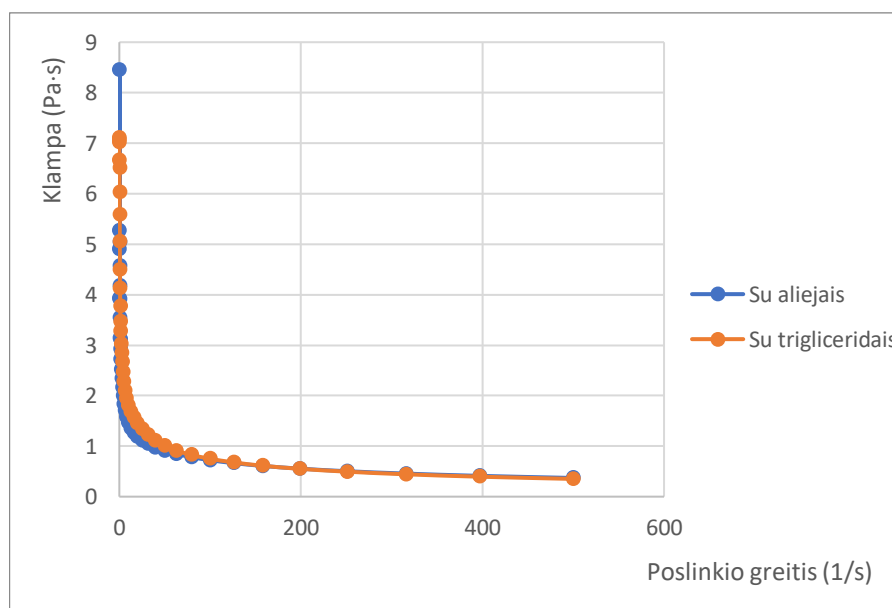
Plaktos emulsijos su skirtingomis aliejinėmis fazėmis bei į vidinę vandens fazę įkapsuliuotos probiotinės bakterijos. Vienos daugianarės emulsijos plaktos su rapsų aliejumi, kitos su trigliceridais. Jų klampos kreivės pateiktos 33 ir 34 paveikslėliuose, o 11 lentelėje pateikta klampos konstantos (K) ir jų nuokrypiai.

**11 lentelė.** Daugianarių emulsijų klamos konstantos

Lipofilinė fazė	Probiotikas	Klamos konstanta (K), Pa · s <sup>n</sup>
Aliejus	<i>L. plantarum</i>	2,24±1,80 <sup>ab</sup>
	<i>L. reuteri</i>	2,03±1,42 <sup>ab</sup>
Trigliceridai	<i>L. plantarum</i>	2,76±2,20 <sup>b</sup>
	<i>L. reuteri</i>	1,64±0,92 <sup>a</sup>

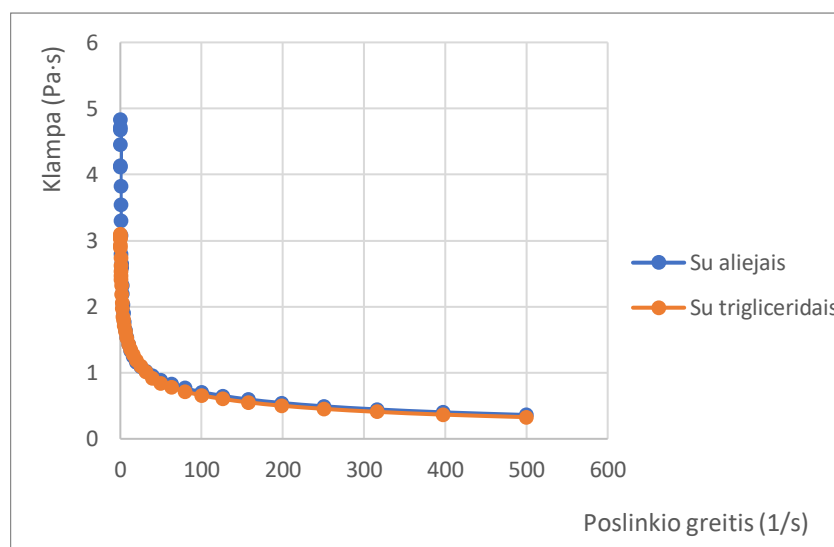
Rezultatai pateikti kaip vidurkiai su standartiniais nuokrypiais. Mažosios raidės parodo statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp daugianarių emulsijų.

Iš 11 lentelės pateiktų rezultatų matoma, kad nepriklausomai nuo lipofilinės fazės, klamos konstantos yra mažesnės su į vandeninę fazę ( $V_1$ ) įkapsuliuotomis *L. reuteri* bakterijomis nei su *L. plantarum*. Kai naudojama aliejinė fazė dvigubos emulsijos su *L. plantarum* konstanta didesnė 0,21 [Pa · s] už dvigubos emulsijos su *L. reuteri*, o su trigliceridais net 1,12 [Pa · s] didensė. Klamos konstanta tarp emulsijų, kurių lipofilinė fazė buvo aliejus, reikšminio skirtumo neturėjo ( $p < 0,05$ ). Kitų autorių yra nustatyta, kad klamos dydį lemia temperatūra ir aliejaus cheminė struktūra (riebiųjų rūgščių grandinių ilgis bei jų sotumo laipsnis); keliant temperatūrą labiausiai pakinta klampa aliejų, kurių sudėtyje esančių riebiųjų rūgščių molekulės turi daugiau dvigubų jungčių [80].



**33 pav.** Daugianarių emulsijų klampa su *L. plantarum*

Mėlynai pažymėtos kreivės lipofilinė fazė yra rapsų aliejus, o raudonai – trigliceridai. Šios dvi lipofilinės fazės kambario temperatūroje (klamos matavimas atliktas kambario temperatūroje) skiriasi reologinėmis savybėmis, tačiau nežymiai. Emulsijos skiriasi ne tik lipofiline faze, bet ir jos kiekiu emulsijose. Tai rodo, kad lipofilinės fazės procentinis kiekis sąlygoja klamos rezultatus. Emulsijos gamintos su aliejais, lipofilinę fazę sudarė 40 %, tai yra aliejaus ir vandens santykis buvo 4:6, o emulsijoje su trigliceridais – 20 % santykiu 2:8.



**34 pav.** Daugianarių emulsijų klampa su *L. reuteri*

Paruoštų dvigubų emulsijų klampa su *L. plantarum* didesnė su trigliceridais nei su aliejais. Su *L. reuteri* dvigubų emulsijų klampa didesnė paruoštų su aliejais. Aliejų takumas taip pat priklauso nuo pagrindinių ingredientų – riebiųjų rūgščių struktūros, kad augaliniam aliejui būdingas niutoninis tekėjimo pobūdis [80].

Įvertinus rezultatus, gautus ir aprašytus ankstesniuose skyriuose, buvo nutarta tolimesnius tyrimus atlikti su viena iš probiotinių bakterijų – *L. plantarum* ir su ją teigiamai veikusiais prebiotikais (manitolis, trehalozė).

Daugianarės emulsijos buvo plakamos su probiotikais, prebiotikais bei augaliniu ekstraktu (šaltalankių). Sudarytos 6 tipų daugianarės emulsijos, kurių sudėtis pateikta 12 lentelėje.

**12 lentelė.** A–F dvigubų emulsijų sudedamieji komponentai

Fazės Emulsija	Aliejinė (A)	Vidinė vandens (V <sub>1</sub> )	Išorinė vandens fazė (V <sub>2</sub> )
<b>A</b>	Lecitino emulsiklis 5 %	Guarguma 5000 0,5 % Tween 80 emulsiklis 5 % Kultūra ( <i>L. plantarum</i> )	Alginatas 2 % Tween 80 emulsiklis 5 %
<b>B</b>	Lecitino emulsiklis 5 %	Guarguma 5000 0,5 % Tween 80 emulsiklis 5 % Kultūra ( <i>L. plantarum</i> ) Manitolis 2 %	Alginatas 2 % Tween 80 emulsiklis 5 %
<b>C</b>	Lecitino emulsiklis 5 %	Guarguma 5000 0,5 % Tween 80 emulsiklis 5 % Kultūra ( <i>L. plantarum</i> ) Trehalozė 4 %	Alginatas 2 % Tween 80 emulsiklis 5 %
<b>D</b>	Lecitino emulsiklis 5 % Šaltalankių ekstraktas 5 %	Guarguma 5000 0,5 % Tween 80 emulsiklis 5 % Kultūra ( <i>L. plantarum</i> )	Alginatas 2 % Tween 80 emulsiklis 5 %

Fazės Emulsija	Aliejinė (A)	Vidinė vandens (V <sub>1</sub> )	Išorinė vandens fazė (V <sub>2</sub> )
E	Lecitino emulsiklis 5 % Šaltalankių ekstraktas 5 %	Guarguma 5000 0,5 % Tween 80 emulsiklis 5 % Kultūra ( <i>L. plantarum</i> ) Manitolis 2 %	Alginatas 2 % Tween 80 emulsiklis 5 %
F	Lecitino emulsiklis 5 % Šaltalankių ekstraktas 5 %	Guarguma 5000 0,5 % Tween 80 emulsiklis 5 % Kultūra ( <i>L. plantarum</i> ) Trehalozė 4 %	Alginatas 2 % Tween 80 emulsiklis 5 %

Su visomis gautomis 6 emulsijomis buvo atlikti reologiniai tyrimai, oksidacinis stabilumas bei bakterijų gyvybingumas laikymo metu.

### 3.8. Daugianarių emulsijų (A–F) reologiniai parametrai

Emulsijos buvo suplaktos ir matuojamos po 2 pakartojimus tiek klampos tyrime tiek dalelių dydžio nustatyme.

Daugianarių emulsijų klampos ir dalelių dydžiai pagal tūrį (D [4, 3]) ir pagal paviršiaus plotą (D [3, 2]) rezultatai pateikti 13 lentelėje.

**13 lentelė.** Daugianarių emulsijų A–F dalelių dydis ir reologinės charakteristikos

Dvigubos emulsijos tipas	Dalelių dydis		Reologinės charakteristikos		
	D [4, 3], μm	D [3, 2], μm	n	K [Pa·s]	R <sup>2</sup>
A	0,79 ± 0,11 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,5643	4,47 ± 4,11 <sup>a</sup>	0,9934
B	0,93 ± 0,15 <sup>ab</sup>	0,22 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,5853	4,13 ± 3,73 <sup>ab</sup>	0,9996
C	0,98 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,5495	4,44 ± 4,48 <sup>a</sup>	0,9963
D	1,00 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,6045	3,42 ± 2,85 <sup>ab</sup>	0,9991
E	1,97 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,78 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,6042	2,36 ± 2,17 <sup>b</sup>	0,9961
F	1,40 ± 0,31 <sup>c</sup>	0,44 ± 0,53 <sup>c</sup>	0,6212	3,07 ± 2,46 <sup>ab</sup>	0,9997

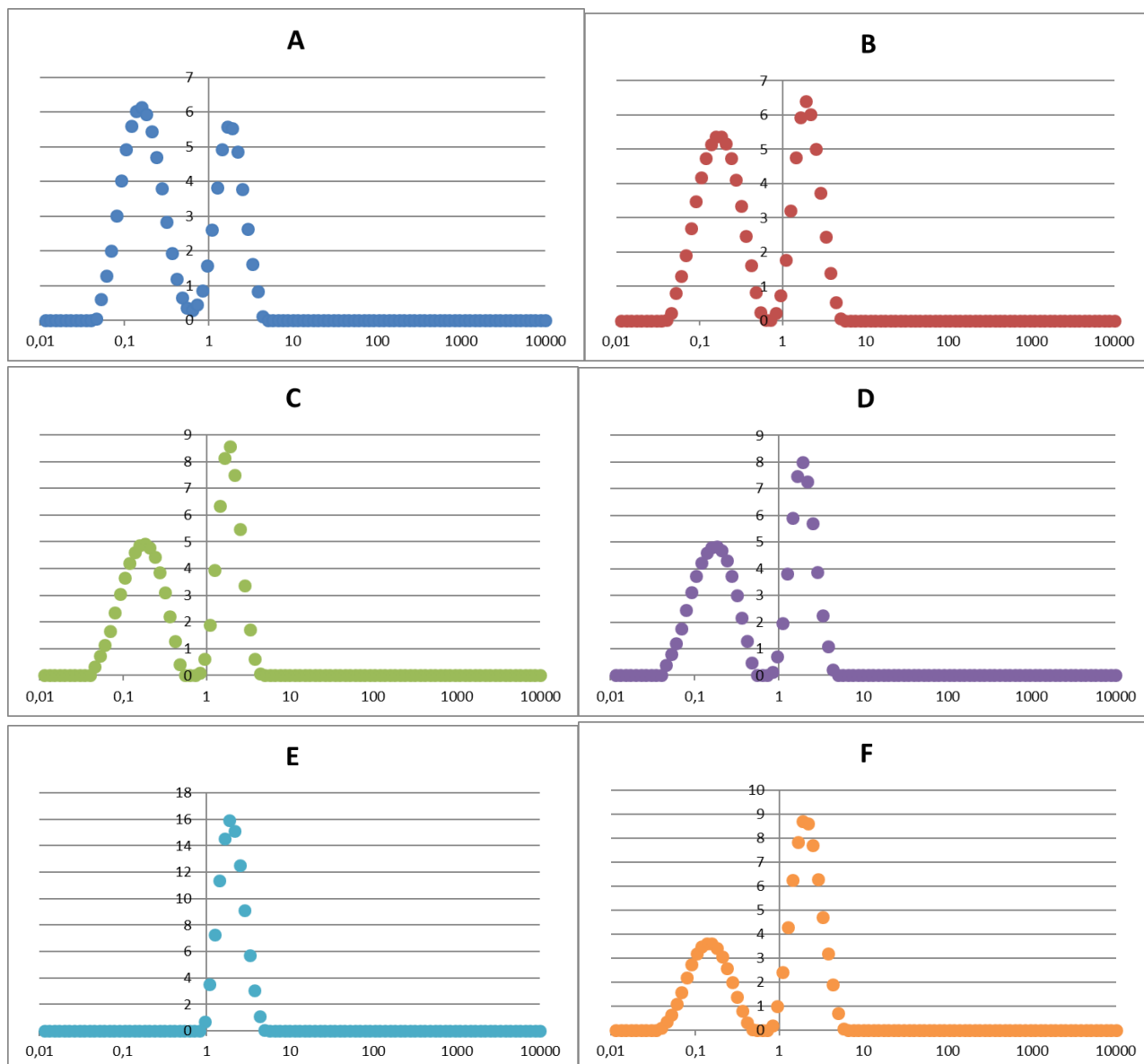
Rezultatai pateikti kaip vidurkiai su standartiniais nuokrypiais. Mažosios raidės parodo statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp daugianarių emulsijų.

Didžiausia klampa pasižymėjo A, B, C tipo daugianarės emulsijos, mažesne D, F tipo ir mažiausia klampa pasižymėjo E tipo emulsija. Emulsijose, kuriose yra trehalozės sudaro mažesnius dalelių dydžius [81]. Pagal gautą takumo indeksą ( $n < 1$ ) yra daroma išvada, kad visos emulsijos pasižymėjo pseudoplastiniams skysčiams būdingomis savybėmis, tai yra didinant deformaciją klampa mažėjo [82].

Dalelių dydis labai svarbus rodiklis emulsijų stabilumui. Mažesnis dalelių dydis lemia ilgesnį stabilumą emulsijose. Kuo didesnis dalelių dydis tuo sunkiau emulsijos lieka stabilios. Teoriškai, stabilų emulsijų lašelių dydis gali svyruoti nuo 0,1 iki 10 μm. Jeigu lašeliai didesni negu 10 μm, emulsijos laikomos nestabiliomis [81].

Iš 13 lentelės matoma, kad visų tipų emulsijų dalelių dydis buvo mažesnis nei 10  $\mu\text{m}$ , todėl galima teigti, kad daugianarės emulsijos yra pakankamai homogeniškos ir stabilios. Didžiausias dalelių dydis yra E ir F tipo emulsijose, mažesni C, D, B o mažiausias – A emulsijoje. Taip galėjo nutikti dėl to, kad A tipo daugianarėje emulsijoje yra mažiausias komponentų kiekis. Dalelių dydžio skirtumas pagal tūrį tarp A ir E tipo emulsijų yra 1,18  $\mu\text{m}$ , o pagal paviršiaus plotą 1,58  $\mu\text{m}$ .

Dalelių dydžio pasiskirstymas (A–F) daugianarėse emulsijose pateiktas 35 paveiksle.



35 pav. Dalelių dydžio pasiskirstymo kreivės daugianarėse (A–F) emulsijose

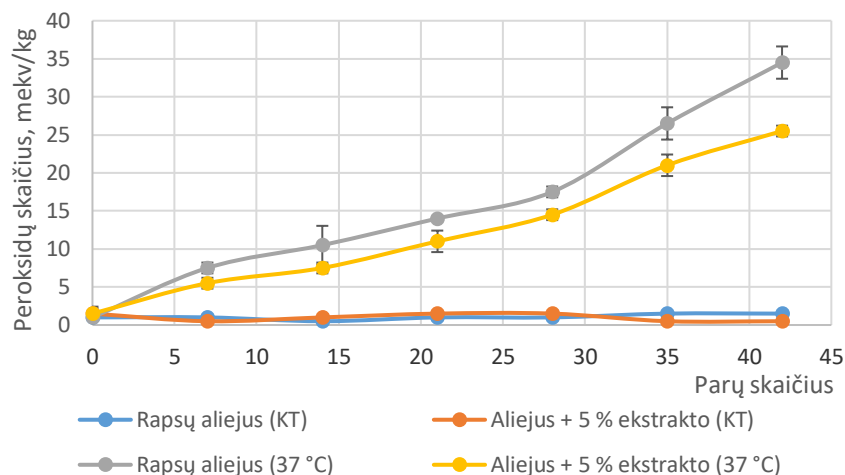
E tipo emulsijoje dalelės yra pasiskirsčiusios vienoje smailėje, kitose A, B, C, D ir F tipo emulsijose – dviejose smailėse. Tai parodo, jog daugianarės emulsijos sistemoje esančios dalelės yra įvairaus dalelių dydžio.

### 3.9. Daugianarių emulsijų (A-F) oksidacinis stabilumas

Emulsijos laikytos ir stebėtos nuo 0 val. iki 42 parų skirtingose temperatūrose, kambario temperatūroje (KT) ir 37 °C temperatūroje. Taip pat norint įvertinti tik šaltalankių ekstrakto

antioksidacinę poveikį, buvo atliekamas oksidacinis stabilumas su aliejumi ir aliejumi su 5 % augaliniu ekstraktu. Stabilumo vertinimas atliekamas buvo dvejais metodais, kurie aprašyti 2 skyriuje.

Norint iširti šaltalankių ekstrakto antioksidacines savybes, jo buvo pridėta 5 % į aliejinę fazę ir kas 7 dienas fiksuojamas peroksidų skaičius (PS). Gauti rezultatai pateikti 36 paveikslėlyje.

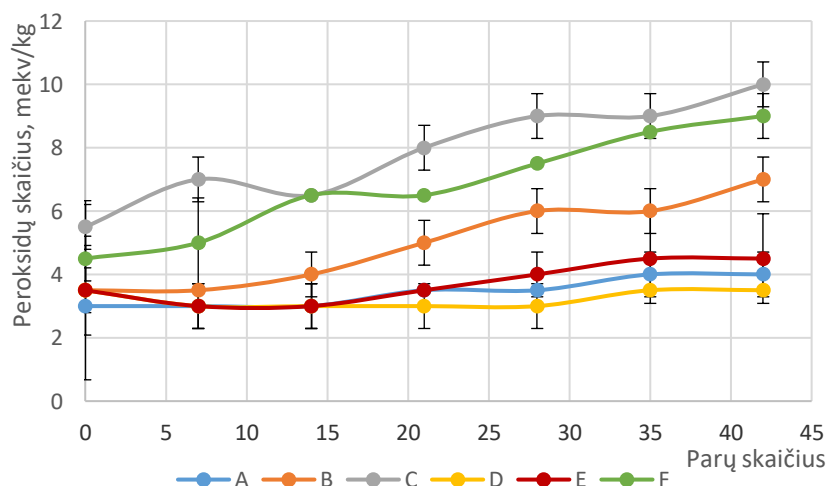


**36 pav.** Peroksidų skaičius rapsų aliejuje ir aliejuje su 5 % šaltalankių ekstraktu laikymo metu (KT ir 37 °C)

Iš rezultatų matyti, kad kambario temperatūroje (KT) aliejus be ir su šaltalankių ekstraktu didelės įtakos neturėjo PS kitimui. PS svyravo nuo 0,5 mekv/kg iki 1,5 mekv/kg. Bandiniai, kurie laikyti 37 °C temperatūroje oksidavosi daug greičiau nei laikyti KT. Palyginus aliejų laikytą KT ir 37 °C temperatūroje po 42 parų, tai PS padidėjo 33 mekv/kg laikytas 37 °C. Aliejus su ekstraktu, kuris buvo laikytas 37 °C temperatūroje skyrėsi 25 mekv/kg nuo aliejaus su ekstraktu, kuris buvo laikytas KT. Skirtumas tarp aliejaus be ir su ekstraktu, kurie buvo laikyti 42 paras 37 °C temperatūroje buvo reikšmingai skirtingas ( $p > 0,05$ ) 9 mekv/kg.

Pagal šiuos gautus rezultatus galima daryti išvadą, kad šaltalankių CO<sub>2</sub> ekstraktas slopino emulsijų oksidaciją.

Duomenys, gauti laikant emulsijas (A-F) kambario temperatūroje nurodyti 37 paveiksle.



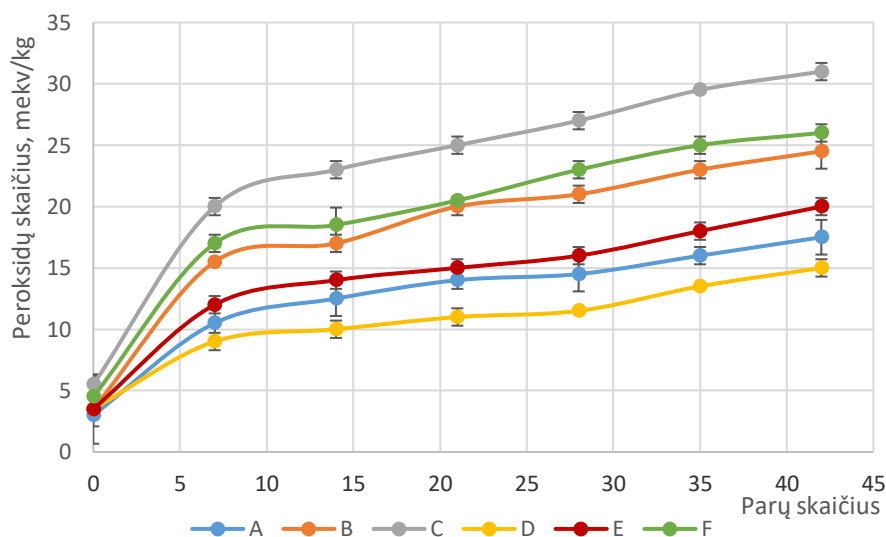
**37 pav.** Peroksidų skaičius daigianarėse (A–F) emulsijose laikymo metu (kambario temperatūroje)



Peroksidų skaičius didėjo laikymo metu. Didžiausias peroksidų kiekis buvo emulsijose, kuriose nebuvo šaltalankių ekstrakto arba, kuriose buvo didžiausias kiekis priedų. Lyginant emulsijas A ir D, tai emulsijoje su ekstraktu PS buvo mažesnis 0,5 mekv/kg.

Emulsijose C ir F, kuriose buvo pridėta prebiotikas trehalozė, po 42 parų PS buvo ganėtinai didelis atitinkamai 10 mekv/kg ir 9 mekv/kg nepaisant, kad F emulsijoje buvo pridėtas šaltalankių ekstraktas. Tačiau palyginus E ir F emulsijas, kuriose buvo ir ekstraktas ir prebiotikas jų PS skyrėsi 4,5 mekv/kg. Galima daryti išvadą, kad trehalozė didina oksidacinį nestabilumą. Statistiškai didžiausias reikšminis skirtumas buvo C emulsijoje ( $p > 0,05$ ) po 42 parų.

38 paveikslėlyje pateiktos emulsijų A-F peroksidų skaičius laikytas 37 °C temperatūroje.



**38 pav.** Peroksidų skaičius daigianarėse (A–F) emulsijose laikymo metu (37 °C)

Iš pateikto 36 paveikslėlio matyti, kad PS didėjo sparčiau nei laikytos emulsijos kambario temperatūroje. Tačiau didėjimo eiliškumas nekito, mažiausias PS po 42 parų buvo D emulsijoje 15 mekv/kg, didžiausias C emulsijoje 31 mekv/kg ( $p > 0,05$ ). PS po 7 parų ženkliai šoktelėjo į viršų, po to PS didėjo tolygiau.

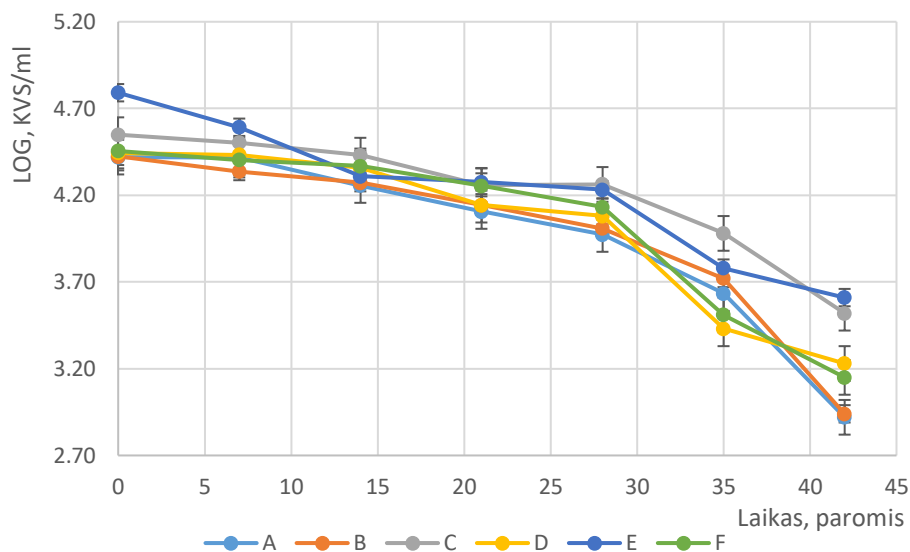
Palyginus 35 ir 36 paveikslėlius matoma, kad temperatūra daro įtaką PS kiekiui. Pavyzdžiui, D emulsijos peroksidų skaičius po 42 parų, kambario temperatūroje buvo 3,5 mekv/kg, o laikyta 37 °C temperatūroje PS siekė 15 mekv/kg. Tad ta pati D emulsija laikyta skirtingose temperatūrose turėjo didesnį PS.

Gauti duomenys parodė, kad šaltalankių ekstraktas turi antioksidacinių savybių ir didina oksidacinį stabilumą. Taip pat PS kiekiui įtakos turi ir temperatūra, bei priedai (prebiotikai).

### 3.10. *L. plantarum* bakterijų gyvybingumas laikymo metu A-F tipo daigianarėse emulsijose

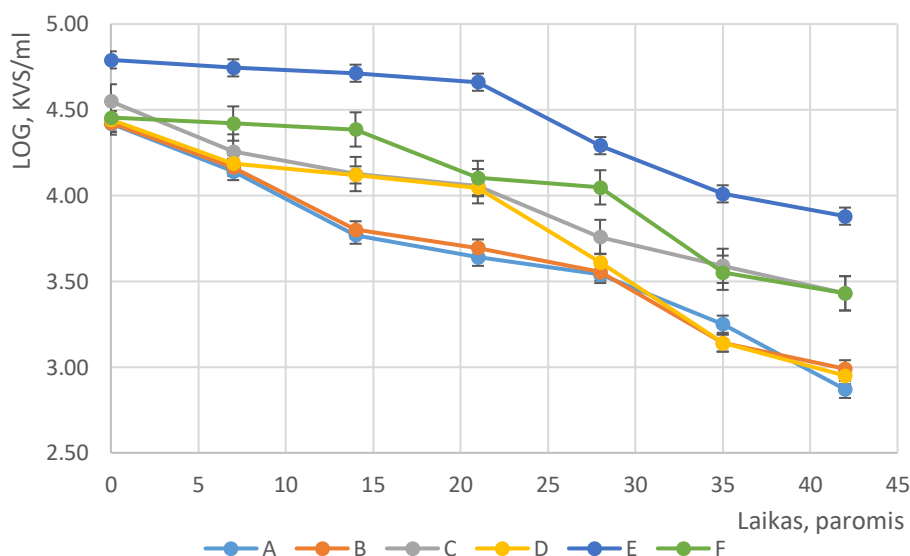
Kas savaitę buvo vertinamas bakterijų gyvybingumas ir stebimas jų pokytis daigianarėse emulsijose. Bakterijos buvo įkapsuliuotos į skirtingų tipų daigianares emulsijas (A–F) ir laikomos 7 savaites skirtingose temperatūrose (KT, 37 °C). Bakterijų gyvybingumas buvo vertinamas serijiniu sėjimo būdu į petri lėkšteles.

39 paveikslėlyje pateikti duomenys gauti kambario temperatūroje. *L. plantarum* gyvybingumas mažėjo visose emulsijose, bet didžiausias gyvybingumas bakterijų išliko C ir F emulsijose.



39 pav. *L. plantarum* augimo kreivės emulsijose A-F laikymo metu KT

40 paveikslėlyje pavaizduotas *L. plantarum* augimo kreivė A-F tipo emulsijose laikymo metu 37 °C temperatūroje.



40 pav. *L. plantarum* augimo kreivės emulsijose A-F laikymo metu 37 °C temperatūroje

Įkapsuliuotos probiotinės bakterijos su prebiotikais išgyveno geriau nei įkapsuliuotos bakterijos be prebiotikų. Sumažėjimo greitis buvo labai skirtingas ( $p < 0,05$ ) tarp kapsulių su ir be antioksidanto bei prebiotiko. Antioksidantas teigiamai veikia probiotines bakterijas [66], todėl bakteijų skaičius buvo didesnis emulsijose su antioksidantu.

Į daugianares emulsijas C ir F buvo pridėta trehalozės prebiotiko ir jose bakterijų gyvybingumo mažėjimo greitis buvo mažesnis nei A, B ir D emulsijose. Tokius apsauginius junginius kaip trehalozę pridedama siekiant išlaikyti probiotinių organizmų gyvybingumą dehidratacijos ir laikymo metu [83].

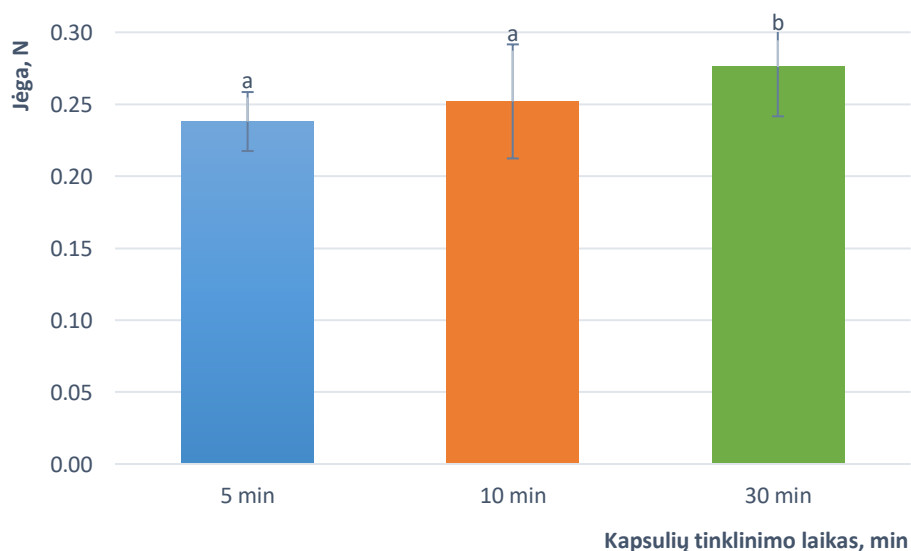
### 3.11. Alginatinės kapsulės ir jų kietumas

Atsižvelgiant į bakterijų gyvybingumą daugianarėse emulsijose laikymo metu (3.10.) buvo nuspręsta įkapsuliuoti *L. plantarum* probiotiką į E tipo emulsiją, kurioje bakterijos išlaikė didžiausią bakterijų skaičių. Iš šios emulsijos buvo gautos apie 2 mm skersmens, standžios, balkšvos spalvos polisacharidinės kapsulės (41 pav.)



41 pav. Alginatinės kapsulės su *L. plantarum* probiotiku

Kapsulės buvo tinklintos skirtingą laiką ir 42 pav. pateikti rezultatai gauti matuojant kapsulių kietumą. Rezultatai pateikti kaip kapsulių suspaudimo jėgos (N) priklausomybė nuo tinklinimo laiko (min) kalcio chlorido tirpale.

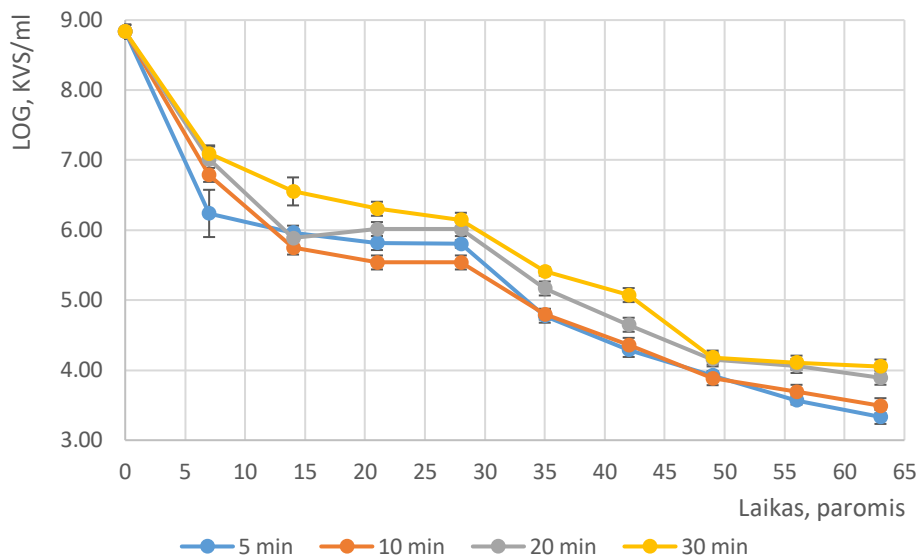


42 pav. Kapsulių kietumas

Kuo ilgiau kapsulės buvo tinklinamos, tuo labiau reikėjo didesnės jėgos joms suspausti. Kaip matoma iš pateiktų rezultatų 5 min tinklintoms kapsulėms reikėjo 0,24 N, o 30 min – 0,28 N. 5 min ir 10 min tinklintos kapsulės neturėjo reikšmingo skirtumo tarpusavy, tačiau 30 min tinklintos kapsulės turėjo ( $p > 0,05$ ).

### 3.12. Įkapsuliuotų *L. plantarum* bakterijų gyvybingumas kapsulėse laikymo metu

Įkapsuliuotos *L. plantarum* probiotinės bakterijos buvo laikytos plastikiniuose steriliuose mėgintuvėliuose su steriliu distiliuotu vandeniu. Kas savaitę buvo stebėtas bakterijų gyvybingumas laikymo metu, iš viso 62 paras (43 pav.).



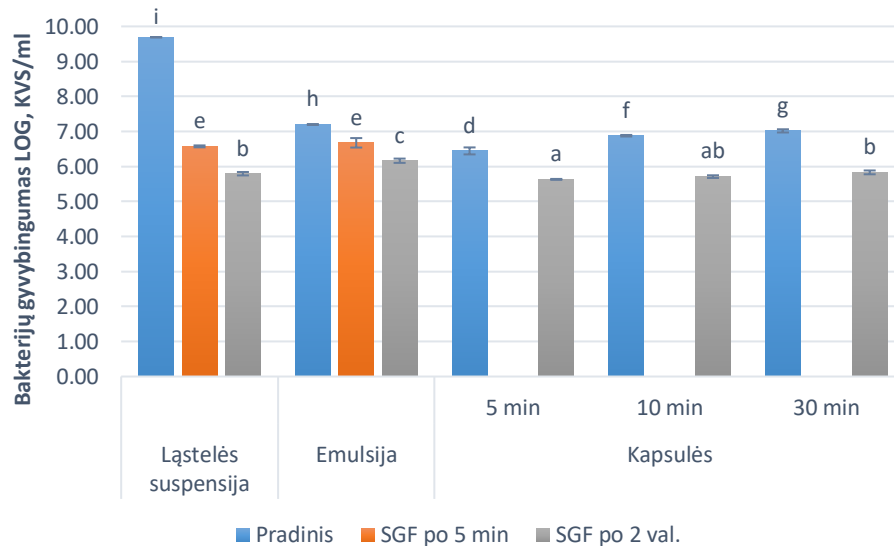
43 pav. *L. plantarum* gyvybingumas alginatinėse kapsulėse laikymo metu

Nustatyta, kad bakterijų įkapsuliavimas į alginatines kapsules veiksmingai apsaugo organizmus tam tikrą laiką. Kaip tikėtasi, skirtingas tinklinimo laikas daro įtaką bakterijų gyvybingumui. Kuo ilgesnis tinklinimo laikas, tuo didesnis kapsulės membranos storis, kuris ir užtikrina didesnę bakterijų gyvybingumą [56]. Bakterijų skaičius kapsulėse mažėjo vienodu greičiu (39 pav.), tačiau didžiausias gyvybingumas išliko kapsulėse, kurios buvo tinklintos kalcio chlorido tirpale ilgiausią laiką, tai yra 30 min. Blandino ir kt. (1999) pranešė, kad maksimalus gelio dydžio augimas realizuojamas per pirmąsias 15 min. [84], todėl kapsulės, kurios buvo laikytos kalcio chlorido tirpale 20 min ir 30 min užtikrino didesnę bakterijų skaičių kapsulės. Kapsulės, tinklintos skirtinguose laikuose, buvo reikšmingai skirtingos po 62 parų ( $p < 0,05$ ).

### 3.13. Kapsulių virškinimas *IN VITRO*.

Norint šias kapsules panaudoti realiuose produktuose (maisto, kosmetikos ir kt.), reikia nustatyti ar šios polisacharidinės kapsulės apsaugo bakterijas skrandžio virškinimo metu, ar probiotikai atsipalaiduoja žarnyne virškinimo metu ir ar bakterijos išlieka gyvybingos pasiekus tikslingą vietą, tai yra žarnyną. Todėl įkapsuliuotų probiotikų gyvybingumas buvo vertinamas *in vitro* imituotose virškinimo trakto sąlygose.

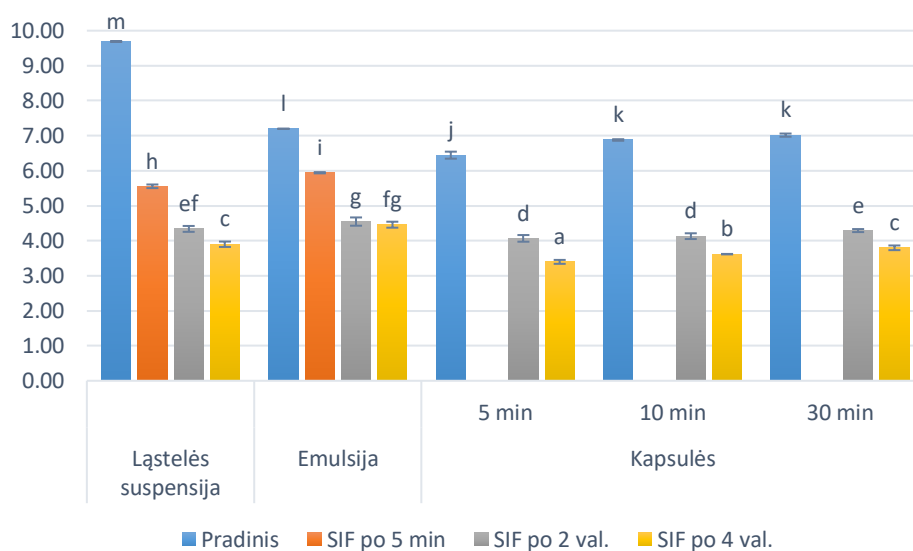
Palyginimui buvo atliekamas virškinimas ląstelės suspensijos (*L. plantarum*), E tipo emulsijos ir iš šios emulsijos gautoms kapsulėms. 44 pav. parodytas bakterijų gyvybingumas virškinimo metu *in vitro* imituotose skrandžio sultyse. Gyvybingumas ląstelės suspensijoje ir emulsijoje buvo fiksuojamas po 5 min bei po 2 val., o kapsulėse tik po 2 val.



44 pav. *L. plantarum* gyvybingumas imituotose skrandžio sultyse (SGF)

Atliekant tyrimą, žymus bakterijų gyvybingumo šuolis žemyn buvo nustatytas ląstelės suspensijoje. Bakterijų skaičius sumažėjo 3,90 KVS/ml po SGF 2 val. Emulsijoje ir kapsulėse bakterijų gyvybingumas mažėjo apylygiai, didelio skirtumo po 2 val. nuo pradinio taško nebuvo. Emulsijoje gyvybingumas sumažėjo 1,03 KVS/ml. Emulsijoje po 2 val. buvo didesnis bakterijų skaičius nei ląstelės suspensijoje ( $p > 0,05$ ). Pradiniame taške bakterijų gyvybingumo reikšminis skirtumas buvo tarp kapsulių tinklintų skirtinguose laikuose. Po 2 val. mažiausias bakterijų skaičius buvo kapsulėse, kurios buvo tinklintos 5 min, o didžiausias skaičius kapsulėse, kurios tinklintos buvo 30 min. 10 min. Tinklintos kapsulės reikšminio skirtumo neturėjo tarp 5 min ir 10 min kapsulių po 2 val. SGF ( $p < 0,05$ ).

Bakterijų gyvybingumas buvo stebėtas imituotose žarnyno sultyse. Bakterijų skaičius ląstelės suspensijoje fiksuojamas po 5 min, 2 val. bei 4 val., kapsulėse – po 2 val. ir 4 val. Gauti duomenys pateikti 45 pav.



45 pav. *L. plantarum* gyvybingumas imituotose žarnyno sultyse (SIF)

Nustatyta, kad bakterijų įkapsuliavimas į alginato kapsules veiksmingai apsaugo organizmus nuo didelio rūgštingumo ir išgyvena imituotose virškinimo trakto sąlygose.

Chandramouli ir kt. (2004) teigia, kad įkapsuliuotos probiotinės bakterijos išgyvena daug geriau ir ilgiau nei laisvos probiotinės bakterijos [56].

Po 4 valandų inkubacijos imituotose žarnyno sultyse (pH 7) bakterijų ląstelių išlikimas buvo pastebimai padidėjęs ( $p > 0,05$ ) kapsulėse, kurios buvo sukietintos 30 min. kalcio chlorido tirpale, palyginti su kapsulėmis, kurios buvo sukietintos tik 5 min., kadangi kapsulių membranos storis buvo didesnis [56]. *Lactobacillus* bakterijų gyvybingumas galėjo išlikti didesnis, galbūt dėl didesnio toleravimo rūgštims [66].

## Išvados

1. Tyrimų metu nustatyta, kad stabilios A/V emulsijos susidaro naudojant 0,5 % Tween 80, 0,5 % Tween 80 + lecitiną, 2 % lecitino arba 5 % Span 80 emulsiklius esant aliejaus-vandens santykiui 6:4. Tačiau esant aliejaus-vandens santykiui 7:3 stabilios emulsijos gautos tik su 0,5 % Tween 80, 0,5 % Tween 80 + Span 80 ir 10 % Span 80 emulsikliais. Ištyrus V/A emulsijų stabilumą, nustatyta, kad tik su 5 ir 10 % Tween 80 + lecitino emulsikliais susidaro stabilios emulsijos esant vandens-aliejaus santykiui 6:4, o pakeitus vandens-aliejaus santykį į 7:3 stabilių emulsijų nesusidaro.
2. Ištyrus daugianarių V/A/V stabilumą, nustatyta, kad stabilios daugianarės emulsijos susidaro su 2 % alginato priedu išorinėje  $V_2$  fazėje. Be to, nustatyta, kad emulsijų stabilumui įtakos turi ir polisacharidų priedas vidinėje vandens fazėje, tai yra jų stabilumas padidėjo ir susidaro 100 % stabilios emulsijos su Guargum 5000, Thixogum ( $V_1$  fazėje) ir 2 % alginatu ( $V_2$  fazėje).
3. Atlikus daugianarių emulsijų klamos tyrimus, dalelių dydžio matavimus, nustatyta, kad emulsijos pasižymi dideliu stabilumu.
4. Apskaičiuotas peroksidų skaičius aliejuje be ir su antioksidantu, bei daugianarėse A–F emulsijose. Nustatyta, kad mėginiai su šaltalakių ekstraktu turėjo mažesnę peroksidų skaičių, nei mėginiai, kuriuose nebuvo ekstrakto.
5. Įkapsuliuotoms *L. plantarum* bakterijoms į daugianarės emulsijas gyvybingumą kėlė prebiotikai: manitolis ir tehalozė, bei antioksidantas: šaltalankių ekstraktas. Palyginus gyvybingumą tarp emulsijų su ir be prebiotiku bei antioksidantu, tai gyvybingumas buvo didesnis tose emulsijose, kuriose buvo priedų.
6. Nustatyta, kad ilgesnis kapsulių tinklinimo laikas kalcio chlorido tirpale užtikrina didesnę gyvybingų bakterijų skaičių kapsulėse.
7. Atlikus daugianarių  $V_1/A/V_2$  emulsijų bei kapsulių virškinimą žarnose *in vitro* sąlygomis, nustatyta, kad probiotikai išgyvena ir tikslingai pasiekia gyvybingos žmogaus žarnyną.
8. Šio tyrimo metu pagamintos daugianarės  $V_1/A/V_2$  emulsijos ir kapsulės gali būti sėkmingai naudojamos probiotikų įkapsuliuojimui kartu su prebiotiku bei šaltalankių ekstraktu.

## Literatūros sąrašas

1. VAN DER ARK, K. C. H., A. D. W. Nugroho, C. Berton-Carabin, C. Wang, C. Belzer, W. M. de Vos, K. Schroen. Encapsulation of the therapeutic microbe *Akkermansia muciniphila* in a double emulsion enhances survival in simulated gastric conditions. *Food Research International*. 2017, vol. 102, p. 372-379.
2. MARINO, M., N. Innocente, S. Calligaris, M. Maifreni, A. Marangone, M. C. Nicoli. Viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* in structured emulsions containing saturated monoglycerides. *Journal of Functional Foods*. 2017, vol. 35, p. 51-59.
3. ZHANGA, Y., J. Lin, Q. Zhonga. The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Research International*. 2015, vol. 71, p. 9-15.
4. Prieiga per internetą: <https://www.optibacprobiotics.co.uk/livecultures/articles/history-of-probiotics> [žiūrėta 2017-12-06].
5. SEMAŠKAITĖ, A., R. Gružasuskas, V. Tėvelis, A. Racevičiūtė-Stupelienė, V. Šašytė, Z. Zdunczyk, J. Juskiewicz. Prebiotikų fruktooligosacharidų ir probiotikų *Pediococcus acidilactici* įtaka viščiukų broilerių produktyvumui. *ŽEMĖS ŪKIO MOKSLAI*. 2006, p. 68–74.
6. Prieiga per internetą: <http://alkas.lt/2013/04/06/probiotikai-kas-tai/> [žiūrėta 2017-12-06].
7. SAARELA M., G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto, T. Mattila-Sandhol. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*. 2000, vol. 84, p. 197 – 215.
8. Prieiga per internetą: <http://www.e-vaistine.lt/sveikata/sveika-mityba/gerosios-bakterijos/> [žiūrėta 2017-12-08].
9. Prieiga per internetą: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-zindex/probiotics/en/> [žiūrėta 2017-12-02].
10. COOK, M. T., G. TZORTZIS, D. CHARALAMPOPOULOS, V. V. KHUTORYANSKIY. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*. 2012, vol. 162, p. 56-67.
11. PARVEZ, S., K. A. MALIK, S. A. KANG, H. Y. KIM. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*. 2006, vol. 6, p. 1171–1185.
12. LAKKIS, J. M. Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems. Second edition. 2016.
13. CALAFIORE, A., P. Gionchetti, C. Calabrese, R. Tambasco, G. Spuri-Fornarini, G. Liguori, D. Riso, M. Campieri, F. Rizzello. Probiotics, Prebiotics and Antibiotics in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY RESEARCH*, 2012, vol. 1.
14. HEMAISWARYA, S., R. Raja, R. Ravikumar, I. S. Carvalho. Mechanism of action of probiotics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2013, vol. 56. ISSN 1678-4324.
15. CAPELA, P., T. K. C. Hay, N. P. Shah. Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Research International*. 2007, vol. 40, p. 1261-1269.
16. MORTAZAVIAN, A., S. H. Razavi, M. R. Ehsani, S. Sohrabvandi. Principles and Methods of Microencapsulation of Probiotic Microorganisms. Department of Food Science and Engineering. Faculty of Biosystem Engineering. Campus of Agriculture. University of Tehra. 2007, vol. 5, p. 1-18.



17. HOU, C., X. Zeng, F. Yang, H. Liu, S. Qiao. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. Journal of animal science and biotechnology. 2015, vol, 6(1), p 14.
18. MUTHUKUMARASAMY, P., P. Allan-Wojtas and R. A. Holley. Stability of *Lactobacillus reuteri* in Different Types of Microcapsules. JOURNAL OF FOOD SCIENCE. 2006, vol. 71,
19. MU, Q., V. J. Tavella and X. M. Luo. Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. Front Microbiol. 2018, vol. 9, p. 757.
20. Prieiga per internetą: [https://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus\\_plantarum](https://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_plantarum) [žiūrėta 2017-12-06].
21. TRABELSI, I., W. Bejar, D. Ayadi, H.Chouayekh, R. Kammoun, S. Bejar, R. B. Salah. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. International Journal of Biological Macromolecules. 2013, vol. 61, p. 36-42.
22. Prieiga per internetą: [https://www.researchgate.net/figure/SEM-images-of-cells-from-microcolonies-of-acid-stressed-L-plantarum-WCFS1-grown-on-PAO\\_fig2\\_23416146](https://www.researchgate.net/figure/SEM-images-of-cells-from-microcolonies-of-acid-stressed-L-plantarum-WCFS1-grown-on-PAO_fig2_23416146) [žiūrėta 2017-12-20].
23. WHISNER, C. M., L. F. Castillo. Prebiotics, Bone and Mineral Metabolism. Calcif Tissue Int. 2018, vol. 102, p. 443–479.
24. JUKNA, Č., V. Jukna, A. Šimkus. PROBIOTIKŲ IR FITOBIOTIKŲ ĮTAKA GALVIJŲ PRIEAUGLIO MĖSINĖMS SAVYBĖMS IR MĖSOS KOKYBEI. VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA. 2005, vol. 29 (51). ISSN 1392-2130.
25. KULIKAUSKIENĖ, M., V. Speičienė. Prebiotinių skaidulų Fibregum įtaka jogurto sineretinėms ir reologinėms savybėms. MAISTO CHEMIJA IR TECHNOLOGIJA. 2007. Vol. 41(1). ISSN 1392-1227.
26. KHANGWAL, I., P. Shukla. Potential prebiotics and their transmission mechanisms: Recent approaches. Journal of Food and Drug Analysis. 2019.
27. BOSSCHER, D. Fructan Prebiotics Derived from Inulin. Prebiotics and Probiotics Science and Technology. p. 163-205.
28. NINESS, K. R. Inulin and Oligofructose: What Are They?. The Journal of Nutrition. 1999, vol. 129, p. 1402S–1406S.
29. HURTADO-FERNANDEZ, E., M. Gómez-Romero, A. Carrasco-Pancorbo, A. Fernández-Gutiérrez. Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2010, vol. 53, p. 1130-1160.
30. SURYAKUMAR, G., A. Gupta. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). Journal of Ethnopharmacology. 2011, vol. 138, p. 268-278.
31. PETROVIC, T., V. Nedovic, S. Dimitrijevic-Brankovic, B. Bugarski, C. Lacroix. Protection of probiotic microorganisms by microencapsulation. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly. 2007, vol. 13, p. 169-174.
32. NAGA JYOTHI, N. V., P. M. Prasanna, S. N. Sakarkar, K. S. Prabha, P. S. Ramaiah, G. Y. Srawan. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. Journal of Microencapsulation. 2010, vol. 27, p. 187-197.
33. KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. 2002, p. 39-48.

34. HUQ, T., A. Khan, R. A. Khan, B. Riedl, M. Lacroix. Encapsulation of Probiotic Bacteria in Biopolymeric System. *Food Science and Nutritionals*. 2012, p. 909-916.
35. BURGAIN, J., C. Gaiani, M. Linder, J. Scher. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 2011, vol. 104, p. 467-483.
36. HIMANSHU, K. S., D.D. Pawar, D. A. Shah, V. D. Prajapati, G. K. Jani, A. M. Mulla, and P. M. Thakar. Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent. Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International*. 2013.
37. CHAVARRI, M., I. Marañón, M. C. Villarán. Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. Chapter 23. *Intech*. 2012. DOI:10.5772/50046.
38. KRASAEKOOPT, W., B. Bhandari, H. Deeth. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 2003, vol. 13, p. 3-13.
39. IQBAL, M., N. Zafar, H. Fessi, A. Elaissari. Double Emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, vol. 496, p. 173-190.
40. Prieiga per internetą: <http://soft-matter.seas.harvard.edu/index.php/Emulsions>, žiūrėta [2019-03-28].
41. LEI, L., Q. Zhang, S. Shi, S. Zhu. High internal phase emulsion with double emulsion morphology and their templated porous polymer systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016, vol. 483, p. 232-240.
42. PAYS, K., J. Giermanska-Kahn, B. Pouligny, J. Bibette, F. Leal-Calderon. Double emulsions: how does release occur?. *Journal of Controlled Release*. 2002, p. 193-205.
43. NESTRENKO, A., A. Drelich, H. Lu, D. Clause, I. Pezron. Influence of a mixed particle/surfactant emulsifier system on water-in-oil emulsion stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014, vol. 457, p. 49-57.
44. KAUR, G., S. K. Mehta. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017, vol. 529, p. 134-160.
45. FAROOQ, A., H. Shafaghat, J. Jae, S. C. Jung, Y. K. Park. Enhanced stability of bio-oil and diesel fuel emulsion using Span 80 and Tween 60 emulsifiers. *Journal of Environmental Management*. 2019, vol. 231, p. 694-700.
46. Prieiga per internetą: <http://www.mpe.lt/lt/mpe/medziagos,id,Lecitinas> [peržiūrėta 2018-12-02].
47. FLORENCE, A. T., D. Whitehill. Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1981, vol. 79, p. 243-256.
48. SIVAPRIYA, S., P. A. Daisy, G. Bobby Johns, R. Praveen Raj, T. Noby, C. Betty. MULTIPLE EMULSIONS A COPREHENSIVE REVIEW. *WORLD JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND MEDICAL RESEARCH*. 2016, vol. 2(5), p. 83-88.
49. BHATIA, N., S. Pandit, S. Agrawal, D. Gupta. A Review On Multiple Emulsions. *International Journal of Pharmaceutical Erudition*. 2013, vol. 3(2), p. 22-30.
50. BADOLATO, G. G., F. Aguilar, H. P. Schuchmann, T. Sobisch, D. Lerche. Evaluation of Long Term Stability of Model Emulsions by Multisample Analytical Centrifugation. *Progr Colloid Polym Sci*. 2008, vol. 134, p. 66-73.

51. ZHAO, S., G. Tian, C. Zhao, C. Li, Y. Bao, C. Di Marco-Crook, Z. Tang, C. Li, D. J. McClements, H. Xiao, J. Zheng. The stability of three different citrus oil-in-water emulsions fabricated by spontaneous emulsification. *Food Chemistry*. 2018, vol. 269, p. 577-587.
52. Prieiga per internetą: <http://pssnicomp.com/definitions/ostwald-ripening/> [žiūrėta 2019-04-05].
53. SHARMA, G., S. Sharma, A. Kumar, A. H. Al-Muhtaseb, M. Naushad, A. A. Ghfar, G. T. Mola, F. J. Stadler. Guar gum and its composites as potential materials for diverse applications: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2018, vol. 199, p. 534-545.
54. IRAVANI, S., H. Korbekandi, S. V. Mirmohammadi. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *Journal of Food Science and Technology*. 2015, vol. 52, p. 4679-4696.
55. SETH, D., H. Mishra, S. C. Deko. Effect of microencapsulation using extrusion techniques on viability of bacterial cells during spray drying of sweetened yoghurt. 2017, vol. 103, p. 802-807.
56. CHANDRAMOULI, V., K. Kailasapathy, P. Peiris, M. Jones. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, vol. 56, p. 27-35.
57. BRACCINI, I., S. Perez. Molecular Basis of Ca<sup>2+</sup>-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules*. 2001, vol. 2, p. 1089-1096.
58. LINARES, N. C., M. Di Falco, I. Benoit-Gelber, B. S. Gruben, M. Peng, A. Tsang, M. R. Mäkelä, R. P. de Vries. The presence of trace components significantly broadens the molecular response of *Aspergillus niger* to guar gum. *New Biotechnology*. 2019, vol. 51, p. 57-66.
59. GEORGE, A., P. A. Shah, P. S. Shrivastav. Guar gum: Versatile natural polymer for drug delivery applications. *European Polymer Journal*. 2019, vol. 112, p. 722-735.
60. SINHA, V. R., A. Kumar. Multiple emulsions: An Overview of Formulation, Characterization, Stability and Applications. *Indian J. Pharm.* 2002, vol. 64(3), p. 191-199.
61. ZHU, X. F., N. Zhang, W. F. Lin, C. HeTang. Freeze-thaw stability of pickering emulsions stabilized by soy and whey protein particles. *Food Hydrocolloids*. 2017, vol. 69, p. 173-184.
62. EISINAITĖ, V., D. Juraite, K. Schroën, D. Leskauskaite. Preparation of stable food-grade double emulsions with a hybrid premix membrane emulsification system. *Food Chemistry*. 2016, vol. 206, p. 59-66.
63. HUANG, X., Y. Kakuda, W. Cui. Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*. 2001, vol. 15, p. 533-542.
64. WEISS, J., I. Scherze, G. Muschiolik. Polysaccharide gel with multiple emulsion. *Food Hydrocolloids*. 2005, vol. 19, p. 605-615.
65. ANNAN, N. T., A. D. Borza, L. Truelstrup Hansen. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*. 2008, vol. 41, p. 184-193.
66. CHAVARRI, M., I. Maranon, R. Ares, F. C. Ibanez, F. Marzo, M. del Carmen Villaran. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, vol. 142, p. 185-189.
67. MEI, X., F. M. Etzler, Z. Wang. Use of texture analysis to study hydrophilic solvent effects on the mechanical properties of hard gelatin capsules. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006, vol. 324, p. 128-135.

68. MINEKUS, M., M. Alming, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carriere, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. Menard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies and A. Brodkorb. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function*. 2014, vol. 5, p. 1113.
69. ESLAMI, P., L. Davarpanah, F. Vahabzadeh. Encapsulating role of  $\beta$ -cyclodextrin in formation of pickering water-in-oil-in-water ( $W_1/O/W_2$ ) double emulsions containing *Lactobacillus dellbrueckii*, *Food Hydrocolloids*. 2017, vol. 64, p. 133-148.
70. BOSMULER ZUGE, L. C., C. W. Isidoro Haminiuk, G. M. Maciel, J. L. Meira Silveira, A. de Paula Scheer. Catastrophic inversion and rheological behavior in soy lecithin and Tween 80 based food emulsions. *Journal of Food Engineering*. 2013, vol. 116, p. 72-77.
71. RAJESH, K., K. Murugesan, M. Nanjaian. Multiple Emulsions: A Review. 2012, p. 9-19.
72. LV, G., F. Wang, W. Cai, X. Zhang. Characterization of the addition of lipophilic Psan to the hydrophilic Tween 80-stabilized emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014, vol. 447, p. 8-13.
73. ROCCHINO, J., J. Neilsen, K. Everett, G. D. Bothum, A solvent-free lecithin-Tween 80 system for oil dispersion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2017, vol. 533, p. 218-223.
74. RUCKENSTEN, E. Microemulsions, Macroemulsions, and the Bancroft Rule. *Langmuir*. 1996, vol. 12(26), p. 6351-6353.
75. NEIRYNCK, N., K. Van lent, K. Dewettinck, P. Van der Meeren. Influence of pH and biopolymer ratio on sodium caseinate—guar gum interactions in aqueous solutions and in O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*. 2007, vol. 21, p. 862-869.
76. SINGH, K., S. Gangacharyulu, D. Vijaya, K. Bulasar. Formation, stability and comparison of water/oil emulsion using gum arabic and guar gum and effect of aging of polymers on drag reduction percentage in water/oil flow. *Vacuum*. 2019, vol. 159, p. 247-253.
77. AKIN, M. B., M. S. Akin, Z. Kirmaci. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chemistry*. 2007, vol. 104, p. 93-99.
78. Prieiga per internetą: <https://chekasmikrobio.blogspot.com/2017/09/augimo-fazes.html> [žiūrėta 2019-03-08].
79. USHIKUBO F.Y., R. L. Cunha. Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. *Food hydrocolloids*. 2012.
80. BABONIENĖ, E., L. Jonaitienė, R. Pečiūra. LIPOFILINĖS FAZĖS ĮTAKOS EMULSIJŲ, GAMINAMŲ SU POLIAKRILO RŪGŠTIES POLIMERINIAIS EMULSIKLAIS, STABILUMUI, TYRIMAS. *SVEIKATOS MOKSLAI*. 2014, vol. 6, p. 95-99. ISSN 1392-6373.
81. SOLEDAD, M., A. Cerimedo, C. H. Iriart, R. J. Candal, M. L. Herrera. Stability of emulsions formulated with high concentrations of sodium caseinate and trehalose. *Food Research International*. 2010, vol. 43, p. 1482-1493.
82. DICKINSON, E., Particle-based stabilization of water-in-water emulsions containing mixed biopolymers. *Trends in Food Science & Technology*. 2019, vol. 83, p. 31-40.

83. GUERGOLETTTO, K. B., M. Magnani, J. San Martin, C. G. T. de Jesus Andrade, S. Garcia. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2010, vol. 11, p. 415-421.
84. BLANDINO, A., M. Macias, D. Centro. Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl<sub>2</sub> concentration on gelation kinetics. Journal of Bioscience and Bioengineering. 1999, vol. 88, p. 686-689.