



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Vertingų ingredientų sukūrimas iš mėlynių išspaudų taikant aukšto slėgio biorafinavimo ir mikroįkapsuliavimo procesus**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Džiuljeta Godoladze**

Projekto autorė

**Lekt. dr. Milda Pukalskienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Vertingų ingredientų sukūrimas iš mėlynių išspaudų taikant aukšto slėgio biorafinavimo ir mikroįkapsuliavimo procesus**

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslo ir saugos studijų programa (6211FX011)

---

**Džiuljeta Godoladze**

Projekto autorė

**Lekt. dr. Milda Pukalskienė**

Vadovė

**Lekt. dr. Paulius Kraujalis**

Recenzentas

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Džiuljeta Godoladze

## **Vertingų ingredientų sukūrimas iš mėlynių išspaudų taikant aukšto slėgio biorafinavimo ir mikroįkapsuliavimo procesus**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Džiuljetos Godoladzes, baigiamasis projektas tema „Vertingų ingredientų sukūrimas iš mėlynių išspaudų taikant aukšto slėgio biorafinavimo ir mikroįkapsuliavimo procesus“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

---

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

---

(parašas)

Godoladze, Džiuljeta. Vertingų ingredientų sukūrimas iš mėlynių išspaudų taikant aukšto slėgio biorafinavimo ir mikroįkapsuliavimo procesus. Magistro baigiamasis projektas / vadovė lekt. dr. Milda Pukalskienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: *Vaccinium myrtillus*, mėlynių išspaudos, ekstrakcija, trigliceriai, antocianiai, antioksidacinis aktyvumas.

Kaunas, 2019. 62 p.

## Santrauka

Po mėlynių sulčių spaudimo, lieka didelė dalis šalutinių produktų – mėlynių išspaudų. Šie produktai paprastai panaudojami ne itin racionaliai ir neretai utilizuojami. Toks mėlynių išspaudų švaistymas nulemia didelių vertingų maistinių junginių kiekių praradimą. Remiantis mokslinių šaltinių duomenimis nustatyta, kad mėlynių išspaudose po sulčių spaudimo lieka didelis kiekis maistinių skaidulų ir biologiškai aktyvių junginių, kurie pasižymi palankiu poveikiu sveikatai.

Šio darbo tikslas buvo pritaikyti optimalius bioaktyvių junginių išskyrimo metodus iš mėlynių (lot. *Vaccinium myrtillus*) išspaudų, įvertinti gautų frakcijų ir ekstraktų pagrindinius cheminės sudėties rodiklius bei savybes, taikant įvairius *in vitro* metodus. Tyrimų metu buvo stengiamasi atrinkti perspektyviausias bioaktyvių junginių frakcijas ir pritaikyti sudarytose modelinėse sistemose *in vitro*.

Pirmiausia, sausos mėlynių išspaudos buvo susmulkintos 2, 1 ir 0.5 mm frakcijomis. Tada atliktas ekstraktų išgavimas iš susmulkintų išspaudų naudojant tradicinius ir šiuolaikiškus ekstrakcijos metodus: daugiapakopę superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu, pagreitintą ekstrakciją organiniais tirpikliais bei maceravimą.

Gautų ekstraktų ir po ekstrakcijų likusių kietųjų frakcijų antioksidacinis aktyvumas įvertintas naudojant įvairius *in vitro* metodus. Įvertinta radikalų sujungimo geba taikant 2,2-difeni-1-pikrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) radikalo ir 2,2'-azino-bis-3etilbenzotiazolin-6- sulfono rūgšties (ABTS<sup>•+</sup>) radikalo blukinimo metodus. Taip pat nustatytas bendras fenolinių junginių kiekis *Folin-Ciocalteu* metodu ir deguonies surišimo geba (ORAC). Netirpių išspaudų komponentai buvo tirti taikant QUENCHER procedūrą ir nustatyta, kad po ekstrakcijų išspaudose dar lieka antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių junginių.

Kokybinė mėlynių išspaudų ekstraktų, triacilglicerolių bei antocianinų kiekybinė analizė buvo atlikta taikant ultra efektyviąją skysčių chromatografiją. Didžiausia antocianinų koncentracija nustatyta ekstrakto, kuris buvo gautas maceracivimu purtant, kai ekstrahavimui buvo parinktas vandens ir etanolio mišinys. Šis ekstraktas toliau tirtas, taikant išpurkiamąjį džiovavimo metodą, kuomet ekstraktas prieš išpurškimą buvo įkapsuliuotas, naudojant tris skirtingas dangas (matricas), o vėliau įkapsuliuoti produktai buvo tirti įvertinant įkapsuliavimo efektyvumą. Naudojant maltodekstriną kaip įkapsuliavimo agentą, gautas didžiausias įkapsuliavimo efektyvumas. Sekančiame etape buvo įvertintas išpurkštų miltelių stabilumo tyrimas jogurte. Vertinant stabilumą, jogurtas buvo tirtas 4 savaites, kas savaitę tikrinant antocianinų kiekį jame.

Apibendrinant galima teigti, kad mėlynių išspaudos yra puikus bioaktyvių junginių šaltinis, kurį toliau galima panaudoti maisto pramonėje praturtinant kitus maisto produktus, taip sukuriant vertingus funkcionaliuosius maisto produktus, pasižyminčius teigiamomis sveikatą gerinančiomis savybėmis.

Godoladze, Džiuljeta. Development of Valuable Functional Ingredients from Bilberry Pomace Using High Pressure Biorefining and Microencapsulation Processes. Master's Final Degree Project / supervisor lect. dr. Milda Pukalskienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: *Vaccinium myrtillus*, bilberry pomace, extraction, triacylglycerols, anthocyanins, antioxidant activity.

Kaunas, 2019. 62 pages.

## Summary

After the production of blueberry juice, a large part of the by-products remain. These products are generally not used in a rational way and are often utilized. Such a waste of blueberry pomace determines the loss of large amounts of valuable nutrients. According to scientific studies, high amounts of nutrient fiber and biologically active compounds have been found in bilberry pomace. These compounds have a beneficial effect for human health.

The aim of this work was to apply different extraction methods of bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) pomace and evaluate the main chemical composition properties of the obtained fractions and extracts using various *in vitro* methods. In the course of the research, were tried to select the most active extracts of the bioactive compounds and to apply them to *in vitro* systems.

Firstly, the dried pomace was ground to obtain 2, 1, and 0.5 mm particle size fractions. Then extracts were obtained from bilberries using traditional and modern extraction techniques such as multi-level supercritical carbon dioxide extraction, accelerated solvent extraction and maceration.

Antioxidant potential of extracts and solid plant material was evaluated by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) radical, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) scavenging and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays, total phenolic content (TPC) was determined by *Folin-Ciocalteu* method. Solid fractions investigated by QUENCHER approach showed that solid fractions obtained after various extractions, still contain significant amounts of active compounds.

Qualitative chemical composition analysis of bilberry pomace extracts, triacylglycerols and quantitative analysis of anthocyanins were performed by ultra performance liquid chromatography. The highest concentration of anthocyanins showed MAC H<sub>2</sub>O/EtOH (8:2) extract. This extract was further selected for encapsulation by spray-drying with three different matrices, and the efficiency of the encapsulation was monitored. By using maltodextrin as an encapsulating agent, maximum encapsulation efficacy was obtained. These matrixes were added to the ecological yogurt without additives and then samples were kept for 4 weeks, and anthocyanins content was monitored weekly.

This study revealed that bilberry pomace is a great source of bioactive compounds that can be further utilized in nutrition to enrich other nutritional values or to produce various natural food supplements.

## Turinys

<b>Lentelių sąrašas .....</b>	<b>9</b>
<b>Paveikslų sąrašas .....</b>	<b>10</b>
<b>Santrumpų sąrašas .....</b>	<b>11</b>
<b>Įvadas.....</b>	<b>13</b>
1.1. Mėlynių (lot. <i>Vaccinium myrtillus</i> ) morfologiniai požymiai ir paplitimas .....	15
1.2. Mėlynių biocheminė sudėtis.....	15
1.3. Mėlynių veikliųjų medžiagų farmakologinis poveikis.....	17
1.4. Technologinių veiksnių įtaka veikliųjų junginių įkapsuliacijos efektyvumui, prailginto veikimo produktų sukūrimui .....	18
<b>2. Tyrimo objektas ir metodai .....</b>	<b>23</b>
2.1. Tyrimų objektas.....	23
2.2. Tyrimams naudoti cheminai reagentai ir įrenginiai.....	23
2.3. Ekstraktų gavimo schema.....	24
2.4. Superkritinė ekstrakcija anglies dioksidu (SKE-CO <sub>2</sub> ).....	26
2.5. Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (PET).....	26
2.6. Baltymų, riebalų, drėgmės ir mineralinių medžiagų kiekio nustatymas .....	27
2.7. Ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas .....	27
2.7.1. Bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas (BFJK) .....	27
2.7.2. DPPH• 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalų sujungimo metodas.....	28
2.7.3. ABTS• <sup>+</sup> 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties laisvųjų radikalų sujungimo metodas.....	28
2.7.4. Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas (ORAC).....	29
2.8. Ekstraktų ir triacilglicerolių analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UESCh – MS).....	30
2.9. Riebalų rūgščių (RR) sudėties nustatymas dujų chromatografijos (DC – LJD) metodu .....	30
2.10. Antocianinų kokybinis ir kiekybinis įvertinimas .....	31
2.11. Antocianinų įkapsuliacijos efektyvumo nustatymas naudojant purškiamojo džiovinimo metodą. ....	31
2.11.1. Mikroapsulių gamyba.....	31
2.11.2. Mikroįkapsuliuotų produktų struktūros analizė skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (SEM) 32	
2.11.3. Bendras ir paviršiaus antocianinų kiekio ir įkapsuliacijos efektyvumo nustatymas .....	32
2.11.4. Įkapsuliuotų antocianinų stabilumo tyrimas.....	33
<b>3. Rezultatai ir jų aptarimas.....</b>	<b>34</b>
3.1. Mėlynių išspaudų sudėtis .....	34
3.2. Ekstraktų išėigos gautos ekstrahuojant organiniais tirpikliais.....	34
3.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ekstraktuose.....	36
3.4. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas .....	42
3.5. Triacilglicerolių sudėties nustatymas .....	42
3.6. Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė.....	44
3.6.1. Antocianinų įkapsuliacijos efektyvumo (IE) nustatymas .....	46
3.6.2. Gautų mikroįkapsuliuotų produktų struktūros analizė skenuojančiu elektroniniu mikroskopu 47	
3.6.3. Mikroapsulių stabilumo tyrimas.....	49

3.7. Kokybinė ekstraktų analizė (UESCh-MS) metodu .....	51
<b>4. Išvados .....</b>	<b>54</b>
<b>5. Literatūros sąrašas .....</b>	<b>55</b>
<b>6. Priedai.....</b>	<b>61</b>



## Lentelių sąrašas

<b>1 lentelė.</b> Mėlynių išspaudų sudėtis .....	34
<b>2 lentelė.</b> Riebalų rūgščių (RR) sudėtis mėlynių išspaudų (SK – CO <sub>2</sub> ) ekstrakte.....	42
<b>3 lentelė.</b> Triacilglicerolių kompozicija 0,5mm mėlynių išspaudų SK – CO <sub>2</sub> ekstrakto.....	43
<b>4 lentelė.</b> Antocianinų kiekis mėlynių etaloniniuose ekstraktuose (mg/100g išspaudų) .....	45
<b>5 lentelė.</b> Antocianinų įkapsuliavimo efektyvumas (%) .....	47
<b>6 lentelė.</b> Antocianinų išgava paviršiuje ir viduje naudojant skirtingas dangas (%) .....	47
<b>7 lentelė.</b> Cheminės sudėties rezultatai mėlynių išspaudų ekstraktuose gautos UESCh – MS metodu .....	51

## Paveikslų sąrašas

<b>1.1 pav.</b> Mėlynė (lot. <i>Vaccinium myrtillus</i> ) [9].....	15
<b>1.2 pav.</b> Flavanoidų struktūros modelis [17].....	16
<b>1.3 pav.</b> Antocianinų struktūrinė schema [35] .....	17
<b>1.4 pav.</b> Mikrokapsulių sudarymo principinė schema [53].....	19
<b>1.5 pav.</b> Purškiamojo džiovinimo pricipinė schema [72].....	20
<b>1.6 pav.</b> Centrifuginės ekstruzijos proceso schema [75].....	21
<b>2.1 pav.</b> Mėlynių išspaudų gamybos (I dalis) ir vykdytų eksperimentų schema (II dalis) .....	25
<b>2.2 pav.</b> Superkritinio ekstraktoriaus anglies dvideginiu schema [76] .....	26
<b>2.3 pav.</b> Pagreitinios ekstrakcijos organiniais tirpikliais sistemos schema [77] .....	27
<b>3.1 pav.</b> Skirtingų ekstraktijų metu gautos išeigos (g/100g sausų išspaudų) .....	35
<b>3.2 pav.</b> Superkritinės ekstrakcijos 0,5, 1 ir 2 mm mėlynių išspaudų kinetinės kreivės.....	36
<b>3.3 pav.</b> Bendras fenolinių junginių kiekis mėlynių išspaudų ekstraktuose .....	37
<b>3.4 pav.</b> Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS <sup>•+</sup> metodu mėlynių išspaudų ekstraktuose ..	38
<b>3.5 pav.</b> Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH <sup>•</sup> metodu mėlynių išspaudų ekstraktuose ...	38
<b>3.6 pav.</b> Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ORAC metodu mėlynių išspaudų ekstraktuose ....	39
<b>3.7 pav.</b> Kietosios frakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas BFJK metodu .....	40
<b>3.8 pav.</b> Kietosios frakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH <sup>•</sup> modelinėje sistemoje...	41
<b>3.9 pav.</b> Kietosios frakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ORAC metodu .....	41
<b>3.10 pav.</b> Triacilglicerolių smailės chromatogramoje, analizei naudojant 0,5 mm SK – CO <sub>2</sub> ekstraktą.....	43
<b>3.11 pav.</b> Mikrokapsuliacijos būdu gauti miteliai naudojant skirtingas dangas: (1) maltodekstriną, (2) modifikuotą krakmolą HI-CAP, (3) maltodekstino/išrūgų baltymų mišinį (santykiu 2:1).....	46
<b>3.12 pav.</b> Mikrokapsulių SEM nuotrauka, naudojant skirtingas dangas: (1) maltodekstriną, (2) modifikuotą krakmolą HI-CAP, (3) maltodekstino/išrūgų baltymų mišinį (santykiu 2:1) ir esant skirtingiems didinimams: (a) – × 2500 ir (b) - × 10000 .....	49
<b>3.13 pav.</b> Antocianinų kiekio kitimas jogurte (µg/25 gr jogurto) laikymo metu 4 ± 1 °C temperatūroje .....	50
<b>3.14 pav.</b> Mėlynių išspaudų MAC H <sub>2</sub> O/EtOH ekstrakto UESCh – MS chromatograma.....	53
<b>6.1 pav.</b> Triacilglicerolių smailės chromatogramoje, analizei naudojant 1 mm SK-CO <sub>2</sub> ekstraktą. 61	
<b>6.2 pav.</b> Triacilglicerolių smailės chromatogramoje, analizei naudojant 2 mm SK-CO <sub>2</sub> ekstraktą. 61	

## Santrumpų sąrašas

### Santrumpos:

SKE – CO<sub>2</sub> – superkritinis anglies dvideginis

PD – purškiamasis džiovinimas

IE – įkapsuliavimo efektyvumas

AAPh – 2,2'-azobio (2-amidinpropano) dihidrochloridas

ABTS<sup>•+</sup> – 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštieskatijono laisvasis radikalas

DPPH<sup>•</sup> – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas

ORAC - deguonies radikalų absorbcijos geba

BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis

PET – pagreitinta ekstrakcija tirpikliais

GRE – galo rūgšties ekvivalentai

TRE – trolokso ekvivalentai

UESCh – ultra efektyvioji skysčių chromatografija

MS/MS – dviguba masių spektrometrija

UESCh – MS – ultra efektyvioji skysčių chromatografija su kvadrupoliniu skriejimo laiko masių detektoriumi

UV – ultravioletiniai spinduliai

STN – standartinis nuokrypis

RR – riebalų rūgštys

MAC – maceravimas

DC – LJD – dujų chromatografija su liepsnos jonizacijos detektoriumi

SEM – skenuojantis elektroninis mikroskopas

SM – sausa medžiaga

GIS – grynos išspaudos

MAC H<sub>2</sub>O/EtOH – po maceravimo etanolio ir vandens mišiniu (2:8) gautas ekstraktas

PET H<sub>2</sub>O – pagreitinotos ekstrakcijos vandeninis ekstraktas, gautas naudojant 120 °C temperatūrą

PET EtOH – pagreitinotos ekstrakcijos etanolinis ekstraktas, gautas naudojant 70 °C temperatūrą

SK – CO<sub>2</sub> – superkritinio anglies dvideginio ekstraktas

SK – CO<sub>2</sub> MAC EtOH – po superkritinio anglies dvideginio taikytos maceracijos gautas etanolinis ekstraktas

SK – CO<sub>2</sub> MAC H<sub>2</sub>O - po superkritinio anglies dvideginio taikytos maceracijos gautas vandeninis ekstraktas

\*MAC H<sub>2</sub>O/EtOH – išspaudos po maceravimo etanolio ir vandens mišiniu (2:8)

\*PET H<sub>2</sub>O – išspaudos po pagreitinotos ekstrakcijos vandeniu

\*PET EtOH – išspaudos po pagreitinotos ekstrakcijos etanolium

\*SK – CO<sub>2</sub> – išspaudos po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginium

\*SK – CO<sub>2</sub> MAC H<sub>2</sub>O – išspaudos po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginium taikytos maceracijos purtant vandenium

## Įvadas

Sveiko gyvenimo būdo ir sveikatai naudingų maisto produktų vartojimo įpročiai vis labiau išsiskiria šiuolaikinėje visuomenėje. Vis daugiau vartotojų stengiasi vartoti sveikesnius ir natūralesnius maisto produktus. Sveikesnis mitybos modelis daro teigiamą poveikį mūsų sveikatai ir sveikatos priežiūros išlaidoms. Šiuo metu ypač didelis dėmesys skiriamas augalinės kilmės produktams, kadangi juose gausu vertingų junginių, kurie teigiamai veikia sveikatą. Moksliniuose šaltiniuose nustatyta, kad vaisiai ir uogos pasižymi dideliu bioaktyvių junginių kiekiu ir ypač didele gausa polifenolinių junginių [1, 19].

Šiais laikais vis didesnį susirūpinimą kelia įvairios maisto gamybos ir apdorojimo metu susidarančios atliekos. Vienas dažniausiai naudojamų uogų apdorojimo būdų yra sulčių spaudimas. Gaminant įvairių uogų sultis yra gaunama 70 – 80 % sulčių ir 20 – 30 % po sulčių spaudimo likusio šalutinio produkto [2]. Šie produktai, kuriuos dažniausiai sudaro uogų odelės, stiebai ir sėklos, paprastai perdirbami į gyvūnų pašarus, kompostuojami, naudojami biodujų gamyboje, bet dažniausiai utilizuojami [3]. Toks uogų išspaudų švaistymas nulemia didelių kiekių vertingų maistinių junginių praradimą. Po mėlynių sulčių spaudimo likusiose išspaudose gausu maistinių skaidulų ir biologiškai aktyvių junginių, kurie pasižymi palankiu poveikiu sveikatai: mažina riziką susirgti širdies, kraujagyslių ligomis bei vėžiu dėl stipraus antioksidacinio ir priešuždegiminio aktyvumo, kuris savo ruožtu mažina oksidacinį stresą [4]. Dėl šios priežasties ieškoma alternatyvų kaip jas efektyviai panaudoti, kadangi tokiu atveju bus pasiekta ne tik ekonominė nauda, bet ir išnaudojama galimybė racionaliau panaudoti antrines žaliavas, didinant kitų maisto produktų vertes arba gaminant įvairius natūralius maisto priedus ar dažiklius [5].

Mėlynių išspaudos yra šalutinis sulčių apdorojimo produktas, turintis daug bioaktyvių junginių, kuriuos skirtingais ekstrakcijos metodais galima išgauti ir toliau panaudoti funkcinių maisto produktų gamyboje. Remiantis biorafinavimo koncepcija, išspaudose lieka tik minimalus kiekis vertingų junginių, ir ši žaliava gali būti toliau naudojama ne maisto pramonėje, pavyzdžiui, biokuro gamyboje.

**Darbo tikslas** – parinkti optimalius mėlynių išspaudų (lot. *Vaccinium myrtillus L.*) bioaktyvių junginių išskyrimo metodus, įvertinti gautų ekstraktų cheminę sudėtį bei antioksidacines savybes, taikant įvairius *in vitro* metodus. Įvertinti perspektyviausių ekstraktų mikrokapsuliuavimo efektyvumo ir stabilumo tyrimus.

### **Darbo tikslui pasiekti buvo išsikelti uždaviniai:**

1. Įvertinti mėlynių (lot. *Vaccinium myrtillus L.*) išspaudų pradines charakteristikas.
2. Išskirti iš mėlynių išspaudų ekstraktus, taikant pagreitintą ekstrakciją aukštame slėgyje, maceravimą purtant ir ekstrakciją superkritiniu anglies dvideginiu bei nustatyti ekstraktų išeigas.
3. Įvertinti mėlynių išspaudų ir kietos frakcijos po skirtingų ekstrakcijos būdų antioksidacinį potencialą, taikant įvairius antioksidacinio aktyvumo *in vitro* metodus.
4. Taikant dujų ir skysčių chromatografijos metodus atlikti skirtingų ekstraktų riebalų rūgščių, antocianinų ir kitų fenolinių junginių kokybinę ir kiekybinę analizę, nustatyti triacilglicerolių sudėtį.
5. Atrinkti perspektyviausią, didelę antocianinų koncentraciją pasižymintį ekstraktą, ir įvertinti jo panaudojimo galimybę įkapsuliuojant ekstraktą į skirtingomis fizikocheminėmis savybėmis

pasižyminčias dangas. Taip pat įvertinti antocianinų įkapsuliavimo efektyvumą bei atlikti produkto stabilumo tyrimą.

## Literatūros apžvalga

### 1.1. Mėlynių (lot. *Vaccinium myrtillus*) morfologiniai požymiai ir paplitimas

Mėlynė (lot. *Vaccinium myrtillus*) – tai 15 – 40 cm aukščio daugiametis krūmokšnis, priklausantis erikinių (lot. *Ericaceae*) augalų šeimai, dilenijažiedžių (lot. *Dilleniidae*) poklasiui. Augalo lapai yra odiški, ovalios formos, nusmailėjusia viršūne, kraštuose smulkiai dantyti, šviesiai žalios spalvos. Pavasarį išsiskleidus lapams, jų spalva yra rausva, kuri vėliau pasikeičia į gelsvai žalsvą, o prieš numetant lapus, jie paraudonuoja. Žiedai pavieniai, rausvai žalios spalvos, išsidėstę lapų pažastyse. Vaisiai rutuliški, 6 – 8 mm skersmens, sultingi, malonaus kvapo, saldaus skonio, melsvai juodos spalvos. Uogos vidus yra mėsingas, violetinės spalvos su rudomis ovaliomis sėklomis (1.1 pav.) [6, 7].

Mėlynės yra visame pasaulyje paplitusias uogas. Daugiausia auga Šiaurės Amerikoje ir Europoje. Ypač gausiai paplitusios Lietuvos pietų ir pietryčių srityje. Dažniausiai auga kalnuotose ir miškingose vietose, drėgnose pievose, pelkėse ir rūgščiuose dirvožemiuose [6]. Lietuvoje randamos ir kitos *Vaccinium* L. genties rūšys: girtuoklė (lot. *Vaccinium uliginosum* L.), bruknė (lot. *Vaccinium vitis-idaea* L.), tarpinė šilauogė (lot. *Vaccinium intermedium* Ruthe). Lietuvos klimato sąlygomis mėlynių krūmai pradeda žydėti gegužės mėnesio pabaigoje ir žydi iki birželio vidurio, tačiau pavienių žiedų galima aptikti visą vasarą. Mėlynių uogos galutinai prinoksta liepos mėnesio pradžioje ir laikosi iki rugsėjo [6, 8].



2.1 pav. Mėlynė (lot. *Vaccinium myrtillus*) [9]

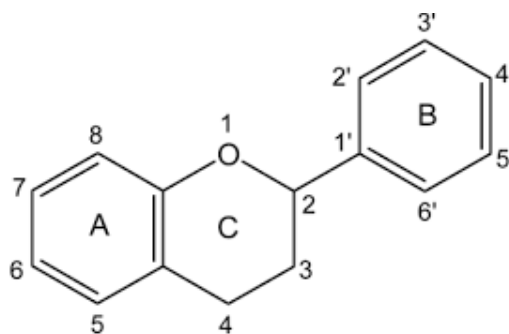
### 1.2. Mėlynių biocheminė sudėtis

Mėlynių išspaudose gausu flavanoidų, taninų, fenolinių, oraganinių rūgščių bei kitų biologiškai aktyvių junginių, tokių kaip vitaminai C (askorbo rūgštis), B1 (tiamino), B2 (riboflavino), B3 (niacino), K (naftochinono) bei mineralinių medžiagų (geležies, kalcio, kalio, vario, magnio, fosforo, chromo, mangano). Šių uogų išspaudose rasti dideli maistinių skaidulų kiekiai: 5,12 g / 100 g tirpiųjų ir 77,74 g / 100 g netirpiųjų maistinių skaidulų. Jų sudėtyje yra pektino (3,33 %), celiuliozės (8,38 %) ir hemiceliuliozės (20,91 %). Nustatyta, kad šviežiose mėlynių vaisiuose

galima rasti iki 4g / kg pektino [10]. Mėlynių išspaudose yra labai daug polifenolinių junginių grupei priklausančių antocianinų. Nustatyti cianidino, delphinidino, malvidino, peonidino ir petunidino arabinozidų, galaktozidų ir gliukozidų, kurie pasižymi farmakologiniu poveikiu bei suteikia mėlynių vaisiams būdingą spalvą [11]. Svarbu paminėti, kad uogų sudėtis priklauso nuo jų rūšies, augimo sąlygų bei uogų sunokimo laipsnio.

Mėlynės yra laikomos vienos svarbiausių fenolinių junginių šaltiniu. Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad mėlynių uogose fenolinių junginių randama apie 0,7 – 1,2 mg/g sausos masės [12]. Šie junginiai yra plačiai paplitę visų augalų tarpe ir turi itin didelę svarbą jų augimui bei reprodukcijai. Fenoliniai junginiai turi aromatinį žiedą, kuris turi vieną ar daugiau hidroksilo grupių, o jų struktūros gali kisti nuo paprastos fenolio molekulės iki sudėtingos didelės molekulinės masės polimero struktūros [13]. Tokie struktūriniai skirtumai lemia plačią fenolinių junginių įvairovę gamtoje.

Kaip ir daugelyje kitų uogų mėlynėse gausu flavanoidų [10, 15]. Tai dideliu antioksidaciniu aktyvumu pasižymintys junginiai, priklausantys fenolinių junginių grupei. Pagrindinis flavanoidų struktūros elementas yra flavono branduolys, kuriame randama 15 anglies atomų išdėstytų trijų žiedų sfera (C6-C3-C6), jie ženklinami A, B ir C raidėmis. Šiame struktūriniame skelete svarbu tai, kad yra chromano žiedas (C), kurio antroje, trečioje ar ketvirtoje vietoje prisijungęs aromatinis žiedas B (1.2 pav.) [16].



2.2 pav. Flavanoidų struktūros modelis [17]

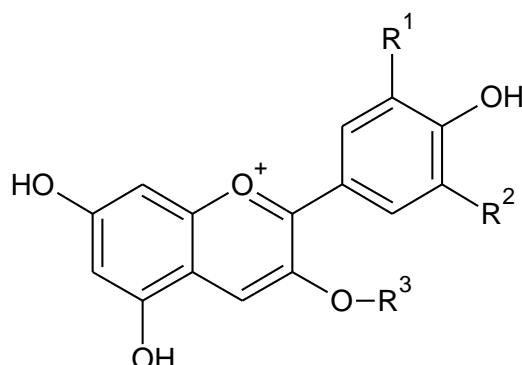
Mėlynių vaisiuose nustatyta nuo 5 iki 12 % taninų, iš kurių didžiausią dalį sudarė katechinas [7, 8]. Neprinokusiuose vaisiuose rasta fenolinių rūgščių: galo, protokatecho, m-hidroksibenzoinės ir p-hidroksibenzoinės, vanilino, chlorogeno, kavos, siringo, ferulio bei o-, m- ir p-kumaro rūgšties. Identifikuota keletas fenolinių rūgščių esterių su cukraus liekana: 1-O-hidroksicinamil-β-D-gliukozė ir p-kumarilgliukozė. Nustatyta organinių rūgščių: obuolių, chinino, pieno, oksalo, gintaro, citrinų [8, 20, 21].

Mėlynių vaisiuose identifikuota apie 109 lakieji junginiai, iš kurių didžiausią dalį sudarė alifatiniai alkoholiai, aldehydai ir ketonai, terpeno dariniai, aromatiniai junginiai ir esteriai. Nustatyti trys pagrindiniai junginiai, suteikiantys būdingą mėlynėms kvapą: trans-2-heksenalis, etil-3-metilbutiratas ir etil-2-metilbutiratas [22]. Mėlynių vaisių sėklose nustatyta baltymų, riebalinio aliejaus, kurio sudėtyje yra sočiųjų, mono ir polinesočiųjų riebalų rūgščių [23].

Mėlynėse aptinkami dideli antocianinų kiekiai, kurie sudaro didžiausią vandenyje tirpių polifenolinių flavanoidų grupę augalų karalystėje (1.3 pav.) [24]. Tai natūralūs pigmentai, atsakingi už daugelio daržovių, vaisių ir uogų (taip pat ir mėlynių) mėlyną, violetinę, geltoną ir oranžinę



spalvas. Mėlynėms būdingas didelis antocianinų kiekis, lyginant su kitomis uogomis. Literatūros šaltiniuose nurodyta, kad mėlynėse antocianinai sudaro apie 90% visų fenolinių junginių esančių šiose uogose [25]. Pavyzdžiui, vidutinis kiekis šių junginių spanguolėse yra apie 40%, o braškėse apie 48 % [26]. Antocianinų kiekis, mėlynėse kinta nuo 300 iki 700mg/100g šviežių uogų [27].



R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Antocianinas
H	H	Gliukozė/Arabinozė/Galaktozė	Pelargonidin-3-gliukozė/arabinozė/galaktozė
OH	H	Gliukozė/Arabinozė/Galaktozė	Cianidin-3-gliukozė/arabinozė/galaktozė
OH	OH	Gliukozė/Arabinozė/Galaktozė	Delfinidin-3-gliukozė/arabinozė/galaktozė
OCH <sub>3</sub>	OH	Gliukozė/Arabinozė/Galaktozė	Petunidin-3-gliukozė/arabinozė/galaktozė
OCH <sub>3</sub>	H	Gliukozė/Arabinozė/Galaktozė	Peonidin-3-gliukozė/arabinozė/galaktozė
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Gliukozė/Arabinozė/Galaktozė	Malvidin-3-gliukozė/arabinozė/galaktozė

2.3 pav. Antocianinų struktūrinė schema [35]

Moksliniuose šaltiniuose nurodama, kad mėlynėse rasta 15 skirtingų antocianinų: malvidin 3-galaktozidas, delfinidin 3-galaktozidas, delfinidin 3-arabinozidas, petunidin 3-galaktozidas, petunidin 3-arabinozidas, malvidin 3-arabinozidas, cianidin 3-gliukozidas, cianidin 3-galaktozidas, cianidin 3-arabinozidas, delfinidin 3-gliukozidas, malvidin 3-gliukozidas, peonidin 3-gliukozidas, peonidin 3-galaktozidas, peonidin 3-arabinozidas ir peonidin 3-gliukozidas [28]. Kiekvienas junginys suteikia skirtingą vaisiaus luobelės atspalvį ir turi skirtingas antioksidacines savybes [29]. Kurio junginio mėlynės uogoje kaupiama daugiausiai, vienareikšmiškai atsakyti negalima, nes atlikinėjami tyrimai rodo skirtingus rezultatus. Moksliniuose šaltiniuose teigiama, jog daugiausiai yra randama delfinidino ir cianidino junginių.[30, 31, 32]. Uogų kiekybinė sudėtis priklauso nuo augalo augimo lokalizacijos, nokimo periodo bei surinkimo laikotarpio.

Antioksidacinės antocianinų savybės paprastai priklauso nuo molekulės struktūros ir pakaitų išsidėstymo. Šių junginių antioksidantinis poveikis pasireiškia per daugelį sudėtingų mechanizmų, tokių kaip: (1) sugebėjimą tiesiogiai surišti laisvuosius radikalus, (2) apsaugoti nuo aktyviųjų deguonies junginių formavimosi [33]. Modelinėse sistemose nustatyta, kad antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys antocianinai atiduoda elektroną ar vandenilio atomą iš hidroksilo pakaito laisviesiems radikalams ir taip suriša laisvuosius radikalus nutraukdami oksidacinių procesų grandinę [34].

### 1.3. Mėlynių veikliųjų medžiagų farmakologinis poveikis

Per pastaruosius kelerius metus mėlynių uogų farmakologinis poveikis buvo plačiai nagrinėjamas įvairiais *in vivo* ir *in vitro* eksperimentais [36]. Literatūroje daugelis tyrimų patvirtina, kad visos

uogos, įskaitant ir mėlynės, pasižymi reikšmingu biologiniu poveikiu žmogaus sveikatai dėl sudėtyje esančių fenolinių junginių kiekio. Mėlynėse gausu biologiškai aktyvių medžiagų, kurios pasižymi antikancerogeniniu, priešuždegiminiu, antioksidaciniu bei antimikrobinu poveikiu. [37, 38]. Šios uogos pasižymi ypač dideliu antocianinų kiekiu. Moksliniuose šaltiniuose nurodyta, kad mėlynėse aptinkami antocianinai sudaro apie 90 % visų fenolinių junginių [25]. Zheng ir kt. (2003) teigia, kad antioksidacinis aktyvumas mėlynėse labiausiai priklauso nuo jų sudėtyje esančių antocianinų [39].

Antocianinai turi potencialių farmakologinių ir biologinių savybių, dėl kurių gali būti naudojami tiek medicinoje, tiek terapiniais tikslais. Dėl šios priežasties susidomėjimas jais paskutiniu metu itin išaugo. Atlika daugybė tyrimų tiriant mėlynių bei jų sudėtyje esančių antocianinų poveikį sveikatai. Šie junginiai suriša laisvuosius radikalus bei svarbūs prevencijai nuo kancerogenezės [40]. Hou ir kt. (2004) nustatė, antocianinų ir jų anglikonų teigiamą poveikį slopinant vėžines ligas sukeliančių veiksnių poveikį [41].

Taip pat buvo ištirtas antocianinų apsauginis poveikis širdies ir kraujagyslių ligų prevencijai [42]. Teigiamas šių junginių poveikis pastebėtas atliekant eksperimentinius tyrimus su pelėmis, kuriuose nustatyta, kad mėlynių sudėtyje esantys antocianinai sumažino bendrą žarnose aptiktų adenomų skaičių [40]. *In vitro* eksperimentais nustatyta, jog antocinainai slopina uždegimą sukeliančių junginių (prostaglandinų, leukotrienų bei histamino) sintezę ir išsiskyrimą [44]. Literatūroje rasta keletas tyrimų, kurie atlikti įvertinant mėlynių vaisių antocianinų antioksidacinį poveikį, šie junginiai pasižymėjo proteazių inhibiciniu poveikiu, kurios turi įtakos antikancerogeniniam, antioksidantiniam, priešuždegiminiam bei neuroprotekciniam poveikiui. Vartojant antocianinų turinčius produktus, galima apsaugoti nuo daugelio lėtinių ir neurodegeneracinių ligų [45].

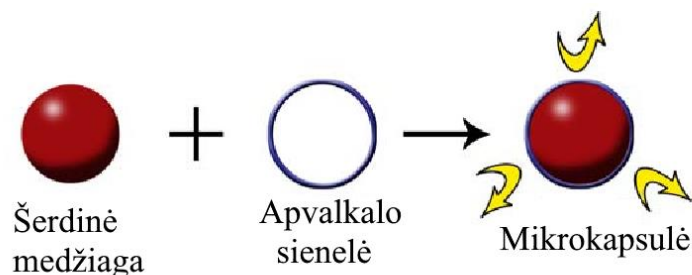
Tyrimais įrodyta, kad polifenoliniai junginiai apsaugo augalus nuo ultravioletinių saulės spindulių poveikio, oksidacinio streso bei patogeninių mikoorganizmų [46]. Literatūroje rasta tyrimų, kuriuose nustatyta, kad mėlynių sudėtyje esantys fenoliniai junginiai gali antibakteriškai veikti *Salmonella* ir *E. coli* bakterijas [47].

Kai kurie autoriai teigia, jog iš mėlynių išgauti ekstraktai gerina regėjimą bei akių prisitaikymą prie tamsos bei ryškios šviesos [48]. Ekstraktų sudėtyje esantys komponentai pagreitina akių aprūpinimą krauju bei deguonimi, kuris ypač svarbus norint apsaugoti nuo tokių ligų kaip glaukoma. Atlikus bandymus su žmonėmis sergantiems glaukoma, kuriems buvo vieną kartą duota 200 mg mėlynių antocianinų dozė, pastebėtas teigiamas poveikis šios ligos atžvilgiu [49]. Atlikus bandymus su gyvūnais taip pat nustatyta, jog iš uogų išgauti ekstraktai gali pagerinti atmintį ir apsaugoti smegenis, sumažinant oksidacinio streso įtaką [50].

#### **1.4. Technologinių veiksnių įtaka veikliųjų junginių įkapsuliacijos efektyvumui, prailginto veikimo produktų sukūrimui**

Įkapsuliacija – inovatyvi technologija, kuri naudojama siekiant pagaminti mikro/nano dydžio daleles. Šiuo būdu pagaminti tarpiniai produktai dažniausiai naudojami farmacijos, chemijos ir maisto pramonėse srityse [51]. Šios technologijos principas pagrįstas tuo, kad mikro dydžio dalelės yra padengiamos kietųjų dalelių, lašelių ar inertinių dujų apvalkalu, taip apsaugodamos pagamintas mikrokapsules nuo šorinių veiksnių (1.4 pav.). Įkapsuliacijos proceso metu pagamintos dalelės yra skirstomos pagal dydį:

- nanodalelės (<1 μm);
- mikrodalelės (1 – 800 μm);
- makrodalelės (>800 μm) [52].



**2.4 pav.** Mikrokapsulių sudarymo principinė schema [53]

Efektyviam įkapsuliavimui, svarbu parinkti tinkamas sąlygas, kadangi nuo jų priklauso kokio dydžio bus dalelės, mikrokapsulių dangą ir veikliųjų medžiagų savybės [54]. Ypač svarbu parinkti tinkamas dangas [55]. Šios medžiagos turi būti nehidrofobiškos, mažos klampos bei pasižymėti emulguojančiomis savybėmis, siekiant suformuoti reikalingą plėvelę veikliųjų medžiagų padengimui [56]. Apvalkalo medžiagos gali būti sintetinės, pusiau sintetinės ir natūralios. Dažniausiai naudojamos dangos: polisacharidai, ir jų mišiniai su lipidais ar proteinais [57]. Remiantis mokslinėmis publikacijomis, galima daryti išvadą, kad įkapsuliuojant augalų ekstraktus tikslinga būtų naudoti natūralios kilmės dangas dėl tinkamos sąveikos su augalinės kilmės veikliosiomis medžiagomis [58]. Dažniausiai naudojamos natūralios dangos yra maltodekstrino, želatinos ir ciklodekstrino medžiagos [58,59].

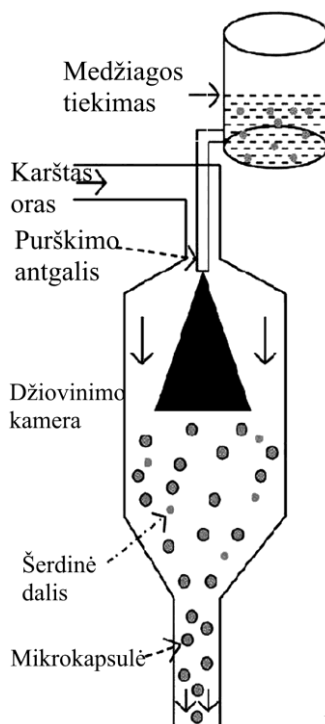
Tyrimais įrodyta, kad maltodekstrinas purškiamojo džiovinimo metu pagerina išpurkštų miltelių technologines savybes [57]. Želatina dėl fizikocheminių savybių suderinamumo plačiai naudojama eterinių aliejų įkapsuliavimui [63]. Taip pat ji turi įtakos pagamintų emulsijų stabilumui: didinant želatinos koncentraciją tirpale klampa tiesiogiai didėja [64]. Ciklodekstrinai pasižymi tiek hidrofobinėmis, tiek hidrofobinėmis savybėmis, to pasekoje puikiai įkapsuliuojamos įvairios veikliosios medžiagos [65].

Mikrokapsulės gali būti gaminamos taikant daug įvairių metodų: purškiamojo džiovinimo, purškiamojo aušinimo, sukamojo disko purškimo, centrifuginės ekstruzijos, tirpiklio garinimo, tirpiklio ekstrahavimo, tarpfazinės polimerizacijos, liposomų technologijos, nanokapsuliacijos, išsamųjų medžiagų polimerizacijos, in – situ polimerizacijos metodus [55, 67]. Dažniausiai naudojami džiovinimo būdai mikrokapsulėms gauti:

- Purškiamojo džiovinimo metodas

Vienas iš dažniausiai taikomų pigmentų įkapsuliavimo metodų yra išpurškiamasis džiovinimas (1.5 pav.). Purškiamojo džiovinimo (PD) metodas yra dažniausiai naudojamas metodas, norint įkapsuliuoti antocianinus [55]. Šis metodas naudojamas įkapsuliuoti karščiui ir šilumai jautrias medžiagas dėl trumpo džiovinimo laiko (5 – 30 s) [69]. Šios technologijos principas pagrįstas tuo, kad įkapsuliavimui naudojamų dangų bei veikliųjų medžiagų pagalba yra suformuojama emulsija, tada tirpiklio garinimo metu susidarant aukštam slėgiui ir suspausto oro srovei, apvalkalo medžiagų mišinys padengia veikliąsias medžiagas, tokiu būdu mikrokapsulėms dažniausiai suteikiant ovalią formą. [67]. Taikant šį metodą junginys įkapsuliuojamas daugiabranduolėse arba matricinio tipo

mikrokapsulėse [70]. Purškiamojo džiovavimo metodo metu pagamintų mikrokapsulių fizikomechaninėms savybėms įtakos turi emulsijos, suspensijos ar paruošto tirpalo kokybė, jų klampa, pagalbinių medžiagų savybės bei proceso technologiniai parametrai [71].



**2.5 pav.** Purškiamojo džiovavimo principinė schema [72]

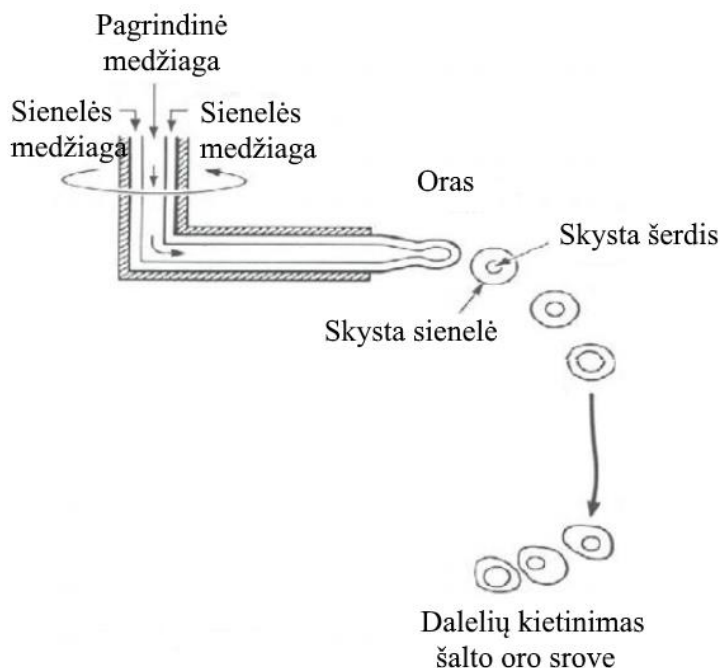
Purškiamojo džiovavimo metodo tinkamų parametrų parinkimas (vidinės proceso temperatūros, išorinės proceso temperatūros, tirpalo tėkmės greičio) turi įtakos išpurkštų miltelių charakteristikoms: miltelių fizikocheminėms savybėms, veiklių junginių įkapsuliacijos efektyvumui bei išeigai [73]. Siekiant pagaminti tinkamos kokybės miltelius reikia atsižvelgti į technologines proceso savybes bei tinkamą pagalbinių medžiagų bei savybių parinkimą.

Nuo tinkamos vidinės ir išorinės oro temperatūros purškiamojo džiovavimo proceso metu, priklauso išpurkštų miltelių charakteristikos: žemesnė temperatūra įtakoja didesnį drėgmės kiekį produkte, aukšta temperatūra sąlygoja veiklių junginių termolabilumą. Nustatyta, kad aukšta vidinė proceso temperatūra leidžia pagreitinti gamybą, ant lašelių paviršiaus suformuoja pusiau pralaidžią membraną, tačiau tai gali sąlygoti pridžiūvimą ir suformuoti didelius burbulus ant paviršiaus, kurie daro įtaką produkto išeigai bei įtakoja miltelių lipnumą [40, 79]. Purškiamojo džiovavimo metodas pažangus veiklių junginių įkapsuliacijos metodas, skirtas išgauti miltelius, norint juos apsaugoti nuo aplinkos poveikio. Siekiant pagaminti tinkamos kokybės miltelius reikia atsižvelgti į technologines proceso savybes bei tinkamą emulsijos, pagalbinių medžiagų bei parinkimą.

- Centrifūginės ekstruzijos metodas

Centrifūginės ekstruzijos metodas tinka įkapsuliuoti tik skystas medžiagas. Šio proceso metu, įkapsuliuojimui skirta medžiaga yra paduodama cilindrinio vamzdžio, o mikrokapsulių dangos skysčio pavidalu pumpuojama kartu aplink pagrindinės medžiagos žiedo erdvę (1.6 pav.). Naudojant besisukantį ekstruzijos antgalį su koncentriniais purkštukais, šerdinė medžiaga

išspaudžiama į ją apdengiančią membraną ir tada kietinami šalto oro srove, kol sustingsta. Šis procesas tinkamas formuojant 400 – 2000 μm skersmens daleles [55, 67].



2.6 pav. Centrifūginės ekstruzijos proceso schema [75]

- Tirpiklio garinimo metodas

Mikrokapsulėms pasirinkta danga yra ištirpinama lakiame tirpiklyje. Gautas polimerinės dangos tirpalas yra disperguojamas, siekiant gauti norimo dydžio bei formos mikrokapsules. Pagrindinė įkapsuliuojamoji medžiaga yra tirpinama polimerinės dangos mišinyje, kol ištirpsta. Siekiant išgarinti polimero tirpiklį, mišinys gali būti kaitinamas, kol tirpiklio nebelieka. Nešiklio temperatūra sumažinama iki aplinkos temperatūros su nuolatiniu sužadinimu. Šiame etape mikrokapsulės gali būti naudojamos suspensinėje formoje, pvz: milteliai [55, 67].

- Tarpfazinės polimerizacijos metodas

Gaminant šiuo būdu, du reagentai polikondensacijoje susijungia ir greitai sureaguoja. Šio metodo pagrindas yra klasikinė Schotten Baumann reakcija tarp rūgščių chloridų ir junginio, kurio sudėtyje yra aktyvus vandenilio atomas, pvz: aminorai arba alkoholis, poliesteriai, polikarbamidai, poliuretanai. Esant tinkamoms sąlygoms, plonos lanksčios sienelės forma suformuojama greitai. Pesticido ir dirūgščių chlorido tirpalas yra emulsuojamas vandeniniame tirpale, kurių sudėtyje yra pridėtas amino ir polifunkcinis izocianatas. Bazės dalyvauja neutralizuojant rūgštis reakcijos metu. Suglaustos polimerinės sienos akimirksniu sudaro emulsinius lašelius [55, 67].

- Rišamųjų medžiagų polimerizacijos metodas

Daugelyje procesų, pagrindinė medžiaga yra įterpiama į polimerinę matricą dalelių formavimo metu. Paprastas šio metodo tipas purškimas – džiovinimas, kurioje dalelės suformuojamos išgarinant tirpiklį iš matricinės medžiagos. Tačiau matricos kietėjimas taip pat galibūti sukeltas

naudojant cheminę kaitą. Naudojant šį reiškinį, paruošiamos mikrokapsulės, kurių sudėtyje yra baltyminis tirpalas [55, 67].

## 2. Tyrimo objektas ir metodai

### 2.1. Tyrimų objektas

Tyrimo objektas – po sulčių spaudimo gautos mėlynių (*lot. Vaccinium myrtillus*) išspaudos, išdžiovintos 2016 metais ~ 40°C laipsnių temperatūroje. Prieš ekstrakciją džiovintos mėlynių išspaudos buvo smulkinamos cikloniniu malūnu (Retsch, Haan, Vokietija) naudojant 8000 aps./min. greičiu, kartu derinant tris skirtingo tankumo sietus: 0,5, 1 ir 2 mm. Išdžiovintos ir susmulkintos mėlynių išspaudos laikomos hermetiškai sandariuose stikliniuose induose, vėsioje, sausoje ir tamsioje, saulės spindulių nepasiekiančioje, patalpoje. Smulkinimo metu gautos trijų skirtingų frakcijų vienalyčiai išspaudų mišiniai padidina aktyvių komponentų ekstrahavimo efektyvumą.

### 2.2. Tyrimams naudoti cheminai reagentai ir įrenginiai

Cheminiai reagentai:

- Ekstraktų paruošimui naudoti reagentai ir medžiagos: heksanas (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), etanolis (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH; 96,3%), acetonas (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), metanolis (CH<sub>3</sub>OH), CO<sub>2</sub> ir azoto dujos (99,9 %, Gaschema, gamtinės dujos), diatominė žemė (Sigma-Aldrich, Mousa, Sent Luisas), ultra švarus vanduo 0,054 μSi/cm (gryninta Milipore, Bedford MA, JAV vandens gryninimo sistema) ir distiliuotas vanduo 0,054 μSi/cm (gryninta Milipore, Bedford MA, JAV vandens gryninimo sistema) ir distiliuotas vanduo.

- Antioksidacinio aktyvumo tyrimuose naudoti reagentai ir medžiagos: Folin-Ciocalteureagentas (Sigma-Aldrich, Buchs, Šveicarija), galo rūgštis >99 % grynumo (Fluka, Lenkija), metanolis ≥ 99,9 % grynumo (Sigma-Aldrich, Vokietija), bevandenis natrio karbonatas (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 98 % grynumo (CHEMPUR, Lenkija), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilhidratas (DPPH • laisvasis radikalas, 95 %), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis 97 % grynumo (troloksas), kalio chloridas, natrio chloridas, vandeninis natrio hidrofosfatas, kalio dihidrofosfatas, kalio persulfatas ir natrio hidroksidas (StanLab, Liublinas, Lenkija). 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis (ABTS•+, laisvasis radikalas, 98 %), 2,2'-azobio (2-amidinpropano) dihidrochloridas (AAPH), 3',6'-dihidroksispiro(izobenzofuran-1(3H),9'-(9H)ksanten)-3-onas (fluoresceinas, Steinheim, Vokietija). Mikrokristalinė celiuliozė (Sigma-Aldrich, Mouse, Sent Luisas) ir plastiko kiuvetės 10 x 10 x 45 mm. (Fluka, Lenkija).

- Baltymų, drėgmės ir mineralinių medžiagų nustatymui naudoti reagentai ir medžiagos: druskos rūgštis (HCl; Chempur, Piekary Slaskie, Lenkija), koncentruota sieros rūgštis (konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Chempur, Piekary Slaskie, Lenkija), katalizatorius tabletė (3,5 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 290.4 g CuSO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich), natrio šarmas (NaOH; Chempur, Piekary Slaskie, Lenkija), boro rūgštis (H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>; Chempur, Piekary Slaskie, Lenkija), taširo indikatorius.

- Chromotografinėi analizei naudoti reagentai, medžiagos ir junginių standartai ESCh klasės grynumo tirpalai: skruzdžių rūgštis 98 % grynumo, acetonitrilas ir metanolis (Sigma-Aldrich, Steinheim, Vokietija). Ultra švarus vanduo 0,054 μSi/cm (gryninta Milipore, Bedford MA, JAV vandens gryninimo sistema).

Naudoti įrenginiai:

- cikloninis malūnas „ZM 200“ (Retsch, Haan, Vokietija);
- analitinės svarstyklės „KERN 770“ (Goti, Kern&Sohn GmbH., Alkstad, Vokietija);
- svarstyklės „Precisa XB 620C“, (Šveicarija);

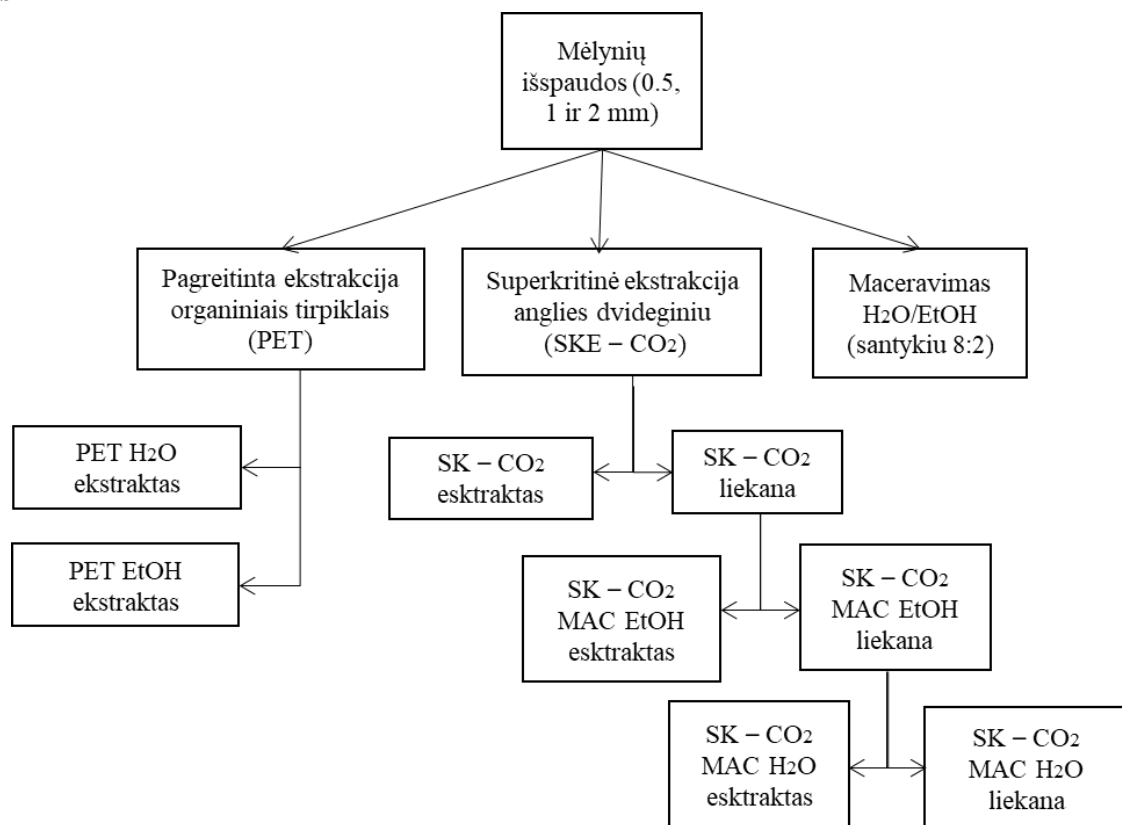
- laboratorinė ekstrakcijos superkritiniais skysčiais „Helix“ sistema (Applied Separation, Allen-town, PA, JAV);
- pagreitinotos ekstrakcijos organiniais tirpikliais sistema (PET) „DIONEX ASE 350“, (Sunnyvale, CA, JAV);
- vakuuminis – rotacinis garintuvas „BUCHI Rotavapor R-210“, (Kanada);
- purtytuvas „Platform Shaker Universal PSU 20“, (JAV);
- purtyklė – vorteksas „Bio vortex V1 Bioscan“, (Ryga, Latvija);
- ultragarso vonelė „Ultrasonics“ (Astra-Son™, JAV);
- Biuchnerio piltuvas;
- liofilizatorius „MAXI DRY LYO“ (Danija);
- automatinės pipetės: 20-200 µl, 100-1000 µl (CAPP, Danija), 1000 µl (Hirshmann Laborgerate, Hirshmann Technocolor, Vokietija);
- spektrofotometras „GENESYS 8, 10 UV“ (Spectronic instruments, Rochester, JAV);
- Perkin Elmer Clarus dujų chromatografas su liepsnos jonizacijos detektoriumi (Perkin Elmer, CA, JAV);
- mikrošvirkštas 50 µl (SGE, Australia);
- ESCh chromatografas: binarinis siurblys Waters 1525 (Water, Hilford, MA), rankinis bandinio įleidimo įrenginys Rheodyne 7725i ((Rheodyne, Rohnert Park, CA), UV detektorius Waters 996 (Waters, Hilford, MA), masių detektorius Water-Micromass ZQ 2000 (Water, Arlington, MA));
- skenuojantis elektroninis mikroskopas „Quanta 200 F“ (Zurich, Switzerland).

### **2.3. Ekstraktų gavimo schema**

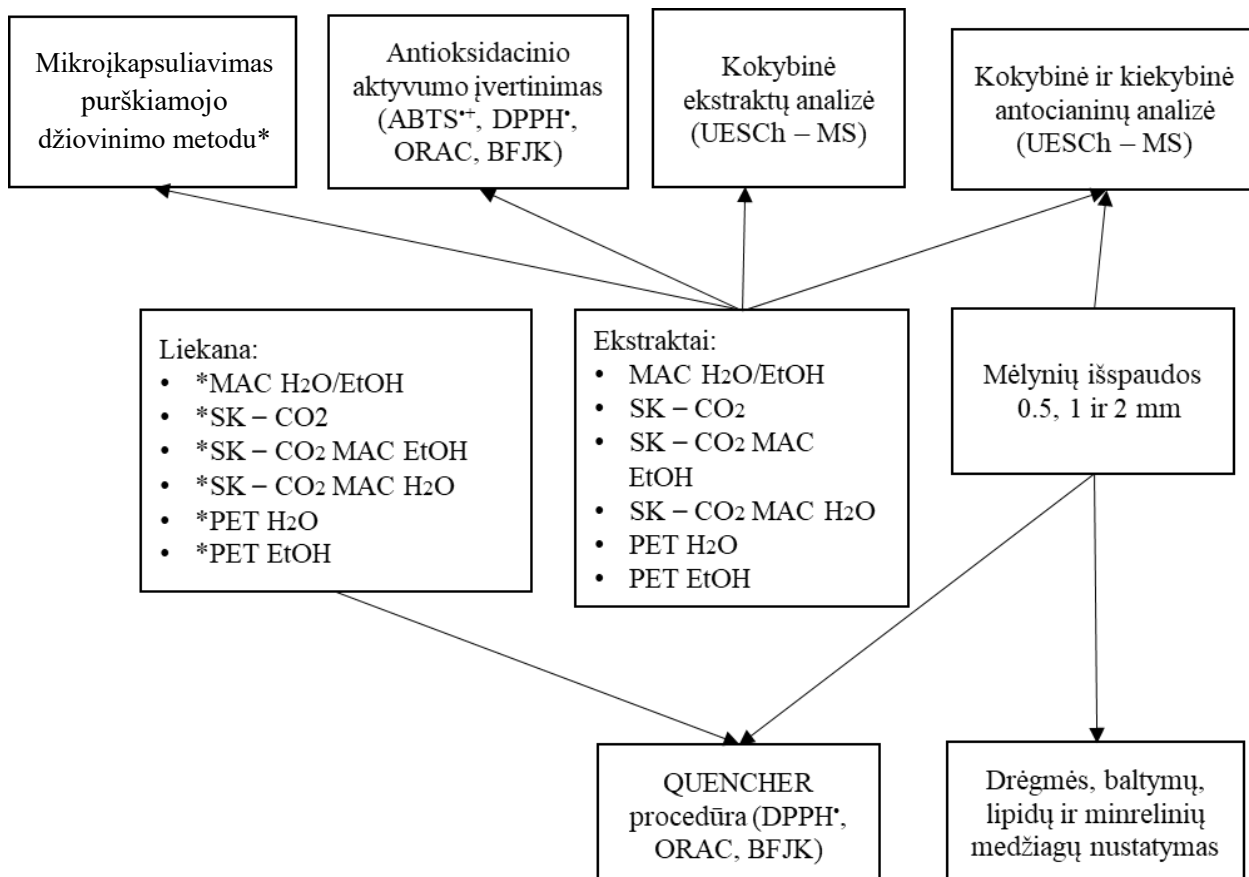
Iš mėlynių išspaudų siekiant išgauti funkcionaliaisiais komponentais praturtintus ekstraktus taikyti tradiciniai ir šiuolaikiški ekstrakcijos metodai. Ekstraktai buvo išgaunami maceravimo purtant būdu bei naudojant ekstrahavimo metodus, pasižyminčius padidinto slėgio sąlygomis – superkritinė ekstrakcija anglies dioksidu (SKE – CO<sub>2</sub>) bei pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (PET). Mėlynių išspaudų eksperimentinių tyrimų schema pateikta 2.1 paveiksle.



## I dalis



## II dalis



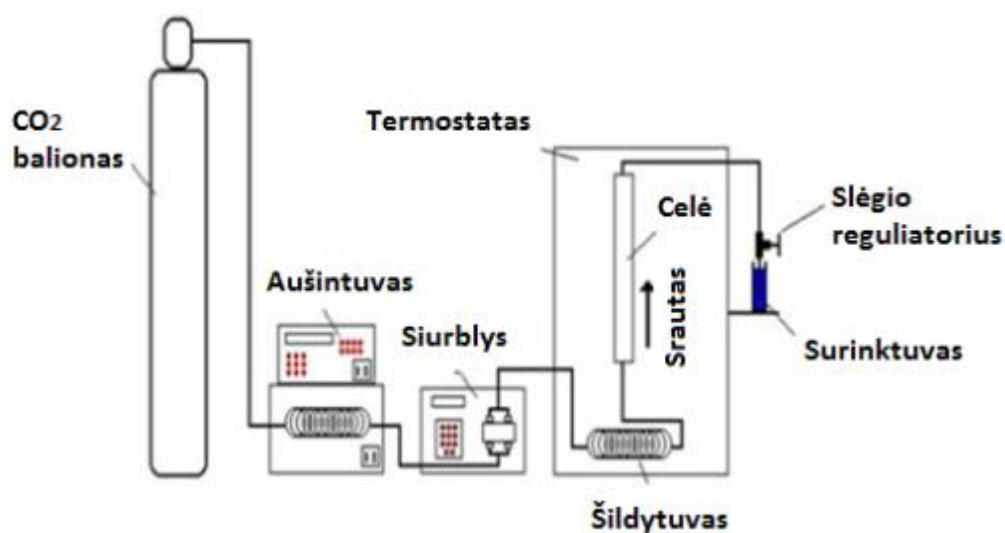
\*mikroįkapsulimui pasirinktas vienas ekstraktas MAC H2O/EtOH (santykiu 8:2)

2.1 pav. Mėlynių išspaudų gamybos (I dalis) ir vykdytų eksperimentų schema (II dalis)

## 2.4. Superkritinė ekstrakcija anglies dioksidu (SKE-CO<sub>2</sub>)

Ekstrakcijos atliktos naudojant „Helix“ sistemą (Applied Separation, Allen-town, PA, USA) su 10L (145 x 490 mm) tūrio nerūdijančio plieno ekstrakciniu indu, kurios principinė schema pateikta 2.2 pav.

125 g susmulkintos vienos frakcijos (0,5, 1 arba 2 mm) mėlynių išspaudos sudedamos į celę taip, kad pilnai ją užpildytų ir tada sandariai uždaroma. Prieš pradėdant dinaminę ekstrakciją, 30 min vykdoma statinė ekstrakcija. CO<sub>2</sub> srautas visos ekstrakcijos metu vienodas – 2 l/min. Ekstrahavimo slėgis ir temperatūra nustatomi automatiškai, prieš pradėdant ekstrakciją, ekstraktoriaus valdymo blokuose, o laikas kontroliuojamas rankiniu būdu. Ekstrakcija vykdoma esant 45 °C temperatūrai ir 400 bar slėgiui 360 min, kas pusvalandį vertinant masės padidėjimą analitinėmis svarstyklėmis „KERN 770“ (Goti, Kern&Sohn GmbH., Alkstad, Vokietija). Surinkti ekstraktai iki tolimesnių tyrimų saugomi sandariuose stikliniuose buteliukuose –4 °C temperatūroje.



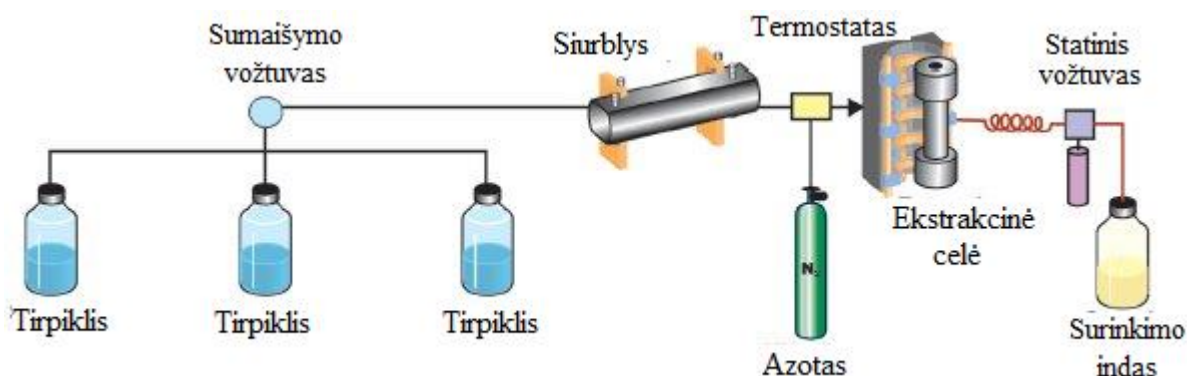
2.2 pav. Superkritinio ekstraktoriaus anglies dvideginio schema [76]

## 2.5. Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais (PET)

Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais buvo atlikta naudojant pagreitinto tirpiklio ekstrahavimo įrengimą ASE 350 (Dionex, Sunnyvale, CA, JAV). Aparatūrą sudaro tirpiklių talpyklos, siurblys, ekstrakcinė celė, termostatas, surinktuvas ir dujinio azoto balionas (2.3 pav).

Užsukama iš abiejų galų nerūdijančio plieno celė, prieš tai užpildoma 7 g atitinkamos frakcijos susmulkintomis mėlynių išspaudomis. Celės galuose dedama po 1 g diatominės žemės ir celiuliozinai filtrai siekiant išvengti mėginio patekimo į įrenginio sistemą ir surinkimo indą. Užpildyta ekstrakcinė celė statoma į karuselės principo stovą. Ekstrakcijos vykdomos naudojant etanolio ir vandens tirpiklius, vykdant tris ciklus esant 1000 psi slėgiui bei skirtingoms temperatūroms, priklausomai nuo to, koks tirpiklis naudojamas (etanoliui – 70 °C, vandeniui – 120 °C). Po ekstrakcijos likęs etanolis buvo išgarintas rotaciniu garintuvu (BUCHI Rotavapor R-210“, Kanada) naudojant 40 °C temperatūrą, o vanduo – liofilizatoriuje (MAXI DRY LYO, Danija).

Gauti ekstraktai buvo saugomi sandariuose tamsaus stiklo buteliukuose  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje iki sekančių tyrimų.



2.3 pav. Pagreitinotos ekstrakcijos organiniais tirpikliais sistemos schema [77]

## 2.6. Baltymų, riebalų, drėgmės ir mineralinių medžiagų kiekio nustatymas

Baltymų, riebalų, drėgmės ir mineralinių medžiagų kiekis buvo nustatytas remiantis standartine (AOAC) nustatymo metodika (AOAC, 1995) [78].

Sausosios medžiagos arba pusiausvyrinis drėgnis buvo nustatytas gravimetriškai, džiovinat  $105^{\circ}\text{C}$  temperatūroje iki nekintamos masės. Mineralinių medžiagų kiekis nustatytas gravimetriškai apdorojus tiriamąją žaliavą  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Baltymų kiekis nustatytas Kjeldalio, o riebalų kiekis – Soksleto metodais.

## 2.7. Ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas

### 2.7.1. Bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas (BFJK)

Bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas pagal Folin ir Ciocalteu (1927) metodinį aprašymą naudojant Folin–Ciocalteu (Sigma – Aldrich, Buchs, Šveicarija) reagentą (Folin, O., Ciocalteu 1927) ir išreikštas galo rūgšties ekvivalentais (mg/g GRE).

Atliekant tradicinę tyrimų analizę,  $150\ \mu\text{l}$  bandinio arba metanolio (kontrolinis mėginys) buvo sumaišyta su  $750\ \mu\text{l}$  Folin – Ciocalteu's reagento (1:9, v/v) ir  $600\ \mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tirpalo (75 g/l). Paruošti mėginiai supurtomi ir laikomi 120 minučių tamsioje. Praėjus numatytam laikui, matuojama absorbcija esant 760 nm bangos ilgiui. Naudojant galo rūgšties tirpalą (koncentracijų ribos: 0,050 mg/ml – 0,250 mg/ml), pagal gautus rezultatus buvo apskaičiuota kalibracinės kreivės lygtis:  $y = 10,339x + 0,0326$ ;  $R^2 = 0,9989$ .

Taikant QUNCHER procedūrą, 10 mg bandinio arba mikrokristalinės celiuliozės (kontrolinis bandinys) sumaišoma su  $150\ \mu\text{l}$  distiliuoto  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $750\ \mu\text{l}$  Folin – Ciocalteu's reagento (1:9, v/v) ir  $600\ \mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tirpalo (75 g/l). Bandiniai 120 minučių purtomi tamsoje, o po to centrifuguojami 7 minutes, naudojant 14000 aps./min. Absorbcija matuojama esant 760 nm bangos ilgiui. Kalibracinė kreivė paruošiama 10 mg mikrokristalinės celiuliozės sumaišant su  $150\ \mu\text{l}$  galo rūgšties (0 – 80  $\mu\text{l}/\text{ml}$  dist.  $\text{H}_2\text{O}$ ) arba distiliuoto  $\text{H}_2\text{O}$  (kontrolinis bandinys),  $\mu\text{l}$  Folin – Ciocalteu's reagento (1:9, v/v) ir  $600\ \mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tirpalo (75 g/l). Kalibracinė tiesinės priklausomybės lygtis:  $y = 4,2157x - 0,107$ ;  $R^2 = 0,9977$ .

Bendras fenolinių junginių kiekis išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentais (mg/g GRE), naudojant (2.1) formulę:

$$C = c \times V \times m^{-1} \quad (2.1)$$

$C$  – polifenolių junginių kiekis (mg/g GRE);

$c$  – galo rūgšties koncentracija, nustatyta pagal kalibracinę kreivę (mg/ml);

$V$  – ekstrakto tūris (ml);

$m$  – ekstrakcijai naudota mėginio masė (g).

### 2.7.2. DPPH• 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalų sujungimo metodas

Laisvųjų radikalų sujungimo (DPPH•) tyrimas atliekamas pagal Brand-Williams ir kt. metodinį aprašymą (Brand-Williams ir kt., 1995) [14]. Metodas pagrįstas reakcija tarp antioksidanto ir DPPH• radikalo. DPPH• laisvųjų radikalų sujungimo geba išreiškiama Trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu.

Atliekant tradicinę tyrimų analizę, 500 µl bandinio arba metanolio (kontrolinis mėginys) buvo sumaišyta su 1000 µl darbinio DPPH• tirpalu, kuris ruošiamas 0,0175 g radikalo ištirpinant 200 ml metanolio. Darbinis DPPH• tirpalas skiedžiamas metanolio, esant 517 nm bangos ilgiui, kad absorbcijos vertė būtų lygi  $0,800 \pm 0,03$  optinio tankio vienetų. Paruošti mėginiai supurtomi ir laikomi 120 minučių tamsioje. Praėjus numatytam laikui, matuojama absorbcija esant 517 nm bangos ilgiui. Kalibracinė kreivė sudaryta panaudojus etaloninius įvairių koncentracijų Trolokso tirpalus (1,25 – 10 µg/ml). Kalibracinė tiesinės priklausomybės lygtis:  $y = 6,5426x + 4.4281$ ;  $R^2 = 0,9982$ .

Taikant QUNCHEER procedūrą, 10 mg bandinio arba mikrokristalinės celiuliozės (kontrolinis bandinys) sumaišoma su 500 µl metanolio bei 1000 µl darbinio DPPH• tirpalu. Paruošti mėginiai 120 minučių purtomi tamsoje, o po to centrifuguojami (7 min., 14000 aps./min.). Absorbcija matuojama esant 517 nm bangos ilgiui. Kalibracinė kreivė paruošiama 10 mg mikrokristalinės celiuliozės sumaišant su 500 µl Trolokso tirpalu (0 – 60 µmol/l metanolio) arba MeOH (kontrolinis bandinys) ir 1000 µl darbinio DPPH• tirpalo. Kalibracinės kreivės lygtis:  $y = 5,8458x - 1,1538$ ;  $R^2 = 0,9935$ .

Laisvųjų radikalų sujungimo geba apskaičiuojama naudojant (2.2) formulę:

$$I = \frac{(AB - AA)}{AB} \times 100 \quad (2.2)$$

$I$  – laisvųjų radikalų sujungimo aktyvumas (%);

$AB$  – DPPH• reakcijos sistemos optinis tankis;

$AA$  – sistemos su antioksidantu optinis tankis.

### 2.7.3. ABTS•+ 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties laisvųjų radikalų sujungimo metodas

Tyrimas atliktas pagal Re ir kt. (1999) metodinį aprašymą [79]. ABTS•+ radikalų sujungimo geba išreiškiama Trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu.

Eksperimentui atlikti reikalingi du tirpalai. Prieš pradėdant tyrimą pasirošiamas fosfatinis buferinis tirpalas (PBS), kuris ruošiamas į 1 l matavimo kolbą su distiliuotu H<sub>2</sub>O, ištirpinant 8,18 g NaCl, 0,27 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O ir 0,15 g KCl (pH = 7,4). Pradinis ABTS<sup>•+</sup> tirpalas gaunamas 0,0549 g ABTS<sup>•+</sup> radikalo ištirpinant 50 ml PBS tirpale ir pridėdant 0,0038 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> druskos, kuri ištirpinta 200 μl distiliuotame vandenyje. Gautas tirpalas 15 – 16 val laikomas tamsoje. Praėjus numatytam laikui, ruošiamas darbinis ABTS<sup>•+</sup> tirpalas: pradinis ABTS<sup>•+</sup> tirpalas skiedžiamas su PBS, esant 734 nm bangos ilgiui, kad absorbcijos vertė būtų lygi 0,700 ± 0,03 optinio tankio vienetų.

Atliekant tradicinę tyrimų analizę, 25 μl bandinio arba metanolio (kontrolinis mėginys) buvo sumaišyta su 1500 μl darbinio ABTS<sup>•+</sup> tirpalu. Paruošti mėginiai supurtomi ir laikomi 120 minučių tamsoje. Absorbcija matuojama esant 734 nm bangos ilgiui. Kalibracinė kreivė sudaryta panaudojus etaloninius įvairių koncentracijų Trolokso tirpalus (0,02 – 0,4 mg/ml). Kalibracinė tiesinės priklausomybės lygtis:  $y = 0,2087x - 1,013$ ;  $R^2 = 0,999$ .

#### 2.7.4. Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas (ORAC)

Tyrimas atliktas pagal Prior ir kt. metodinį aprašymą (Prior ir kt., 2003) [18]. Metodas pagrįstas peroksido radikalų surišimu, kurį generuoja azobis (AAPH), slopindamas fluoresceino fluorescentinį signalą.

Eksperimentui atlikti ruošiami trys skirtingų koncentracijų fluoresceino tirpalai: S<sub>1</sub> = 0,045 g fluoresceino ištirpinama 100 ml PBS, S<sub>2</sub> = imama 0,5 ml S<sub>1</sub> tirpalo ir skiedžiama 100 ml PBS bei S<sub>3</sub> = imama 0,8 ml S<sub>2</sub> tirpalo ir skiedžiama 50 ml PBS.

Atliekant tradicinę tyrimų analizę, 96 šulinėlių juodoje nepermatomoje lėkštelėje 25 μl bandinio arba metanolio (kontrolinis mėginys) sumaišoma su 150 μl fluoresceino tirpalo S<sub>3</sub> ir inkubuojama 15 min 37 °C temperatūroje. Po to, naudojant daugiakanalę pipetę, į šulinėlius greitai pilama po 25 μl AAPH tirpalo. Tada lėkštelė įdedama į spektrofotometrą (FLUOstar Omega reader BMG Labtech, Offenburg, Vokietija). Fluorescencija spektrofotometru matuojama 150 ciklų, kai vieno ciklo trukmė 66s, o atitinkami emisijos bangų ilgiai 485 ir 520 nm. Kalibracinė tiesinės priklausomybės lygtis:  $y = 21671x + 2.4292$ ;  $R^2 = 0,9727$ .

Taikant QUNCHEER procedūrą, 10 mg bandinio arba mikrokristalinės celiuliozės (kontrolinis bandinys), 150 μl PBS tirpalo bei 900 μl fluoresceino tirpalo S<sub>3</sub> supilama į ependorfus. Sumaišyti bandiniai 60 min purtomi tamsoje, o vėliau centrifuguojami (5 min, 5000 aps./min). Po centrifugavimo su pipete paimamas optiškai skaidrus skystis ir supilamas į 96 šulinėlių juodą nepermatomą lėkštelę ir 15 min inkubuojama 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos supilama po 25 μl AAPH tirpalo. Fluorescencija matuojama 150 ciklų (vieno ciklo trukmė 66s), kai atitinkami emisijos bangų ilgiai 485 ir 520 nm. Kalibracinės kreivės lygtis:  $y = 0,114x + 6,4243$ ;  $R^2 = 0,9617$ .

Kalibracinė kreivė sudaryta panaudojus įvairių koncentracijų Trolokso tirpalus (0,1 – 0,4 mg/ml). Po kalibracinės kreivės sudarymo esantis plotas (AUC) kiekvienam bandiniui apskaičiuojamas integruojant santykinę fluoresceino kreivę. AUC apskaičiuojamas pagal (2.3) formulę:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=120} \frac{f_i}{f_0} \quad (2.3)$$

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

## **2.8. Ekstraktų ir triacilglicerolių analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UESCh – MS)**

Ekstraktų analizė atlikta naudojant Waters Acquity sistemą (Waters, Milford, JAV). Sistema buvo sujungta su hibridiniu kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru (Bruker Daltonic, Brėmenas, Vokietija).

Atvirkščių fazių analitine kolonėle (Acquity BEH C18, Amide 2,1 × 100 mm) atliktas analičių skirstymas, kai sorbento dalelių dydis – 1,7 μm (Waters, Milford, JAV), esant 40 °C temperatūrai. Eliuentų sistema: A – 0,2 % skruzdžių rūgštis (v/v) ir B – 100 % acetonitrilas. Chromatografijos trukmė – 10 min. Taikytas gradiento kitimas: 0 min. – 10 % B; 1 min. – 16 % B; 2 min. – 22 % B; 5 min. – 40 % B; 7 min. – 50 % B, 8,5 – 10 min. – 70–100 % B. Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min., o įleidžiamas tūris – 2 μL. Junginiai, išeinantys iš kolonėlės, aptikti diodų matricos detektoriumi (DMD) esant 100 – 450 nm bangos ilgiui. Masių detektorius buvo nustatytas neigiamos elektrinės – išpurškiamosios jonizacijos režimu, o visi parametrai kontroliuojami naudojant HyStar programinę įrangą. Jonizacijai naudota + 4500 V įtampa, fragmentavimo celės įtampa 5 eV, azoto dujos naudotos kaip išpurškiančios (slėgis 2 bar) bei džiovinančios dujos, kurių tėkmės greitis 10 l/min.

Tarpusavyje derinant pilno skenavimo ir MS/MS modelius nustatytos junginių molekulinės formulės intervale –  $m/z$  100 – 1500, kai skenavimo greitis buvo 2,5 Hz. Taikant MS/MS modelį buvo patvirtinti junginiai, kurių negalima vienareikšmiškai identifikuoti. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės, standartinių junginių masių spektrus, eliucijos trukmės sutapimą, MS/MS režimu gautus fragmentus bei lyginant juos su literatūros duomenimis. Nežinomų junginių identifikavimui buvo taikytas MS/MS režimas, kai fragmentavimo įtampa celėje buvo 30 eV.

Triacilglicerolių analizė atlikta su 0,5, 1 ir 2 mm SK – CO<sub>2</sub> ekstraktais, pagal Alam Zeb ir Michael Murkovic (Grazas, Austrija, 2010 m.) metodiką [96]. Išskirtymas atliktas su Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm, 2.1 × 50 mm kolonėle (Waters, Milford, JAV), esant 40 °C temperatūrai. Analizė atlikta izokratiškai. Naudota mobili fazė: 18 % izopropanolio ir 82 % metanolio mišinys, kuriame buvo 0,1 % acto rūgšties ir 0,05 % amonio acetato. Eliuento srauto greitis 0,4 ml/min, o analizės trukmės greitis 12 min.

Masių spektrometras naudojamas ESI režimu, jonizacijai naudota – 5000 V įtampa, fragmentavimo celės įtampa 8 eV, džiovinančių dujų tėkmės greitis 8 l/min, o temperatūra 200 °C. ESI – MS spektrai buvo gauti  $m/z$  intervale nuo 100 iki 1500, kai skenavimo greitis buvo 1 Hz. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal molekulinės mases, MS/MS režimu gautus fragmentus bei lyginant juos su literatūros duomenimis, o santykinė triacilglicerolių sudėtis apskaičiuojama pagal ploto vienetus.

## **2.9. Riebalų rūgščių (RR) sudėties nustatymas dujų chromatografijos (DC – LJD) metodu**

Nustatinėjant riebalų rūgščių sudėtį dujų chromatografijos metodu, pirmiausia atliekamas riebalų peresterinimas. Pasverinama 0,5 g riebalų ir užpilama 4 ml metanolinio 0,5N NaOH tirpalo. Gautas

mišinys gerai supurtomas ir kaitinamas grįžtamuju šaldytuvu, kol išnyksta riebalų fazė. Kai baigiama esterifikuoti riebalus, įpilama 5 ml 24 boro trifluorido ir kaitinama dar 2 min. Bandinį atšaldžius iki kambario temperatūros, įpilama 5 ml heksano, sumaišoma ir laukiama, kol nusistovės skirtingi sluoksniai. Viršutinė heksano fazė yra atskiriama ir iki analizė laikoma 4 °C temperatūroje. Galutiniam bandiniui paimama 100 µl heksano fazės ir praskiedžiama 900 µl heksano.

Analizė atliekama naudojant chromatografą su liepsnos jonizuojančiu detektoriumi. Krosnies temperatūra užprogramuota nuo 150 °C išlaikant 5 min ir keliama iki 230 °C 6°C/min greičiu, o nuo 230 iki 250 °C temperatūra keliama 2 °C/min greičiu ir išlaikoma šioje temperatūroje 10 min. Detektoriaus temperatūra 280 °C, o inžektoriaus – 250 °C.

Rugščių metilo esteriai indentifikuojami pagal gautus sulaikymo laikus, lyginant juos su žinomų riebalų rūgščių standartais, o procentinė riebalų rūgščių sudėtis apskaičiuojama pagal smailių plotų procentus.

Riebalų rūgščių kompozicija nustatoma naudojant dujų chromatografijos metodu (LST EN ISO 12966-1:2015) [81]. Naudojant šį metodą, nustatomi anglies atomus turinčių riebalų rūgščių metilo esteriai.

## **2.10. Antocianinų kokybinis ir kiekybinis įvertinimas**

Antocianinų ekstrakcija: 2 g susmulkintų grynų išspaudų supilama į plačiadugnę kolbą ir užpilama 40 ml EtOH/H<sub>2</sub>O/0,1M HCl (85:14:1) mišiniu. Ekstrakcija vykdoma 10 min ultragarsinėje vonelėje ir 30 min intensyviai maišant magnetine maišykle (270 rpm). Gauta ištrauka filtruota per filtrą, o tada 15 min centrifuguota 5000 aps/min. greičiu, esant 4 °C temperatūrai. Gautas supernantas surenkamas į 50 ml kolbą ir praskiedžiamas iki žymos su etanoliumi. Mišinys filtruojamas per 15 mm švirkšto filtrą, praskiedžiamas ESCh grynumo metanoliumi ir nufiltruojamas membraniniu filtru.

Kiekybinei analizei atlikti buvo naudojama Waters Acquity sistema. Kolonėlės parametrai, termostato temperatūra, A ir B elientai, judrios fazės tėkmės greitis bei injekcijos tūris nurodyti 2.8. skyriuje. Detekcija atlikta esant 550 nm bangos ilgiui. Gradiento kitimas: 0 min. – 99 % A; 7 min. – 85 % A; 8 min. – 0 % A; 10 min. – 9,5 % A; 10 min. – 99 % A. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas teigiamos elektrinės jonizacijos režimu. Masių spektrai užrašyti pilno skenavimo režime, intervale –  $m/z$  100 – 800. Chromatografinių smailių identifikavimas buvo atliktas remiantis literatūros duomenimis bei MS/MS režimu gautų junginių fragmentais. Fragmentavimo įtampa celėje – 40 eV.

Kiekybinė analizė atlikta naudojant išorinius standartus. Kalibracinė kreivė sudaryta pagal komercinio standarto cianidin-3-gliukozido ( $y = 0,00712x + 104,2035$ ;  $R^2 = 0,998$ ) skirtingų koncentracijų (10 – 250 µg/ml) tirpalus. Junginių koncentracijos apskaičiuotos pagal tiesinę plotų regresiją (koreliaciją) ir išreikštos mg/100 g sausos masės (SM).

## **2.11. Antocianinų įkapsuliavimo efektyvumo nustatymas naudojant purškiamojo džiovinimo metodą.**

### **2.11.1. Mikrokapsulių gamyba**

Mikroįkapsuliavimui naudotos 3 skirtingos matricos (dangos):

- maltodekstrinas (100% Maltodextrin carbs, MyProtein, Manchester, England);
- išrūgų baltymų izoliatas (Maisto mokslo ir technologijos katedra, KTU) ir maltodekstino mišinys (1:2);
- modifikuotas krakmolos HI-CAP (Ingredion, Westchester, IL).

Į plačiadugnę kolbą pasveriami 50 g pasirinktos matricos ir sumaišoma su 200 ml distiliuoto vandens. Gautas mišinys 5 valandas mašomas ant magnetinės maišyklės, po to į gautą mišinį įvedamas 1 % tiriamojo ekstrakto (nuo bendo sausų medžiagų kiekio) ir valanda maišomas magnetine maišykle, saugant nuo tiesioginių saulės spindulių. Toliau gautas mišinys 7 min homogenizuojamas 16000 aps./min greičiu ir išpurškiamas purkštuvine džiovykle (BUCHI, Switzerland) į miltelius. Tirpalo padavimo greitis injekcijos proceso metu 3 – 5 ml/min, o vidinė proceso temperatūra 150 – 160 °C. Pagaminti milteliai buvo laikomi tamsaus stiklo induose, apsaugant nuo tiesioginių saulės šviesos spindulių.

### **2.11.2. Mikroįkapsuliuotų produktų struktūros analizė skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (SEM)**

Skenuojantysis elektroninis mikroskopas yra prietaisas, skirtas daug kartų padidintam kietojo kūno paviršiaus vaizdui tirti. Skenuojančiuoju elektroniniu mikroskopu gauti vaizdai turi gerokai didesnę skiriamąją gebą lyginant su optiniu mikroskopu.

SEM metodas pasirinktas dėl jo universalumo ir galimybės vizualiai pamatyti ir kokybiškai įvertinti tiek stambius tiek ir smulkius paviršinius darinius. Purkštuvine džiovykle gautų granulių paviršiaus mikrostruktūra buvo tirta Quanta 200 F (Switzerland) skenuojančiu elektroniniu mikroskopu, palaikant 10 kV įtampą.

### **2.11.3. Bendras ir paviršiaus antocianinų kiekio ir įkapsuliovimo efektyvumo nustatymas**

Vertinant įkapsuliovimo efektyvumą buvo nustatyta išgava mikrokapsulių viduje ir paviršiuje. Tiriant antocianinų koncentraciją kapsulės viduje 100 mg miltelių ištirpinama 1 ml metanolio, acto rūgšties ir dist. vandens mišinyje, santykiu (50:1:49) ir 1 min vorteksuojama („Bio vortex V1Bioscan“, Ryga, Latvija). Gauta dispersija įdedama į ultragarso vonelę („Ultrasonics“, Astra-Son™, JAV) 20 min, o po to 8 min centrifuguojama 11000 aps./min greičiu. Mėginys filltruojamas (0,22 μm PTFE membraniniu filtru, VWR International), toliau tiriama UESh – MS metodu (žr. 2.8 skyrius).

Paviršiaus antocianinų kiekio nustatymas: 100 mg miltelių ištirpinam 1 ml metanolio ir acto rūgšties mišinyje, santykiu (99:1) ir 1 min švelniai vorteksuojama. Mėginys filltruojamas naudojant 0,22 μm membraninį filtrą toliau tiriama UESh-MS metodu (žr. 2.8 skyrius)

Antocianinų išeiga, regeneravimas ir įkapsuliovimo efektyvumas apskaičiuojami taikant formules [82]:

$$I\text{šeiga}(\%) = \frac{\text{miltelių masė (g)}}{\text{sausųjų medžiagų kiekis prieš išpurškimą (g)}} \times 100 \quad (2.4)$$

$$I\text{šgava}(\%) = \frac{\text{antocianinų kiekis milteliuose (mg/g)}}{\text{antocianinų kiekis ekstrakto (mg/g)}} \times 100 \quad (2.6)$$



$$\text{Antocianinų IE(\%)} = \frac{\text{bendras antocianinų kiekis}^i - \text{paviršiaus antocianinų kiekis}}{\text{bendras antocianinų kiekis}^i} \times 100 \quad (2.6)$$

<sup>i</sup> atitinka kiekvieną atskirą antocianiną

#### **2.11.4. Įkapsuliuotų antocianinų stabilumo tyrimas**

Į tamsaus stiklo indelius buvo pasverta po 0,25 įkapsuliuotų miltelių ir 25 g ekologiško jogurto. Visi mėginiai sumaišomi, sandariai uždaromi ir 4 savaites laikomi  $4 \pm 1$  °C temperatūroje. Kontrolė buvo ruošiama analogiškai kaip ir tiriamieji mėginiai. Paruošti kontrolės mėginiai tą pačią dieną analizuoti ir nustatytas antocianinų kiekis jogurte iš karto po tiriamojo bandinio sumaišymo. Stabilumo tyrimui buvo paruošti bandiniai po 3 pakartojimus.

*Chromatografinė analizė:* Į centrifuginius mėgintuvėlius buvo pasveriami 4 g sumaišyto jogurto 1 g parūgštinto ultra švaraus vandens (pH = 3). Kiekvienas mėginys 1 min vorteksuojamas ir 20 min centrifuguojamas 6000 aps./min greičiu 4 °C temperatūroje. Toliau gautas supernatantas 20 min centrifuguojamas 12000 aps./min greičiu. Gautas mėginys buvo filtruojamas (0,22 μm PTFE membraniniu filtru, VWR International) tiriamas UESh – MS metodu (žr. 2.8 skyrius)

#### **2.12 Rezultatų statistinė analizė**

Gauti tyrimų duomenys apdoroti naudojant matematinės statistikos programą MS Office Excel (Microsoft, JAV). Visi atlikti eksperimentai kartoti po 2 – 3 kartus, išreiškiant gautus rezultatus vidurkiais ir apskaičiuojant standartinį nuokrypį.

### 3. Rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Mėlynių išspaudų sudėtis

Tyrimų metu nustatyti pagrindiniai išspaudų sudėtiniai komponentai: baltymų, riebalų, drėgmės bei mineralinių medžiagų kiekis. Tyrimams naudotos išdžiovintos ir skirtingomis frakcijomis (0,5, 1 ir 2 mm) susmulkintos išspaudos, kurių baltymų kiekis svyravo nuo 4,54 iki 4,74 g/100g, riebalų kiekis nuo 0,20 iki 0,23 g/100g, mineralinių medžiagų nuo 1,24 iki 1,44 g/100g ir drėgmės kiekis nuo 6,03 iki 6,26 g/100g. Iš gautų rezultatų (1 lentelė) galima daryti išvadą, kad išspaudų susmulkinimo laipsnis neturi didelės įtakos jų cheminei sudėčiai.

Yemmireddy ir kt., (2013) nustatė, kad išdžiovintose mėlynėse baltymų kiekis svyravo nuo 2,22 iki 2,95 g/100g, riebalų kiekis nuo 0,47 iki 0,84 g/100g, mineralinių medžiagų nuo 1,26 iki 1,34 g/100g. Lyginant literatūroje pateiktus rezultatus su šio darbo rezultatais pastebėta, kad Yemmireddy ir kt., (2013) gavo 2 kartus mažesnę baltymų kiekį, tačiau 2 kartus didesnę riebalų kiekį, o mineralinių medžiagų kiekis buvo panašus [83]. Reque ir kt., (2014) nustatė, kad mėlynių išspaudose baltymų kiekis atitinka 4,67 g/100g, riebalų – 0,67 g/100g, o mineralinių medžiagų – 1,59 g/100g [84]. Šių autorių gauti baltymų ir mineralinių medžiagų kiekiai atitiko šiame darbe gautus rezultatus, tačiau riebalų kiekis buvo 3 kartus didesnis.

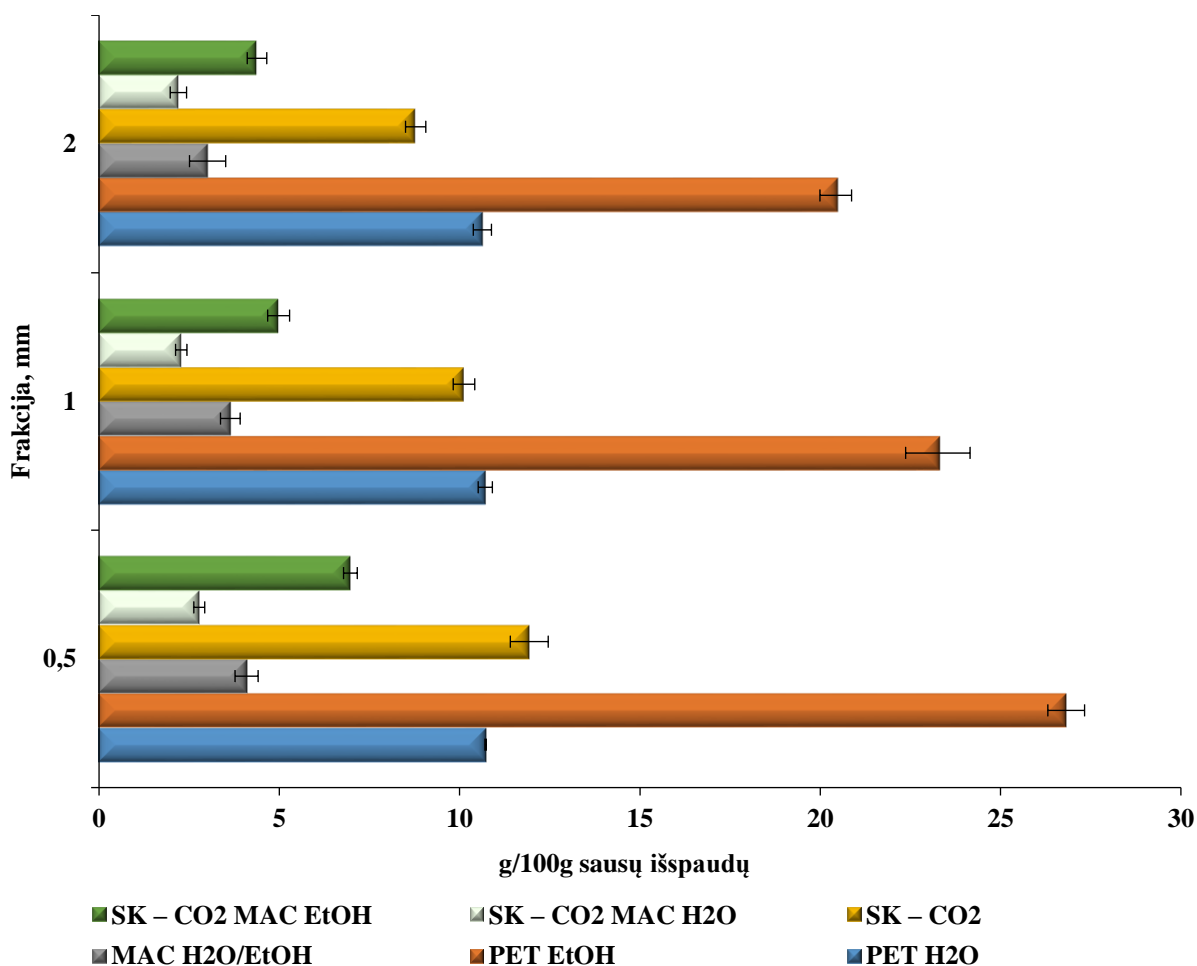
1 lentelė. Mėlynių išspaudų sudėtis

Komponentai	Nustatytas kiekis išspaudose, g/100g		
	0,5 mm	1 mm	2 mm
Baltymai	4,74±0,04	4,56±0,02	4,54±0,21
Riebalai	0,21±0,02	0,23±0,03	0,20±0,04
Drėgmė	6,16±0,12	6,03±0,14	6,26±0,50
Mineralinės medžiagos	1,44±0,02	1,29±0,07	1,24±0,06

Svarbu paminėti, kad mėlynių cheminė sudėtis gali skirtis dėl geografinių regionų bei klimato sąlygų ypatumų. Bunea ir kt. (2011) nustatė, kad laukinės mėlynės pasižymi didesniu fenolinių junginių kiekiu ir antioksidaciniu aktyvumu lyginant su pramoniniu būdu auginamomis uogomis [85].

#### 3.2. Ekstraktų išeigos gautos ekstrahuojant organiniais tirpikliais

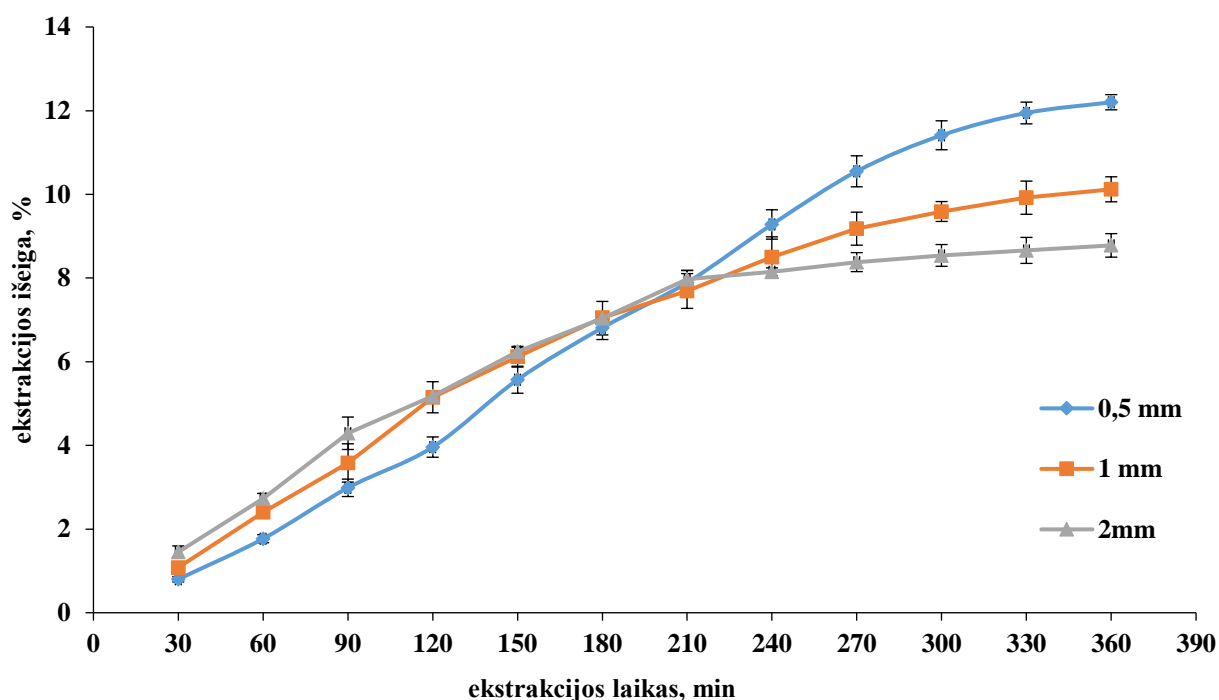
Mėlynių išspaudų ekstraktams ruošti buvo taikyti skirtingi ekstrakcijos būdai. Ekstraktai buvo išgaunami naudojant daugiapakopę superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu (SKE – CO<sub>2</sub>), pagreitintą ekstrakciją organiniais tirpikliais (PET) ekstrahuojant vandeniu ir etanolio bei maceruojant mėlynių išspaudas vandens/etanolio (8:2) mišiniu. Ekstrakcijų išeigos pateiktos 3.1 paveiksle.



3.1 pav. Skirtingų ekstraktacijų metu gautos išeigos (g/100g sausų išspaudų)

Didžiausios ekstraktacijų išeigos gautos naudojant pagreitintą ekstraktaciją organiniais tirpikliais ekstrahuojant etanolu 70 °C temperatūroje. Gautų ekstraktų išeigos ekstrahuojant 0.5, 1 ir 2 mm susmulkintas išspaudas atitinkamai varijavo 26,82 g, 23,26 g ir 20,43 g 100 gramų sausų išspaudų. Du kartus mažesnės išeigos gautos taip pat naudojant pagreitintą ekstraktaciją organiniais tirpikliais, bet ekstrahuojant vandeniu 120 °C temperatūroje. Ekstrahuojant superkritiniu anglies dvideginiu buvo nustatytos mažesnės išeigos nei ekstrahuojant pagreitinta ekstraktacija organiniais tirpikliais.

Norint patikrinti superkritinės ekstraktacijos anglies dvideginiu priklausomybę nuo laiko, buvo vertinta ekstraktų išeigos priklausomybė nuo ekstraktacijos trukmės (3.2 pav.). Ekstraktacijai buvo parinkta 45 °C temperatūra, 40 MPa slėgis, 2 l/min CO<sub>2</sub> tėkmės greitis ir 360 min laikas. Iš gautų rezultatų matyti, kad prailginta ekstraktacijos trukmė padidina išeią. Nuo ekstraktacijos pradžios iki 210 min, ekstraktų išeigos žymiai nesiskyrė, tačiau nuo 210 min ekstraktacijos išeių skirtumai išryškėjo: pastebėta, kad didžiausia išeią nuo šio taško gauta iš 0.5 mm frakcijos, o mažiausia – 2 mm. López-Padilla ir kt. (2016) nustatinėjo Kolumbijoje surinktų mėlynių išeią ekstrahuojant superkritinės CO<sub>2</sub> ekstraktacijos būdu. Tyrimas atliktas naudojant 30 MPa slėgį, 37,5 °C temperatūrą ir 32 g/min CO<sub>2</sub> tėkmės greitį, jau po 180 min išeią buvo lygi 3,22% [86]. Lyginant literatūroje pateiktus rezultatus su šio darbo rezultatais pastebėta, kad autoriai po 180 min ekstraktacijos gavo 2 kartus mažesnes vertes.



**3.2 pav.** Superkritinės ekstrakcijos 0,5, 1 ir 2 mm mėlynių išspaudų kinetinės kreivės

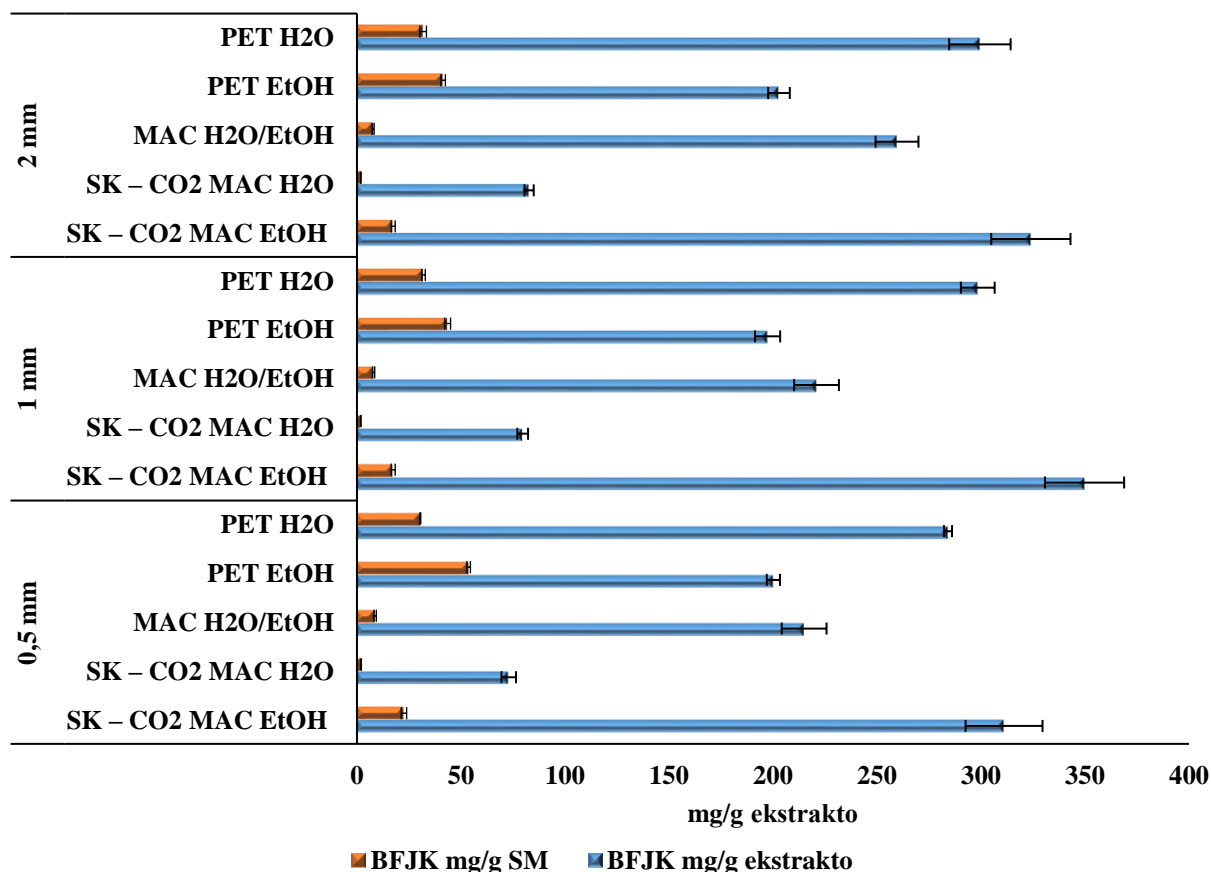
Grynas išspaudas maceruojant ir purtant vandens/etanolio (santykiu 8:2) mišiniu, gautų ekstraktų 0.5, 1 ir 2 mm susmulkintų išspaudų išeigos atitinkamai buvo 4,09 g, 3,64 g ir 20,43 g 100 gramų sausų išspaudų. Mažiausios išeigos gautos atliekant daugiapakopę ekstrakciją, kai liekana po superkritinių skysčių anglies dvideginio ekstrakcijos buvo ekstrahuota vandeniu. Tai galėjo nulėmti, jog po kiekvienos ekstrakcijos pakopos mažėjo bandinio mišinyje tirpių komponentų kiekis. Svarbu paminėti, kad ekstrakcijai parinktas slėgis, temperatūra, laikas, tirpiklio tipas ir kiekis, žaliavos susmulkinimo laipsnis, augalo augimo vieta bei derliaus nuėmimo laikas veikia ne tik gautų ekstraktų sudėtį, bet ir išeigą [87].

Vienas iš svarbiausių veiksnių, lemiančių ekstrakcijos efektyvumą, yra dalelių dydis. Iš pateiktų duomenų matome, kad susmulkinimo laipsnis turi įtakos ekstrakcijų išeigai: kuo mažesnis susmulkinimo laipsnis, tuo didesnė ekstrakcijų metu gauta išeiga. Didesnis susmulkinimo laipsnis padidina ekstrakcijos išeigą, nes padidinamas paviršiaus plotas pernešimui. Ekstrakcijos greitis padidėja, kadangi kai dalelė mažesnė sumažėja difuzijos atstumas iš kietos medžiagos ir todėl reikia mažiau laiko, kad tirpiklis pasiektų paviršių [88]. Laroze ir kt. (2010) nustatė, kad ekstrahavimo išeiga padidėja mažinant dalelių dydį, kadangi tada tirpiklis lengviau patenka į ekstrakcijai naudojamą medžiagą bei pagerina masių mainus [89].

### 3.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ekstraktuose

Antioksidacinio aktyvumo pasiskirstymas ekstraktuose tirtas taikant laisvųjų radikalų sujungimo DPPH• ir ABTS<sup>•+</sup> ir deguonies radikalo surišimo (ORAC) metodus. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) įvertintas naudojant *Folin – Ciocalteu* metodu.

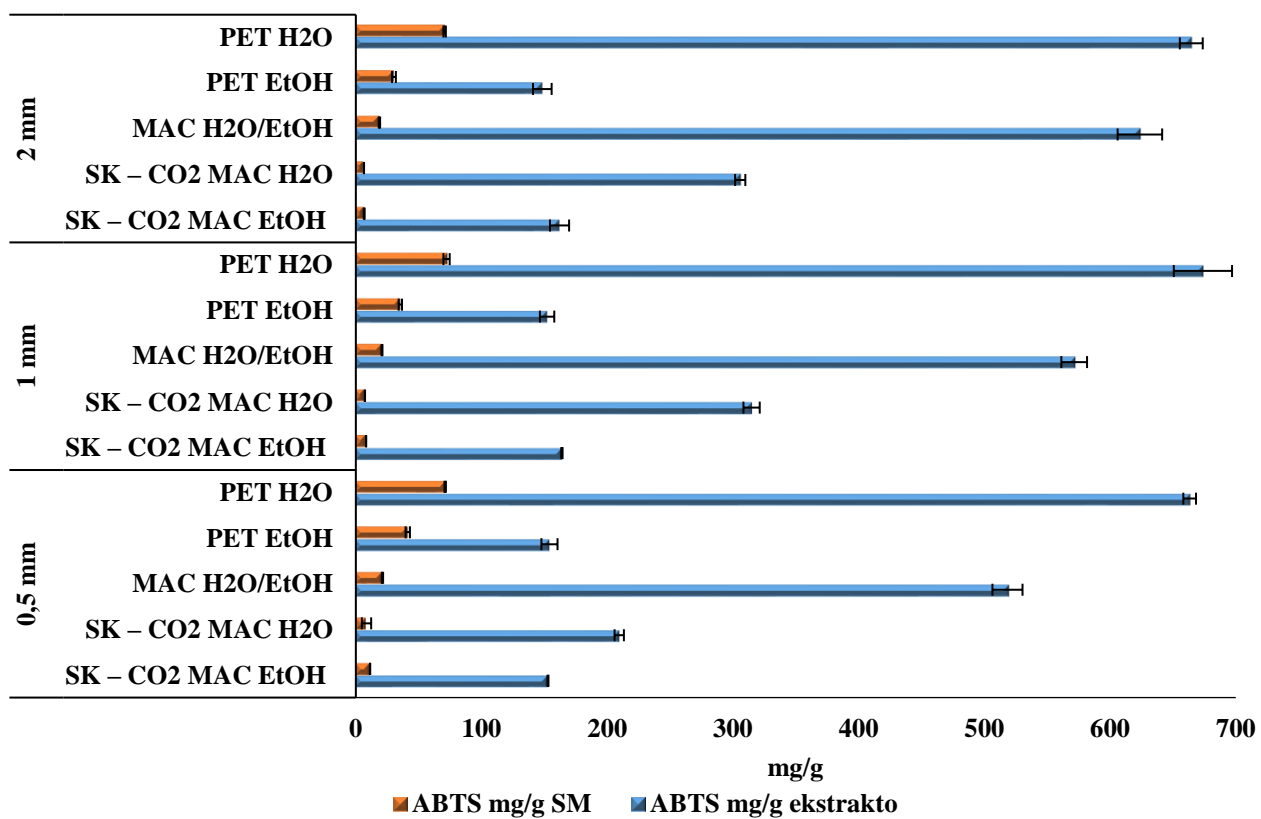
Ekstraktų antioksidacinės savybės priklauso nuo fitocheminės sudėties, o ypač polifenolinių junginių tokių kaip flavanoidai ir fenolinės rūgštys. Rezultatai išreikšti galo rūgšties ekvivalentais (GRE), kurie pateikti 3.3 paveiksle. BFJK ekstraktuose kito nuo 72,97 iki 349,77 mg GRE g<sup>-1</sup> ekstrakto. Didžiausi fenolinių junginių kiekiai nustatyti ekstraktuose, kurie buvo gauti po superkritinės ekstrakcijos gautą liekaną maceruojant ir purtant etanolio 0,5, 1 ir 2 mm frakcijose, kuriose atitinkamai gauta 311,08, 349,77 ir 323,98 mg GRE g<sup>-1</sup> ekstrakto. Šie ekstraktai galėtų būti geri natūralių antioksidantų šaltiniai. Mažiausi BFJK kiekiai nustatyti po superkritinės ekstrakcijos gautą liekaną, maceruojant ir purtant vandeniu: 0,5 mm – 72,97 GRE g<sup>-1</sup> ekstrakto, 1 mm – 79,67 GRE g<sup>-1</sup> ekstrakto ir 2 mm – 82,75 GRE g<sup>-1</sup> ekstrakto.



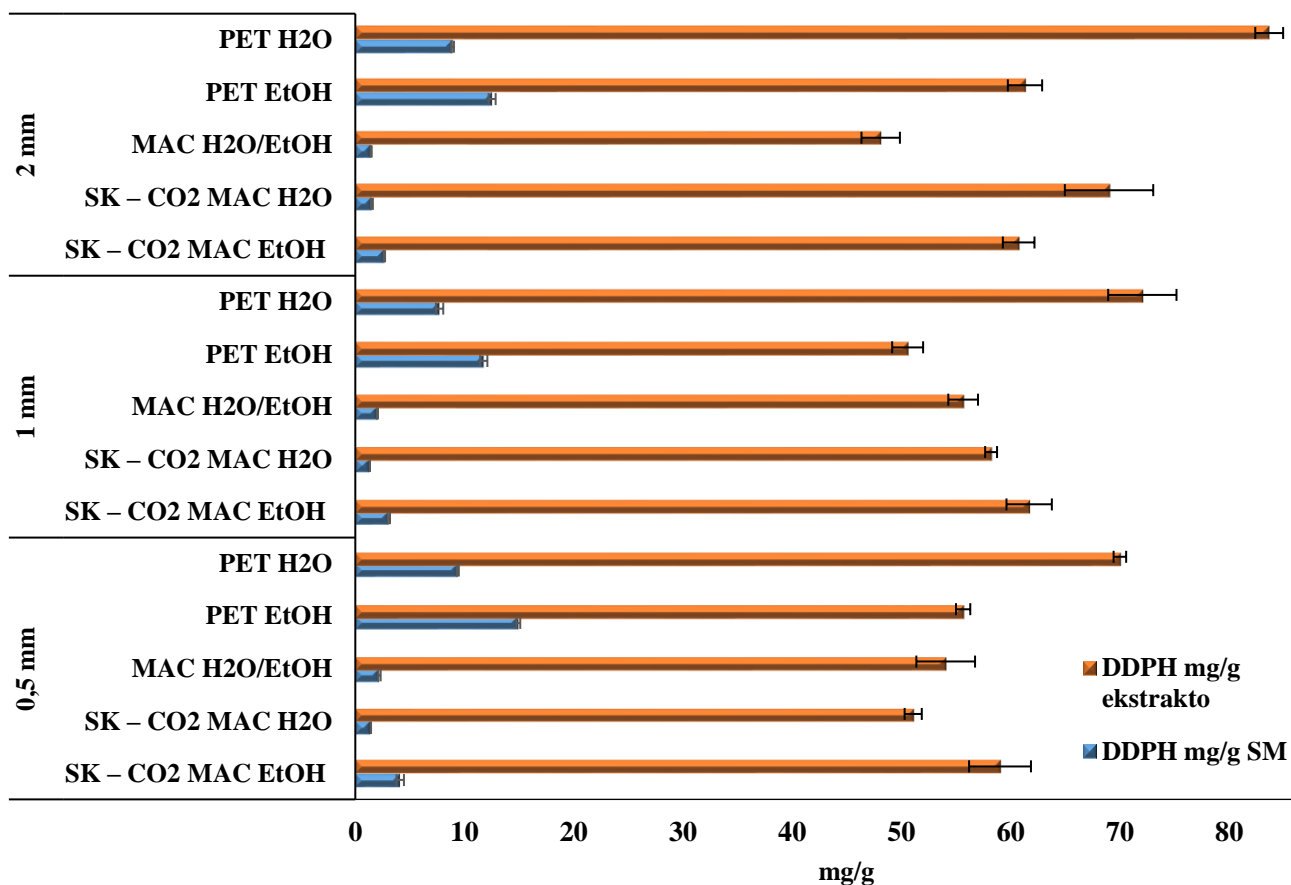
3.3 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis mėlynių išspaudų ekstraktuose

Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas toliau buvo tirtas atliekant ABTS<sup>•+</sup> katijono radikalo ir DDPH<sup>•</sup> radikalo blukinimo metodus. Gauti rezultatai pateikti 3.4 ir 3.5 paveiksluose.

Įvertinus antioksidacinę galią ABTS<sup>•+</sup> modelinėje sistemoje nustatyta, kad ji didėjo nuo 148,36 iki 673,87 mg/g ekstrakto, o sausoje medžiagoje nuo 6,46 iki 72,17 mg/g. Didžiausiu aktyvumu pasižymėjo po pagreitintos ekstrakcijos vandeniu ir po maceravimo purtant vandens/etanolio mišiniu gauti ekstraktai. Mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo pagreitintos ekstrakcijos etanoliniu ir po superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos gautos liekanos maceruotas ir purtytas etanolinis ekstraktas.



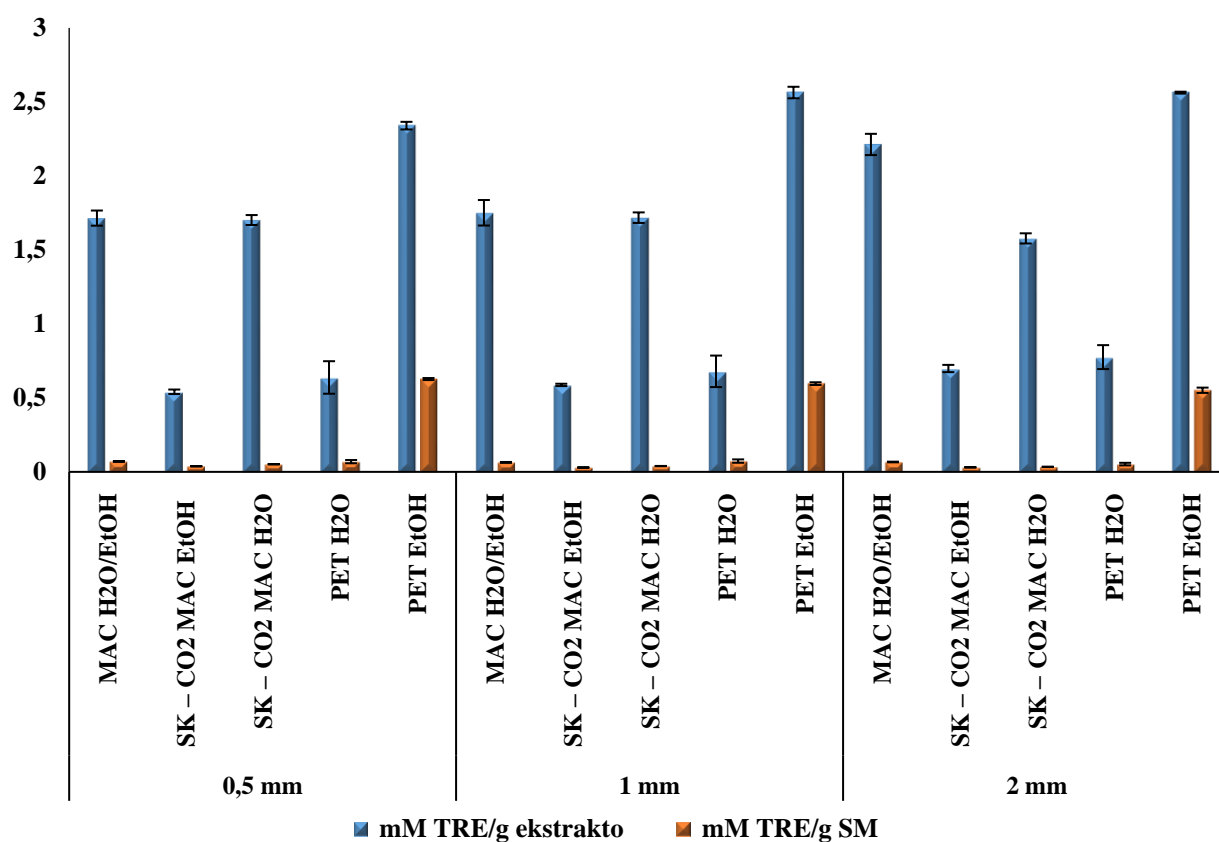
3.4 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS<sup>•+</sup> metodu mėlynių išspaudų ekstraktuose



3.5 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH<sup>•</sup> metodu mėlynių išspaudų ekstraktuose

Įvertinus laisvųjų radikalų sujungimą DPPH• reagentu nustatyta, kad antioksidacinė ekstraktų geba kito nuo 48,11 iki 83,68 mg/g ekstrakto. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu taip pat kaip ir ABTS•+ modelinėje sistemoje, pasižymėjo PET – H<sub>2</sub>O ekstraktai. Sausoje medžiagoje didžiausiu antiradikaliniu aktyvumu pasižymėjo PET – EtOH ekstraktai.

Ekstraktų aktyvumas ORAC modelinėje sistemoje buvo 0,54 – 2,76 mmol TRE/g. Didžiausia deguonies radikalo suširšimo geba (ORAC) nustatyta pagerintinos ekstrakcijos etanolio gautuose ekstraktuose (3.6 pav.) Šiek tiek mažesne antiradikaline geba pasižymėjo ekstraktai gauti maceruojant ir purtant etanolio/vandens mišiniu. Sausoje medžiagoje didžiausiu antiradikaliniu aktyvumu pasižymėjo PET – EtOH ekstraktai. Mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo po superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos liekaną maceruojant ir purtant etanolio gautuose ekstraktuose.



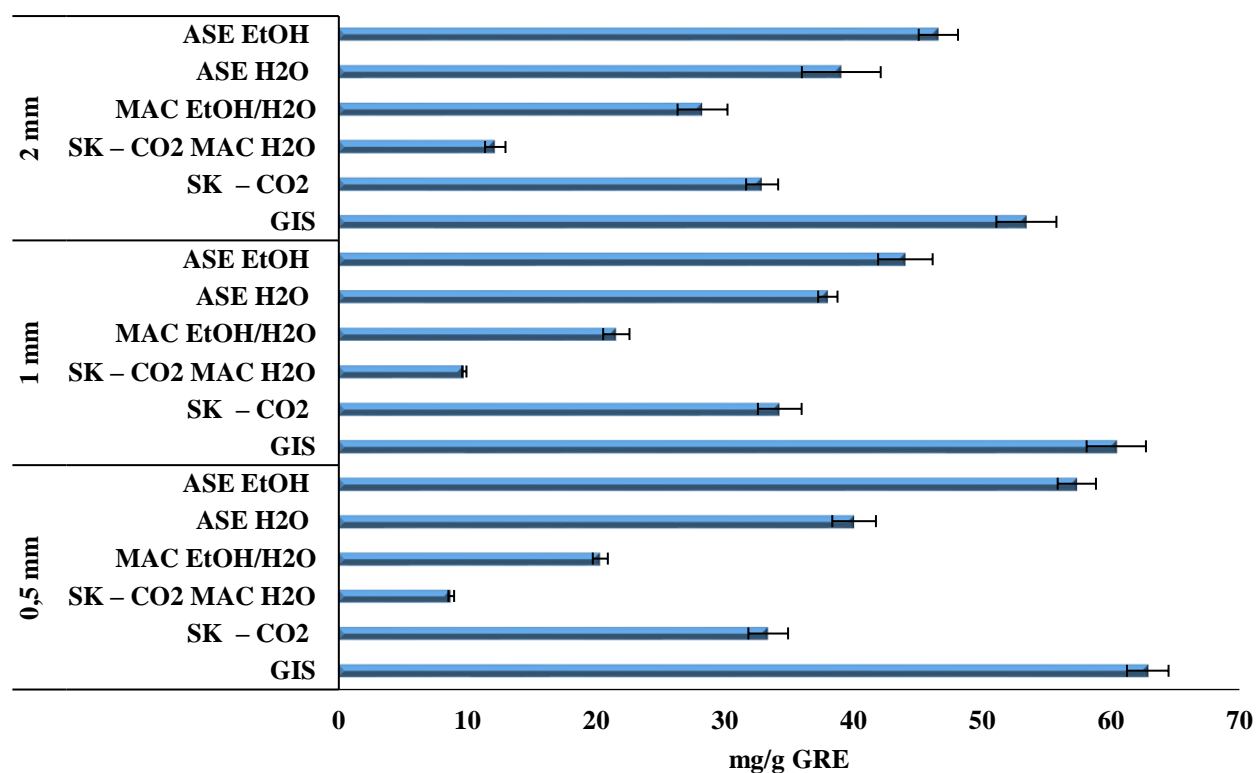
3.6 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ORAC metodu mėlynių išspaudų ekstraktuose

Taigi, remiantis gautais rezultatais nustatyta, kad didžiausias antioksidacinį aktyvumą turėjo ekstraktai, kurie buvo pagaminti naudojant 1 ir 2 mm mėlynių išspaudų frakcijas. Pastebėta, kad naudojant išspaudų stambesnes frakcijas (1 ir 2 mm) efektyviau išsieksstrahuoja bioaktyvūs junginiai nei naudojant 0.5 mm susmulkinimo laipsnį. Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad naudojant smulkesnes žaliavų frakcijas, gaunamos didesnė išėigos, tačiau išsieksstrahuoja dideli vaškų kiekiai, kurie neturi biologinio aktyvumo [90].

Kai kurie antioksidacinę gebą turintys junginiai gali neišsieksstrahuoti su tyrimuose naudotais tirpikliais. Norint gauti tikslesnius rezultatus taikyta QUENCHER procedūra, kuri paremta oksidacijos – redukcijos reakcijomis kietos fazės paviršiuje. Po skirtingų ekstrakcijų gautos

kietosios frakcijos liekanos ir grynios išspaudos buvo iširtos antioksidacino aktyvumo nustatymo DPPH<sup>•</sup>, ORAC ir BFJK metodais taikant QUENCHER procedūrą.

Bendras fenolinių junginių kiekis varijavo nuo 8,74 iki 62,87 GRE mg/g sausų išspaudų (3.7 pav.). Bendras fenolinių junginių kiekis prieš ekstrakcijas išspaudose buvo 62,87, 60,43 ir 53,44 GRE mg/g sausų išspaudų atitinkamai tiriant 0,5, 1 ir 2 mm frakcijas. Min-Sheng Su ir kt. (2006) nustatė, kad mėlynių išspaudose bendras fenolinių junginių kiekis buvo 20,7 – 29,2 mg GRE /g sausos masės[91].

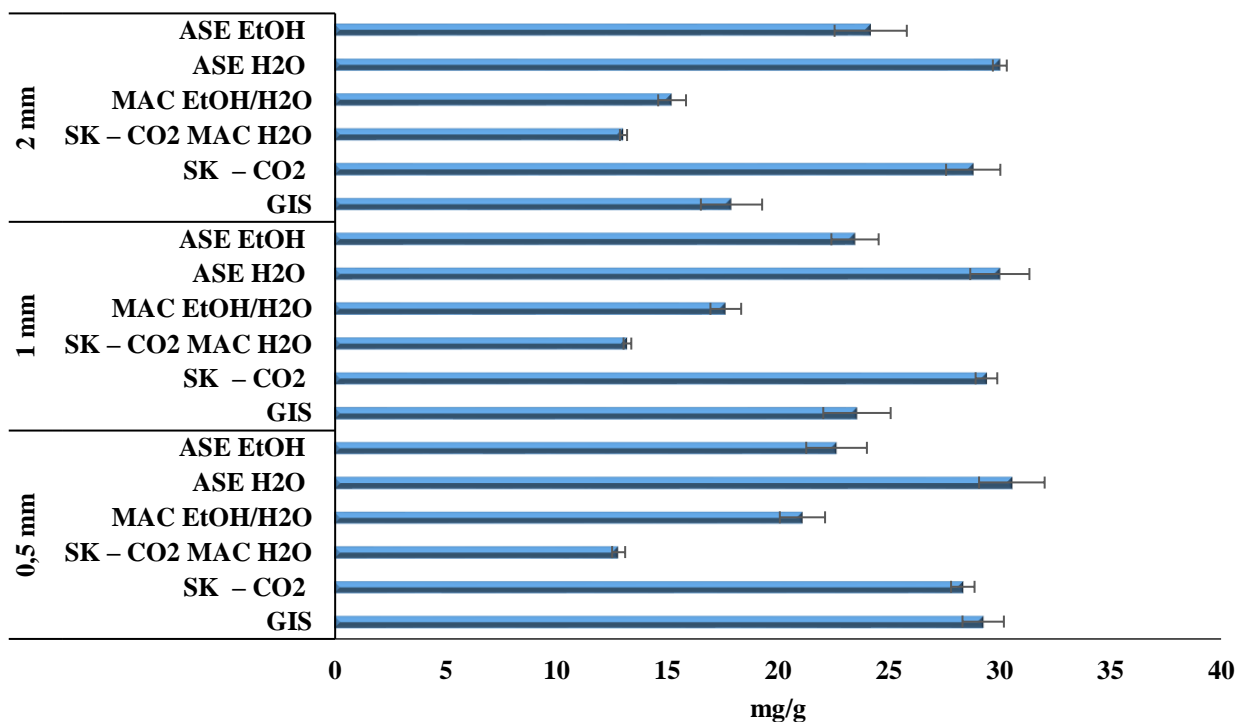


3.7 pav. Kietosios frakcijos antioksidacino aktyvumo įvertinimas BFJK metodu

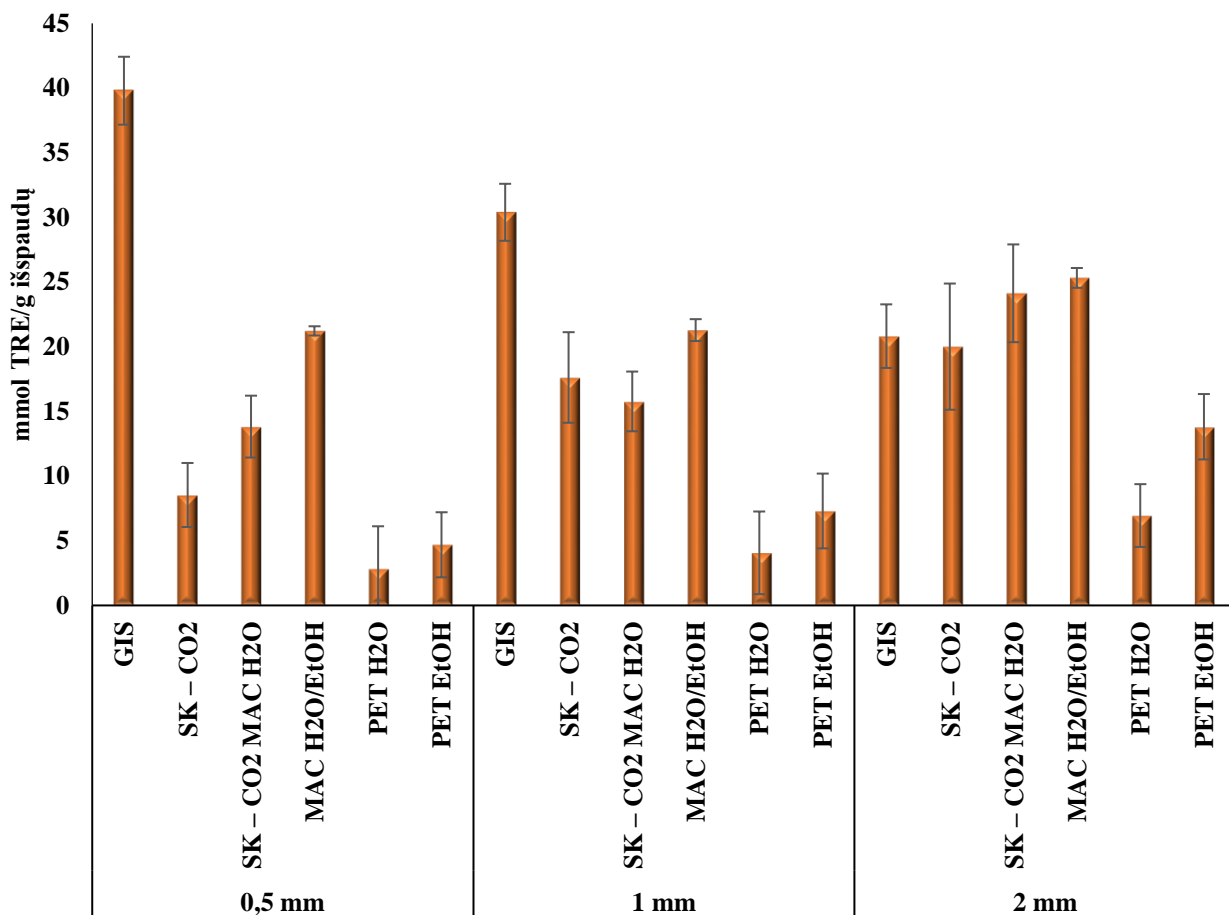
DPPH<sup>•</sup> modelinėje sistemoje antioksidacinis aktyvumas didėjo nuo 12,80 iki 30,55 mg/g sausų išspaudų (3.8 pav). Grynose išspaudose antioksidacinis aktyvumas 0.5 mm frakcijoje nustatytas 29,26 mg/g GRE, 1 mm – 23,56 mg/g GRE, o 2 mm – 17,89 mg GRE /g sausų išspaudų. ORAC modelinėje sistemoje išspaudų deguonies radikalo surišimo geba buvo 2,82 – 39,79 mmol/g išspaudų (3.9 pav). Didžiausia antioksidacine geba visose frakcijose pasižymėjo grynios išspaudos, šiek tiek mažesnę aktyvumą turėjo išspaudos gauto po maceravimo purtant vandens/etanolio (santykiu 8:2) mišiniu. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas ORAC modelinėje sistemoje nustatytas po PET H<sub>2</sub>O ekstrakcijos likusiose išspaudose.

Įvertinus QUENCHER metodu gautus rezultatus pastebėta, jog po ekstrakcijų išspaudose dar lieka dideli kiekiai antioksidacinį aktyvumą turinčių junginių. Didžiausią antioksidacinį aktyvumą BFJK, DPPH<sup>•</sup> ir ORAC modelinėse sistemose turėjo grynios mėlynių išspaudos. Taip pat pastebėta, kad 0.5 frakcijos antioksidacinis efektyvumas buvo nežymiai didesnis nei su 1 ir 2 mm. Svarbu paminėti, kad skirtingų tyrimų rezultatai gali skirtis dėl tokių veiksnių kaip uogos veislė, augimo vieta bei derliaus nuėmimo laikas. Taip pat didelę įtaką antioksidacino aktyvumo vertinimui turi mėginio paruošimas, ekstrakcijos būdas bei sąlygos.





3.8 pav. Kietosios frakcijos antioksidacino aktyvumo įvertinimas DPPH• modelinėje sistemoje



3.9 pav. Kietosios frakcijos antioksidacino aktyvumo įvertinimas ORAC metodu

### 3.4. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas

Riebalų rūgščių sudėtis nustatyta dujų chromatografijos metodu, šiame tyrime tirtas superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos metu gautas ekstraktas. Rūgščių sudėtis identifikuota remiantis riebalų rūgščių etalinių standartų sulaikymo laikais. Gauti rezultatai pateikti 2 lentelėje.

**2 lentelė.** Riebalų rūgščių (RR) sudėtis mėlynių išspaudų (SK – CO<sub>2</sub>) ekstrakto

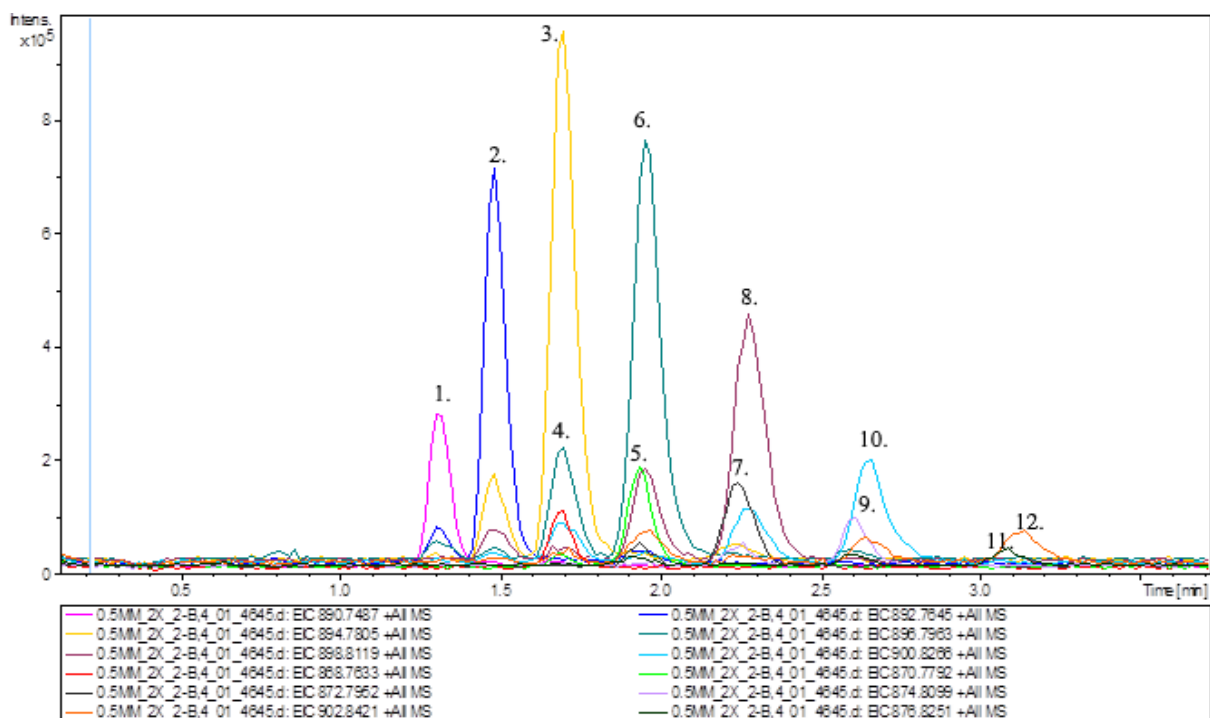
Nr.	Junginys	Junginio kiekis, %
1.	Palmitino rūgštis (C16:0)	6,12
2.	Stearino rūgštis (C18:0)	1,26
3.	Oleino rūgštis (C18:1)	22,46
4.	Linolo rūgštis (C18:2)	36,07
5.	Arachino rūgštis (C20:1)	0,29
6.	$\alpha$ – Linoleno rūgštis (C18:3)	31,83
7.	Kitos rūgštys	~ 2

Iš pateiktų duomenų matyti, kad mėlynių išspaudų ekstrakto dominuoja 5 riebalų rūgštys: linolo (36,07 %),  $\alpha$  – linoleno (31,83 %), oleino (22,46 %), palmitino (6,12 %) ir stearino (1,26 %). Kitų rūgščių kiekiai pakankamai maži, nesiekia 1%. Gauti rezultatai patvirtina ultra efektyviosios skysčių chromatografijos metodu gautus duomenis, kadangi šiuose ekstraktuose buvo rastos linolo ir bei  $\alpha$  – linoleno rūgštys (žr.3.5 skyrius).

Gustinelli ir kt., (2018) tyrinėjo mėlynių išspaudų ekstraktą, gautą po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu, ir ekstrakto identifiko linolo (35,5 %),  $\alpha$  – linoleno (33,7 %), oleino (23,3 %), palmitino (6,1 %) ir stearino (1,4 %) rūgštis [92]. Parry ir kt., mėlynių išspaudose taip pat nustatė šias dominuojančias riebalų rūgštis [93]. Taigi, palyginus rezultatus su mokslinėmis publikacijomis, galima teigti, kad pagrindinės riebalų rūgštys nustatytos tiksliai, kadangi atitiko šaltiniuose gautus duomenis [92, 93].

### 3.5. Triacilglicerolių sudėties nustatymas

Triacilglicerolių sudėtis buvo nustatyta ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu. Tirti superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos būdu gauti ekstraktai (0.5, 1 ir 2 mm). Gauta 0.5 mm mėlynių išspaudų ekstrakto SK – CO<sub>2</sub> chromatograma pateikta 3.10 paveiksle, kitos chromatogramos pateikiamos priedų skyriuje (I priedas).



**3.10 pav.** Triacilglicerolių smailės chromatogramoje, analizei naudojant 0,5 mm SK – CO<sub>2</sub> ekstraktą

Mėlynių išspaudų po superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos gautuose ekstraktuose nustatyti 12 triacilglicerolių, kurių sudėtyje aptiktos riebalų rūgštys: palmitino (P), linolo (L), linoleno (Ln) ir oleino (O). Pagal gautus MS/MS fragmentus ir tikslas triacilglicerolių molekulinės masės nustatytos tikslios jų formulės, junginiai identifikuoti remiantis mokslinėmis publikacijomis [96]. Didžiausi triacilglicerolių kiekiai nustatyti 1 mm susmulkintų mėlynių ekstraktoje, o mažiausi – 0.5 mm ekstraktoje. Dominuojantis junginys tirtuose ekstraktuose buvo trilinoleatas, santykiniai mažiausia koncentracija nustatyta palmitindioleino. Gauti rezultatai pateikti 3 lentelėje.

**3 lentelė.** Triacilglicerolių kompozicija 0,5mm mėlynių išspaudų SK – CO<sub>2</sub> ekstraktoje

Smailės nr.	Triacilgliceroliai	M+	Jonų fragmentai (m/z)	Sulaikymo laikas, min	0,5 mm sąlyginiai ploto vnt.	1 mm sąlyginiai ploto vnt.	2 mm sąlyginiai ploto vnt.
1.	LnLnLn	890,7487	LnLn 595	1,3	13,63	17,02	15,46
2.	LLnLn	892,7645	LnL 597, LnLn 595	1,5	32,06	46,10	38,28
3.	LLLn	894,7805	LL 599, LLn 597	1,5	49,80	69,64	59,74
4.	PLnLn	868,7643	LnLn 595, PLn 573	1,7	5,12	6,48	5,90
5.	PLLn	870,7800	LLn 597, PL 575	1,9	9,35	11,67	10,16
6.	LLL	896,7963	LL 599	2,0	43,69	60,06	52,42
7.	PLLn	872,7952	LL 599, PL 575	2,3	9,30	12,52	11,03
8.	OLL	898,8119	LL 599, LO 601	2,3	30,06	37,84	3,35
9.	PLL	874,8107	OL 601, PL 575, PO 577	2,6	5,02	6,32	5,37
10.	OLO	900,8266	OL 601, OO 603	2,7	13,63	16,81	15,29
11.	POO	876, 8258	PO 577, OO 603	3,1	1,95	2,42	2,26
12.	OOO	902,8424	OO 603	3,1	4,75	5,71	5,56

### 3.6. Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė

Antocianinų kokybinis ir kiekybinis nustatymas buvo atliktas naudojant ultra efektyviosios skysčių chromatografijos su kvadrupoliniu – skriejimo laiko masių detektoriumi metodą (UESCh – MS). Šis prietaisas pasižymi tuo, kad gali fiksuoti tikslią molekulinio junginio masę, apm tikslumu, ko pasekoje galima paskaičiuoti tikslią molekulinę formulę. UESCh metodu išskirti junginiai buvo identifikuoti literatūros šaltiniuose publikuotais duomenimis, lyginant su šiame darbe gautomis junginių molekulinėmis masėmis, tiksliais jų formulėmis, MS/MS fragmentais, sulaikymo laikais ir UV spektro duomenimis.

Kiekybinė analizė atlikta naudojant komercinį antocianinų standartą (cianidin-3-gliukozidą). Atlikus chromatografišką antocianinų nustatymą mėlynių išspaudų skirtinguose ekstraktuose buvo rasta 15 antocianinų, kurie nurodyti 4 lentelėje. Antocianinų kiekis ekstraktuose varijavo nuo 55,42 iki 440,42 mg/100 g išspaudų priklausomai nuo ekstrakto. Lyginant bendrą antocianinų kiekį nustatyta, kad didžiausi antocianinų kiekiai buvo aptikti MAC H<sub>2</sub>O/EtOH ir ekstrahuojant grynas išspaudas parūgštintu ekstrahentu specialiai pritaikytu antocianinų ekstrakcijai. Mažiausi kiekiai nustatyti vandeniame ekstrakte, kuris buvo gautas po superkritinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos gautą liekaną maceruojant ir purtant etanolio, vėliau vandeniu – 0,5, 1 ir 2 mm frakcijose antocianinų kiekis atitinkamai buvo 55,42, 65,83 ir 68,65 mg/100g išspaudų.

Lyginant nustatytus antocianinus tarpusavyje pastebėta, kad dominuojantys antocianinai mėlynių išspaudų ekstraktuose yra gliukozidai: delfinidin-3-gliukozidas, cianidin-3-gliukozidas, malvidin-3-gliukozidas ir petunidin-gliukozidas. Tuo tarpu mažiausias kiekis ekstraktuose buvo peonidin-3-arabinozido, kurio rasti kiekiai visose frakcijose buvo 4 kartus mažesni nei gliukozidų. Pastebėta, kad didžiausios individualių antocianinų koncentracijos visuose ekstraktuose buvo gautos iš 1 mm susmulkinimo frakcijos, išskyrus MAC H<sub>2</sub>O/EtOH ekstrakte, kur didžiausi kiekiai nustatyti 0,5 mm frakcijoje. Tam įtakos galėjo turėti osmosinis slėgis, nes ekstrahuojant padidintame slėgyje gaunamas geresnis tirpiklo pasiskirstymas.

Bunea ir kt. (2013) nustatė, kad skirtingose mėlynių veislių uogose antocianinų kiekis svyruoja nuo 101 iki 195 mg/100g sausos masės [85]. Jie nustatė, kad dominuojantis antocianinas yra delfinidinas, šiek tiek mažesni kiekiai rasti malvidino ir petunidino. Tuo tarpu Burdulis ir kt. (2007) analizuotuose mėlynių ekstraktuose rado didžiausius cianidino kiekius (vidutiniškai – 0,053 mg/ml). Delfinidino ir petunidino kiekiai nustatyti 2,5 karto mažesni nei cianidino, o peonidino ir malvidino rasti mažiausi kiekiai [99]. Prior ir kt. (2001) nustatė, kad mėlynėse dominuojantis antocianinas yra petundin-3-gliukozidas [28]. Šiame darbe rezultatai skyrėsi, kadangi rasti didžiausi delfinidino kiekiai, truputėlį mažesni cianidino, o peonidino 2 kartus mažesni kiekiai nei cianidino. Svarbu paminėti, kad tokių skirtumų priežastys galėjo būti skirtingi fenolinių junginių išgavimo būdai, ekstrakcijos sąlygos, taip pat įtakos gali turėti augalo augimo vieta ir derliaus nuėmimo laikas.

Mėlynių išspaudoms būdingas didelis antocianinų kiekis, lyginant su kitų uogų išspaudomis. White ir kt. (2010) spanguolių išspaudose nustatytas antocianinų kiekis siekė 121 mg/100g sausų išspaudų [100]. Iš gautų rezultatų galima daryti išvadą, kad mėlynių išspaudos galėtų būti puikus funkcinis priedas, siekinat sustiprinti spalvos intensyvumą tam tikruose maisto produktuose.

4 lentelė. Antocianinų kiekis mėlynių etaloniniuose ekstraktuose (mg/100g išspaudų)

Nr.	Junginys	MS [M-H] <sup>-</sup> m/z	MAC H <sub>2</sub> O/EtOH			SK – CO <sub>2</sub> MAC EtOH			SK – CO <sub>2</sub> MAC H <sub>2</sub> O			PET EtOH			PET H <sub>2</sub> O			GIS		
			0,5 mm	1 mm	2 mm	0,5 mm	1 mm	2 mm	0,5 mm	1 mm	2 mm	0,5 mm	1 mm	2 mm	0,5 mm	1 mm	2 mm	0,5 mm	1 mm	2 mm
1.	delfinidin-3-galaktozidas	465,1023	33,29 ±1,27	23,77 ±0,20	27,88 ±0,37	25,57 ±0,33	35,77 ±0,02	18,58 ±0,23	4,84± 0,10	6,25± 0,08	6,47± 0,04	18,29 ±0,26	22,59 ±0,48	13,99 ±0,05	22,75 ±0,04	26,55 ±4,17	31,43 ±1,42	35,62 ±0,14	45,00 ±0,06	42,14 ±0,10
2.	delfinidin-3-gliukozidas	465,1023	42,26 ±1,71	32,24 ±0,28	37,57 ±0,50	33,47 ±0,36	46,34 ±0,99	24,13 ±0,29	5,59± 0,01	7,27± 0,13	7,24± 0,05	19,51 ±0,11	24,72 ±0,04	14,30 ±0,18	29,36 ±0,71	35,78 ±4,93	44,19 ±0,61	42,71 ±0,68	53,09 ±1,27	52,17 ±0,98
3.	delfinidin-3-arabinozidas	435,0918	34,73 ±2,12	21,58 ±4,64	29,10 ±0,23	32,67 ±0,08	45,73 ±0,64	23,75 ±0,48	4,19± 0,05	5,58± 0,18	5,69± 0,01	18,16 ±0,15	22,92 ±0,08	13,40 ±0,21	17,66 ±0,01	22,27 ±4,44	25,72 ±0,25	41,69 ±0,31	51,78 ±0,50	49,14 ±0,40
4.	cianidin-3-galaktozidas	449,1074	29,93 ±2,24	21,58 ±4,66	21,18 ±0,40	18,33 ±0,22	25,18 ±0,04	13,39 ±0,28	3,93± 0,02	4,49± 0,03	4,67± 0,07	22,11 ±0,40	28,63 ±0,18	15,58 ±0,61	18,54 ±0,31	20,59 ±4,81	25,98 ±0,25	22,01 ±0,63	27,75 ±0,51	26,06 ±0,57
5.	cianidin-3-gliukozidas	449,1077	50,68 ±4,68	30,89 ±0,31	36,26 ±0,18	29,31 ±0,49	40,52 ±0,97	21,58 ±0,01	5,58± 0,19	6,38± 0,09	6,72± 0,09	22,02 ±1,24	27,32 ±0,14	16,72 ±0,40	30,11 ±0,77	34,16 ±4,27	43,08 ±0,03	34,50 ±0,37	41,95 ±0,49	40,08 ±0,43
6.	petunidin-3-galaktozidas	479,1181	16,90 ±1,50	11,42 ±0,07	13,89 ±0,29	14,14 ±0,41	18,15 ±0,38	10,21 ±0,11	2,73± 0,01	3,23± 0,07	3,46± 0,05	17,81 ±0,34	21,53 ±0,45	14,10 ±0,23	12,89 ±0,59	14,23 ±3,62	17,15 ±0,22	14,87 ±0,36	17,73 ±0,54	16,71 ±0,45
7.	cianidin-3-arabinozidas	419,0969	38,62 ±4,48	25,17 ±0,01	29,19 ±0,35	28,40 ±0,12	37,97 ±0,87	21,33 ±0,42	4,18± 0,03	4,84± 0,10	5,09± 0,01	23,97 ±0,46	33,21 ±0,69	14,73 ±0,23	17,27 ±0,05	20,54 ±4,51	25,47 ±0,73	34,29 ±0,88	42,50 ±1,70	39,99 ±1,29
8.	petunidin-3-gliukozidas	479,118	39,34 ±3,69	27,03 ±0,36	31,18 ±0,03	29,51 ±0,23	39,00 ±0,03	21,46 ±0,90	5,01± 0,03	6,14± 0,13	6,35± 0,04	26,08 ±0,37	33,93 ±0,07	18,22 ±0,67	26,97 ±0,13	31,41 ±4,67	39,39 ±1,02	30,81 ±0,22	36,32 ±0,01	35,43 ±0,11
9.	petunidin-3-arabinozidas	449,1079	16,71 ±0,63	8,22± 4,10	13,92 ±0,10	15,69 ±0,16	21,00 ±0,41	11,22 ±0,65	2,32± 0,07	2,70± 0,06	2,91± 0,06	16,71 ±0,12	20,65 ±0,11	12,76 ±0,13	9,70± 0,35	11,56 ±2,46	12,90 ±0,16	16,37 ±0,01	19,98 ±0,14	19,62 ±0,07
10.	peonidin-3-galaktozidas	463,1232	7,40 ±2,11	8,19± 4,31	5,31± 0,08	6,16± 0,09	7,34± 0,03	5,27± 0,99	1,63± 0,05	1,71± 0,05	1,97± 0,01	13,84 ±0,14	16,54 ±0,20	11,15 ±0,07	7,32± 0,05	7,74± 0,73	8,47± 0,31	5,73± 0,04	6,51± 0,02	6,44± 0,03
11.	peonidin-3-gliukozidas	463,1231	32,21 ±2,02	15,95 ±4,24	22,8± 0,33	17,72 ±0,36	23,52 ±0,38	14,32 ±1,28	3,67± 0,07	4,13± 0,21	4,33± 0,01	20,39 ±0,22	28,02 ±0,38	12,76 ±0,06	18,55 ±0,03	21,18 ±4,72	26,62 ±0,67	20,53 ±0,32	24,08 ±0,33	23,24 ±0,33
12.	malvidin-3-galaktozidas	493,1336	19,45 ±1,83	15,45 ±4,74	13,83 ±0,57	12,59 ±0,06	16,04 ±0,53	8,87± 0,09	2,86± 0,01	3,16± 0,14	3,46± 0,02	18,64 ±0,10	23,78 ±0,12	13,50 ±0,09	11,93 ±0,01	13,19 ±2,90	15,37 ±0,04	12,05 ±0,47	14,57 ±0,25	13,95 ±0,36
13.	malvidin-3-gliukozidas	493,1336	52,50 ±1,77	31,65 ±0,32	36,77 ±0,06	26,17 ±0,32	36,53 ±0,47	19,98 ±0,33	5,18± 0,05	6,00± 0,28	5,94± 0,15	27,25 ±0,80	37,36 ±1,24	17,13 ±0,36	24,16 ±0,34	29,23 ±4,13	37,68 ±0,48	28,84 ±0,82	33,43 ±1,16	32,05 ±0,99
14.	peonidin-3-arabinozidas	433,112	7,09 ±0,47	4,42± 0,08	5,11± 0,05	6,35± 0,05	7,47± 0,05	4,66± 0,15	1,50± 0,02	1,51± 0,05	1,75± 0,01	13,50 ±0,13	16,04 ±0,23	10,96 ±0,03	6,53± 0,01	6,95± 0,55	7,41± 0,05	6,36± 0,09	7,18± 0,04	7,03± 0,06
15.	malvidin-3-arabinozidas	463,123	19,31 ±0,49	11,85 ±0,17	13,86 ±0,44	12,30 ±0,03	15,70 ±0,02	8,96± 0,15	2,21± 0,09	2,45± 0,05	2,60± 0,04	16,60 ±0,29	21,04 ±0,44	12,16 ±0,14	8,82± 0,18	10,41 ±1,72	12,10 ±0,51	13,05 ±0,39	15,61 ±0,08	14,88 ±0,24

### 3.6.1. Antocianinų įkapsuliavimo efektyvumo (IE) nustatymas

Remiantis 3.6.1. skyriuje gautais rezultatais, didžiausia antocianinų koncentracija buvo nustatyta MAC H<sub>2</sub>O/EtOH ekstrakto. Dėl šios priežasties šis ekstraktas pasirinktas ir toliau naudotas įkapsuliavimo proceso metu, kai veiklieji junginiai yra apgaubiami apvalkalu, kuris apsaugo nuo išorinio aplinkos poveikio, todėl pagaminti milteliai tampa stabilūs ir pagerėja jų tirpumas. Mikrokapsuliacija buvo atlikta naudojant išpurškiamojo džiovavimo metodą, kurio metu buvo gautos mikrokapsulės su mėlynių ekstraktu (3.11 pav.) ir nustatytas antocianinų įkapsuliavimo efektyvumas. Gauti rezultatai patekti 5 lentelėje.



**3.11 pav.** Mikrokapsuliacijos būdu gauti milteliai naudojant skirtingas dangas: (1) maltodekstriną, (2) modifikuotą krakmolą HI-CAP, (3) maltodekstrino/išrūgų baltymų mišinį (santykiu 2:1)

Remiantis mokslinėje literatūroje aprašytais tyrimų rezultatų duomenimis, viso produkto ir jo atskirų sudedamųjų veikliųjų junginių įkapsuliavimo efektyvumą lemia įkapsuliavimui naudojamų dangų fizikocheminės savybės ir jų gebėjimas formuoti emulsiją bei džiovavimo purkštuviniu būdu proceso parametrai [73]. Proceso metu naudotos angliavandenių/baltyminės kilmės dangos suformuoja tvirtą apsauginę plėvelę, tokiu būdu užlaikydamos mėlynių išpaudų bioaktyvius junginius. Nustatyta, kad į maltodekstrino danga įkapsuliuotų antocianinų proceso efektyvumas buvo didžiausias (77,20 %), naudojant maltodekstrino/baltymų (2:1) dangą įkapsuliavimo efektyvumas buvo truputį mažesnis (74,08 %), o naudojant modifikuotą krakmolą HI-CAP efektyvumas buvo mažiausias (69,42%). Fredes ir kt. (2018) nustatė, kad mėlynių sulčių įkapsuliacijos efektyvumas, išpurškiant 150°C temperatūroje, kito nuo 74,7 iki 91,6 % priklausomai nuo sulčių ir įkapsuliavimo agento santykio mišinyje. Šiame tyrime gauti rezultatai galėjo skirtis nuo nurodomų literatūroje [82] dėl skirtingų naudotų produktų ir proceso sąlygų.

Vienas svarbiausių mikrokapsulių kokybės parametrų – veikliųjų junginių įkapsuliacijos efektyvumas. Gauti rezultatai rodo, kad didžiausiu įkapsuliacijos efektyvumu pasižymėjo trys skirtingi delfinidino glikozidai: delfinidin-3-galaktozidas, delfinidin-3-gliukozidas ir delfinidin-3-arabinozidas. Iš visų antocianinų efektyviausiai į maltodekstriną įkapsuliuotas delfinidin-3-gliukozidas: naudojant maltodekstrino matricą įkapsuliavimo efektyvumas buvo 81,96 %, maltodekstrino/baltymų mišinį – 78,30 %, o modifikuotą krakmolą HI-CAP – 73,01 %. Fredes ir kt. (2018) nustatė, kad delfinidin-3-gliukozido įeinančio į mėlynių sulčių sudėtį įkapsuliavimo

efektyvumas kito nuo 66,5 iki 87,7 %, o šiame darbe gauti rezultatai atitiko šio junginio vertės kito nuo 73,01 iki 81,96 %. Gauti rezultatai sutapo su literatūroje pateiktas duomenimis [82]. Galima teigti, kad tinkamiausia mėlynių išspaudų ekstrakto įkapsuliuojanti dangą yra maltodekstrinas.

**5 lentelė** Antocianinų įkapsuliuojimo efektyvumas (%)

Junginys	Formulė	MS [M-H] <sup>-</sup> m/z	Maltodekstrinas	Maltodekstrinas/ baltymai (1:2)	HI-CAP
delfinidin-3-galaktozidas	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	465,1023	80,79±0,39	77,7±0,30	72,23±1,11
delfinidin-3-gliukozidas	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	465,1023	81,96±0,58	78,3±0,33	73,01±1,03
delfinidin-3-arabinozidas	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	435,0918	80,78±0,21	77,37±0,28	69,62±1,72
cianidin-3-galaktozidas	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449,1074	78,28±0,69	74,21±0,27	70,32±1,51
cianidin-3-gliukozidas	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449,1077	79,98±0,69	75,33±0,53	67,87±1,44
petunidin-3-galaktozidas	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	479,1181	76,58±0,87	73,73±0,23	71,18±1,02
cianidin-3-arabinozidas	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	419,0969	79,76±0,70	76,03±0,42	70,28±1,05
petunidin-3-gliukozidas	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	479,118	80,54±0,29	76,95±0,26	72,47±0,80
petunidin-3-arabinozidas	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449,1079	77,16±0,33	74,47±0,46	71,93±0,34
peonidin-3-galaktozidas	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	463,1232	65,67±0,60	63,87±0,12	63,2±0,16
peonidin-3-gliukozidas	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	463,1231	79,08±0,64	75,11±0,51	69,25±0,46
malvidin-3-galaktozidas	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	493,1336	76,75±0,41	74,19±0,58	66,46±1,17
malvidin-3-gliukozidas	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	493,1336	79,93±0,39	76,67±0,41	72,66±1,54
peonidin-3-arabinozidas	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	433,112	62,68±0,93	61,12±0,27	60,54±1,54
malvidin-3-arabinozidas	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	463,123	78,07±0,63	75,37±0,28	73,35±0,87

Kitas labai svarbus mikrokapsulių kokybės parametras yra išgava kapsulių viduje ir išorėje. Atlikus tyrimus nustatyta, kad didžiausia antocianinų išgava mikrokapsulių viduje buvo gauta naudojant maltodekstrino (76,42 %), o mažiausia – naudojant modifikuoto krakmolo HI-CAP (37,10 %) dangas (6 lentelė). Nustačius išgavą paviršiuje, mažiausias kiekis buvo rastas naudojant maltodekstriną (22,80 %). Taigi, gauti rezultatai patvirtina, kad tinkamiausias įkapsuliuojimo agentas antocianinams yra maltodekstrinas.

**6 lentelė.** Antocianinų išgava paviršiuje ir viduje naudojant skirtingas dangas (%)

	Maltodekstrinas		Maltodekstrinas/ baltymai (1:2)		HI-CAP	
	Paviršiuje	Viduje	Paviršiuje	Viduje	Paviršiuje	Viduje
Išgava, %	22,80±0,56	76,42±1,78	25,97±0,35	61,34±1,37	30,58±1,05	37,10±0,59

### 3.6.2. Gautų mikrokapsuliuotų produktų struktūros analizė skenuojančiu elektroniniu mikroskopu

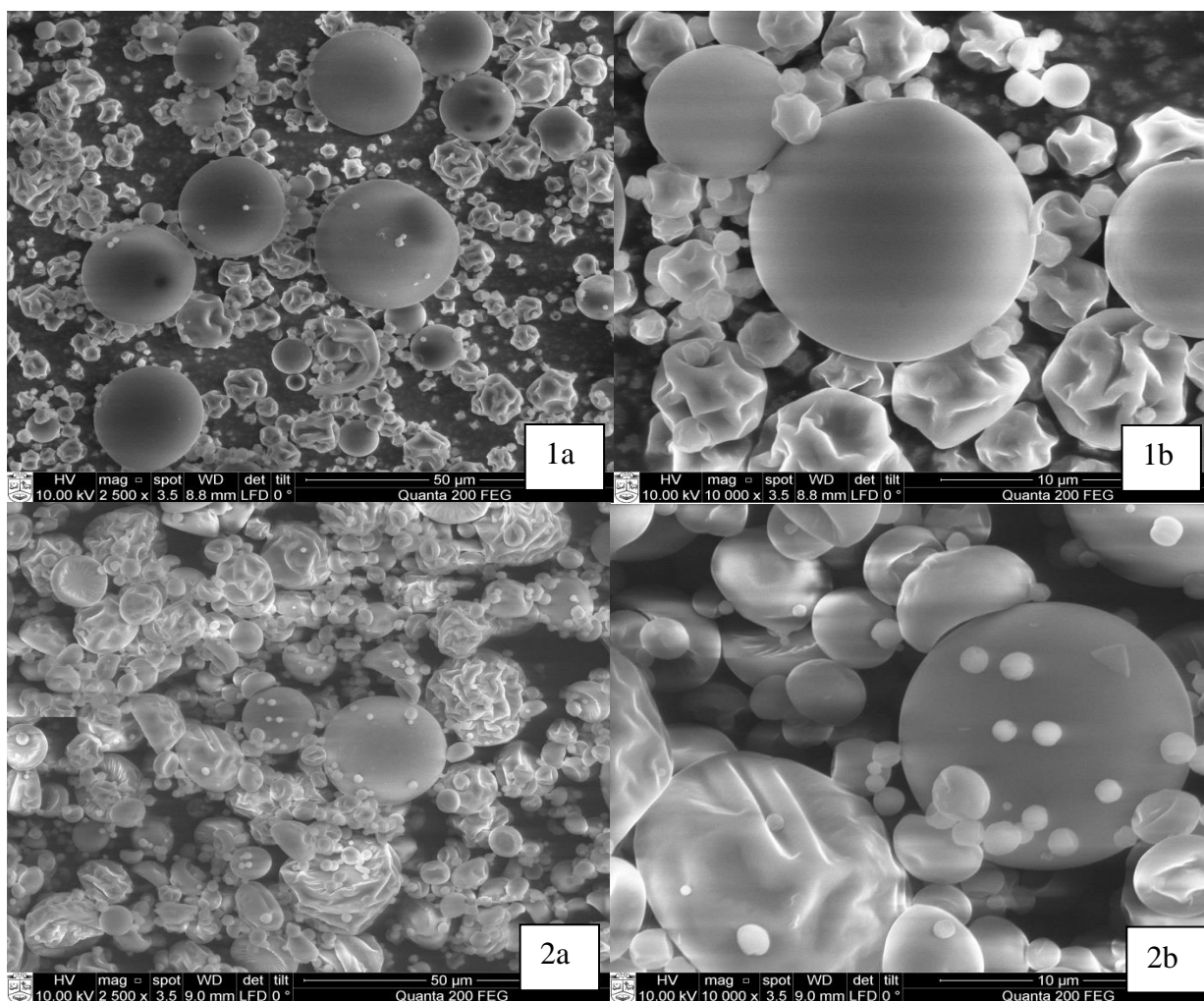
Mikrokapsulių paviršiaus morfologija yra svarbus mikrokapsulių kokybės rodiklis. Paviršiaus struktūra turi įtakos ne tik mikrokapsulių poveikiui, bet ir glaudžiai susijusi su mikrokapsulių fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis [101].

Vertinant gautų mikrokapsulių išorinius morfologinius skirtumus elektroniniu skenuojančiu mikroskopu (SEM) (3.12 pav.) matyti, kad maltodekstrino/išrūgų baltymų danga įtakojo didžiausią netaisyklingos formos kapsulių kiekį (3.12 pav. 3a, b). Daugumai mikrokapsulių buvo būdinga netaisyklinga sferinė forma su ryškiomis įdubomis, o kai kurios pasižymėjo plonomis kapsulės sienelėmis ir šiurkščiu paviršiumi, ant kurio buvo matomi trūkiai.

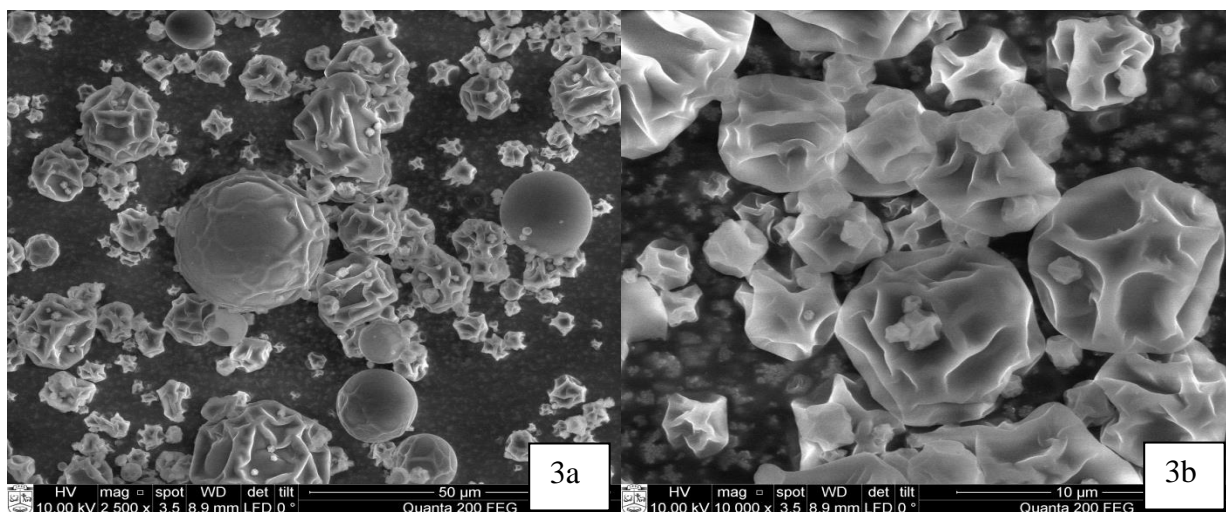
Naudojant kaip įkapsuliavimo dangą modifikuotą krakmolą HI-CAP iš gautų nuotraukų (3.12 pav. 2a, b) matyti, kad šioms kapsulėms buvo būdingas paviršiaus šiurkštumas, taip pat dalis granulių pasižymėjo paviršiaus susitraukimu. Manoma, kad dalelių kapsulių susitraukimu įtakos galėjo turėti džiovavimo procesas, kadangi šio proceso metu veikiant aukšta temperatūra buvo prarandama dalis drėgmės.

Iš SEM nuotraukų matyti, kad mažiausiai deformuotų mikrokapsulių gauta naudojant maltodekstrino apvaskalą (3.12 pav. 1a, b). Tyrimais įrodyta, kad maltodekstrinas purškiamojo džiovavimo metodo metu pagerina pagamintų miltelių technologines savybes [57]. Be to, 3.6.2 skyriuje pateiktuose rezultatuose būtent su šia danga gautas didžiausias antocianių įkapsuliavimo efektyvumas.

Svarbu paminėti, kad netaisyklingos formos kapsulės, įtrūkimai, įdubimai neigiamai veikia miltelių savybes bei padidinti paviršiaus plotą, tokiu būdu sumažėja kapsulių stabilumas [101].





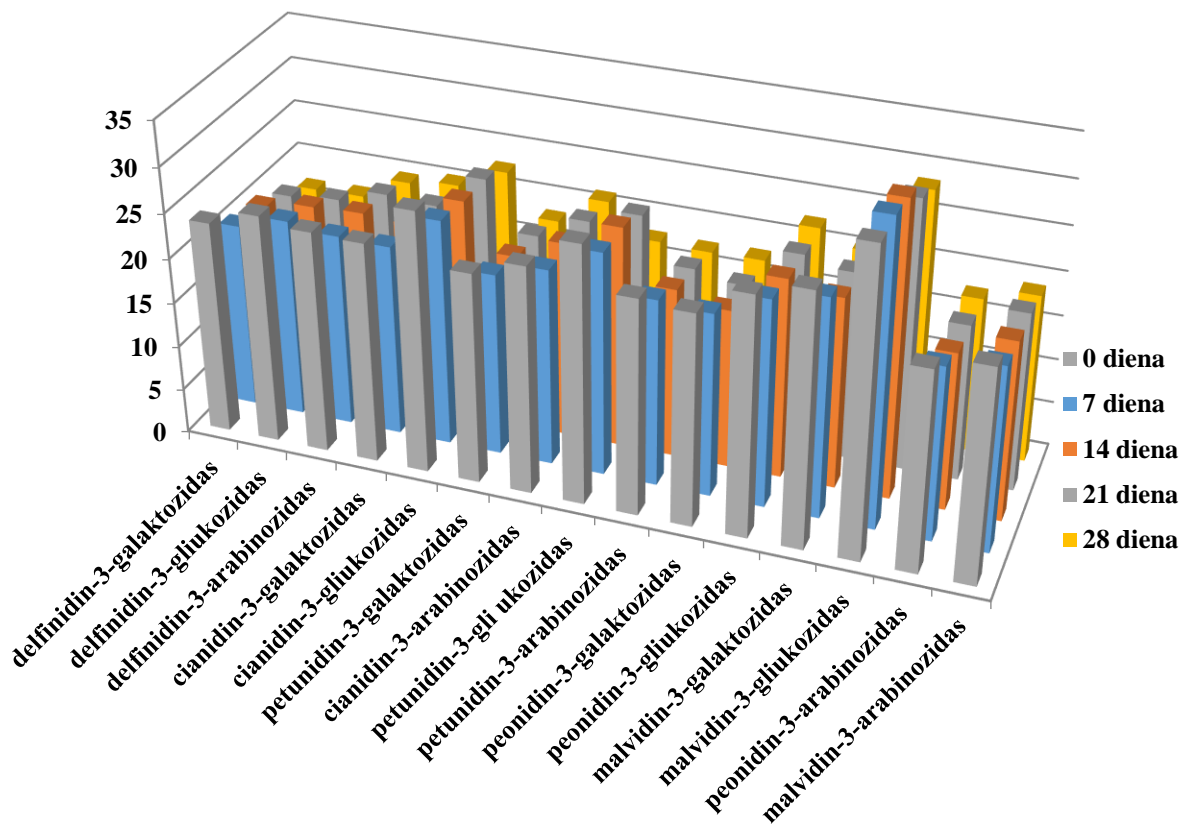


**3.12 pav.** Mikrokapsulių SEM nuotaukos, naudojant skirtingas dangas: (1) maltodekstriną, (2) modifikuotą krakmolą HI-CAP, (3) maltodekstino/išrūgų baltymų mišinį (santykiu 2:1) ir esant skirtingiems didinimams: (a) –  $\times 2500$  ir (b) -  $\times 10000$

### 3.6.3. Mikrokapsulių stabilumo tyrimas

Pieno produktų praturtinimas įvairiomis biologinę vertę turinčiomis medžiagomis yra naudingas, kadangi taip sukuriama didesnė pridėtinės vertės produktas [102]. Augalų ekstraktai yra vieni svarbiausių šaltinių galinčių padidinti gaminio funkcionalumą, nes juose gausu įvairių bioflavonoidų, saponinų, vitaminų ir mineralinių medžiagų, eterinių aliejų, chlorofilo, polisacharidų, glikozidų bei terpenų [103]. Mokslškai nustatyta, kad maisto produktai turintys savo sudėtyje augalų ekstraktų, mažina susirgimų riziką įvairiomis ligomis bei teigiamai veikia organizmo imunitetą sistemą [104].

Remiantis 3.6.2 skyriuje gautais rezultatais, didžiausias antocianinų įkapsuliuojimo efektyvumas nustatytas naudojant maltodekstriną, kaip efektyviausią įkapsuliuojimui skirtą dangą. Maltodekstrinas purškiamojo džiovinimo metodu pagerina pagamintų miltelių technologines savybes [57]. Jis yra tirpus vandenyje ir įdėjus jį į skystus maisto produktus, tokius kaip jogurtas, aktyvieji junginiai atsipalaiduoja palaipsniui ir pamažu pradeda veikti [69, 98]. Dėl šių priežasčių įkapsuliuotas ekstraktas į maltodekstrino dangą buvo pasirinktas tirti toliau, įmaišant juos jogurtą. Tyrimams naudotas ekologiškas natūralus 2,5% riebumo jogurtas be laktozės ir pridėtinio cukraus. Jogurtas pagamintas iš ekologiško pieno, ekologiškų pieno baltymų bei jogurtinių bakterijų kultūros. Eksperimento tikslas įvertinti mikrokapsulių stabilumą, taip sukuriant novatorišką didesnės biologinės vertės jogurtą su įkapsuliuotu mėlynių ekstraktu. Antocianinų kiekis vertintas, kas savaitę nustatant jų likutinę koncentraciją jogurte laikymo metu.



**3.13 pav.** Antocianinų kiekio kitimas jogurte ( $\mu\text{g}/25$  gr jogurto) laikymo metu  $4 \pm 1$  °C temperatūroje

Iš gautų rezultatų matyti, kad laikas turi įtakos antocianinų kiekiui: kuo ilgiau buvo laikomas produktas, tuo gautas santykinai mažesnis antocianinų kiekis tiriamajame produkte (3.13 pav.). Eksperimento pabaigoje, po 4 savaičių buvo aptiktas mažiausias antocianinų kiekis lyginant su eksperimento pradžioje pagamintu jogurtu. Nustatyta, kad antocianinų kiekis nuo pradinio sumaišymo 0 dieną sumažėjo 20 – 30 %. Stabiliausias antocianinas jogurte buvo malvidin-3-gliukozidas, nes šio junginio kiekis buvo didžiausias tiriant visas 4 savaites. Mažiausi kiekiai nustatyti delfinidin-3-galaktozido ir delfinidin-3-gliukozido, nuo ekperimento pradžios iki 28 dienos antocianinų kiekis sumažėjo iki 30 %.

Antocianiniai jautrūs šviesos, deguonies, temperatūros ir pH pokyčiams. Jų stabilumą gali įtakoti funkcinų grupių kiekis anglikono struktūroje. Malvidin-3-gliukozinas turi metilo grupę B žiede 3' ir 5' padėtyje, tai įtakoja didesnę jų stabilumą laikymo metu. Delfinidin-3-galaktozidas ir delfinidin-3-gliukozidas turi hidroksilo grupę B žiede 3', 4' ir 5' padėtyje ir tai nulemia mažesnę stabilumą jogurte laikymo metu.

Fredes ir kt. (2018) atliko antocianinų kiekybinį nustymą, įkapsuliuojant mėlynių sultis, gautus miltelius tolygiai įmaišant į jogurtą ir laikant 35 dienas 5°C temperatūroje [82]. Praėjus numatytam terminui, autoriai nustatė didelį antocianinų stabilumą nuo 81 iki 88 % lyginant su kontroliniu bandiniu. Kai kurie autoriai nemažai tyrinėjo ir kitų uogų įkapsuliacijos efektyvumą. Pavyzdžiui Robert ir kt.(2010) tyrė, granatų sulčių antocianinų įkapsuliacijos efektyvumą ir nustatė, kad įkapsuliuoti antocianinai, įmaišyti į jogurtą ir laikomi 2 bei 7 dienas 4 °C temperatūroje, suskilo [98]. Tam įtakos galėjo turėti jogurto pH ir skirtingų antocianinų cheminės savybės.

### 3.7. Kokybinė ekstraktų analizė (UESCh-MS) metodu

Remiantis 3.6.1 skyriuje gautais rezultatais, didžiausia antocianinų koncentracija buvo nustatyta MAC H<sub>2</sub>O/EtOH ekstrakto. Dėl šios priežasties šis ekstraktas pasirinktas ir tolimesniuose tyrimuose UESCh – MS metodu. Atlikus kokybinę ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos (UESCh – MS) analizę, ekstraktuose buvo nustatyta 40 junginių iš kurių dominuojantys: miricetino, kvercicino ir kumarino rūgšties dariniai. Gauti rezultatai patekti 6 lentelėje, o chromatograma 3.14 paveiksle.

**7 lentelė.** Cheminės sudėties rezultatai mėginių išspaudų ekstraktuose gautus UESCh – MS metodu

Nr.	Sulaikymo trukmė, min	Junginys	Molekulinė masė [M – H] <sup>-</sup>	Jono formulė (m/z)	MS <sup>2</sup> fragmentai	MS formulė (m/z)
1.	0,5	Citrinų rūgštis <sup>a</sup>	191,0203	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	111,0088	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
2.	0,7	Izocitrinų rūgštis <sup>a</sup>	191,0202	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	111,0088	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
3.	0,9	Chinino rūgštis <sup>a</sup>	191,0563	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	-	-
4.	1,0	Kvercetin-glikozidas <sup>b</sup>	463,0884	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	301,0275	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>
5.	1,1	Protokatechuinė rūgštis <sup>a</sup>	153,0197	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	-	-
6.	1,3	Chlorogeno rūgštis <sup>a</sup>	353,0878	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	-	-
7.	1,4	Nežinomas junginys	353,0407	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>9</sub>	183,0300 139,0402	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>5</sub> C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>
8.	1,5	Nežinomas junginys	509,1305	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub>	-	-
9.	1,6	Nežinomas junginys	179,0353	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	135,0454	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>
10.	1,7	Nežinomas junginys	481,0990	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>13</sub>	-	-
11.	1,7	Nežinomas junginys	329,0876	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	-	-
12.	1,8	Nežinomas junginys	451,0883	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	-	-
13.	1,9	Miricetino heksozidas <sup>b</sup>	479,0809	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>13</sub>	317,0227	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>8</sub>
14.	2,0	Nežinomas junginys	319,0457	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub>	-	-
15.	2,1	Nežinomas junginys	349,0565	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub>	165,0197	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
16.	2,2	Gentisiko rūgštis <sup>b</sup>	153,0196	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	-	-
17.	2,3	p-kumarino rūgštis <sup>a</sup>	163,0403	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	-	-
18.	2,3	Kvercetin-glikozidas <sup>c</sup>	463,0883	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	301,0272	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>
19.	2,4	Nežinomas junginys	477,0676	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>13</sub>	-	-
20.	2,4	Nežinomas junginys	535,1462	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub>	-	-
21.	2,5	Nežinomas junginys	581,1519	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub>	-	-
22.	2,5	Ferulio rūgšties heksozidas <sup>b</sup>	355,1034	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	193,0181	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>
23.	2,6	Nežinomas junginys	175,0978	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub>	-	-
24.	2,7	Nežinomas junginys	363,0717	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>9</sub>	-	-
25.	2,8	Miricetinas <sup>b</sup>	317,0301	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>8</sub>	-	-
26.	2,9	Nežinomas junginys	447,0934	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	-	-
27.	3,1	Nežinomas junginys	187,0979	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub>	125,0967	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O

6 lentelės tęsinys kitame puslapyje

6 lentelės tęsinys

28.	3,4	Nežinomas junginys	145,0872	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub>	-	-
29.	3,5	Kumaro rūšties darinys <sup>b,c</sup>	411,1661	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> O <sub>9</sub>	-	-
30.	3,6	Kumaro rūšties darinys <sup>b,c</sup>	411,1660	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> O <sub>9</sub>	163,0399	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>
31.	3,7	Nežinomas junginys	445,1141	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	-	-
32.	3,7	Kvercetas <sup>a</sup>	301,0350	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	165,98	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
33.	3,9	Nežinomas junginys	159,1033	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub>	-	-
34.	4,0	Nežinomas junginys	241,1083	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>5</sub>	-	-
35.	4,3	Nežinomas junginys	171,1030	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub>	-	-
36.	4,5	Nežinomas junginys	345,0617	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub>	-	-
37.	4,6	Nežinomas junginys	315,0509	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	165,0197	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
38.	5,0	Nežinomas junginys	157,0874	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub>	-	-
39.	5,3	Nežinomas junginys	169,0873	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub>	-	-
40.	5,4	Nežinomas junginys	329,2333	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub>	171,1038 139,1117	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O

<sup>a</sup>identifikuota naudojant standartą

<sup>b</sup>identifikuota remiantis literatūros duomenis

<sup>c</sup>identifikuotas remiantis duomenų bazėje (ChemSpider) esančiais duomenis

Junginiai buvo identifikuoti remiantis duomenų bazės ChemSpider ir literatūroje publikuotais duomenimis, lyginant su šiame darbe gautomis junginių molekulinėmis masėmis, tiksliais jų formulėmis, MS/MS fragmentais, sulaikymo laikais ir UV spektro duomenimis. Junginiai Nr. 1, 2, 3, 5, 6, 17, 32 buvo identifikuoti naudojant etaloninius standartus.

Junginys Nr. 4 ir 18 identifikuoti kaip kvercetino glikozidai. Junginio Nr. 18 molekulinis jonas [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  463,0883, kuris atitiko C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>12</sub> molekulinę formulę. MS/MS fragmentavimo metu šis junginys suteikė molekulinį fragmentą [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  301,0272 atitinkantį C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>7</sub> molekulinę formulę, būdingą kvercetinui. Skirtumai tarp fragmentų atitiko 162 amv, todėl remiantis literatūros duomenimis (Baranauskienė ir kt., 2014), ši liekana atitiko glikozido molekulinę masę [66].

Junginio Nr. 13 molekulinis jonas [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  479,0809 atitinko C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>13</sub> molekulinę formulę, o MS/MS fragmentavimo metu gautas  $m/z$  317,0227 molekulinis jonas atitiko C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>8</sub> molekulinę formulę. Remiantis literatūros duomenimis (Ancilloti, 2016) junginys Nr. 18 identifikuotas kaip miricetino heksozidas [68].

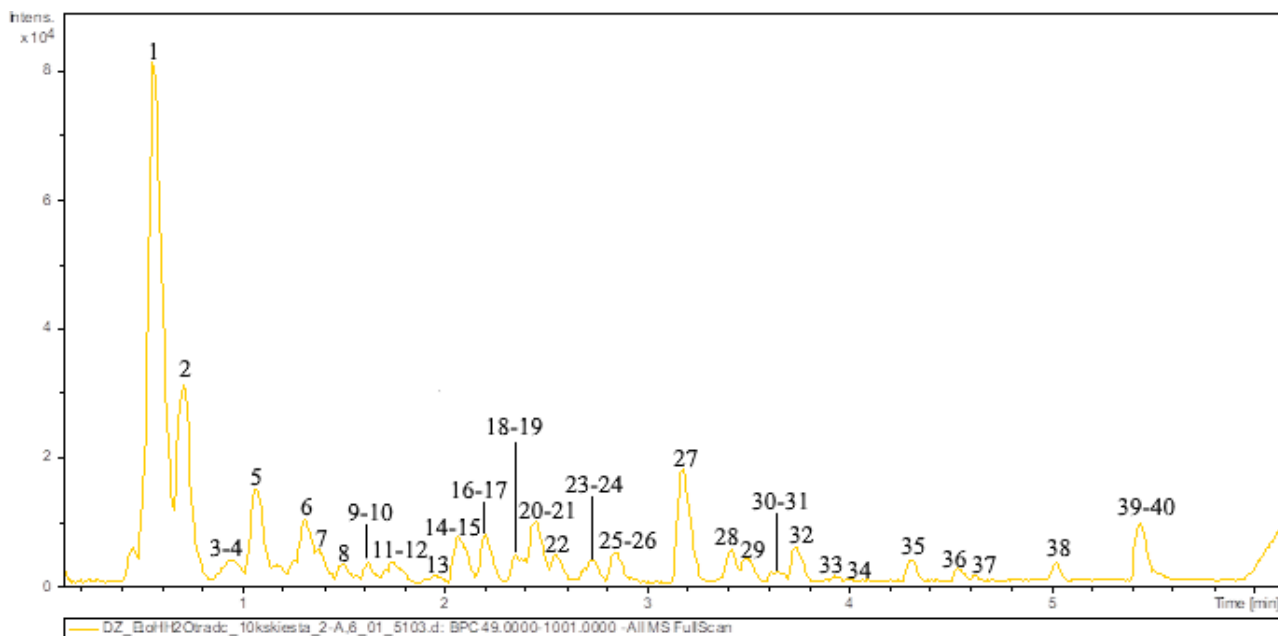
Nr. 22 junginio molekulinio jono [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  355,1034, kuris atitiko C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub> molekulinę formulę, MS/MS režimu buvo gautas  $m/z$  193,0181 fragmentas, kuris atitiko C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub> molekulinę formulę. Skirtumas tarp fragmentų buvo 162 amv ir atitiko heksozės molekulinę masę. Remiantis literatūros duomenimis (Ancilloti, 2016) šis junginys identifikuotas kaip ferulio rūgšties heksozidas [68].

Remiantis Ancilloti ir kt. (2016) publikuotais duomenimis, junginys Nr. 25 identifikuotas kaip miricetino aglikonas, o junginys Nr. 16 – gentisiko rūgštis [68]. Gautos molekulinės masės, formulės ir ChemSpider duomenų bazės duomenys atitiko šiuos junginius.

Junginiai Nr. 29 ir 30 turėjo vienodą molekulinį joną [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  411,1660, kuris atitiko molekulinę formulę C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>O<sub>9</sub>. Junginys Nr. 30 buvo identifikuotas kaip kumaro rūgšties darinys, nes MS/MS

režmu analizuojant junginį gautos molekulinis jonas  $m/z$  163,0399 atitinkantis p-kumaro rūgšties liekaną ( $C_9H_7O_3$ ). Junginys Nr. 29 gali būti izomerinė šios rūgšties forma.

Junginių Nr. 7 – 12, 14, 15, 19 – 21, 23, 24, 26 – 28, 31, 33 – 40 vienareikšmiškai identifikuoti nepavyko, nes MS/MS režimu nepavyko gauti šių junginių fragmentų, todėl tolimesniame etape jų nepavyko palyginti nei su moksliniais šaltiniais, nei su duomenų bazės duomenimis.



**3.14 pav.** Mėlynių išspaudų MAC  $H_2O/EtOH$  ekstrakto UESch – MS chromatograma

#### 4. Išvados

1. Nustatyta mėlynių išspaudų cheminė sudėtis tirtose 0,5, 1 ir 2 mm frakcijose: baltymų kiekis varijavo nuo 4,54 iki 4,74 g/100g, riebalų kiekis nuo 0,20 iki 0,23 g/100g, mineralinių medžiagų nuo 1,24 iki 1,44 g/100g ir drėgmės kiekis nuo 6,03 iki 6,26 g/100g. Galima teigti, kad išspaudų susmulkinimo laipsnis neturi didelės įtakos cheminei sudėčiai.
2. Įvertinus skirtingus ekstrakcijos būdus nustatyta, kad tirtų ekstraktų išeiga priklauso nuo mėlynių išspaudų susmulkinimo laipsnio: kuo mažesnis susmulkinimo laipsnis, tuo didesnė ekstrakcijų metu gauta išeiga. Didžiausios ekstraktų išeigos gautos naudojant pagreitintos ekstrakcijos metodą organiniais tirpikliais. Ekstrahuojant etanoliu 0,5, 1 ir 2 mm susmulkintų išspaudų išeiga atitinkamai siekė 26,82 g, 23,26 g ir 20,43 g 100 gramų sausų išspaudų. Mažiausios išeigos gautos atliekant daugiapakopę superkritinių skysčių anglies dvideginio vandeninę ekstrakciją.
3. Įvertinus ekstraktų antioksidacinį aktyvumą nustatyta, kad BFJK ekstraktuose varijavo nuo 72,97 iki 349,77 mg GRE g<sup>-1</sup> ekstrakto, ABTS<sup>•+</sup> modelinėje sistemoje nuo 148,36 iki 673,87 mg/g ekstrakto, DPPH<sup>•</sup> modelinėje nuo 48,11 iki 83,68 mg/g ekstrakto, ORAC modelinėje sistemoje 0,54 – 2,76 mmol TRE/g ekstrakto. Taip pat pastebėta, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo ekstraktai, kurie buvo pagaminti naudojant 1 ir 2 mm mėlynių išspaudų frakcijas nei 0,5 mm. Netirpių išspaudų komponentai buvo tirti taikant QUENCHER procedūrą ir nustatyta, kad po ekstrakcijų išspaudose dar lieka antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių junginių.
4. Atliekant kokybinę ekstraktų analizę, mėlynių išspaudose rasta 40 junginių, iš kurių identifikuota 15 junginių, tai daugiausia kvercetino ir miricetino dariniai. Nustatyta RR sudėtis mėlynių išspaudų ekstraktuose. Analizės metu buvo nustatyta 6 riebalų rūgštys. Daugiausiai sudėtyje randama linolo (36,07 %) ir  $\alpha$  – linoleno (31,83) rūgštys. Taip pat oleino (22,46 %), palmitino (6,12 %), stearino (1,26 %) ir arachino (0,29 %) rūgščių. Mėlynių išspaudų ekstraktuose nustatyti 12 triacilglicerolių: LnLnLn, LLnLn, LLLn, PLnLn, PLLn, LLL, PLLn, OLL, PLL, OLO, POO ir OOO. Įvertinus kiekybiškai antocianinus, nustatyta 15 antocianinų, kurių bendras kiekis ekstraktuose varijavo nuo 55,42 iki 440,42 mg/100 g išspaudų priklausomai nuo ekstrakto. Didžiausi antocianinų kiekiai rasti MAC H<sub>2</sub>O/EtOH ir ekstraktoje nuo grynų išspaudų. Taip pat pastebėta, kad dominuojantys antocianinai mėlynių išspaudų ekstraktuose yra gliukozidai: delfinidin-3-gliukozidas, cianidin-3-gliukozidas, maldvidin-3-gliukozidas ir petunidin-gliukozidas.
5. Atlikus antocianinų įkapsuliavimą, nustatyta, kad didžiausias įkapsuliavimo efektyvumas buvo gautas naudojant maltodekstriną (81,96 %), o mažiausias modifikuotą krakmolą HI-CAP (73,01 %). Nustatyta, kad laikymo metu į jogurtą įmaišius įkapsuliuotus miltelius, antocianinų kiekis sumažėja. Per 4 savaites bendras antocianinų kiekis sumažėjo 20 – 30 %.
6. Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad mėlynių išspaudos yra puikus bioaktyvių junginių šaltinis, kurį toliau galima panaudoti maisto praturtinant kitus maisto produktus, taip sukuriant vertingus funkcionaliuosius maisto produktus, pasižyminčius teigiamomis sveikatą gerinančiomis savybėmis.

## 5. Literatūros sąrašas

1. Stewart, D., McDougall, G.J., Sungurtas, J., Verrall, S., Graham, J., Martinussen, I. Metabolomic approach to identifying bioactive compounds in berries: Advances toward fruit nutritional enhancement. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007, p. 645 – 651.
2. Struck, S., Plaza, M., Turner, C., Rohm, H. Berry pomace – a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *International Journal of Food Science and Technology*, 2016, p. 1305 – 1318.
3. Rohm, H., Brennan, C., Turner, C. et al. Adding value to fruit processing waste: Innovative ways to incorporate fibers from berry pomace in baked and extruded cereal-based foods—A SUSFOOD project. *Foods*, 2015, p. 690 – 697.
4. Mazzoni, L., Perez-Lopez, P., Giampieri, F. et al. The genetic aspects of berries: from field to health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, p. 365 – 371.
5. Lee, J., Wrolstad, R.E. Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from Blueberry Processing Waste. *Food Chemistry and Toxicology*, 2006, p. 1–10.
6. Monograph. *Vaccinium myrtillus* (Bilberry). *Alternative Medicine Review*, 2001, p. 500 – 504.
7. Blumenthal, M., Goldberg, A., Brinckmann, J., Herbal Medicine. Expanded Commission E Monographs. 2000, p. 16 – 19.
8. Cruz, S. American Herbal Pharmacopoeia. Bilberry fruit. 2001. p. 1 – 23.
9. Plants For A Future [žiūrėta 2019 kovo 18 d.]. Prieiga per internetą: <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Vaccinium+myrtillus>.
10. Može, Š., Polak, T., Gašperlin, L., Koron, D., Vanzo, A., Ulrih, N.P., Abram, V. Phenolics in Slovenian Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2011, p. 6998 – 7004.
11. Ancillotti, C., Ciofi, L., Rossini, D., Chiuminatto, U., Stahl-Zeng, J., Orlandini, S., Furlanetto, S., Bubba, M.D. Liquid chromatographic/electrospray ionization quadrupole/time of flight tandem mass spectrometric study of polyphenolic composition of different *Vaccinium* berry species and their comparative evaluation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, p. 1347 – 1368.
12. Terry L.A. Health-promoting properties of fruits and vegetables. 2011, p. 51 – 74.
13. Balasundram N., K. Sundram, S. Samman. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 2006, p. 191 – 203.
14. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 1995, p. 25 – 30.
15. Giovanelli, G., Buratti, S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chem.*, 2009, p. 903 – 908.
16. Cheynier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Clinic Nutrition*, 2005, p. 223 – 229.
17. Flavonoid ring structure and numbering. [žiūrėta 2019 balandžio 28 d.]. Prieiga per internetą: [https://www.researchgate.net/figure/Flavonoid-ring-structure-and-numbering\\_fig1\\_256541111](https://www.researchgate.net/figure/Flavonoid-ring-structure-and-numbering_fig1_256541111).
18. Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, p. 3273–3279.

19. Szajdek, A., Borowska, E.J. Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2008, p.147 – 153.
20. Jensen, H. D., Krogfelt, K. A., Cornett, C., Hansen, S. H., Christensen, S. B. Hydrophilic Carboxylic Acids and Iridoid Glycosides in the Juice of American and European Cranberries (*Vaccinium macrocarpon* and *V. oxycoccos*), Lingonberries (*V. vitis-idaea*), and Blueberries (*V. Myrtillus*). *J. Agric. Food Chem.* 2002, p. 6871 – 6874.
21. Viljakainen, S., Vistiand, A., Laakso, A. Concentrations of Organic Acids and Soluble Sugars in Juices from Nordic Berries. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science*, 2002, p. 101 – 109.
22. Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E. M. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytoterapy. *Elsevier Science Ltd*, 2004, p. 217 – 218.
23. Bere, E. Wild berries: a good source of omega-3. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2006, p. 1 – 3.
24. Ghosh, D., Konishi, T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: Role in diabetes and eye function. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 2007, p. 200 – 208.
25. Pascual-Teresa S. D., Moreno D. A., García-Viguera C. Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. *Molecular Sciences*, 2010, p. 1679 – 1703.
26. Heinonen, M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2007, p. 684 – 691.
27. Benvenuti, S., Brighenti, V., Federica, P. High-performance liquid chromatography for the analytical characterization of anthocyanins in *Vaccinium myrtillus* L. (bilberry) fruit and food products. *Anal Bioanal Chem.*, 2018, p. 3559 – 3571.
28. Prior, R. L., Lazarus, S. A., Cao, G., Muccitelli, H., Hammerstone, J. F. Identification of Procyanidins and Anthocyanins in Blueberries and Cranberries (*Vaccinium Spp.*) Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, p. 1270 – 1276.
29. Ichianagi T. et al. Structural dependence of HPLC separation pattern of anthocyanins from Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2004, p. 628 – 630.
30. Adams L. S., Seeram N. P., Hardy M. L., Carpenter C., Heber D. Analysis of the Interactions of Botanical Extract Combinations Against the Viability of Prostate Cancer Cell Lines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2006, p. 117 – 124.
31. Calixto J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2000, p. 179 – 189.
32. Dreiseitel A, Schreier P, Oehme A, Locher S, Rogler G, Piberger H, Hajak G, et al. Inhibition of proteasome activity by anthocyanins and anthocyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, p. 57 – 61.
33. Akhlaghi M, Bandy B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia–reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2009, p. 309 – 317.
34. Wang H, Cao G, Prior R. L. The oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, p. 304 – 309.
35. Dionex, Part of Thermo Fisher Scientific. Rapid and Sensitive Determination of Anthocyanins in Bilberries Using UHPLC. p. 1 – 10.
36. Rio, D. D., Borges, G., Crozier, A. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*, 2010, p. 67 – 90.
37. Ziberna L., Lunder M., Moze S., Vanzo A., Tramer F., Passamonti S., Drevensek G. Acute cardioprotective and cardiotoxic effects of bilberry anthocyanins in ischemia-reperfusion



- injury: beyond concentration-dependent antioxidant activity. *Cardiovasc. Toxicol.*, 2010, p. 283 – 294.
38. Chatterjee, A., Yasmin, T., Bagchi D., Stohs, S. J. Inhibition of *Helicobacter pylori* *in vitro* by various berry extracts, with enhanced susceptibility to clarithromycin. *Mol. Cell. Biochem.*, 2004, p. 19 – 26.
  39. Zheng W., Wang S. Y. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, p. 502 – 509.
  40. Cooke D., Schwarz M., Boocock D., Winterhalter P., Steward W. P., Gescher A. J., Marczylo T. H. Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis–Relationship with tissue anthocyanin levels. *Int. J. Cancer*, 2006, p. 2213 – 2220.
  41. Hou D. X., Kai K., Li J.-J., Lin S., Terahara N., Wakamatsu M., Fujii M. et al. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis*, 2004, p. 29 – 36.
  42. Bell D. R., Gochenaur K. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *J. Appl. Physiol.*, 2006, p. 1164 – 1170.
  43. Mattila, P., Hellstrom, J., Torronen, R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, p. 7193 – 7199.
  44. Amella M., Bronner C., Briancon F. Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and bioflavonoids. *Planta Medica*, 1985, p. 16 – 20.
  45. Dreiseitel A., Schreier P., Oehme A., Locher S., Rogler G., Piberger H., Hajak G. et al. Inhibition of proteasome activity by anthocyanins and anthocyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, p. 57–61.
  46. Balasundram N., Sundram K., Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, 2006, p. 191 – 203.
  47. Pimiä R. P., Nohynek L., Alakomi H. L., Oksman-Caldentey K. M. The action of berry phenolics against human intestinal pathogens. *BioFactors*, 2005, p. 243 – 251.
  48. Matsumoto A., Nakamura Y., Hirayama M., Yoshiki Y., Okubo K. Antioxidant activity of black currant anthocyanin aglycons and their glycosides measured by chemiluminescence in a neutral pH region and in human plasma. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, p. 5034 – 5037.
  49. Murray, M.T., Bilberry (*Vaccinium myrtillus*). *American Journal of Natural Medicine*, 1997.
  50. Kang, T. H., Hur, J. Y., Kim, H. B., Ryu, J. H., Kim, S. Y., Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O-beta-D-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.*, 2006, p. 122 – 126.
  51. Paulo F., Santos L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering*, 2017, p. 1327 – 1340.
  52. N. V. N. Jyothi, 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, p. 187 – 197.
  53. S.Y. Cheng, C. W. M. Yuen, C. W. Kan, K. K. L. Cheuk. Development of Cosmetic Textiles Using Microencapsulation Technology. 2008, p. 41 – 51.
  54. Ahmed M., Akter M., Lee J. C., Eun J. B. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, p. 1307 – 1312.

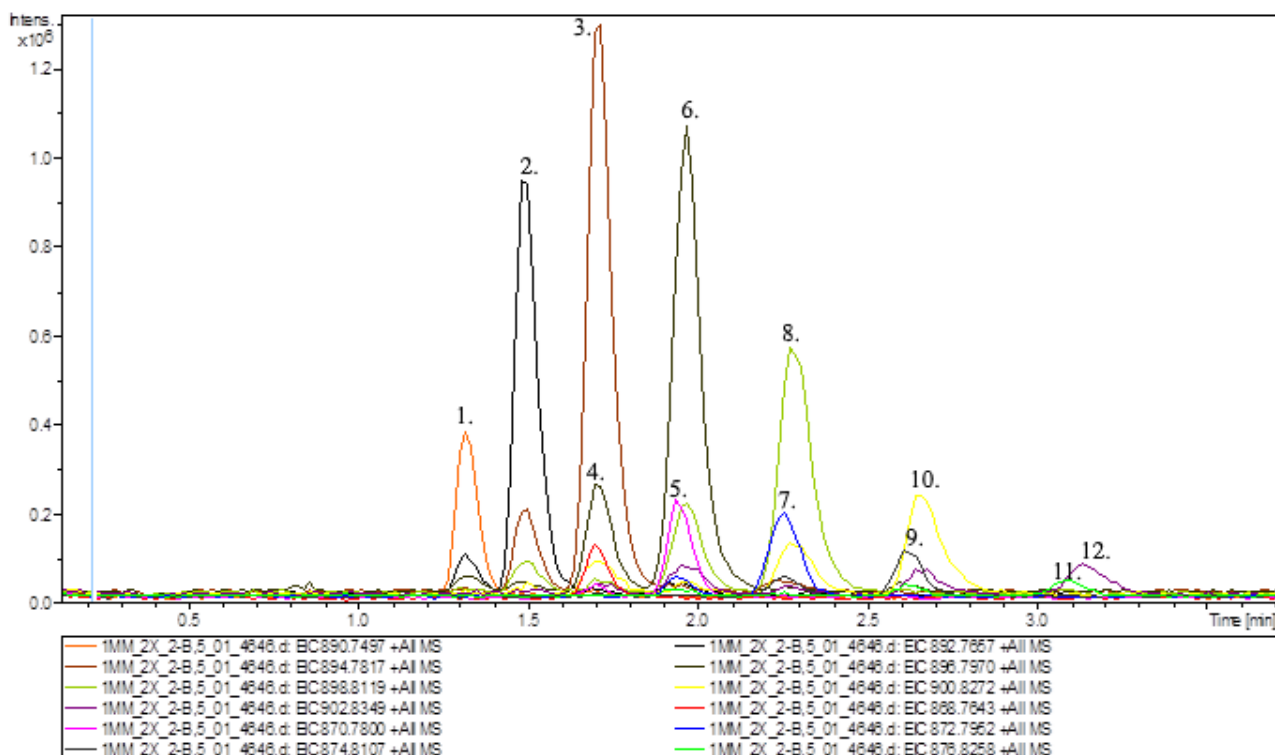
55. Mahdavi S. A., Jafari S. M., Assadpoor E., Dehnad D. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International journal of biological macromolecules*, 2016, p. 379 – 385.
56. Almeida A.P., Rodríguez-Rojo S., Serra A.T., Vila-Real H., Simplicio A.L., Delgadillo I., et al. Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2013, p. 140 – 145.
57. Silva P.I., Stringheta P.C., Teófilo R.F., Oliveira I. R. N. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 2013, p. 538 – 544.
58. Anaya-Castro M. A., Ayala-Zavala J. F., Muñoz-Castellanos L., Hernández-Ochoa L., Peydecastaing J., Durrieu V.  $\beta$ -Cyclodextrin inclusion complexes containing clove (*Eugenia caryophyllata*) and Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils: preparation, physicochemical and antimicrobial characterization. *Food Packaging and Shelf Life*, 2017, p. 96 – 101.
59. Baranauskaitė J., Jakštas V., Ivanauskas L., Kopustinskienė D.M., Drakšienė G., Masteikova R., et al. Optimization of carvacrol, rosmarinic, oleanolic and ursolic acid extraction from oregano herbs (*Origanum onites* L., *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* and *Origanum vulgare* L.). *Natural product research*, 2016, p. 672 – 674.
60. Kalušević A, Lević S, Čalija B, Pantić M, Belović M, Pavlović V, et al. Microencapsulation of anthocyanin-rich black soybean coat extract by spray drying using maltodextrin, gum Arabic and skimmed milk powder. *Journal of microencapsulation*. 2017;34(5):475-87.
61. Nguyen DQ, Mounir S, Allaf K. Optimization of the Spray Drying Operating Conditions for Producing the Powder Mixture of Gum Arabic and Maltodextrin. *International Journal of Food Engineering*. 2017;13(8).
62. Gonçalves ND, Grosso CR, Rabelo RS, Hubinger MD, Prata AS. Comparison of microparticles produced with combinations of gelatin, chitosan and gum Arabic. *Carbohydrate polymers*. 2018.
63. Asensio C. M., Paredes A. J., Martín M. P., Allemandi D. A., Nepote V., Grosso N. R. Antioxidant Stability Study of Oregano Essential Oil Microcapsules Prepared by Spray Drying. *Journal of Food Science*, 2017, p. 2864 – 2872.
64. Ferreira S., Malacrida C. R., Telis V. Influence of emulsification methods and use of colloidal silicon dioxide on the microencapsulation by spray drying of turmeric oleoresin in gelatin-starch matrices. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 2016, p. 2210 – 2218.
65. Liu L., Zhao Q., Liu T., Kong J., Long Z., Zhao M. Sodium caseinate/carboxymethylcellulose interactions at oil–water interface: Relationship to emulsion stability. *Food chemistry*, 2012, p. 1822 – 1829.
66. Baranauskienė, R., Kazernavičiūtė, R., Pukalskienė, M., Maždzierienė, R., Venskutonis, P.R. Agrorefinery of *Tanacetum vulgare* L. into valuable products and evaluation of their antioxidant properties and phytochemical composition. *Industrial Crops and Products*, 2014, p.113 – 122.
67. Vehring R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharmaceutical research*. 2008, p. 999 – 1022.
68. Ancillotti, C. ,Bubba, M., Chiuminatto, U., Stahl-Zeng, J. Identification of Polyphenolic Compounds in Berries from Different *Vaccinium* Species using Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry (LC-HR-MS). *Food and Environmental*, 2016, p. 1 – 9.

69. Desai, K., Park, H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technol.*, 2005, p. 1361–1394.
70. Jyoth, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., Srawan, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 2010, p. 187 – 197.
71. Munin A., Edwards-Lévy F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 2011, p. 793 – 829.
72. Chinta S. K., P. P. Wane. Use of microencapsulation in textile. *Indian Journal of Engineering*, 2013, p. 37 – 40.
73. Fernandes R. V., Borges S. V., Botrel D. A., Silva E. K., Costa J. M., Queiroz F. Microencapsulation of rosemary essential oil: characterization of particles. *Drying technology*, 2013, p. 1245 – 1254.
74. Ray S, Raychaudhuri U, Chakraborty R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 2016, p . 76 – 83.
75. Microsphere & microcapsules. 2016 [žiūrėta 2019-05-01]. Prieiga per internetą: <https://www.slideshare.net/pravinchinchole/microsphere-amp-microcapsules>.
76. Schematic diagram of supercritical fluid extraction apparatus. 2017 [žiūrėta 2019-05-03]. Prieiga per internetą: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SFESchematic.jpg>.
77. Dorich B., Francis E., Murphy B., Richter B., Henderson S. Accelerated Solvent Extraction With Acid Pretreatment for Improved Laboratory Productivity. *American Laboratory*, 2008.
78. Association of Official Analytical Chemists International - AOAC. (2005). Official methods of analysis (18th ed.). Gaithersburg. Official Method 2005.
79. Re, R., et al.,. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, p.1231 – 1237.
80. Garcia-Lomillo, J., Luisa Gonzalez-Sanjose, M. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Wine Byproducts and Their Potential Uses in the Food Industry. *J. Agric. Food Chem.*, 2014, p. 12595 – 12602.
81. LST EN ISO 12966-1:2015. Gyvūniniai ir augaliniai riebalai ir aliejus. Riebalų rūgščių metilesterių nustatymas. 4 dalis. Nustatymas naudojant kapiliarinę dujų chromatografiją (ISO 6612966-4:2015). Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters - Part 4: Determination by capillary gas chromatography (ISO 12966-4:2015). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2015 m.
82. Fredes C., Becerra C., Parada J., Robert P. The Microencapsulation of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) Juice by Spray-Drying and Freeze-Drying Produces Powders with Similar Anthocyanin Stability and Bioaccessibility. *Molecules*, 2018, p. 1 – 15.
83. V. K. Yemmireddy, M. S. Chinnan, W. L. Kerr, Y. ConHung. Effect of drying method on drying time and physico-chemical properties of dried rabbiteye blueberries. *LWT - Food Science and Technology*, 2013, p. 739 – 745
84. Reque, P.M., Steffens, R.S., Martins Da Silva, A., Jablonski, A., Flores, S.H., Rios, A.O., Vogt De Jong, E. Characterization of blueberry fruits (*Vaccinium* spp.) and derived products. *Food Science and Technology*, 2014, p.773 – 779.
85. Bunea. A., Rugină. D.O , Pinte. A.M, Sconța, Z., Bunea, C.I, Socaciu, C. Comparative Polyphenolic Content and Antioxidant Activities of Some Wild and Cultivated Blueberries from Romania. *Not Bot Horti Agrobi*, 2011, p. 70 – 76.
86. López-Padilla, A., Ruiz-Rodriguez, A., Flórez, C. E. R., Barrios, D. M. R., Reglero, G., Fornari, T. *Vaccinium meridionale* Swartz Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction: Effect of Process Conditions and Scaling Up. *Materials*, 2016, 9(7), p. 519.

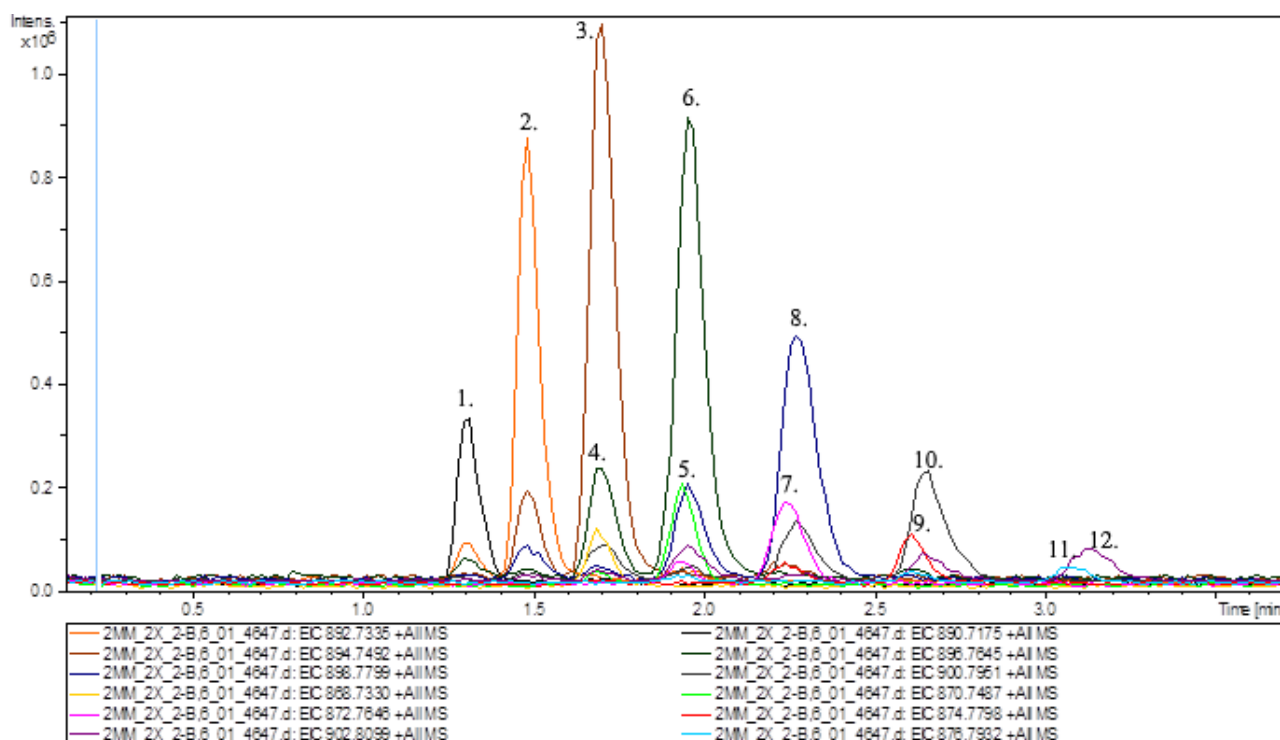
87. Fornari, T., Ruiz-Rodriguez, A., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R., Reglero, M. Kinetic study of the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of different plants from *Lamiaceae* family. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2012, p. 1 – 8.
88. Rajha H. N., Darra N. El., Hobaika Z., Boussetta N., Vorobiev E., Maroun R. G., et al. Extraction of Total Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins and Tannins from Grape Byproducts by Response Surface Methodology . Influence of Solid-Liquid Ratio, Particle Size, Time, Temperature and Solvent Mixtures on the Optimization Process. *Food Nutr. Sci.*, 2014, p. 397 – 409.
89. Laroze, L.I., Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Zúñiga, M.E., Domínguez, H. Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. *European Food Research and Technology*, 2010, p. 669 – 677.
90. F. Gaspar. J. Agricultural and Food Chemistry. 2003, p. 6604.
91. Min-Sheng Su, Juan L. Silva. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) by-products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, 2006, p. 447 – 451.
92. Gustinelli, G., Eliasson, L., Svelander, C., Alminger, M., Ahrne, L. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) seed oil: Fatty acid composition and antioxidant activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2018, p. 91 – 97.
93. Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M. P., Whittaker, P., and Yu, L. Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, p. 566 – 573.
94. B.R. Yang, M. Ahotupa, P. Maatta, H. Kallio Composition and antioxidative activities of supercritical CO<sub>2</sub>-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Res. Int.*, 2011, p. 2009 – 2017.
95. Bunea, A., Rugina, D., Pinteá, A., Andrei, S., Bunea, C., Pop, R., Bele, C. Carotenoid and fatty acid profiles of blueberries and cultivated blueberries from Romania. *Chemical Papers*, 2012, p. 935 – 939.
96. Zeb, A., Murkovic, M. Analysis of triacylglycerols in refined edible oils by isocratic HPLC-ESI-MS. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2010, p. 844 – 851.
97. Lee J., Rennaker C., Wrolstad R. E. Correlation of Two Anthocyanin Quantification Methods: HPLC and Spectrophotometric Methods. *Food Chemistry*, 2008, p. 782 – 786.
98. Robert, P.; Gorena, T.; Romero, N.; Sepulveda, E.; Chavez, J.; Saenz, C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2010, p. 1386 – 1394.
99. D. Burdulis, L. Ivanauskas, V. Diršė, S. Kazlauskas, A. Ražukas. Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. *M medicina*, 2007, p. 971 – 977.
100. White, B. L., Howard, L. R., Prior, R. L. Proximate and polyphenolic characterization of cranberry pomace. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, p. 4030 – 4036.
101. Li, Y., Tang, B., Chen, J., & Lai, P. Microencapsulation of plum (*Prunus salicina* Lindl.) phenolics by spray drying technology and storage stability. *Food Science and Technology*, 2017, p. 530 – 536.
102. Sekmokiėnė D., Špakauskienė J., Pauliukas K., Malakauskas M. Tradicinės ir naujos daugiafaktorinėse sąlygose pagaminto pieno perdirbimo technologijos. 2004. p. 47 – 56.
103. Sekmokiėnė D., Liutkevičius A. Funkcionalusis maistas – ateities produktas. *KTU Maisto institutas*, 2007, p. 32 – 33.
104. Peter K. V. Handbook of herbs and spices. 2004, p. 3 – 15.

## 6. Priedai

### 1 priedas.



6.1 pav. Triacilglicerolių smailės chromatogramoje, analizei naudojatn 1 mm SK-CO<sub>2</sub> ekstraktą



6.2 pav. Triacilglicerolių smailės chromatogramoje, analizei naudojatn 2 mm SK-CO<sub>2</sub> ekstraktą

## **2 priedas.**

Mokslinēs konferencijas:

- D. Godoladze, M. Pukalskienė, A. Pukalskas, R. Maždžierienė, P. R. Venskutonis. Fractionation of Bilberry Pomace with Supercritical Carbon Dioxide, Ethanol and Water. Foodbalt 2019 13th Baltic conference on food science and technology “Food. Nutrition. Well-being” and NEEFOOD 2019 5th North and East European congress on food: Jelgava May 2-3, 2019: abstract book p. 59.

## **Padėka**

Dėkoju baigiamojo darbo vadovei lekt. dr. Mildai Pukalskienei už darbo temos idėją, konsultacijas, pastabas ir supratingumą. Už bendradarbiavimą ir pagalbą atliekant antocianinų įkapsuliavimą dėkoju jaunesn. mokslo darbuotojai Renatai Baranauskienei. Dėkoju Maisto produktų katedros darbuotojams už gerą atmosferą darbo metu. Nuoširdžiai dėkoju šeimai ir draugams už palaikymą, kantrybę ir supratingumą.