



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Antimikrobinių komponentų parinkimas ir technologinis jų  
funkcionalizavimas nutraceutikų vystymui**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Jurga Andrėja Kazlauskaitė**

Projekto autorė

**Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2020**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Antimikrobinių komponentų parinkimas ir technologinis jų funkcionalizavimas nutraceutikų vystymui**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Jurga Andrėja Kazlauskaitė**

Projekto autorė

**Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė**

Vadovė

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2020**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Jurga Andrėja Kazlauskaitė

## **Antimikrobinių komponentų parinkimas ir technologinis jų funkcionalizavimas nutraceutikų vystymui**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Jurgos Andrėjos Kazlauskaitės, baigiamasis projektas tema „Antimikrobinių komponentų parinkimas ir technologinis jų funkcionalizavimas nutraceutikų vystymui“ 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.

Jurga Andrėja Kazlauskaitė

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

## Turinys

<b>Santrauka .....</b>	<b>7</b>
<b>Summary .....</b>	<b>8</b>
<b>Santrumpų ir terminų sąrašas.....</b>	<b>9</b>
<b>Įvadas.....</b>	<b>10</b>
<b>1. Literatūros apžvalga.....</b>	<b>12</b>
1.1. Antrinių produktų funkcionalizavimas pridėtinės vertės didinimui .....	12
1.1.1. Sausojo separavimo taikymas produktų pridėtinės vertės didinimui .....	12
1.1.2. Ultragarso taikymas augalinės žaliavos apdorojimui .....	12
1.1.3. Kietafazė augalinės žaliavos fermentacija.....	14
1.2. Antrinių augalinių produktų panaudojimas antimikrobinių nutraceutikų vystymui .....	15
1.2.1. Bakterijų atsparumas antibiotikams.....	15
1.2.2. Nauji veikliųjų medžiagų preparatai.....	15
1.3. Antimikrobinės augalinės ir mikrobinės kilmės medžiagos nutraceutikų gamyboje .....	17
1.3.1. Eteriniai aliejai ir jų antimikrobinės savybės .....	17
1.3.2. Probiotinės pieno rūgšties bakterijos ir jų biologinis aktyvumas .....	17
1.3.3. Nutraceutikų biologinio aktyvumo didinimas augalinėmis išspaudomis .....	20
1.4. Biologiškai aktyvių medžiagų imobilizavimas į hidratuotus gelius .....	21
1.4.1. Nutraceutikų gamyboje naudojami geliacijos agentai ir baltyminės medžiagos.....	21
1.4.2. Biologiškai aktyvių medžiagų imobilizavimo metodai jų funkcionalumo didinimui .....	22
1.5. Aktyviųjų medžiagų atsipalaidavimo mechanizmas veikliųjų medžiagų pernašos sistemose ...	23
1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas .....	24
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....</b>	<b>26</b>
2.1. Tiriamieji objektai .....	26
2.2. Reagentai .....	29
2.3. Aparatūra .....	29
2.4. Tyrimo metodai .....	30
2.4.1. Baltymų tyrimai.....	30

2.4.2. Antimikrobinių savybių tyrimai .....	33
2.4.3. Fenolinių junginių tyrimai .....	34
2.4.4. Antioksidacinio aktyvumo tyrimai .....	35
2.4.5. Fermentacijos proceso vertinimas .....	37
2.4.6. Funkcinių savybių tyrimai .....	38
2.4.7. Hidratuotų gelių tekstūros, struktūros ir stabilumo analizė .....	39
2.4.8. Biologiškai aktyvių medžiagų <i>in vitro</i> atsipalaidavimo testas .....	39
2.5. Matematinė statistinė duomenų analizė.....	39
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas .....</b>	<b>40</b>
3.1. Technologinis augalinės žaliavos funkcionalizavimas biologiškai aktyvių medžiagų imobilizavimui.....	40
3.1.1. Sausojo separavimo taikymas aviečių antrinių perdirbimo produktų pridėtinės vertės didinimui.....	40
3.1.1.1. Fenolinių junginių aviečių išspaudų frakcijose kokybinė ir kiekybinė sudėtis .....	40
3.1.1.2. Biologinis aviečių išspaudų aktyvumas ir jam įtakos turintys veiksniai .....	41
3.1.1.3. Aviečių išspaudų frakcijų baltyminės medžiagos ir technologinės savybės .....	42
3.1.2. Sonifikacijos įtaka kokosų išspaudų baltyminių medžiagų pokyčiams.....	44
3.1.2.1. Kokosų išspaudų sudėties ir savybių charakteristika .....	44
3.1.2.2. Ultragarsinio apdorojimo įtaka kokosų baltyminių medžiagų pokyčiams .....	45
3.1.2.3. Kokosų išspaudų ultragarsinio apdorojimo įtaka PRB fermentacijai.....	46
3.1.3. Sonifikacijos įtaka krakmolo funkcinėms savybėms.....	48
3.1.3.1. Krakmolo suspensijų tekstūros pokyčiai .....	48
3.1.3.2. Krakmolo gelių stabilumo pokyčiai laikymo metu .....	48
3.2. Eterinių aliejų biologinis aktyvumas ir jam įtakos turintys veiksniai .....	49
3.2.1. Skirtingos kilmės eterinių aliejų antimikrobino aktyvumo ir sudėties savitumai .....	49
3.2.2. Antioksidacinis eterinių aliejų aktyvumas ir jo ryšys su cheminės sudėties komponentais....	53
3.3. Hidratuotų gelių su funkcionalizuotų komponentų priedais struktūrizavimas, antimikrobinių komponentų imobilizavimo efektyvumo didinimui .....	55
3.3.1. Gelių sudėties optimizavimas parenkant stabilizatorių .....	55

3.3.2. Funkcionalizuotų kokosų baltyminių medžiagų įtaka gelių tekstūrai ir struktūrai .....	59
3.3.3. Funkcionalizuoto krakmolo panaudojimo galimybės gelių struktūrizavimui .....	60
3.4. Gelių su imobilizuotais funkcionalizuotais komponentais antibakterinis aktyvumas .....	62
3.4.1. Antimikrobinės funkcionalizuotų gelių savybės .....	62
3.4.2. PRB aktyvumas hidratuotose geliuose .....	64
3.5. Biologiškai aktyvių komponentų struktūrizuotuose geliuose atsipalaidavimo <i>in vitro</i> savitumai .....	65
3.5.1. Fenolinių junginių atsipalaidavimo <i>in vitro</i> iš skirtingos struktūros agaro gelių vertinimas ..	65
3.5.2. Fenolinių junginių atsipalaidavimo <i>in vitro</i> iš krakmolo gelių vertinimas.....	67
<b>4. Rekomendacijų dalis .....</b>	<b>69</b>
<b>Išvados .....</b>	<b>71</b>
<b>Literatūros sąrašas .....</b>	<b>72</b>

Kazlauskaitė, Jurga Andrėja. Antimikrobinių komponentų parinkimas ir technologinis jų funkcionalizavimas nutraceutikų vystymui. Magistro baigiamasis projektas / vadovė prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: funkcionalizavimas, fermentacija, sausasis separavimas, ultragarsinis apdorojimas, aviečių išspaudos, kokosų išspaudos, krakmolo modifikavimas, eteriniai aliejai, hidratuoti geliai, antimikrobiniai nutraceutikai.

Kaunas, 2020. 79 p.

## Santrauka

Antriniai augaliniai produktai turi biologiškai aktyvių junginių, skaidulų, baltymų, kurie pasižymi naudingomis savybėmis, tačiau dažniausiai yra panaudojami neefektyviai. Siekiant padidinti tokių biomasių pridėtinę vertę, jas būtų tikslinga funkcionalizuoti, naudojant inovatyvius technologinius sprendimus, įskaitant ir mikrobinę fermentaciją. Funkcionalizavimui gali būti taikomas augalinės kilmės baltyminių medžiagų apdorojimas aukšto dažnio (850 kHz) ultragarsu žemose temperatūrose (<50 °C), taip pat sausasis separavimas bei kietafazė fermentacija.

Šio darbo tikslas buvo ištirti augalinių išspaudų (aviečių ir kokosų) savybes, pritaikyti inovatyvius sprendimus jų funkcionalizavimui į pridėtinės vertės produktus ir juos panaudoti antimikrobinių hidratuotų gelių (nutraceutikų) gamybai.

Šiame darbe nustatyta, kad aviečių išspaudoms pritaikius sausąjį separavimą, galima išgauti frakcijas (<0,315 mm ir 0,5–1 mm), pasižyminčias didesniu elago rūgšties kiekiu ir antioksidaciniu aktyvumu nei pradinė žaliava (be frakcionavimo). Be to, aviečių išspaudos pasižymėjo antimikrobiniu aktyvumu prieš atsparius antibiotikams patogenus: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ir *Pseudomonas aeruginosa*. Sonifikuojant kokosų išspaudas aukšto dažnio ultragarsu (850 kHz), aptikta, kad didžiausias tirpių baltymų kiekis ir koncentracijos jose atsipalaiduoja, veikiant aukšto dažnio ultragarsu (850 kHz, intensyvumas 2 W/cm<sup>2</sup>), 10 min., esant pH 9. Sonifikuotos kokosų išspaudos buvo išbandytos PRB fermentacijai ir įrodytas jos, kaip mitybinės terpės, tinkamumas antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčios *L. paracasei* dauginimuisi. Nustatytas bakterijų skaičius po fermentacijos buvo 9,097 log KSV/ml. Papildomai išbandyta sonifikacija natyvinio krakmolo modifikavimui, siekiant suteikti jam naujas funkcines savybes. Įrodyta, kad suspensijų apdorojimas aukšto dažnio ultragarsu, reikšmingai mažino suspensijų klampą ir turėjo teigiamą poveikį jų tekstūrai. Atlikus eterinių aliejų antibakterinio aktyvumo tyrimus, nustatyta, kad didžiausiu poveikiu pasižymėjo arbatmedžių eterinis aliejus. Arbatmedžių ir pipirmėčių eteriniai aliejai imobilizuoti į OSA-krakmolą buvo tinkamiausi nutraceutikų gamybai. Hidrogelių (vienasluoksnių ir trisluoksnių) struktūrizavimui parinktas agaras ir aviečių išspaudų priedas (20 %) kombinacijoje su sorbitoliu ir maltitoliu. Vertinant agaro gelių su imobilizuotais eteriniais aliejais virškinamumą *in vitro*, buvo stebima, kad daugiausia fenolinių junginių atsipalaiduoja *in vitro* skrandžio terpėje (pH 2) iš agaro gelių su arbatmedžių eteriniu aliejumi, o žarnyno terpėje (pH 7,5) iš gelių su pipirmėčių eteriniu aliejumi (vienasluoksniai agaro geliai). Funkcionalizuotas krakmolas panaudotas kaip alternatyva agaro gelių ruošimui. Tiriant hidrogelius su nauju stabilizatoriumi, daugiausiai fenolinių junginių *in vitro* testo metu atsipalaidavo geliuose su imobilizuotu arbatmedžių eteriniu aliejumi.

Kazlauskaitė, Jurga Andrėja. Selection of Antimicrobial Components and Their Functionalisation for Nutraceutical Development. Master's Final Degree Project / supervisor prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė; The Faculty of chemical technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological sciences.

Keywords: functionalization, fermentation, dry separation, ultrasonication, raspberry press cakes, coconut press cakes, starch modification, essential oils, hydrogel, antimicrobial nutraceuticals.

Kaunas, 2020. 79 p.

### Summary

Plant by-products contain biologically active compounds – fibers, proteins, which have beneficial properties, but are often used inefficiently. In order to increase the added value of such biomasses, functionalization can be applied. Functionalization can be performed by high-frequency (850 kHz) sonication at low temperatures (<50 °C), as well as dry separation and solid-phase fermentation.

The aim of this work was to investigate biological properties of plant press cakes (raspberry and coconut), apply functionalization to increase nutritional value of the products and use them in the production of antimicrobial hydrated gels (nutraceuticals).

In this work, it was determined that applying dry separation on raspberry press cake, it is possible to obtain fractions (<0.315 mm and 0.5–1 mm) with higher content of elagic acid and antioxidant activity (comparing with raw material without fractionation). In addition, raspberry pulp showed antimicrobial activity against antibiotic resistant pathogens: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Sonification of coconut press cake with high frequency ultrasound (850 kHz) showed that the highest amount and concentration of soluble proteins were released by high frequency sonication (850 kHz, intensity 2 W/cm<sup>2</sup>) for 10 min at pH 9. Sonicated coconut press cake was tested for LAB (lactic acid bacteria) fermentation and proved its suitability as a culture medium for the cultivation of *L. paracasei* bacteria with antimicrobial properties. After fermentation, it was determined, that the count of bacteria was 9.097 log CFU/ml. Modification of native starch was additionally tested by applying sonification to give it new functional properties. High-frequency sonication of the suspensions significantly reduces the viscosity of the suspensions and have had a positive effect on its texture. Studies on the antibacterial activity of tea tree, peppermint and grapefruit essential oils have shown that tea tree essential oil had the best antibacterial activity against pathogenic bacteria. The essential oils of tea tree and peppermint immobilized on OSA-starch and coated with entero-soluble material were the most suitable for the production of hydrogels (nutraceuticals). Agar gels with raspberry press cake (20 %) in combination with sorbitol and maltitol were chosen for the structuring of hydrogels (single-layer and three-layer). During the digestibility test of agar gels with immobilized essential oils *in vitro*, it was observed that most phenolic compounds were released in gastric medium (pH 2) from agar gels with tea essential oil and in an intestinal medium (pH 7.5) from gels with peppermint essential oil (single layer agar gels). Functionalized starch was used as an alternative to agar in gel preparation. Evaluating hydrogels with a new stabilizer (modified starch) it was found, that the most phenolic compounds were released from gels with immobilized tea tree essential oil.



## Santrumpų ir terminų sąrašas

### Santrumpos:

OSA – oktenilgintaro rūgšties anhidridas;

SDS–PAGE – natrio dodecilsulfato – poliakrilamidinio gelio elektroforezė;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometanas;

TEMED – tetrametiledilendiaminas;

NDS – natriododecilsulfatas;

GPT – glutamo piruvo transmitazė;

BSA – jaučio serumo albuminas;

LDH – laktato dehidrogenazė;

HPLC – aukšto efektyvumo skysčių chromatografija;

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas;

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfoninė rūgštis);

KF – kietafazė fermentacija;

MRS – De Man, Rogosa ir Sharpe mitybinė terpė;

PRB – pieno rūgšties bakterijos;

*L.* – *Lactobacillus*;

KSV – kolonijas sudarantys vienetai;

BMS – bendras mikroorganizmų skaičius;

konc. – koncentracija;

pvz. – pavyzdžiui;

val. – valanda;

min. – minutė.

## Įvadas

Augalinių gėrimų ir sulčių gamybos metu susidaro dideli antrinių produktų – išspaudų kiekiai, kurios yra išmetamos ar naudojamos pašarams bei kelia aplinkosaugos problemą, nors jose gausu vertingų makro- ir mikro- komponentų, o jų tarpe, biologiškai aktyvių medžiagų. Šiuos naudingus komponentus sunku išgauti iš sudėtingų lignoceliuliozinių struktūrų ir (ar) padidinti jų biologinį prieinamumą laipsnį, todėl aktualu ieškoti naujų augalinės žaliavos funkcionalizavimo būdų.

Funkcionalizavimas yra naudingų komponentų išlaisvinimas, pridėjimas ar išskyrimas ir panaudojimas kitų maisto produktų ruošimui. Funkcionalizavimui gali būti taikomi tvarūs procesai, tokie kaip sausasis separavimas, leidžiantis atskirti pridėtinės vertės frakcijas. Apdorojant ultragarsu, gali būti padidintas medžiagų iš augalinės žaliavos ekstraktyvumas, išlaisvinant iš sudėtingų lignoceliuliozinių struktūrų tirpius baltymus ir (ar) tirpias skaidulines medžiagas. Parinkus antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčius mikroorganizmus ir juos pritaikius prebiotinių skaidulų fermentacijai, gali būti pasiektos sinbiotikams būdingas efektas. Sinbiotikai – preparatai, kuriuose yra probiotikų (pvz., PRB) ir prebiotikų (augalinės kilmės skaidulos). Pastaruoju metu didelis susidomėjimas skiriamas kietafazei fermentacijai, kuri savo efektyvumu dažnai gali pralenkti tradicinius lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimo būdus.

Funkcionalizuotos augalinės žaliavos turi plačias pritaikymo galimybes, įskaitant nutraceutikų gamybą. Nutraceutikai nuo farmacinių preparatų išsiskiria savo natūralia prigimtimi ir jiems gali būti suteikiamos specialios funkcinės savybės. Viena iš aktualių kryptų būtų antimikrobinio poveikio pasižyminčių nutraceutikų prieš antibiotikams atsparius patogenus vystymas. Antimikrobinės savybės nutraceutikams gali suteikti eteriniai aliejai ir pieno rūgšties bakterijomis (PRB) fermentuoti augaliniai produktai, naudojami dėl jų teigiamo poveikio gaminių juslinėms savybėms. Aviečių išspaudose gausu fenolinių junginių, antocianinų, vitaminų ir skaidulų. Dėl šių junginių, išspaudos gali būti panaudotos kaip priedai funkcionalių produktų ruošimui. Kokosų išspaudose gausu baltymų, kurių ekstraktyvumas gali būti padidintas ir jos galėtų tapti universaliais PRB mitybine terpe.

Nutraceutikai naudojami įvairiose formose (tablečių, kapsulių, miltelių, gelių ir kt.), iš kurių hidratuoti geliai būtų tinkamiausi antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių produktų gamybai. Nuo gelių struktūrizavimo priklauso veikliųjų medžiagų pernaša organizme ir jų atsipalaidavimas bei veikimo mechanizmas. Imobilizuojant į gelių struktūras probiotines kultūras, aktualus jų gyvybingumo išsilaikymas. Šiuo metu didžiausią susidomėjimą kelia antimikrobinė medžiagų, pvz., eterinių aliejų, pernešimo sistemos, lokalizuotos į gaubtinę žarną, kur siekiama užkirsti kelią kylančioms ligoms. Veikliųjų medžiagų pernašos sistemos gali atsipalaiduoti dviem būdais: atsipalaiduoti terpėje, kurios pH atitiktų 7,5 arba atsipalaiduoti palaipsniui ir visiškai nesuvirškintos pasiekti žarnyną.

**Darbo tikslas** – ištirti augalinių išspaudų savybes, pritaikyti inovatyvius sprendimus jų funkcionalizavimui į pridėtinės vertės produktus ir juos panaudoti antimikrobinėms hidratuotų gelių (nutraceutikų) gamybai.

### **Darbo uždaviniai:**

1. ištirti aviečių išspaudų ir jų frakcijų, gautų naudojant sausąjį separavimą, fenolinių junginių sudėtį ir biologinį aktyvumą;
2. nustatyti ultragarsinio apdorojimo įtaką kokosų išspaudų baltyminių medžiagų kiekiui;

3. įvertinti funkcionalizuotų ultragarsu kokosų išspaudų tinkamumą PRB dauginimuisi kietafazės fermentacijos metu;
4. įvertinti ultragarso panaudojimo galimybes krakmolo suspensijų funkcinių savybių pokyčiams;
5. įvertinti skirtingos kilmės eterinių aliejų antibakterines savybes ir jų sudėtį bei parinkti tinkamiausią formą jų imobilizavimui į hidratuotus gelius;
6. ištirti skirtingai struktūrizuotų (vienasluoksnio ir trisluoksnio) agaro gelių biologinį aktyvumą ir įvertinti struktūros įtaką aktyvių junginių atsipalaidavimui *in vitro*;
7. nustatyti modifikuoto krakmolo, kaip stabilizatoriaus, įtaką gelių aktyvių junginių atsipalaidavimui žarnyne *in vitro* ir įvertinti šių gelių biologinį aktyvumą.

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Antrinių produktų funkcionalizavimas pridėtinės vertės didinimui

Funkcionalizavimas yra naudingų komponentų išlaisvinimas, pridėjimas ar išskyrimas ir panaudojimas kaip funkcinių priedų kitų maisto produktų ruošimui. Funkcionalizuojant augalinę žaliavą, gali būti taikomi cheminiai, fiziniai ar biologiniai metodai. Funkcionalizuoti produktai dažniausiai apibūdinami kaip turintys teigiamą poveikį žmogaus sveikatai, skirti tam tikrų organizmo funkcijų gerinimui ir ligų rizikos prevencijai [1]. Augalinių produktų apdorojimas, pvz.: frakcionavimas, apdorojimas aukšto ar žemo dažnio ultragarsu, kietafazė fermentacija, gali keisti baltyminių medžiagų sudėtį ir turėti įtakos funkcinėms savybėms.

#### 1.1.1. Sausojo separavimo taikymas produktų pridėtinės vertės didinimui

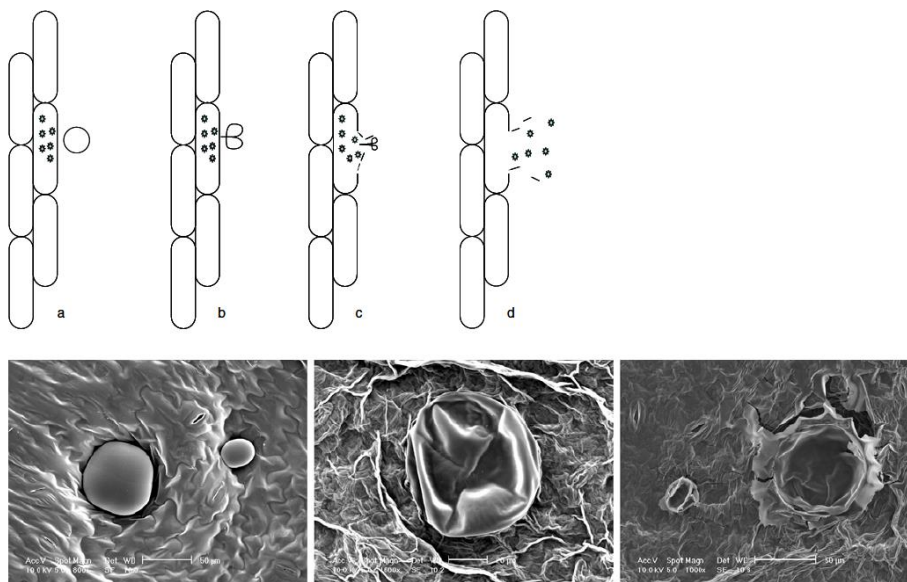
Augalinės žaliavos perdirbimo metu susidariusiose išspaudos yra nevienalytės – jose yra daug sėklų, odelių atplaišų, smulkių miltelių. Dėl šių trūkumų jų tolesnis panaudojimas funkcionaliųjų maisto produktų, nutraceutikų ar papildų gamyboje tampa problematiškas. Be to, svarbu užtikrinti stabilią žaliavos sudėtį ir technologines savybes – vandens įgėrimą, kuris svarbus vystant gelių tipo nutraceutikus. Siekiant pagerinti augalinių produktų kokybę ir praturtinti baltymais pastaruoju metu vis plačiau pradėtas taikyti sausasis frakcionavimas. Sausasis frakcionavimas, lyginant su šlapiuoju, yra ekonomiškesnis, nes reikalauja mažiau energijos, mažesnės vandens sąnaudos ir nereikalauja sudėtingos įrangos. Be gamybos ekonomijos, sausasis frakcionavimas leidžia pagerinti augalinių produktų kokybę, praturtinant juos baltymais [2,3].

Frakcionavimo metu mišinys dažniausiai suskirstomas pagal geometrinius požymius (pvz., dalelių dydį) ir galima atrinkti frakciją, kuri atitinka nustatytus reikalavimus. Gaminant nutraceutikus, visada labiausiai vertinamos frakcijos, kuriose yra ne tik skaidulinės medžiagos, bet ir gausu biologiškai aktyvių komponentų ir baltymų [4].

#### 1.1.2. Ultragarso taikymas augalinės žaliavos apdorojimui

Ultragarso taikymą galima apibūdinti pagal pasirinktą dažnį ir galią, t. y. žemo dažnio ir didelė galia (<16 – 100 kHz ir galią nuo 10 iki 1000 W/cm<sup>2</sup>) bei aukšto dažnio ir maža galia (nuo 100 kHz iki 10 MHz ir galią <1 W/cm<sup>2</sup>). Mažos galios ultragarsas daugiausia naudojamas medicininėje diagnostikoje, tuo tarpu didelės galios ultragarsas dėl mechaninio, kavitacinio ir šiluminio poveikio yra naudojamas biologinių matricių apdorojimui. Kavitacinių burbuliukų susprogdinimas, mikroįtrūkimų susidarymas, mikroturbulumas, didelio greičio dalelių susidūrimai ir mikrostruktūros pokyčiai padidina ekstrahavimo proceso efektyvumą (pvz., išėigą) ir pagreitina chemines reakcijas. Kavitacinių burbuliukų susidarymas ir suyrimas tam tikrose vietose sukelia ypač aukštą temperatūrą ir slėgį bei laisvųjų radikalų susidarymą [5]. Toks ultragarso poveikis sukuria zonas, galinčias smarkiai pagreitinti terpės cheminį reaktyvumą. Kai šie burbuliukai patenka į kietos medžiagos paviršių, aukštas slėgis ir temperatūra sukuria „mikropurkštukus“, nukreiptus į kietą paviršių. Tokių „mikropurkštukų“ susidarymas ultragarso poveikyje pritaikytas metalinių paviršių nuriebalinimui ir medžiagų valymui. Kitas „mikropurkštukų“ pritaikymo pavyzdys būtų maisto pramonėje – augalinių junginių ekstrahavimui. Kaip parodyta 1.1. paveikslėlyje, kavitacinis burbulas gali būti sukurtas arti augalinės žaliavos paviršiaus (a) tada, suspaudimo ciklo metu šis burbulas suyra (b) ir sukuriamas „mikropurkštukas“, kuris yra nukreiptas link augalų matricos (b ir c). Šiame procese susidaręs aukštas slėgis ir temperatūra sunaikina augalo matricos ląstelių sienelės, o tirpiklio kiekis gali prasiskverbti į

jų vidų (d). Tai labai įdomus ir efektingas ingredientų ekstrahavimo iš natūralių produktų sprendimas [6]. Per pastarąjį dešimtmetį ultragarsas buvo vis labiau tiriamas, atliekant kontroliuojama peptidų iš įvairių produktų atpalaidavimą [5].



**1.1. pav.** Kavitacinių burbulų sproginimas ir augalinės matricos suirimas: eterinio aliejaus ekstrahavimas iš baziliko [6]

Augalinių produktų perdirbimo metu gautos išspaudos veikiamos aukšto dažnio ultragarsu, gali būti modifikuotos (ypač turinčios daug baltymų), susidarant daugiau mažesnės molekulinės masės ir biologiškai aktyvių peptidų. Dažniausiai tokie baltyminių medžiagų pokyčiai sąlygoja baltymų tirpumo padidėjimą ir tai suteikia produktui naujas funkcines savybes. Augalinių produktų funkcionalizavimas aukšto dažnio ultragarsu yra paprastas, nebrangus ir pastaruoju metu vis labiau populiarėjantis antrinių produktų apdorojimo būdas [7].

Šiuo metu ultragarsas pradėtas taikyti virškinimui atsparaus krakmolo gamybai. Virškinimui atsparus krakmolas yra laikomas prebiotiku dėl atsparumo amilazės poveikiui plonojoje žarnoje. Jis pasižymi teigiamu poveikiu žmogaus sveikatai – gerina žarnyno peristaltiką ir kontroliuoja glikemiją, mažina širdies bei kraujagyslių susirgimų riziką [8].

Atsparus žarnynui krakmolas gali būti 4 tipų:

- 1 tipas yra fiziškai neprieinamas krakmolas, kuris yra įstrigęs grūduose ar sėklose, jo prieinamumą galima padidinti apdorojant žaliavą;
- 2 tipo yra natūralios krakmolo granulės (tokios kaip bananų, bulvių ir aukštos amilozės kukurūzų krakmolas), kurios yra atsparios virškinimui dėl krakmolo granulių konformacijos ar struktūros;
- 3 tipas yra retrograduotas krakmolas (gaunamas perdirbant ar modifikuojant maistą);
- 4 tipas apibūdina chemiškai modifikuotų krakmolų grupę (oksidacija, eterinimas, esterinimas, rūgštinė hidrolizė ir kt.) dėl jų technologinių (bet ne maistinių) savybių.

Taigi virškinimui atsparus krakmolas gali būti ne tik natūraliai išgautas iš daržovių, vaisių ar sėklų, bet ir gautas fizikinės, cheminės ar fizikinės ir cheminės modifikacijos metu. Krakmolas gali būti modifikuojamas atliekant įvairias reakcijas su sausomis ar pusiau sausomis krakmolo granulėmis, krakmolo grūdelių suspensijoje arba skystoje dispersinėje sistemoje ar tirpale. Modifikuojant natyvų krakmolą, galima sukurti naujus krakmolo darinius, pasižyminčius prebiotiniu veikimu ir naujomis

funkcinėmis savybėmis. Tokiu būdu, modifikuotas krakmolą gali būti naudojamas įvairiose pramonės šakose, įskaitant farmaciją [9].

### 1.1.3. Kietafazė augalinės žaliavos fermentacija

Kietafazė fermentacija (KF) yra bioprocesas, kai mikroorganizmai konvertuoja substratą (fermentacijos terpės sudėtinius komponentus) į metabolitus, esant mažam drėgmės kiekiui (<50 %). Tačiau substratas turi turėti pakankamą drėgmės kiekį, reikalingą mikroorganizmams daugintis ir vykdyti metaboliniams virsmams. KF proceso efektyvumas, apibūdinimas kaip metabolizmo produktų sudarymo greitis fermentacijos metu, priklauso nuo mikroorganizmo rūšies. Mažą substrato drėgmę fermentacijos metu labiau toleruoja mielės ir grybai. Šis procesas praktikoje pritaikytas fermentų gamybai [10].

PRB yra maistinei terpei reiklūs mikroorganizmai ir jų metabolizmo procesai efektyvesni, esant didesnei fermentacijos terpės drėgmei. PRB augimui ir reikalingų metabolitų produkavimui reikia įvairiausių maistinių medžiagų. Poreikiai maistinėms medžiagoms priklauso nuo PRB genotipo. De Man – Rogosa and Sharpe (MRS) ir mielių autolizatas – peptonas – triptonas – tween 80 – gliukozė (LAPTg) yra standartinės terpės, paprastai naudojamos *Lactobacillus* dauginimui pradinėse jų kultivavimo stadijose. Šiose terpėse yra anglies ir energijos šaltinių (angliavandenių, pvz., gliukozės), kompleksinių azoto šaltinių (mielių ekstrakto, mėsos ekstrakto, triptono ir peptono) ir priedų, gautų iš oleino rūgšties (Tween 80). MRS terpės sudėtyje taip pat yra neorganinių ir organinių druskų, kurios stimuliuoja arba yra būtinos PRB augimui. Terpės sudėties komponentai turi įtakos mikroorganizmų gyvybiniams procesams, bioproduktų gamybos proceso stabilumui ir galutinių produktų kokybei, todėl svarbu optimizuoti terpę norimam efektui pasiekti [11].

KF įvardijama kaip alternatyvi tradicinei fermentacijai (skystoje fazėje) su galimu pritaikymu biologiškai aktyvių, pvz.: antimikrobinių medžiagų gamybai, maisto, pašarų, farmacijos bei kt. srityse [12].

Pieno rūgšties bakterijos yra plačiai naudojamos maisto pramonėje, nes jos turi teigiamą įtaką produktų juslinėms savybėms, maistinei vertei ir mažina mikrobiologinę taršą. Antimikrobiniu poveikiu pasižymi PRB antriniai metabolitai, tokie kaip, laisvosios riebalų rūgštys, amoniakas, organinės rūgštys (pvz.: pieno, acto), diacetilai, vandenilio peroksidas, bakteriocinai ir (ar) į bakteriocinus panašios medžiagos. PRB pasižymi plačiu antimikrobinių medžiagų spektru, tačiau svarbiausios iš jų – pieno ir acto rūgštys [13].

Vartotojai teikia pirmenybę natūraliems maisto produktams, kurie pasižymėtų ilgesniu galiojimo laiku ir būtų pagaminti be konservantų. Pieno rūgštis laikoma potencialia alternatyva konservantams. Ji yra natūrali medžiaga, randama įvairiuose vaisiuose ir fermentuotuose produktuose, kuri natūraliai slopina patenkančius į maistą patogenus. Be savo antimikrobinio aktyvumo, pieno rūgštis veikia kaip skonio stipriklis ir antioksidantas, apsaugantis organizmą nuo lipidų oksidacijos ir mažina prooksidacinį NaCl poveikį [14].

Pieno rūgšties molekulė turi du optiškai aktyvius izomerus: *D*(–) ir *L*(+). *L*(+) izomeras natūraliai gaminamas žinduolių organizme ir jis dažniausiai naudojama maisto ir vaistų pramonėje. Veiksmingiausias *L*(+) pieno rūgšties sintezės būdas yra mikrobinė fermentacija. Jos metu dažniausiai gaunamas *D*(–) ir *L*(+) izomerų mišinys, tačiau kai kurios pieno rūgšties bakterijos (PRB) gamina tik *L*(+) pieno rūgšties izomerą (pvz., *L. casei*, *L. rhamnosus*) [15]. Šios bakterijos gali būti

pritaikytos antrinių produktų fermentacijai, suteikiant jiems pridėtinę vertę. Tokie antimikrobinėmis savybėmis pasižymintys produktai šiuo metu būtų populiarūs farmacijos pramonėje [16].

## 1.2. Antrinių augalinių produktų panaudojimas antimikrobinų nutraceutikų vystymui

### 1.2.1. Bakterijų atsparumas antibiotikams

Praeitame amžiuje atradus antibiotikus, mirštamumas ir sergamumas nuo infekcinių ligų sumažėjo, tačiau netinkamas ir neracionalus jų vartojimas lėmė atsparių šiems junginiams bakterijų atsiradimą. Veikliosios medžiagos pernaša į audinius – taikinius, jos biologinis patvarumas ir poveikio mechanizmo išaiškinimas yra pagrindinės farmacinių preparatų vystymo prieš antibiotikams atsparius patogenus strategijos [17].

Didžiausią grėsmę žmogaus sveikatai šiuo metu kelia gramteigiami, antibiotikams atsparūs *Staphylococcus aureus* ir *Enterococcus* rūšių patogenai bei jų sukeliama pandemija. Mirtys nuo MRSA (meticilinui atsparių bakterijų) šiuo metu nužudo daugiau žmonių nei HIV/AIDS, parkinsonas ir emfizema kartu sudėjus.

Gramneigiami patogenai taip pat kelia didelį nerimą, nes jie tampa atsparūs beveik visiems galimiems antibiotikams, sukurdami problematinę situaciją visuomenės sveikatai, kuri buvo dar prieš antibiotikų išradimą. Gramneigiamų bakterijų infekcijos dažniausiai atsiranda sveikatos priežiūros įstaigose ir jas sukelia *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* ir *Acinetobacter*. MDR patogenai (keliems antibiotikams atsparios bakterijos) pastaruoju metu vis labiau plinta visuomenėje. Tarp jų yra  $\beta$ -laktamazės gaminančios *Escherichia coli* ir *Neisseria gonorrhoeae* [18]. Bakterijų atsparumas antibiotikams paskatino ieškoti naujų antimikrobinų medžiagų ir jų imobilizavimo būdų. Tai lėmė susidomėjimą naujomis veikliųjų medžiagų pateikimo formomis „nutraceutikais“ su plačiu biologinio aktyvumo spektru. Jų ruošimui galėtų būti naudojami natūralūs augalinės kilmės komponentai, pasižymintys antimikrobinu ir antioksidaciniu aktyvumu, kombinacijoje su probiotinėmis pieno rūgšties bakterijomis [17].

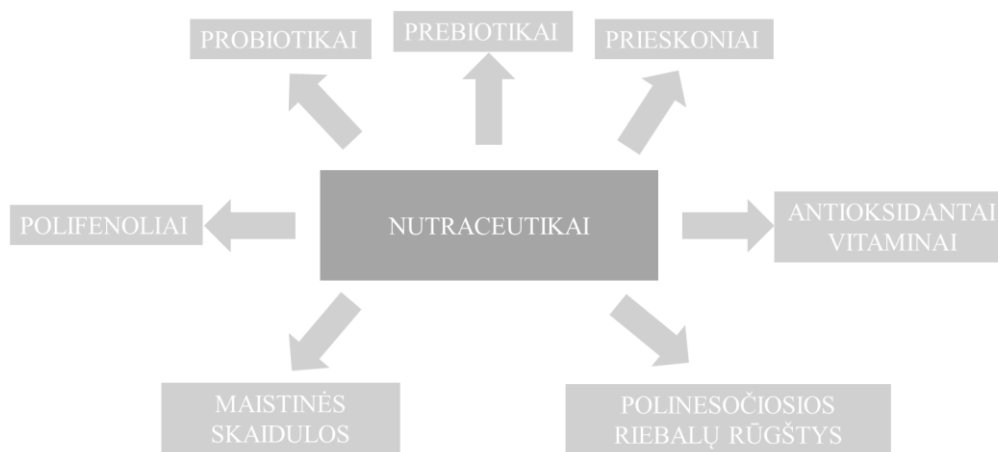
### 1.2.2. Nauji veikliųjų medžiagų preparatai

Nutraceutikai – biologiškai aktyvūs maisto papildai, naudojami cheminės maisto sudėties korekcijai (papildomų maistinių medžiagų: baltymų, amino rūgščių, riebalų, angliavandenių, vitaminų, mineralinių medžiagų, maistinių skaidulų). Funkciniais nutraceutikais siekiama:

- kompensuoti maistinių medžiagų trūkumą;
- atstatyti medžiagų apykaitą (metabolizmą);
- didinti nespecifinį organizmo atsparumą (stabilumą);
- apsaugoti nuo nepalankių aplinkos veiksnių;
- siekti imunomoduliacinio poveikio;
- šalinti toksines medžiagas ir svetimą organizmui medžiagas (ksenobiotikus);
- gydyti maistu.

Nutraceutikuose nėra sintetinių junginių ir todėl juos gali naudoti tiek suaugę, tiek ir vaikai. Būdami natūralios prigimties jie vaidina svarbų vaidmenį sveikos organizmo būsenos palaikymui.

Nutraceutikai pagal paskirtį, sudėtį, veikimo mechanizmą ir kitus kriterijus klasifikuojami į 7 tipus (žr. 1.2. pav.) [19].



**1.2. pav.** Nutraceutikų klasifikacija [19]

Nutraceutikai gali būti gaminami įvairių formų: tablečių, kapsulių, miltelių, tinktūros, gelių ir kt. Tačiau nutraceutikų, teikiančių medicininę naudą, veiksmingumas priklauso nuo jų biologinio patvarumo ir pernašos į audinius – taikinius formas. Šiems efektams pasiekti labai svarbus yra veikliųjų medžiagų imobilizavimas nutraceutikuose [20].

Kai kuriais atvejais reikia pasiekti greitą ir staigų atpalaidavimo burnoje profilį, pavyzdžiui, eteriniai aliejai, kuriais siekiama suteikti burnos gleivinėje antimikrobinį poveikį ir maloniai veikti burnos juslinius receptorių. Dažniausiai pirmenybė teikiama atidėtam veikliųjų medžiagų atsipalaidavimui, kuris priklauso nuo terpės pH. Tuo siekiama, kad veikliosios medžiagos pasiektų taikinius žarnyne. Norint reguliuoti veikliųjų medžiagų nutraceutikuose atsipalaidavimą, tinkamiausia jų ruošimui yra hidratuotų gelių forma [21].

Geliai, kaip vaistų pernešimo sistemos, turi tenkinti šiuos privalumus:

- galimai išvengti virškinimo trakto fermentų ir gelyje esančių biologiškai aktyvių medžiagų sąveikos;
- galimai išvengti farmacinio preparato absorbcijos (priklausomai nuo pH) virškinamajame trakte;
- gelių veikliosios medžiagos neturi būti deaktyvuojamos kepenų fermentų;
- geliai turi užtikrinti veikliųjų medžiagų pernašą į audinius – taikinius ir pasižymėti mažu ar visai nepasižymėti šalutiniu poveikiu [20].

Šiuo metu didelį susidomėjimą turi geliai su apvalkalais, kurie būtų efektyvūs ir taikytini vaistų pernešimo sistemoms. Geliai – koloidinė, dispersinė sistema, kuri paprastai yra drebučių pavidalo. Gelį sudaro mažiausiai dvi fazės: viena fazė yra skysta (tirpiklis, paprastai – vanduo), kita – disperguota medžiaga. Geliams formuoti naudojami įvairūs geliacijos agentai, nuo kurių rūšies priklauso galutinio produkto kokybė [22]. Gelių ruošimui kuriamos receptūros ir parenkami technologiniai parametrai, įvertinant geliacijos agento savybes. Imobilizuojant veikliąsias medžiagas į gelius, papildomas dėmesys turi būti skirtas jų biologiniam aktyvumui. Be to, gelių ruošimui naudojamos medžiagos, suteikiančios nutraceutikui priimtinas vartotojui juslines savybes, tokias kaip: kvapas, skonis ir spalva. Tokiu būdu, gelinių nutraceutikų ruošimui keliami kompleksiniai uždaviniai, skirti atrasti naujas veikliųjų medžiagų pernešimo sistemas ir suteikti vartotojui priimtinus pojūčius.



Nutraceutikai skiriasi nuo tradicinių vaistinių preparatų, nes jie turi mažiau šalutinių poveikių ir jie lengviau prieinami vartojimui. Jų panaudojimas yra platus: nuo imuniteto stimuliavimo iki daugelio ligų prevencijos [23].

### 1.3. Antimikrobinės augalinės ir mikrobinės kilmės medžiagos nutraceutikų gamyboje

#### 1.3.1. Eteriniai aliejai ir jų antimikrobinės savybės

Eteriniai aliejai ir jų sudėtiniai komponentai pasižymi plačiu biologinio aktyvumo spektru, taip pat būdami lakūs skleidžia malonų kvapą ir gali suteikti gaminiui priimtina skonį. Šios savybės daro eterinius aliejus reikšmingus daugelyje sričių, tokiose kaip maisto pramonė, farmakologija, farmacija ir fitoterapija [24]. Eteriniai aliejai yra aromatiniai riebaliniai skysčiai, gauti iš augalinės kilmės žaliavų (vaistinių augalų, vaisių, gėlių, pumpurų, sėklų, lapų, šakelių, žievių, medienos ar šaknų). Jie gali būti gaunami fermentacijos procesų metu, taikant anflerazą (išskyrimą riebalais) arba ekstrahavimą. Distiliacija vandens garais dažniausiai naudojama komercinei eterinių aliejų gamybai. Kai kurie eteriniai aliejai pasižymi antimikrobinėmis savybėmis. Šie požymiai gali būti susiję su šių junginių biologinėmis funkcijomis augaluose [25].

Eteriniai aliejai susideda iš organinių lakiųjų junginių, kurių molekulinė masė paprastai yra mažesnė nei 300 g/mol. Šie lakieji junginiai priklauso įvairioms cheminėms klasėms: alkoholių, eterių arba oksidų, aldehydų, ketonų, esterių, aminių, amidų, fenolių, heterociklų ir daugiausia jų priklauso terpenų klasei [26].

Terpenai ir terpenoidai (deguonimi prisotinti terpenų dariniai) yra cheminiai junginiai, kurių sudėčiai būdingi izopreno molekulės fragmentai. Terpenai yra klasifikuoti pagal izopreno vienetų skaičių jų struktūroje (pvz.: hemiterpenus sudaro vienas izopreno vienetas, monoterenus sudaro du izopreno vienetai ir t. t.). Literatūroje paskelbti tyrimų rezultatai apie biologinį terpenų ir terpenoidų aktyvumą. Kai kurie šios klasės junginiai naudojami farmacijoje kaip terapiniai agentai, nes pasižymi priešūždegiminiu poveikiu ir skatina žaizdų gijimą. Įrodyta, kad terpenų junginiai skatina organizme veikliųjų medžiagų pernašą. Įvertinant šį biologinį efektą, jie naudojami kaip papildomos medžiagos nanostruktūrizuotų sistemų ruošimui [27]. Septyni pagrindiniai, dažniausiai aptinkami terpenoidai –  $\alpha$ -pinenas, limonenas, myrcenas, geraniolis, linalolas, nerolis, terpineolis ir keturi jo izomerai:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -terpineolis ir 4-terpinenolis. Šie terpenoidai dažniausiai randami citrusinių vaisių, notrelinių, arbatmedinių šeimos augalų eteriniuose aliejuose [25].

Eteriniai aliejai, išsiskiriantys savo sudėtimi ir kai kurių komponentų (pvz.: terpenoidais, polifenoliais) gausa bei biologiniu aktyvumu, iki šiol plačiai naudojami antimikrobinų preparatų vystymui. Naudojant eterinius aliejus, galima kontroliuoti antibiotikams atsparius patogenus, įskaitant meticilinui atsparų *Staphylococcus aureus* (MRSA). Dėl šios priežasties tyrėjai raginami pritaikyti vaistines formas platesniam eterinių aliejų naudojimui ir antimikrobinio spektro plėtimui. Kitas eterinių aliejų farmacinis potencialas apima neurodegeneracinės ligos, širdies ir plaučių ligų bei vėžinių susirgimų gydymą [28].

#### 1.3.2. Probiotinės pieno rūgšties bakterijos ir jų biologinis aktyvumas

Probiotikai yra perspektyvus mikrobinės kilmės maisto papildas, kuris turi teigiamą poveikį šeiminkui dėl antimikrobinio poveikio virškinimo trakte. Probiotikai dažniausiai naudojami fermentuojant pieno produktus, tokius kaip jogurtas. Vis dažniau galima pastebėti ir netradicinius

fermentuotus produktus: įvairūs liofilizuoti vaisiai, daržovės, grūdai, gėrimai ir kt. Bakterijų gentys, dažniausiai naudojamos kaip probiotikai, yra *Lactobacillus* ir *Bifidobacterium*. Praėję pro skrandį, plonojoje žarnoje, kai kurie probiotikai išgyvena ir laikinai įsitvirtina storajoje žarnoje [29].

Bifidobakterijos yra anaerobinės, gramteigiamos, sporų neformuojančios, lazdelės formos probiotinės bakterijos. *Bifidobacterium* gentis gamina pieno ir acto rūgštis kaip šalutinius gliukozės metabolizmo produktus. Šios genties bakterijos kartu su *Lactobacillus* genties bakterijomis ir probiotinėmis mielėmis *Saccharomyces boulardii* sumažina neigiamą *Helicobacter pylori* sukeltos infekcijos padarinius.

*Lactobacillus* yra gramteigiami, lazdelės formos, fakultatyviniai anaerobai aptinkami žmogaus virškinimo ir urogenitaliniame trakte. Pavadinimas *Laktobacillus* reiškia bakterijos gebėjimą gaminti pieno rūgštį, o ne gebėjimą fermentuoti laktozę. Šios bakterijos laikomos „draugiškos“ organizmui bakterijos ir naudojamos patogenų, žmogaus žarnyne, prevencijai, taip pat jos padidina mineralinių medžiagų prieinamumą, stabilizuoja raumenų barjerą ir sumažina žarnyno pralaidumą [30]. Laktozės netoleravimo problemą patiria apie 70 % pasaulio gyventojų, kurių žarnyne nustatytas mažas  $\beta$ -galaktozidazės aktyvumas ir todėl laktozė yra nevirškinama. Įrodyta, kad probiotikai pagerina laktozės virškinimą, mažinant šio angliavandens netoleravimo simptomus [29].

Yra dvi pagrindinės probiotinių mikroorganizmų vartojimo formos – fermentuoti maisto produktai ir papildai. Fermentuoti maisto produktai gali būti tiek gyvūninės, tiek augalinės kilmės. Probiotinių papildų ruošimui naudojamos liofilizuotos bakterijos įvairiose formose – miltelių, kapsulių ar tablečių pavidalu. Siekiant klinikinio probiotikų veiksmingumo, probiotinės bakterijos turi išlikti gyvybingos. Probiotinių papildų dozės nustatomos atsižvelgiant į žarnyno infekcijos pobūdį. Sėkmingi rezultatai buvo pasiekti klinikinių tyrimų metu, naudojant tarp  $10^7$  iki  $10^{11}$  gyvybingų bakterijų per dieną [31].

Probiotinės bakterijoms turi būti atsparios skrandžio rūgščiai, kad galėtų praeiti pro skrandį ir įsitvirtinti žarnyne. Probiotinių bakterijų pernašai į žarnyną buvo sukurta daugybė sistemų, apimančių augalinės ir gyvulinės kilmės produktus. Probiotikai ir prebiotikai gali būti naudojami kombinacijose, kad pagerintų medžiagų apykaitą ir skatintų probiotinių bakterijų augimą dėl jų sinergetinio poveikio. Nepaisant to, buvo pastebėta, kad bakterijų gyvybingumas probiotinėje matricoje ir išgyvenimas žarnyne pernašos metu dažnai būna nepakankamai efektyvus dėl įvairių priežasčių: bakterijos skirtingai išgyvena fizinius veiksmus technologinių procesų metu ir besikeičiančias aplinkos sąlygas, o patekusios į žarnyną ne visos geba prisitvirtinti prie žarnyno sienelių [32].

Imobilizuojant bakterijas, kad šios liktų gyvybingos minėtų procesų metu, turi būti tinkamai parinktas substratas bei jo konsistencija. Augalinės kilmės produktai (prebiotikai) gali būti laikomi idealiais probiotikų substratais, nes juose yra vitaminų, mineralų, angliavandenių ir skaidulinių medžiagų. Uogų ir vaisių išspaudos yra nebrangus antrinis produktas, kuriame yra didelis fenolinių junginių ir sacharidų kiekis. Išspaudos yra universalus substratas mikroorganizmams. Funkciniai maisto produktai, kuriuose yra probiotinių bakterijų ir polifenolinių antioksidantų, rinkoje įgyja vis didesnę paklausą [33].

Prebiotinis pluoštas yra nesuvirškinama maisto dalis, tokia kaip bananai, svogūnai, česnakai, obuolių odelės, pupelės ir daugelis kitų. Šis pluoštas yra maistinės skaidulos, kurios patenka per plonąją žarną nesuvirškintos ir yra fermentuojamos, kai pasiekia storąją žarną. Skaidulinės medžiagos gali būti skirstomos pagal jų cheminę sudėtį bei fiziologinį veikimą žmogaus organizme.

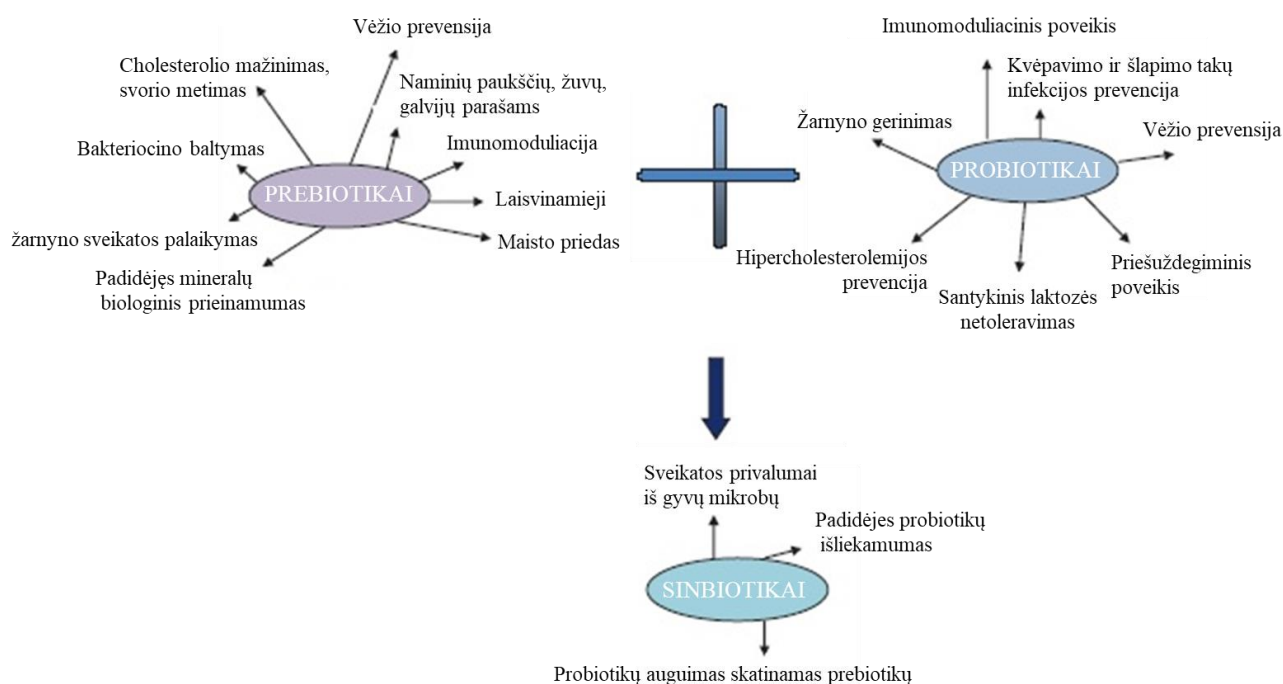
Europos maisto saugos tarnybos (European Food Safety Authority) dietinių produktų grupės ekspertai skaidulines medžiagas suskirstė į šias grupes:

- nekrakmolingi polisacharidai – celiuliozė, hemiceliuliozė, pektinai, hidrokoloidai (pvz.,  $\beta$ -gliukanai);
- atsparūs oligosacharidai – frukto-oligosacharidai, galakto-oligosacharidai, kiti atsparūs oligosacharidai;
- atsparūs krakmolai – chemiškai arba fiziškai apdoroti krakmolai;
- ligninas [34].

Prebiotikai padidina bifidobakterijų kiekį žmogaus žarnyne. Manoma, kad tai padeda sumažinti patogeninių bakterijų kiekį ir stimuliuoja imuninę sistemą. Fruktanų ir galaktanų struktūra paaiškina jų bifidogeninį poveikį (gebėjimas stimuliuoti bifidobakterijų augimą). Šiuose angliavandeniuose yra jungčių, kurios yra atitinkamai skaidomas fermentų  $\beta$ -fruktozidazės (gamina bifidobakterijos, laktobacilos ir bakteroidai) ir  $\beta$ -galaktozidazės (gamina bifidobakterijos). Bifidobakterijos pirmiausia metabolizuoja substratus, kurie yra oligosacharidų dydžio [35]. Prebiotikai taip „pamaitina“ žarnyno mikrobiotą, o jų skilimo produktai yra trumpųjų grandinių riebiosios rūgštys, kurios patenka į kraujotaką, taip teigiamai paveikdami ne tik virškinimo traktą, bet ir kitus organus [36].

Preparatai, kuriuose yra probiotikų ir prebiotikų yra vadinami sinbiotikais. Probiotikų ir prebiotikų naudojimas kartu yra praktiškas būdas įveikti sunkumus, kuriuos gali patirti probiotikai, iš pradžių patekę į žarnyno aplinką. Iššūkiui kuriant sinbiotikus yra tinkamas probiotikų ir prebiotikų derinio parinkimas ir pakankamo jų kiekio užtikrinimas [37].

Stebint simbiotikų veikimą pastebėtas pagerėjimas probiotinių bakterijų išgyvenimas praeinant per viršutinį žarnyno traktą. Organinės rūgštys, pH,  $H_2O_2$ , deguonis, drėgmės stresas ir kt., daro įtaką probiotikų gyvybingumui, ypač pieno produktuose (pvz., jogurtuose), nutraceutikų geliuose šie veiksniai daro mažesnę įtaką probiotikams [38].



1.3. pav. Sinbiotikų nauda kombinuojant probiotikus ir prebiotikus [31]

Simbiotikai pasižymi visomis prebiotikų ir probiotikų teikiamomis naudingomis savybėmis žmogaus organizmui (žr. 1.3. pav.) [31]. Šie produktai yra labai svarbūs siekiant pateikti vartotojui naudingų jo organizmui medžiagų kombinaciją, kuri ne tik pagerina organizmo veiklą, bet ir užkerta kelią galimoms ligoms. Vartotojams taip pat labai svarbu, kad tokie produktai būtų ne tik naudingi, bet ir skanūs, kvapnūs ir tokioje formoje, kuri būtų patogi vartoti [38].

Su prebiotikais galima derinti ir antimikrobines medžiagas tokias kaip eteriniai aliejai, siekiant dar labiau patobulinti nutraceutiką. Būtina atsižvelgti, kad pridėjus papildomas medžiagas produkto skonis, tekstūra, galiojimo laikas ir veikimas gali pasikeisti, todėl formuojant produktą reikia atkreipti dėmesį į visus šiuos parametrus [39].

### 1.3.3. Nutraceutikų biologinio aktyvumo didinimas augalinėmis išspaudomis

Augalų antriniuose produktuose (išspaudose) po sulčių spaudimo, augalinių gėrimų gamybos ar kito apdorojimo yra likę skaidulinės medžiagos ir kt., kurios dažniausiai naudojamos gyvūnų pašarams ir kelia aplinkosaugos problemų. Literatūroje pateikiami tyrimų rezultatai, kad antriniai uogų perdirbimo produktai galėtų būti vertingi biologiškai aktyvių medžiagų šaltiniai, tinkami naudoti maisto praturtinimui. Šių produktų racionalus naudojimas sumažintų atliekų kiekius, leistų padidinti produktų pridėtinę vertę ir sumažinti maisto kainas [40]. Uogų išspaudos susideda iš uogų odelių ir sėklų, kuriose yra ne tik skaidulų, bet ir įvairių biologiškai aktyvių medžiagų. Nustatyta, kad fenolinių junginių, pasižyminčių antioksidacinėmis savybėmis, kiekis vaisių ir uogų perdirbimo produktuose yra didesnis nei sultyse. Epidemiologiniai tyrimai patvirtino, kad fenolinių junginių vartojimas mažina širdies ir kraujagyslių ligų, vėžinių susirgimų ir kitų degeneracinių ligų riziką. Šie junginiai gali pasižymėti ir antimikrobinėmis savybėmis, atveriant galimybes naudingam jų panaudojimui pridėtinės vertės produktų vystymui. Įrodyta, kad erškėtinių šeimos uogos pasižymi antimikrobinėmis savybėmis, todėl jų išspaudų naudojimas produktuose būtų ypač patrauklus [41].

Augalinių žaliavų perdirbimo antriniai produktai pasižymi ne tik dideliais fenolinių junginių kiekiais, bet jie turtingi baltymais. Augalinių gėrimų (pvz.: iš riešutų, migdolų, kokosų) gamybos metu susidaro daug išspaudų, kuriose lieka skaidulų ir baltymų, pasižyminčių biologiniu aktyvumu. Pagal P. Rodsamran'ą, ir kt. [42] biologiškai aktyvūs augalinės kilmės peptidai naudojami širdies ligų gydymui bei diabeto gydymui ir prevencijai [42].

Kokosų riešutai yra vieni iš svarbiausių pasaulyje aliejingų augalinių žaliavų. Iki šiol kokosų riešutai buvo naudojami aliejaus ekstrahavimui, tuo tarpu baltymų išgavimui iš jų buvo skiriamas nepakankamas dėmesys. Šiuolaikinės technologijos leidžia išgauti aliejų iš kokosų riešutų maksimaliomis išeigomis, gamybos metu susidarant kokosų išspaudoms su 18 – 25 % baltymų kiekiu [43]. Kokosų riešutų perdirbimo metu susidaranti išspauda, kurių pasaulinė metinė produkcija siekia 200 milijonų tonų, yra pagrindinis kokosų aliejaus ir pieno pramonės šalutinis produktas. Be kokosų išspaudų maistinės vertės, išskirtinis dėmesys skiriamas baltymams, galintiems sumažinti lipidų kiekį žiurkių serume. Albuminas ir globulinas yra pagrindinės kokosų baltyminės medžiagos. Kokosų išspaudos yra gausus ir potencialus augalinių baltymų šaltinis, tačiau iki šiol jie nebuvo plačiai naudojami funkcionaliųjų maisto produktų vystymui. Siekiant skatinti jų naudojimą, buvo tiriama kokosų išspaudų baltymų frakcijos (albumino, globulino, prolamino, glutelino – 1 ir glutelino – 2), maistinė vertė ir antioksidacinis aktyvumas. Paskelbti literatūroje tyrimai įrodė, kad visos albuminų, globulino, glutelino – 1 ir glutelino – 2 frakcijos turi didelę maistinę vertę. Prolaminas, glutelinas – 1 ir glutelinas – 2 pasižymėjo geru radikalų slopinimo aktyvumu, o

globulinas ir prolaminas pasižymėjo chelatų sudarymo su metalų jonais geba. Be to, visos frakcijos, išskyrus gluteliną – 2, galėtų efektyviai apsaugoti DNR nuo oksidacijos. Naudojant LC – MS / MS, globulino ir glutelino – 2 frakcijose buvo nustatyti keli peptidai, kurių sudėtyje esti nuo penkių iki aštuonių amino rūgščių, pasižyminčių antioksidaciniu aktyvumu. Paskelbti rezultatai rodo, kad kokosų išspaudų baltymų frakcijas galima naudoti funkcionalių maisto produktų ruošimui [44].

Kitas potencialus biologiškai vertingų medžiagų šaltinis galėtų būti raudonosios avietės ir jų perdirbimo antriniai produktai. Jose yra vitamino C, magnio, kalio, vitamino K, kalcio bei geležies. Raudonosiose avietėse yra fitochemikalų, kurie pasižymi antioksidaciniu aktyvumu *in vitro* [45]. Didžiausiu biologiniu aktyvumu išsiskiria vitaminas C, antocianinai ir elagotaninai. Nustatyta, kad elago rūgštis, susidaranti elagotanių rūgšties hidrolizės metu, yra vyraujantis avietėse fenolinis junginys. Elago rūgštis, pasižyminti stipriu antioksidaciniu ir antivirusiniu poveikiu, sulaukė naujų panaudojimo galimybių maistui ir farmakologijai. Be to, elago rūgštis gali veikti kaip chemoprevecinis agentas, skirtas įvairių vėžinių susirgimų prevencijai. Be jau minėtų junginių, aviečių sultyse ir minkštyme, uogų sėklose ir odelėje aptinkama ir kitų antioksidantų bei žmogaus sveikatai palankių komponentų, tačiau uogose jų pasiskirstymas yra netolygus. Pavyzdžiui, elago rūgštis uogų sėklose daugiausia randama elagotanių pavidalu, o minkštyme nustatytas tik nedidelis elago rūgšties/elagotanių kiekis. Perdirbant avietes į sultis ir uogienes, sėklos pašalinamos kaip nepageidaujamas ingredientas (atliekos). Po sulčių spaudimo uogų išspaudos sudaro maždaug 36 % bendros uogų žaliavos. Aviečių išspaudos galėtų būti toliau naudojamos kaip natūralių biologiškai aktyvių medžiagų šaltinis funkcionalių maisto produktų vystymui. Pagal literatūrą, aviečių išspaudų ekstraktai pasižymi antimikrobiniu aktyvumu prieš skirtingas gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas, todėl aviečių išspaudos gali būti potencialiu natūralių antimikrobinių komponentų šaltinis [47].

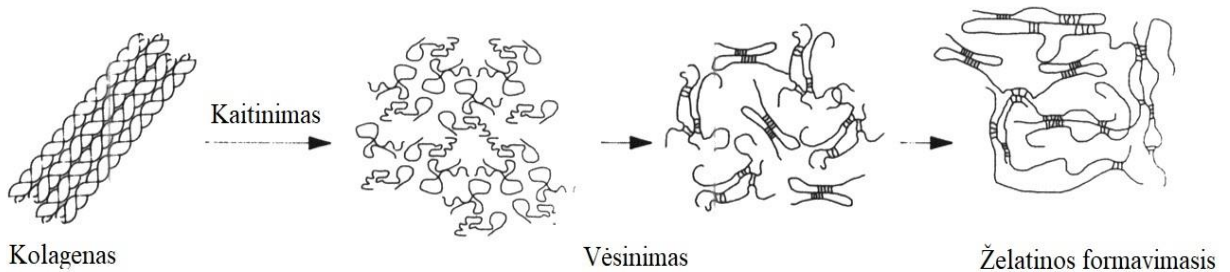
#### 1.4. Biologiškai aktyvių medžiagų imobilizavimas į hidratuotus gelius

##### 1.4.1. Nutraceutikų gamyboje naudojami geliacijos agentai ir baltyminės medžiagos

Yra žinoma daugelis medžiagų, kurios gali būti naudojamos imobilizuoti kietas medžiagas, skysčius arba įvairių tipų, kilmės ir savybių dujas. Tačiau iš jų tik labai nedaug medžiagų yra pripažintos kaip saugios (GRAS) medžiagos [47]. Dažniausiai maisto pramonėje naudojami stabilizatoriai yra agaras, želatina ir pektinas.

Agaras yra hidrofilinis polisacharidas, gaunamas iš jūros dumblių, jo molekulė sudaryta iš agarozės ir agaropektino. Agarozė pasižymi stipriomis gelį formuojančiomis savybėmis, o agaropektine šios savybės silpnesnės [48]. Pagrindinė agaro savybė yra suformuoti grįžtamą gelį, gaunamą aušinant karštą vandeninį jo tirpalą. Prieš tai agaras turi būti pakaitinamas iki aukštesnės nei 80 °C temperatūros. Agaro koncentracijai tirpale esant 1,5 %, tipinė gelio formavimosi temperatūra yra 35–45 °C. Dėl gebos susidaryti labai stiprius gelius, esant labai mažoms koncentracijoms agaras yra plačiai naudojamas kaip gelinimo agentas maisto pramonėje. Su juo pagaminti produktai tinka naudoti veganams, nes jis yra augalinės kilmės. Agaro geliai gali stabilizuoti plėveles formuojančią emulsiją ir sukurti jose makrotinklą. Šis makrotinklas absorbuoja lipidus ir taip pagerinamos plėvelių barjerines savybės. Agaro ir hidrinto augalinio aliejaus mišiniai emulsijų sudėtyje leidžia pagerinti polietileno plėvelių mechanines savybes ir jos pagal kokybę tampa panašios į mažo tankio polietileno plėveles, ruoštas iš keleto baltymų kombinacijos [49].

Želatina gali būti skaidri, bespalvė arba gelsvoka, smulki, beveik beskonė medžiaga, gaunama iš gyvūnų jungiamojo audinio baltymo kolageno. Vandenyje želatina formuoja pusiau kietą koloidinį gelį. Geliacija vyksta sirupo aušinimo metu dėl dalinio kolageno trigubų spiralių persitvarkymo (žr. 1.4. pav.). Pirmajame geliacijos etape polipeptidinė grandinė skyla į trumpus fragmentus. Po to, vyksta grandinių, kurios yra netoli reaktyviosios vietos (reaktyvaus centro), kondensacija ir tai sukelia trigubos spirales formavimąsi [22]. Želatina blogai tirpsta šaltame vandenyje. Jos dariniai gali sukurti stabilias emulsijas su kvapiosiomis medžiagomis [47].

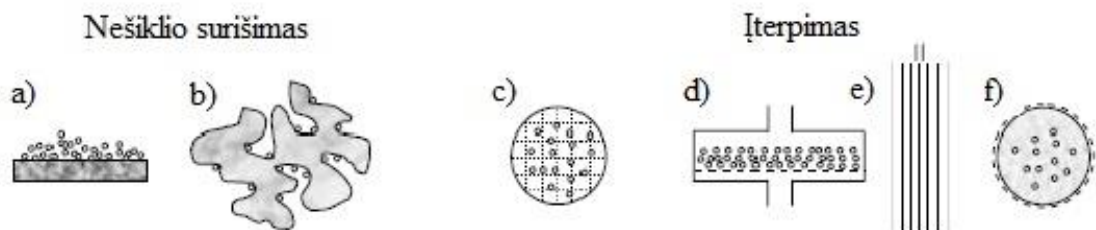


1.4. pav. Želatinos formavimosi procesas

Pektinas savo struktūra ir funkcijomis yra sudėtingiausias polisacharidas, esantis kombinacijoje su kitais augalų ląstelių sienelių polisacharidais [50]. Pektinai maisto pramonėje yra naudojami kaip stabilizatoriai, tirštikliai, kristalizacijos inhibitoriai, geliacijos ir hermetizacijos agentai. Jie naudojami, ruošiant gelius su mažomis pH vertėmis ir esant divalenčiam kalciumiui. Maisto pramonėje pektinai naudojami džemų, pieno desertų, ledų su vaisių geliais, vaisių ir daržovių konservavimo bei maisto dangų gamybai [51].

#### 1.4.2. Biologiškai aktyvių medžiagų imobilizavimo metodai jų funkcionalumo didinimui

Biotechnologijose imobilizacija leidžia apsaugoti ląstelę ar veikliąją medžiagą nuo nepalankių sąlygų, pašalinimo, šlyties ir imunologinio atmetimo. Imobilizacijos metodus galima suskirstyti į dvi pagrindines grupes (žr. 1.5. pav.) priklausomai nuo to ar nešiklis yra surištas, ar įterptas. Pirmu atveju ląstelės ar aktyvioji medžiaga surišama su vandenyje netirpiu nešikliu fizinės adsorbcijos principu arba joniniais ir (arba) kovalentiniais ryšiais. Kitu atveju biologiškai aktyvi medžiaga įterpiama į polimerinę matricą arba į pusiau pralaidžią membraną. Imobilizuojant komponentų mišinius į gelį, jie gali būti išsilaisvinami vienu metu ar palaipsniui [52].



1.5. pav. Imobilizacijos metodai: a) adsorbcija ant nešiklio paviršiaus; b) adsorbcija į nešiklio vidų; c) įterpimas į gelį; d ir e) įterpimas į membraną ar tuščiavidurį pluoštą; f) inkapsuliacija [52]

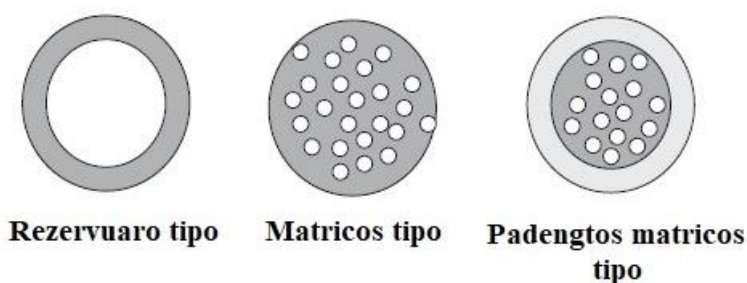
Adsorbcinė imobilizacija yra veikliosios medžiagos adsorbciją į gelį, siekiant išlaikyti jos biologinį aktyvumą galimai ilgesnį laiką. Surišimas ant paviršių gali būti vykdomas dvejopai – inicijuojant sąveikas rišamosiomis medžiagomis (metalų oksidais ar kovalentiniais rišikliais) arba natūraliai,

vykstant savaiminei adsorbicija ant įvairių nešiklių. Ši imobilizacijos technika yra labai populiarė, nes ji paprasta ir greita [53].

Įterpimas į struktūras yra plačiausiai iširtas imobilizacijos metodas. Jis pagrįstas medžiagų įterpimu į standų tinklą, į kurį jos uždarnos pakankamai sandariai, kad būtų išvengta medžiagų išsiskyrimo. Toks bakterijų ląstelių ar aktyvių medžiagų imobilizavimas yra vienas iš saugiausių, padedančių ilgiausiai išlaikyti ląstelių gyvybingumui ar medžiagų aktyvumui [52].

Inkapsuliavimas gali būti apibrėžiama kaip procesas, skirtas įterpti vieną medžiagą kitoje, formuojant daleles, kurių skersmuo yra nuo kelių nanometrų iki kelių milimetrų. Įterpiama medžiaga vadinama pagrindine medžiaga, veikliu agentu, užpildu, vidine faze arba naudingosios fazės faze. Medžiaga, kuri inkapsuliuoja, vadinama danga, membrana, apvaskalu, nešiklio medžiaga, sienelės medžiaga, išorine faze ar matrica.

Kapsulių nešiklio medžiaga, naudojama maisto produktuose ar procesuose, turėtų būti maistinė ir turi sudaryti barjerą tarp veiklaus agento ir jo aplinkos. Galima išskirti du pagrindinius hermetizuojančių dangų tipus: rezervuaro tipą ir matricos tipą (žr. 1.6. pav.). Paveikslėlyje pateikta tik sferinės formos kapsulės, tačiau galimos ir kitokių formų kapsulės. Baltos spalvos zona yra veiklusis agentas, o pilka zona – apvaskalas.



1.6. pav. Inkapsuliavimo tipai, paskutinioji yra pirmųjų dviejų derinys [54]

Rezervuaro tipo kapsulės turi apvaskalą aplink aktyvųjį agentą. Šio tipo produktas gali būti vadinamas kapsule, vieno branduolio tipo ar branduolio su šerdimi tipo produktas. Šio tipo matricoje veiklioji medžiaga yra labiau disperguota nešiklio medžiagoje. Ji gali būti santykinai mažų lašelių formos arba homogeniškai paskirstyta kapsulėje. Matricos tipo kapsulėje, skirtingai nei rezervuaro tipo, aktyviosios medžiagos taip pat gali būti ir paviršiuje (nebent jie turi papildomą dangą, žr. 1.5. pav., padengtos matricos tipas) [54].

#### 1.5. Aktyviųjų medžiagų atsipalaidavimo mechanizmas veiklių medžiagų pernašos sistemose

Gelių tipo nutraceutikai šiuo metu kuriami, norint sukurti veiklių medžiagų pernašos sistemas, lokalizuotas į gaubtinę žarną, siekiant išgydyti apatiniame virškinimo trakte kylančias ligas. Naujausi preparatai, gaubtinės žarnos medžiagų apykaitos aktyvumo didinimu, gaminami iš natūralių, yrančių polimerų. Itin didelis dėmesys skiriamas veiklių medžiagų pernašai polisacharidų geliuose, taikant tik minimalias chemines modifikacijas. Manoma, kad šie polisacharidai su veikliosiomis medžiagomis įsiskverbs į audinius – taikinius ir atliks savo funkcinę paskirtį. Šio tipo pernašos turi didelį potencialą vystant farmacijos produktus, kurie bus skirti storosios žarnos ligoms gydyti, įskaitant kolorektalinę vėžį [20].

Kuriant hidrofiliųjų gelių tipo nutraceutikus, jų matricą gali sudaryti anksčiau aptarti geliacijos agentai (stabilizatoriai) (žr. 1.4.1. skyrių). Hidrofilines gelių matricas galima suskirstyti į dvi grupes:

- klasikines hidrofilines matricas (būdingas neribotas brinkimas);
- riboto brinkimo matricas.

Tarp šių dviejų grupių yra esminis skirtumas, sprendžiant kontroliuojamą veikliųjų medžiagų atpalaidavimo klausimą. Iš gelių, priklausančių neriboto brinkimo grupei, biologiškai aktyvių komponentų išlaisvinimas vyksta difuzijos principu. Tuo tarpu iš riboto brinkimo matricų komponentai yra išlaisvinami tirpikliu.

Neriboto brinkimo hidrofilinių gelių matricas gali sudaryti viena ar keletas žaliavų su veikliosiomis medžiagomis ir hidrofiliniai polimerai. Gelio sąlytyje su vandeniu ar biologiniais skysčiais, nedidelė aktyvaus agento dalis gali ištirpti, o po to – vandens absorbcija ir laipsniška makromolekulių geliacija formuojant didelio klampumo sluoksnį, kuris laikui bėgant storėja. Šis sluoksnis veikia kaip užtvara, kuri kontroliuoja vandens skvarbą gelio centro link. Taip sudaroma kliūtis greitai veikliosios medžiagos difuzijai į išorę. Procesas ir atpalaidavimo greitis priklauso nuo veikliosios medžiagos, gelio ir jo hidratacijos savybių. Be to, hidrofilinės gelių matricos su neribotu brinkimu turi daugiau privalumų:

- paprasta paruošimo technologija;
- naudojamos saugios medžiagos;
- galima pridėti didelį kiekį aktyviųjų medžiagų;
- veikliosios medžiagos išsiskyrimas nepriklauso nuo fiziologinių kintamųjų [55].

Riboto brinkimo matricose veikliosios medžiagos išsiskyrimas aktyvinamos tirpikliu. Šiuose geluose aktyvi vandenyje ir netirpi polimere medžiaga turi neatsipalaiduoti kūno temperatūroje. Struktūros atpalaidavimas molekuliniam lygmenyje vyksta sąlytyje su vandeniu, kad aktyvioji medžiaga galėtų kiekybiškai pasiskirstyti per gelio sluoksnį. Kitos svarbios šio tipo gelių savybės yra polimero brinkimas ir tirpumas vandenyje. Polimerai labai lėtai hidratuoja ir mažai brinksta (apie 100 % nuo pradinio svorio), tačiau jie netirpsta vandenyje. Šias savybes lemia cheminės jungtys polimero struktūroje. Šiuos gelius lengva pagaminti ir į juos galima pridėti aktyviųjų medžiagų, kurios lengvai skyla. Tačiau šie geliai turi mažiau privalumų ir daugiau trūkumų – aktyviosios medžiagos gali skilti gamybos metu nuo temperatūros ar sureaguoti su gelinimo agentu. Taip pat į šiuos gelius galima dėti tik ribotus kiekius aktyviųjų medžiagų [56].

Kai gelis pasiekia kūno biologinį skystį (pvz., skrandžio ir žarnyno), išoriniame sluoksnyje esanti veiklioji medžiaga pirmiausia ištirpinama, o po to ji išsiskiria iš matricos. Tai yra tęstinis dinaminis procesas, apimantis terpės tirpalo ir kietojo aktyviojo agento, sąveiką. Taikant lipidų matricas, hidrofilines neriboto brinkimo matricas ir kitas difuziją kontroliuojančias sistemas, veikliosios medžiagos tirpimo greitis matricoje turi būti didesnis nei ištirpusios ir išsiskiriančios iš matricos veikliosios medžiagos difuzijos greitis [57].

## 1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Pasaulyje aktuali antibiotikams atsparių patogenų problema skatina ieškoti naujų, efektyvių antimikrobinių preparatų, kurie leistų užkirsti kelią jų sukeltamų ligų plitimui. Pageidautina, kad jie būtų natūralios prigimties, pasižymėtų plačiu antimikrobiniu spektru ir būtų priimtini visų amžiaus grupių vartotojui. Būtent dėl šių priežasčių nutraceutikų kūrimas tapo labai populiarus. Nutraceutikų gamybai gali būti naudojami įvairūs komponentai (probiotikai, prebiotikai, antioksidantai, antimikrobiniai polifenoliai ir kt.) ir jų kombinacijos, leidžiančios gauti aukštos pridėtinės vertės antimikrobinius preparatus. Pastaruoju metu atkreiptas dėmesys į pieno rūgšties bakterijas, kurios turi



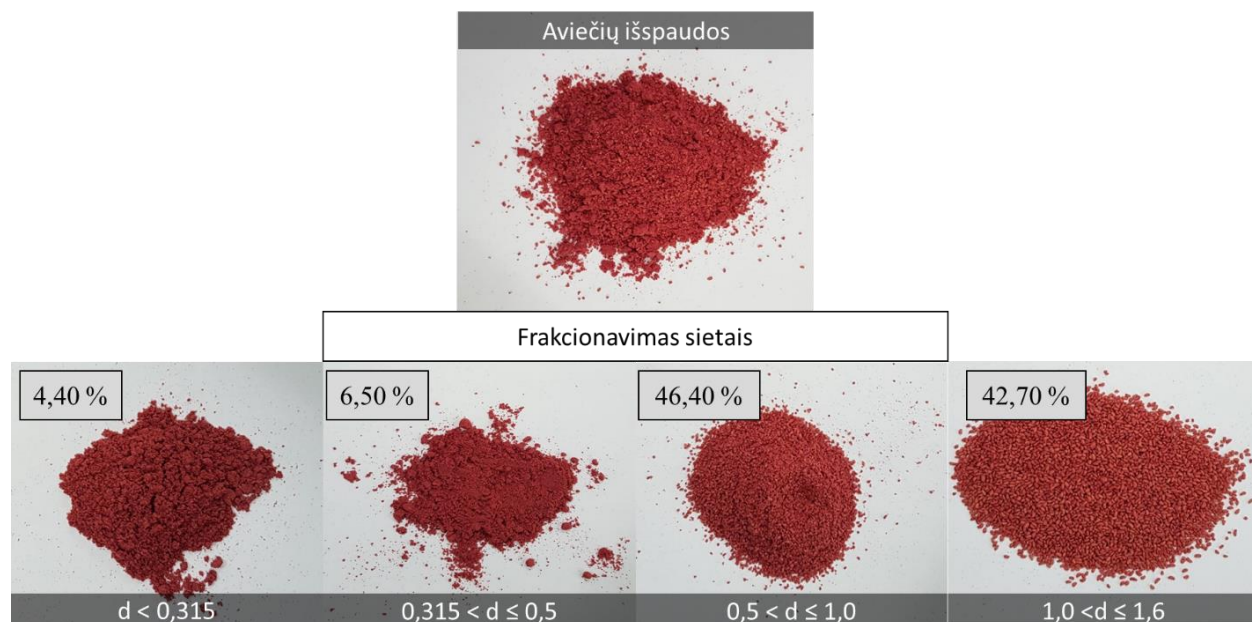
GRAS statusą ir jų metabolizmo produktai pasižymi antimikrobiniu poveikiu. Kaip prebiotikai gali būti naudojami ne tik įvairūs augalai, vaisiai ir daržovės, bet ir jų perdirbimo metu gaunami antriniai produktai (pvz., išspaudos), kurie neretai vertingi, kaip biologiškai aktyvių komponentų šaltinis. Iki šiol uogų išspaudos nesulaukė plataus pritaikymo, nes trūksta racionalių technologinių sprendimų. Tuo tarpu jos galėtų būti panaudotos efektyviau, suteikiant vystomiems nutraceutikams pridėtinę vertę. Išspaudos gali būti funkcionalizuojamos, kad būtų padidintas medžiagų ekstraktyvumas ir virškinamumas, o nutraceutikų su priedais, tekstūra būtų priimtina vartotojui.

Parinkti probiotikai ir prebiotikai ir jų kombinacijos (vadinami sinbiotikais) leistų padidinti antimikrobinių nutraceutikų efektyvumą, sudarant sąlygas bakterijoms išlikti gyvybingesnėms ilgesnį laiką. Nutraceutikai gali būti gaminami įvairių formų (tablečių, kapsulių, miltelių, gelių ir kt.) ir struktūrizuoti priklausomai nuo norimo pasiekti organizme fiziologinio efekto. Hidratuotų gelių tipo nutraceutikai skaitomi kaip vieni iš potencialių veikliųjų medžiagų pernešimo sistemų, skirtų susirgimų gaubtinėje žarnoje gydymui. Hidratuoti geliai gali būti gaminami, naudojant skirtingus stabilizatorius tokius kaip pektinas, agaras, želatina arba virškinimui atsparus krakmolos (modifikuotas stabilizatorius). Priklausomai nuo pasirinktos hidrofilinės matricos galimi įvairūs junginių atsipalaidavimo mechanizmai ir pasiekiamas jų efektyvumas.

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1. Tiriamieji objektai

*Liofilizuotos aviečių išspaudos*, gautos iš LAMMC (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro). Aviečių išspaudų technologiniam funkcionalizavimui buvo naudota sietų sistema *Haver eml digital plus*, esanti KTU Cheminės technologijos fakultete, Silikatų technologijos katedroje. Gautos 4 išspaudų frakcijos, kuriose vyrauja skirtingas dalelių dydis: I frakcijoje –  $d \leq 0,315$  mm; II –  $0,315 < d \leq 0,500$  mm; III –  $0,500 < d \leq 1,000$  mm; IV –  $1,000 < d \leq 1,600$  mm; kontrolei naudotos išspaudos be papildomo apdoravimo (žr. 2.1. pav.).



2.1. pav. Aviečių išspaudų frakcijos (mm) ir kiekvienos jų kiekis procentais

*Kokosų išspaudos*, kurios lieka po augalinių gėrimų gamybos, gautos iš AB „Berief“ (Vokietija). Siekiant padidinti baltymų ekstrakcijos laipsnį, kokosų išspaudų vandeninės suspensijos (7 %) apdorotos aukšto dažnio (850 kHz) ultragarsu, naudojant įvairius intensyvumus ( $0,9 \text{ W/cm}^2$  ir  $2 \text{ W/cm}^2$ ), žemoje temperatūroje ( $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ), taikant skirtingą trukmę (10 ar 30 min.). Šio eksperimento metu buvo keistas pH (4; 7 ir 9), naudojant 1 M citrinų rūgštį ar 1 M natrio hidrokarbonato tirpalą.

Kokosų išspaudų fermentacijai pieno rūgšties bakterijomis (PRB) naudotos vandeninės išspaudų suspensijos (7 %), sonifikuotos 10 min. aukšto dažnio ultragarsu ( $850 \text{ kHz}$ ,  $2 \text{ W/cm}^2$ ) esant pH 7. Mėginiai buvo fermentuoti *Lactobacillus paracasei* NBRC 15889 (244), kuri buvo padauginta MRS skystoje terpėje termostate ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje). Į apdorotą ultragarsu kokosų suspensiją buvo pridėta 2 % PRB bakterijų ir fermentacija vykdyta termostate  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje, 36 val. [58].

*Kviečių natyvus sausas krakmolas*, gautas iš „Roquette Amilina“. Jo funkcionalizavimui ruošta 33 % koncentracijos vandeninė suspensija, kuri apdorota aukšto dažnio (850 kHz) ultragarsu (intensyvumas –  $2 \text{ W/cm}^2$ ). Tiriamų krakmolo mėginių sonifikacija buvo atlikta  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje, taikant skirtingą trukmę (15, 30 ar 45 min.) esant pH 3; 7 ir 9.

*Eteriniai aliejai ar jų mišiniai* (gauti iš – LSMU, Farmacijos fakulteto): greipfrutų, pipirmėčių, arbatmedžių eteriniai aliejai, kurie buvo naudoti tiek skysti, tiek imobilizuoti į paruoštą OSA-

krakmolo tirpalą, padengti enterosoliubilia danga („Eudragit S100“) ir liofilizuoti (naudoti miltelių pavidalu) bei „Eunutritech“ (eterinių aliejų mišinys) tabletės [59].

Papildomai tyrimuose naudotos medžiagos:

- sacharozė (AB „Panevėžio cukrus“);
- gliukozės sirupas (UAB „Mondelez Lietuva Production“);
- saldikliai: maltitolis, eritritolis, sorbitolis (UAB „Mondelez Lietuva Production“);
- agaras (UAB „Mondelez Lietuva Production“);
- pektinas (UAB „Delona“);
- želatina (UAB „Dr. Oatker Lietuva“).

**Hidratuotų gelių ruošimas** vykdytas 3 eksperimento etapais.

*Pirmame etape* buvo vykdoma gelių su funkcionalizuotomis aviečių frakcijomis gamyba (žr. 2.1 lentelę) laboratorinėmis sąlygomis, išbandant įvairius stabilizatorius (agarą, želatiną ir pektiną) ir saldiklius (sorbitolį, maltitolį ir eritritolį). Kontrolei naudoti sacharozės ir gliukozės sirupo mišinys.

Gelių, su aviečių išspaudomis ar jų frakcijomis, gamybai pirmiausiai buvo ruošiamos drebučius sudarančios medžiagos: agaras brinkintas šaltame vandenyje su cukrumi apie 1 val., o po to tirpalas buvo kaitintas kol viskas ištirps. Želatina ar pektinas buvo brinkinamas vandenyje ir tirpinamas kaitinant. Tuo pačiu metu buvo ruošiamas mišinys pagal atitinkamą receptūrą (žr. 2.1. lentelę) iš kitų komponentų (aviečių išspaudų frakcijų, sorbitolio ar gliukozės sirupo kombinacijos su sacharoze/maltitoliu/eritritoliu), homogenizuojant žaliavas iki vienalytės konsistencijos, o po to kaitinant turinį iki virimo. Po to, stabilizatorių tirpalas buvo sumaišomas su receptūriniu mišiniu, gauta masė buvo ataušinta iki 45–50 °C temperatūros. Galiausiai į ją buvo įdėta citrinos rūgštis ir eteriniai aliejai ar PRB fermentuotos kokosų išspaudos (priklausomai nuo receptūros). Turinys buvo sumaišomas ir formuojamas išpilstant į formas.

**2.1. lentelė.** Gelių (I–XIII variantai) su aviečių išspaudų frakcijomis receptūros

Gelių receptūros	Gelių komponentai, %												
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Funkcionalizuotos aviečių išspaudos	10	10	10	20	20	20	20	10	10	10	20	10	10
Funkcionalizuotos kokosų išspaudos	–	–	–	–	–	–	–	20	–	–	–	–	–
Eteriniai aliejai (skysti)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	–	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Agaro tirpalas	20	20	20	20	20	20	20	20	–	–	–	–	–
Želatina	–	–	–	–	–	–	–	–	2	2	2	2	–
Pektinas	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2
Sorbitolis	–	–	45	45	45	–	–	40	50	40	40	–	–
Gliukozės sirupas	30	30	–	–	–	30	30	–	–	–	–	20	–
Sacharozė / maltitolis / eritritolis	–	10	10	–	10	–	10	–	–	10	–	35	60
Citrinų rūgštis	1	1	1	1	1	1	1	–	1	1	1	1	–

Antrame etape išbandytos funkcionalizuotų kokosų išspaudų panaudojimo galimybės hidratuotų gelių gamybai (žr. 2.2. lentelę).

Geliai su kokosų baltymais (žr. 2.2. lentelę, XV variantas) buvo ruošiami agarą sumaišant su vandeniu ir maltitoliu, mišinį brinkinant kambario temperatūroje (trukmė – 1 val.). Po brinkinimo, mišinys buvo verdamas ir gautas agarų sirupas. Atskirai buvo ruoštos vandeninės suspensijos: fermentuotų kokosų išspaudų (7 % koncentracijos) ir aviečių išspaudų (su sorbitoliu), pastaroji buvo kaitinama iki virimo. Po to, agarų sirupas buvo sumaišytas su vandenine aviečių suspensija ir turinys ataušintas iki 45–50 °C temperatūros, buvo pridėta kokosų išspaudų suspensija ir imobilizuoti OSA-krakmole eteriniai aliejai. Turinys buvo gerai sumaišomas ir išpilstytas į formeles.

Papildomai šiame etape analizuotos eterinių aliejų (skystų koncentruotų ir (ar) jų mišinių, miltelių, tablečių ar imobilizuotų krakmole ir aptrauktų enterosoliubilia medžiaga formoje) imobilizavimo galimybės, agarų struktūrizuotuose geliuose: a) *vieno sluoksnio geliuose*, kurie buvo ruošti sumaišant eterinius aliejus (miltelių pavidale) su aviečių išspaudomis, funkcionalizuotomis kokosų baltymingomis medžiagomis, saldiklių mišiniu ir agarų sirupu; b) *trijų sluoksnių geliuose* vidinis sluoksnis – kokosų baltymingas gelis (be eterinių aliejų), o išoriniai sluoksniai buvo sudaryti iš skystų eterinių aliejų ar jų mišinių („Eunutritech“ preparatas tablečių pavidale) kombinacijose su aviečių išspaudomis ir saldikliu (žr. 2.2. lentelę).

**2.2. lentelė.** Geriausios agarų gelių receptūros su eteriniais aliejais

Gelių receptūros	V	VIII	XIV	XV
Gelių komponentai, %				
Funkcionalizuotos aviečių išspaudos	20	10	20	20
Funkcionalizuotos kokosų išspaudos	–	20	–	20
Eteriniai aliejai (skysti/tabletės)	0,3	–	–	–
Eteriniai aliejai (milteliai)	–	–	0,3	0,3
Agarų tirpalas	20	20	20	20
Sorbitolis	45	40	45	35
Maltitolis	10	–	10	5
Citrinų rūgštis	1	–	1	–

*Pastaba.* Gelių struktūrizavimui (trislauksniuose geliuose) buvo pasirinkti V ir VIII variantai, iš kurių V variantas naudotas kaip išorinis sluoksnis, o VIII – vidurinis. Geliai (vienasluoksniai) su eteriniais aliejais (imobilizuotu krakmole ir aptrauktu enterosoliubilia medžiaga) ruošti pagal XV variantą (XIV gelis naudotas kontrolei). Geliai buvo paruošiami atskirai ir supilami į formeles anksčiau aprašytu eiliškumu.

*Trečiame etape* buvo atlikta alternatyvių agarų stabilizatorių paieška. Jo metu tirtos kviečių natyvaus krakmolo modifikavimo ultragarsu galimybės, išbandant sonifikuotas krakmolo suspensijas gelių struktūrizavimui. Natyvinio krakmolo suspensija (33 %) gelių gaminimui buvo apdorota 850 kHz ultragarsu (2 W/cm<sup>2</sup>), 15 min. Agarų gelių formulose buvo keičiamas ultrasonifikuotu krakmolu (žr. 2.3. lentelę).

### 2.3. lentelė. Gelių receptūros su sonifikuotu krakmolu, kaip stabilizatoriumi

Gelių receptūros	XVI	XVII	XVIII	XIX
Gelių komponentai, %				
Funkcionalizuotos aviečių išspaudos	11,1	11,1	9,09	10
Funkcionalizuotos kokosų išspaudos	–	–	18,18	20
Eteriniai aliejai (milteliai)	0,1	0,1	0,1	0,1
Natyvinis krakmolas	22,2	22,2	18,18	20
Sorbitolis	–	11,1	9,09	10

*Pastaba.* Tolesniuose tyrimuose buvo naudoti XVIII ir XIX gelių variantai. XIX gelis buvo gaminamas, apdorojant aukšto dažnio ultragarsu visus komponentus (krakmolą, aviečių išspaudas ir sorbitolį) (vienfazis gaminimo būdas). XVIII gelio ruošimui buvo naudotas didesnis vandens kiekis, nes krakmolas buvo veikiamas atskirai nuo funkcionalizuotų aviečių išspaudų ir sorbitolio (dvifazis ruošimo būdas).

*Geliai su sonifikuoto krakmolo priedais* (aviečių išspaudų ir krakmolo santykis 1:2) buvo gaminami dviem būdais, besiskiriančiais krakmolo apdorojimu – kartu su kitais komponentais (vienfazis būdas) ar atskirai nuo kitų komponentų (dvifazis): a) *vienfaziu būdu* - krakmolo vandeninė suspensija (33 %) apdorojama ultragarsu (žr. 2.1. skyrių, *kviečių natyvus sausas krakmolas*) kartu su aviečių išspaudomis ir sorbitoliu. Gauta masė buvo ataušinta ir į ją buvo dedama PRB fermentuota kokosų išspaudų suspensija bei eteriniai aliejai (XIX variantas); b) *dvifaziu būdu* – krakmolo vandeninė suspensija sonifikuojama atskirai nuo kitų receptūrinių komponentų, po to, antros operacijos metu, ji sumaišoma su pakaitinta iki virimo vandenine aviečių išspaudų suspensija (kartu su sorbitoliu), gauta masė buvo ataušinta iki 50 °C temperatūros ir sumaišyta PRB fermentuotomis kokosų išspaudomis bei eteriniais aliejais (XVIII variantas).

### 2.2. Reagentai

Tiriamajame darbe naudoti šie reagentai: 1 M citrinų rūgštis, 1 M natrio hidrokarbonatas, etanolis, metanolis, jaučio serumo albuminas, Kumasi brilantinio mėlio G250 dažiklio tirpalas (50 mg Kumasi brilantinio mėlio G250 ištirpinama 25 ml 95% etanolio ir įpilama 50 ml 85 % fosforo rūgštis), 30 % akrilamidas, 0,8 % *N,N'*-metilenbisakrilamidas, TRIS, 10 % NDS, 1 N vandenilio chloridas, glicinas, 10 % amonio persulfatas, tetrametiledilendiaminas, DPPH, DMSO, acto rūgštis, 2-merkaptoetanolis, koncentruota sieros rūgštis, boro rūgštis, tašyro indikatorius, trokso rūgštis, galo rūgštis, ABTS, 0,17 mM kalio persulfatas, 7 % natrio karbonatas, Folin – Ciocalteu reagentas, acetonitrilas, buferinis tirpalas su *D*-glutamatu ir natrio azidu, NAD<sup>+</sup> tirpalas, *D*-GPT tirpalas, *D*-LDH tirpalas, *L*-LDH tirpalas, natrio chloridas.

### 2.3. Aparatūra

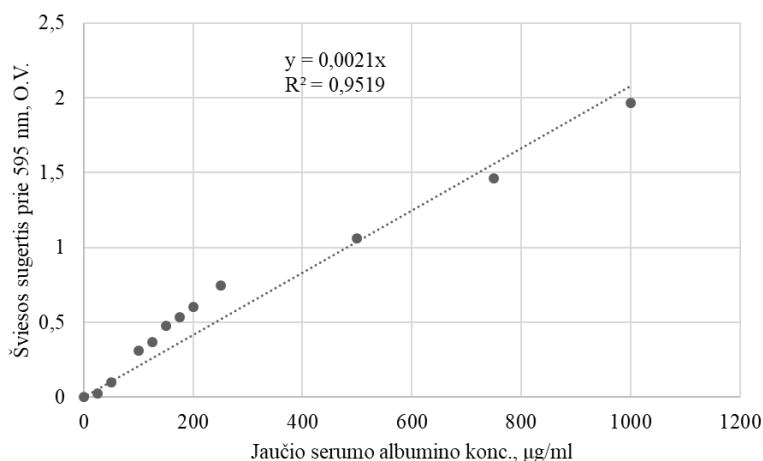
- Laminaras *Telstar BV-100*;
- elektroforezės įranga *Cleaver Scientific Ltd*;
- spektrofotometras *Genesys 10 uv*;
- liofilizatorius *LyoQuest Telstar*;
- pH matuoklis *Sartorius*;

- centrifuga *Microcen 23*;
- centrifuga „epindorf“ mėgintuvėliams *Neolab D–6015*;
- termostatas *Binder*;
- termostatuojama vandens vonelė *Biosam*;
- frakcionavimo aparatas *Haver EML Digital plus, Test Sieve Shaker, 59302 OELDE*;
- vorteksas *Biosan V–1*;
- svarstyklės *Vibra ATX84*;
- autoklavas *Certoclav*;
- tekstūros analizatorius *TA XT plus*;
- akustinis tekstūros analizatorius *MATUOKLIS*;
- frakcionavimo aparatas *Haver eml digital plus*;
- šviesinis mikroskopas *Nikon*;
- magnetinė maišyklė *MSH–300*;
- laboratorinis grūdų malūnėlis *TYP WŽ–1*;
- maišyklė *Ultra Turrax*;
- purtyklė *KS 130 basic (IKA)*;
- distiliatoriaus *Behr Distillation Unit S4, T–Optimus*;
- aukšto efektyvumo skysčių chromatografas.

## 2.4. Tyrimo metodai

### 2.4.1. Baltymų tyrimai

*Baltymų kiekio nustatymas Bradford'o metodu.* Baltymai jungėsi su Kumasi briliantinio mėlio dažikliu ir buvo matuojamas susidariusio komplekso spalvos intensyvumas. Spalvotas junginys susidarė greitai ir buvo stabilus. Susidariusio komplekso spalvos ryškumas priklauso nuo baltymo sudėties. Tyrimui buvo paruošta skirtingų koncentracijų jaučio serumo albumino kalibracinė kreivė. Naudotas 1 mg/ml (1000 µg/ml) koncentracijos tirpalas ir iš jo buvo ruošti atitinkamai 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 500 ir 1000 µg/ml tirpalai. Į visus mėgintuvėlius buvo įpilta po 1,0 ml Kumasi briliantinio mėlio G 250 tirpalo ir sumaišoma su 100 µl mėginio. Supylus, mėginiai buvo laikomi 2 min. kambario temperatūroje. Naudojantis spektrofotometru buvo matuota sugertis ties  $\lambda = 595$  nm ir braižoma kalibravimo tiesė. Ant ordinačių ašies pažymima sugertis, o ant absčių – baltymo kiekis (µg) (žr. 2.2. pav.).



**2.2. pav.** Bradford'o metodo kalibracinė kreivė pagal jaučio serumo albuminą

Tiriamieji mėginiai buvo tirti taip pat, kaip jaučio serumo albumino baltymas. Tiriamųjų mėginių koncentracijos buvo apskaičiuojamos naudojant kalibracinės kreivės lygtį, kuri buvo gauta iš jaučio serumo albumino kalibracinės kreivės [60].

*Baltymų identifikavimas SDS – PAGE elektroforezės metodu.* Atliekant baltymų elektroforezę, kaip molekulinis standartas naudotas baltymų mišinys: SIGMA colorburst „Electrophoresis marker“. SDS – PAGE buvo padarytas naudojant skiriamąjį gelį, sudarytą iš 12 % akrilamido, kurio pH 8,8 ir 4 % koncentruojamojo gelio, kurio pH 6,8. Elektroforezės analizei naudoti tirpalai ir jų paruošimas:

1. 30 % akrilamido/0,8 % *N,N'*-metilenbisakrilamido tirpalas. Tirpalas buvo gaminamas ištirpinant 30 g akrilamido ir 0,8 g *N,N'*-metilenbisakrilamido bei pripildant kolbą vandeniu iki 100 ml.
2. 1,5 M TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas, kai pH 8,8. 36,4 g TRIS buvo ištirpintas 110 ml vandens. Į gautą tirpalą buvo įpilta 8 ml 10 % NDS tirpalo. Tirpalo pH buvo sureguliuotas iki 8,8 su 1 N HCl.
3. 1 M TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas, kai pH 6,8. 12,12 g TRIS buvo ištirpintas 110 ml vandens. Į gautą tirpalą buvo įpilta 8 ml 10 % NDS tirpalo. Tirpalo pH buvo sureguliuotas iki 6,8 su 1 N HCl.
4. Elektroforezės TRIS – glicino buferinis tirpalas. 3 g TRIS, 14,4 g glicino, 1 g NDS ir buvo pripilta vandens iki 1000 ml.
5. 10 % amonio persulfato tirpalas. 0,1 g amonio persulfato buvo ištirpintas 1 ml vandens. Tirpalas buvo ruoštas prieš pat naudojimą.
6. Tetrametiledilendiaminas (TEMED).
7. Spalvos pašalinimo buferis: 400 ml metanolio, 530 ml distiliuoto vandens ir 70 ml 10 % acto rūgšties.
8. 2 × baltymo denatūravimo (pavyzdžio) buferinis tirpalas: 5 ml 4 × TRIS·HCl/NDS buferinis tirpalas, kai pH 6,8, 4 ml glicerolio, 1,2 g NDS, 2 ml 2-merkaptoetanolio, 1 mg Kumasi mėlynojo ir buvo pripilta vandens iki 100 ml.
9. Dažo Kumasi mėlio tirpalas: 10 % acto rūgšties, 0,006 % Kumasi mėlio G–250, 90 % vandens.

Skiriamasis gelis buvo paruoštas imant 3,2 ml distiliuoto vandens, 4 ml akrilamido tirpalo, 2,6 ml 1,5 M TRIS·HCl buferinį tirpalą (pH 8,8), 50 μl 10 % amonio persulfato tirpalas ir 10 μl TEMED. Skiriamasis gelis buvo pilamas tarp elektroforezės prietaiso stiklo plokštelių, likęs viršus buvo užpilamas distiliuotu vandeniu, kad paviršius susidarytų lygus. Gelis buvo paliktas stingti 30–40 min. Koncentruojamasis gelis buvo ruoštas naudojant 3,65 ml distiliuoto vandens, 0,625 ml akrilamido tirpalo, 0,625 ml 1 M TRIS·HCl buferinio tirpalo (pH 6,8), 50 μl 10 % amonio persulfato tirpalas, 5 μl TEMED. Koncentruojamojo gelio tirpalas palengva buvo supilamas tarp prietaiso plokštelių prieš tai nupylus vandenį ir nusašinus gelio paviršių su filtro popieriumi.

Tirtų SDS – PAGE metodu mėginių ekstrakcijos buvo vykdomos su Tris – HCl buferiu santykiu 1:12.

Mėginys elektroforezei buvo paruošiamas imtant norimos koncentracijos, tiriamojo mėginio 20 μl kiekį ir supilant jį su 10 μl redukcinio buferio. Paruoštas mišinys buvo virinamas 5 minutes 95 °C temperatūroje.

Į gelyje esančius tarpus buvo įpilami mėginiai. Elektroforezės prietaisas buvo prijungtas prie elektros srovės šaltinio. Geliams buvo nustatoma 40 mA stiprumo srovė ir 220 V įtampa.

Po elektroforezės poliakrilamido gelis buvo atsargiai atskiriamas nuo stiklo plokštelių ir įdėtas į plastikinę vonelę. Tuomet gelis buvo užpiltas Kumasi mėlio dažo tirpalu. Vonelė buvo lėtai purtoma „KS 130 basic (IKA)“ purtykle kambario temperatūroje, dažyta, kol baltymo juostelės nusidažė norimo ryškumo spalva (1–2 val.). Baigus dažyti, dažai buvo nupilami ir užpiltas dažo nuėmimo buferis. Vonelė buvo purtoma kambario temperatūroje, kol iš gelio išsiplovė nesusirišę su baltymais dažai (10–12 val.). Gelis buvo laikomas dažo nuėmimo buferyje kambario temperatūroje [61].

*Bendras baltymų kiekio nustatymas naudojant Kjeldalio metodą.* Tyrimui atlikti buvo imta 1 g sausos tiriamosios žaliavos (buvo vykdomi 3 pakartojimai ir išvedamas vidurkis) ir įdėta į Kjeldalio kolbas. Žaliava buvo užpilta 20 ml koncentruota sieros rūgštimi. Į kiekvieną kolbą buvo taip pat įdėta po vieną Kjeldalio tablete. Kjeldalio kolbos buvo sudėtos į stovą ir mineralizavimo prietaise buvo lėtai kaitinamos apie 90 minučių. Kaitinimo procesas vyko tol, kol tirpalas kolboje tapo skaidrus ir bespalvis. Atvėsintas tirpalas buvo perpiltas į matavimo kolbą (100 ml) ir praskiestas distiliuotu vandeniu iki žymos. Visos kolbos buvo atvėsintos ir prijungiamos prie distiliatoriaus, naudotas boro rūgšties tirpalas. Kondensatoriaus išėjimo vamzdelio galiukas turėjo būti pamerktas į kūginę 300 ml talpos kolbą distiliatui surinkti. Į gautą distiliatą buvo įlašinamas vienas lašas Taširo indikatorius ir titruojamas vandenilio chlorido tirpalu, kol distiliato spalva iš žalios tapo rausva. Kontrolinis mėginys (distiliuotas vanduo) buvo distiliuotas ir titruotas tokiomis pat sąlygomis.

Azoto kiekis (N) nustatomas procentais arba gramais – 100 gramų tiriamojo mėginio. Skaičiavimai buvo atlikti atsižvelgiant į tyrimui paimtos medžiagos masę, titruojant sunaudotą HCl kiekį, jos koncentraciją ir praskiedimą [62]:

$$N (\%) = 0,014 \cdot (V_1 - V_0) \cdot B \cdot 100 \cdot m \cdot b; \quad (2.1.)$$

čia:

0,014 – azoto kiekis, kurį sujungia 1 ml 0,01 N HCl, g;

$V_1$  – 0,01 M HCl kiekis, sunaudotas iš distiliuojamo mineralizato išsiskyrusiam amoniakui sujungti, ml;

$V_0$  – 0,01 M HCl kiekis, sunaudotas tuščiajam mėginiui nutitruoti, ml;

B – mėginio, mineralizuoto Kjeldalio kolboje, praskiedimo tūris, ml (B = 100);

b – distiliuoti paimtas mineralizato kiekis, ml (jeigu distiliuojamas visas mineralizuotas mėginys (B = b), šis dydis lygus m);

m – pasvertas analizei medžiagos kiekis, g;

100 – daugiklis perskaičiuoti azotui, nustatytame mėginyje, į 100 g produkto.

Baltymų kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$B_{pr} = N \cdot k; \quad (2.2.)$$



čia:

N – azoto kiekis;

k – atitinkamas koeficientas perskaičiuoti azoto kiekį į baltymų kiekį,  $k = 6,25$  [63] (koeficientas naudojamas bendru atveju)

#### 2.4.2. Antimikrobinių savybių tyrimai

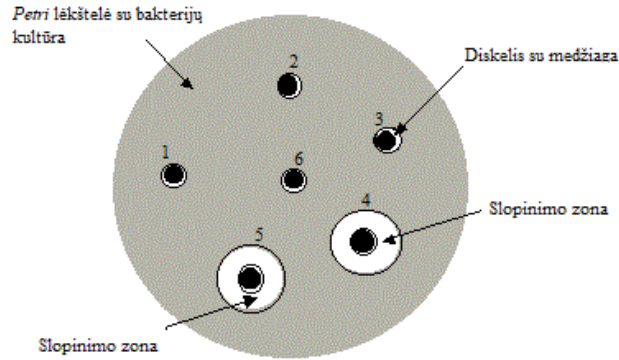
Skystų eterinių aliejų antimikrobinės savybės buvo tirtos naudojant įvairias koncentracijas: 100, 50, 10, 1, 0,3, 0,1 % (naudojant abu antibakterinio aktyvumo metodus). Vertinant didesnių koncentracijų eterinių aliejų tirpalus (100, 50, 10 %), patogeninių bakterijų slopinimas buvo per didelis, naudojant abu antibakterinio aktyvumo metodus, todėl visiems eteriniams aliejams tirti buvo naudota ta pati 1 % konc. Kieti eteriniai aliejai buvo tirti naudojant tą pačią koncentraciją, kuri naudojama gelių gamyboje – 0,03 %. Atlikus tyrimą agaru difuziniu ir šulinėlių metodais nustatyta, kad DMSO, kuriame buvo tirpinami eteriniai aliejai, antibakteriniu aktyvumu nepasižymėjo.

*Antibakterinio aktyvumo nustatymas šulinėlių agaru difuziniu metodu.* Tiriamų medžiagų antibakterinis aktyvumas buvo nustatinėjamas prieš patogenines bakterijas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Bakterijų skiedimui buvo gaminamas fiziologinis tirpalas: buvo ištirpinta 9 g natrio chlorido viename litre distiliuoto vandens. Sterilizuojama 15 min. 121 °C temperatūroje autoklave ir po to tirpalas buvo atvėsintas. Bakterijos buvo atgaivinamos sėjant jas ant standžios „Nutrient“ agaru terpės. Bakterijos buvo augintos termostate 37 °C temperatūroje. Po 24 valandų atgaivintos bakterijos buvo perkeliamos į fiziologinį skystį ir ruošiamos pagal McFarland'o standartą Nr. 1 ( $1,5 \cdot 10^8$  KSV/ ml) t. y. buvo stebėta ar paruoštos bakterijų suspensijos drumstumas atitinka McFarland'o suspensijos drumstumą.

Metodui buvo naudota standi „Nutrient“ agaru terpė, kuri buvo sterilizuojama 15 min. 121 °C temperatūroje autoklave ir po to atvėsinama. Ant sustingusios terpės paviršiaus buvo pasėjama atitinkamos rūšies 100 µl, paruoštų pagal anksčiau aprašyta metodiką, patogeninių bakterijų ir su skleistuvu jos buvo įtrinamos į terpę. Pasėjus patogenines bakterijas su steriliu cilindru buvo išpjauamos šešios 6 mm skersmens skylės ir agaras pašalinamas. Į šulinėlius buvo dozuojuama po 100 µl tiriamųjų reikiamos koncentracijos tirpalų. *Petri lėkštelės* buvo laikomos termostate 37 °C temperatūroje. Antimikrobinis poveikis prieš patogenines bakterijas buvo vertinamas po 24 valandų. Vertinama skaidri zona aplink įdubą, išmatuojant skersmenį horizontalia ir vertikalia kryptimi. Iš gautų duomenų buvo išvestas vidurkis ir apskaičiuotas slopinimo zonos skersmuo [64].

*Antibakterinio aktyvumo nustatymas diskelių agaru difuziniu metodu.* Tiriamų medžiagų antibakterinis aktyvumas buvo nustatinėjamas prieš patogenines bakterijas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Metodui buvo naudota standi „Nutrient“ agaru terpė, kuri buvo sterilizuojama 15 min. 121 °C temperatūroje autoklave ir po to buvo atvėsinta. Ant sustingusios terpės paviršiaus buvo pasėjama atitinkamos rūšies 100 µl, patogeninių bakterijų ir su skleistuvu jos buvo įtrinamos į terpę. Ant terpės buvo išdėliojami 6 sterilūs popieriniai diskai. Diskai buvo suvilgyti 10 µl tiriamojo tirpalo. *Petri lėkštelės* buvo sudėtos į termostatą 37 °C. Po 1–2 parų stebėtas antibakterinis poveikis. Slopinimo zonos matuotos su liniuote ir atimta popierinių diskų plotis (0,6 cm) [65].



2.3. pav. Agaro difuzinis metodas [65]

#### 2.4.3. Fenolinių junginių tyrimai

*Kiekybinis fenolinių junginių kiekio nustatymas Folin – Ciocalteu metodu.* Suminiam fenolinių junginių kiekio nustatymui buvo naudojamas Folin – Ciocalteu metodas. Buvo paruoštas 7,5 % natrio karbonato tirpalas: 100 ml matavimo kolboje distiliuotame vandenyje ištirpinta 7,5 g natrio karbonato. Gautas tirpalas buvo praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki žymos.

Darbinio Folin – Ciocalteu reagento paruošimas: Folin – Ciocalteu reagentas buvo praskiedžiamas distiliuotu vandeniu santykiu 1:9. Tiriamajam tirpalui paruošti buvo imta 0,5 ml tiriamo ekstrakto, kuris buvo sumaišomas su 2,5 ml darbinio Folin – Ciocalteu reagento ir pridėta 2 ml natrio karbonato tirpalo. Gautas mišinys buvo laikomas tamsoje, kambario temperatūroje 1 val. Spektrofotometru buvo išmatuota mišinio absorbcija esant 765 nm bangos ilgiui. Esant didesnei absorbcijai nei etaloninių galo rūgšties tirpalų kalibracinio grafiko absorbcijos reikšmėms, ekstraktai buvo skiesti. Palyginamasis tirpalas ruošiamas taip pat, tačiau vietoje tiriamo ekstrakto buvo dedama parinktos koncentracijos metanolio arba eterinių aliejų tyrimo atveju su DMSO.

Etaloninis galo rūgšties tirpalas buvo ruošiamas 0,025 g elago rūgšties tirpinant 25 ml kolbutėje su distiliuotu vandeniu iki žymės. Ruošiami 5 galo rūgšties tirpalai 10 ml kolbutėse: 0,1 ml, 0,25 ml, 0,5 ml, 0,75 ml, ir 1 ml etaloninio tirpalo iki žymės. Tiek tiriamasis, tiek ir palyginamasis galo rūgšties tirpalai buvo paruošti tomis pačiomis sąlygomis kaip ir tiriamojo augalinio ekstrakto tirpalas. Tik vietoje 0,5 ml tiriamojo ekstrakto imta 0,5 ml žinomos koncentracijos (0,01 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,075 mg/ml ir 0,1 mg/ml) galo rūgšties tirpalų. Išmatavus absorbciją buvo sudaroma galo rūgšties kalibracinė kreivė (žr. 2.4. pav.).

Suminis fenolinių junginių kiekis išreiškiamas galo rūgšties gramui žaliavos. Jis apskaičiuojamas pagal formulę [66]:

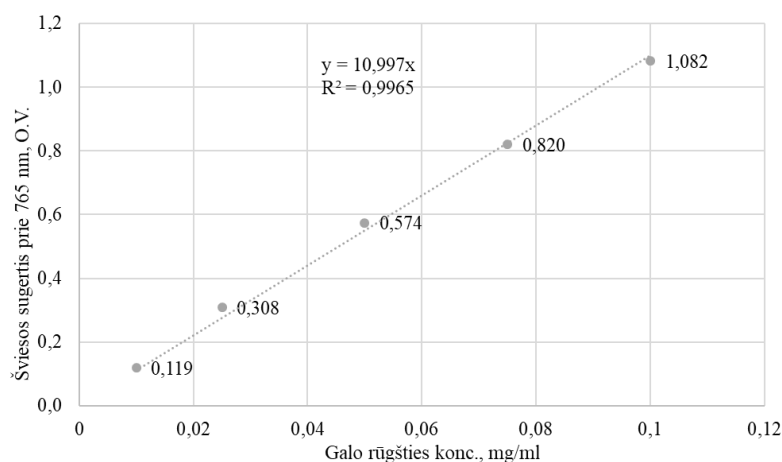
$$\text{galo rūgšties ekvivalentas (mg/g)} = c \cdot V / m; \quad (2.3.)$$

čia:

c – galo rūgšties koncentracija mg/ml nustatyta iš kalibracinės kreivės;

V – ekstrakto tūris ml;

m – atsvertas žaliavos kiekis, g.



**2.4. pav.** Folin – Ciocalteu metodo kalibracinė kreivė pagal galo rūgštį

*Kokybinis fenolinių junginių kiekio nustatymas aukšto efektyvumo skysčių chromatografija.* Tiriamojoje žaliavoje esantys fenoliniai junginiai kokybiškai buvo nustatinėjami HPLC metodu LSMU FF. Fenolinių junginių chromatografinis atskyrimas buvo atliktas naudojant ACE C18 kolonėlę (250 mm x 4,6 mm, 5,0 μm; Pensilvanija, JAV). Eliuavimas buvo atliktas 1 ml/min. srauto greičiu. Judančiosios fazės binarinė tirpiklių sistema susideda iš tirpiklio A (0,1 % acto rūgšties vandenyje) ir tirpiklio B (acetonitrilo). Po ultragarsinio degazavimo visi tirpikliai buvo filtruojami per 0,23 μm membraninį filtrą. Taikyta linijinė gradiento programa: 0–8 min., 5–15 % B; 8–30 min., 15–20 % B; 30–48 min., 20–40 % B; 48–58 min., 40–50% B; 58–65 min., 50 %; 65–66 min., 50–95 % B. Kolonėlės temperatūra buvo pastovi 25 °C. Mėginio tirpalo injekcijos tūris buvo 20 μl [67].

#### 2.4.4. Antioksidacinio aktyvumo tyrimai

*Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu.* Fenoliniai junginiai pasižymi antioksidaciniu aktyvumu, nes geba išaktyvinti laisvuosius radikalus. Reakcijos metu, antioksidantas atiduoda vandenilį ir išlaisvina laisvuosius radikalus. Violetinis DPPH tampa stabiliu junginiu, kuris yra geltonos spalvos DPPH-H.

Tyrimui atlikti buvo paimta susmulkintos išdžiovintos medžiagos, kuri buvo užpilta 10 ml metanolio ir homogenizuota 10 min. Homogenatas buvo centrifuguojamas 9000 aps./min. 10 min. ir supernatantas surenkamas. Tiriant eterinius aliejus, buvo imtas norimas eterinio aliejaus kiekis ir maišomas su DMSO. Tiriamasis tirpalas buvo ruoštas į mėgintuvėlį įpilant 0,5 ml paruošto ekstrakto, 0,5 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turinys sumaišytas ir po 15 min. laikymo tamsoje buvo pamatuotas tirpalo optinis tankis prie 515 nm bangos ilgio. Palyginamasis tirpalas ruoštas į mėgintuvėlį įpilant 0,5 ml metanolio, 0,5 ml DPPH etaloninio tirpalo. Etaloninis DPPH tirpalas ruoštas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje. Tiriamo mėginio radikalo slopinimas buvo išskaičiuojamas iš kalibracinės kreivės.

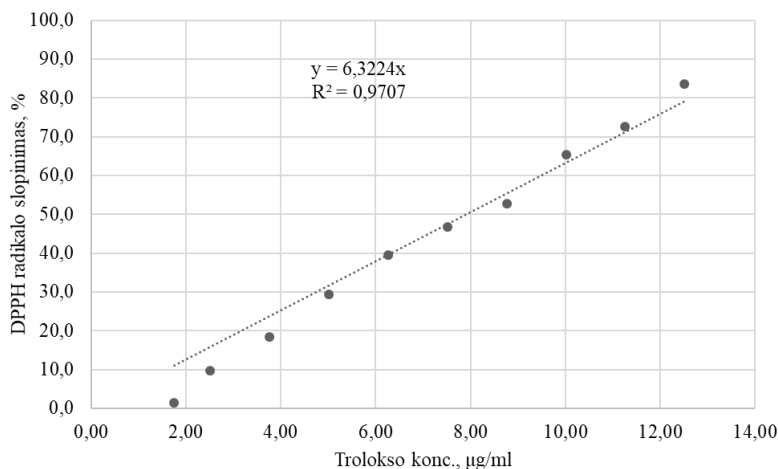
Trolokso kalibracinės kreivės ruošimas. Buvo imti įvairių koncentracijų trolokso tirpalai (0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml). Trolokso mėginiai buvo paruošti matavimams lygiai taip pat, kaip prieš tai aprašyti mėginiai. Panaudojus formulę (žr. 2.4. formulę) buvo apskaičiuotas skirtingų koncentracijų trolokso tirpalų DPPH radikalo slopinimas. Panaudojus rezultatus buvo brėžiama kalibracinė kreivė (žr. 2.5. pav.): ant ordinačių ašies buvo pažymėta sugertis, o ant absčių – DPPH radikalo slopinimas (%) [68].

$$\text{slopinimas (\%)} = [(A_B - A_A) / A_B] \cdot 100; \quad (2.4.)$$

čia:

$A_B$  – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

$A_A$  – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.



**2.5. pav.** DPPH radikalo slopinimo kalibracinė kreivė pagal trolokso rūgštį

*Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu.* 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfoninės rūgšties) 2,45 mM tirpalas buvo ruošiamas ABTS ištirpinant distiliuotame vandenyje. Po to, gautas tirpalas santykiu 1:1 buvo sumaišomas su 0,17 mM kalio persulfatu ir paliktas stovėti tamsoje 16 val. Darbinis tirpalas buvo ruošiamas pradinį ABTS tirpalą skiedžiant iki 0,80 absorbcijos vienetų su metanolium, nustatant 734 nm bangos ilgį. Buvo paimta 2 ml darbinio ABTS tirpalo ir įpilta 20 µg tiriamojo ekstrakto. Gautas mišinys buvo laikomas tamsoje, po 1 val. spektrofotometru išmatuotas jo absorbcijos pokytis, nustačius 734 nm bangos ilgį. Pagal trolokso kalibracijos kreivę buvo apskaičiuojami gauti absorbcijos dydžiai, atitinkantys trolokso koncentracijas (mg/ml).

Trolokso kalibracinės kreivės ruošimas. Buvo imti įvairių koncentracijų trolokso tirpalai (0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml). Trolokso mėginiai buvo paruošti matavimams lygiai taip pat kaip prieš tai aprašyti mėginiai DPPH metodu. Panaudojus formulę (žr. 2.5. formulę), buvo apskaičiuotas trolokso skirtingų koncentracijų tirpalų ABTS radikalo slopinimas. Panaudojus rezultatus buvo brėžiama kalibracinė kreivė (žr. 2.6. pav.): ant ordinačių ašies buvo pažymėta sugertis, o ant absčių – ABTS radikalo slopinimas (%) [69].

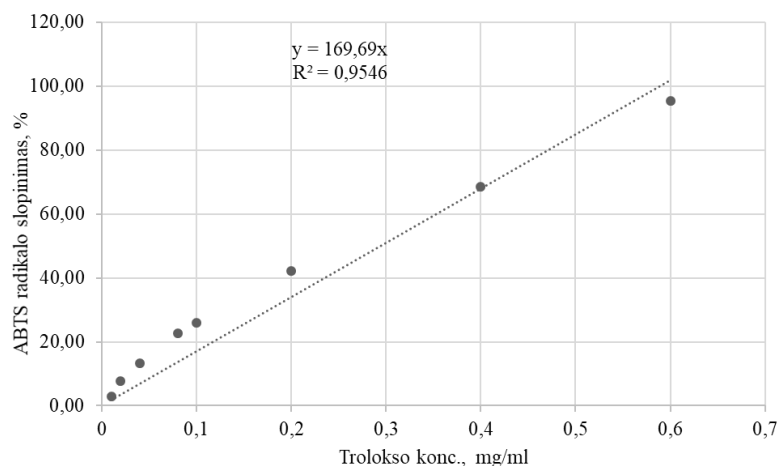
$$\text{slopinimas (\%)} = c \cdot V / m; \quad (2.5.)$$

čia:

$c$  – trolokso koncentracija pagal kalibracijos kreivę (mg/ml);

$V$  – paruošto ekstrakto tūris, ml;

$m$  – žaliavos kiekis, g.



2.6. pav. ABTS radikalo slopinimo kalibracinė kreivė pagal trolokso rūgštį

#### 2.4.5. Fermentacijos proceso vertinimas

*PRB bakterijų dauginimasis fermentacijos metu.* Fermentacijos metu imti mėginiai PRB kiekio įvertinimui. PRB kolonijų, išaugintų standžioje terpėje aerobinėmis sąlygomis 30 °C temperatūroje, skaičius nustatytas taikant bendrą skaičiavimo metodą. Mėginys analizuotas giluminio sėjimo MRS agare būdu.

Fermentacija vyko ant tiriamosios žaliavos anksčiau aprašytų tirpalų pridėjus 2 % LAB. Mėginiai, pieno rūgšties izomerų nustatymui ir bakterijų skaičiui nustatyti, buvo imami kas 6 valandas ir fermentacija buvo vykdoma tol, kol pH terpė nebekito. Fermentuojami mėginiai buvo laikomi termostate 30 °C temperatūroje.

PRB procesas buvo vertintas tiriant: pH pokyčius, PRB dauginimąsi ir susidariusius pieno rūgšties *D(-)* ir *L(+)* izomeras. Analizuojamo mėginio pH matuojamas pH metru. PRB kolonijų, išaugintų standžioje terpėje aerobinėmis sąlygomis 30 °C temperatūroje, skaičius buvo nustatytas taikant bendrą skaičiavimo metodą. Mėginiai buvo analizuojami paviršinio sėjimo MRS agare būdu. Pagaminamas PRB skaičiaus analizei reikiamas kiekis fiziologinio tirpalo (0,9 % natrio chlorido tirpalas) ir MRS agarų terpės. Terpė buvo supilta į *Petri* lėkštes ir jai sustingus dedamas 1 ml tiriamosios medžiagos, su skleistuvu mėginys įtrinamas į terpę. Lėkštelės apverčiamos ir laikomos 30 ± 1 °C temperatūros termostate. Pasibaigus inkubavimo laikui, skaičiavimui buvo atrenkamos lėkštelės, kuriose išaugo mažiausiai 15 ir ne daugiau kaip 300 bakterijų kolonijų. Suskaičiuotos išaugusios kolonijos ir apskaičiuotas jų kiekis 1 g tiriamojo mėginio pagal šią formulę [70]:

$$N = \sum C \cdot V \cdot (n_1 + (0,1 \cdot n_2)) \cdot d; \quad (2.6.)$$

čia:

$\Sigma C$  – suma kolonijų, suskaičiuotų visose neatmestose lėkštelėse iš dviejų vienas po kito einančių skiedinių, kai bent vienoje lėkštelėje yra 15–300 kolonijų;

V – užsėtos medžiagos ar skiedinio tūris lėkštelėje (ml);

$n_1$  – pirmojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;

$n_2$  – antrojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;

d – pirmojo vertinamo skiedinio skiedimo koeficientas.

Pieno rūgštis  $D(-)$  ir  $L(+)$  izomerų kiekio įvertinimas

*Pieno rūgštis  $D(-)$  ir  $L(+)$  izomerų kiekiai buvo įvertinti taikant fermentinį Megazyme analizės testą. K-DLATE 08/18 (Megazyme International, Airija). Skirtingais fermentacijos proceso momentais paimti mėginiai buvo centrifuguojami 10 min., 8000 aps./min. centrifugoje. Supernatantas buvo surenkamas tyrimui atlikti. Į mėgintuvėlį įpilama 1,5 ml distiliuoto vandens, 0,1 ml tiriamojo mėginio, 0,5 ml buferio, 0,1 ml NAD<sup>+</sup> ir 0,02 ml  $D$ -GPT tirpalo. Reakcijos mišinys buvo laikomas 3 min. ir matuota mėginio absorbcija ( $A_1$ ). Išmatavus absorbciją  $A_1$ , į tą patį mišinį buvo įpilama 0,02 ml  $D$ -LDH. Mėginys buvo išmaišomas ir laikomas 5 – 10 min., po to matuojama mėginio absorbcija ( $A_2$ ). Išmatavus absorbciją  $A_2$ , į tą patį mišinį buvo įpilama 0,02 ml  $L$ -LDH. Mėginys buvo išmaišytas ir laikytas 10–15 min., matuota absorbcija ( $A_3$ ). Ruošiant tuščią mėginį tyrimo eiga buvo tokia pat, tačiau į jį vietoje mėginio įpiltas toks pat kiekis distiliuoto vandens. Pieno rūgštis  $D(-)$  ir  $L(+)$  izomerų kiekis apskaičiuotas pagal šias formules:*

$$\Delta A_{D\text{-pieno rūgštis}} = A_2 - A_1; \quad (2.7.)$$

$$\Delta A_{L\text{-pieno rūgštis}} = A_3 - A_2; \quad (2.8.)$$

$D(-)$  ir  $L(+)$  izomerų koncentracijos mėginyje apskaičiuotos naudojantis šias formules:

$$C_{D\text{-pieno rūgštis}} = \frac{V \cdot MW}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A_{D\text{-pieno rūgštis}}; \quad (2.9.)$$

$$C_{L\text{-pieno rūgštis}} = \frac{V \cdot MW}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A_{L\text{-pieno rūgštis}}; \quad (2.10.)$$

čia:

V – reakcijos mišinio tūris (ml);

MW – pieno rūgštis molekulinė masė (g/mol);

$\varepsilon$  – NADH ekstinkcijos koeficientas (esant 340 nm bangos ilgiui lygus  $6300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ );

d – kiuvetės ilgis (cm);

#### 2.4.6. Funkcinių savybių tyrimai

*Vandens įgerties ir tirpiųjų medžiagų nustatymas.* Į pasvertus 250 ml centrifugos indelius buvo pasverti 5 g mėginio ir 30 ml distiliuoto vandens. Indeliai su mėginiais buvo šildyti 30 min. 30 °C vandens vonioje maišant. Po inkubavimo, mėginiai įdėti į centrifugą 20 min., 4000 aps./min. Po centrifugavimo skystis susidaręs viršuje buvo išpilamas į stiklinius indelius, kurie prieš tai buvo iškaitinti iki pastovios masės. Indeliai su nuosėdomis pasveriami.

$$\text{Vandens įdėrimo indeksas} = \text{sedimento svoris} / \text{sauso mėginio masė (5 g)}; \quad (2.11.)$$

$$\text{Tirpių medžiagų kiekis (\%)} = \text{sauso supernatanto masė} / \text{sauso mėginio masė (5 g)}; \quad (2.12.)$$

$$\text{Medžiagos vandens įgėrimo galia} = \text{sedimento svoris} / (\text{sauso mėginio svoris (1 – Netirpių medžiagų kiekis (\%)/100)}); \quad (2.13.)$$

#### 2.4.7. Hidratuotų gelių tekstūros, struktūros ir stabilumo analizė

Pagaminti geliai buvo analizuojami tekstūros analizatoriumi „TAXT plus Texture Analyser“. Analizei buvo naudota po 30–50 g gelių. Matavimo kūnas 20 mm skersmens aliuminis cilindras, matavimo greitis 1 mm/s. Kai matavimo cilindras pasiekia mėginio paviršių matavimo geometrijoje sminga 5 mm. Maksimalios jėgos pikas (N) parodo gelio tvirtumą – kuo didesnė jėga, tuo mėginys tvirtesnis. Kreivės teigiama sritis po šiuo tašku nusako gelio konsistenciją ( $g \cdot s$ ) – kuo didesnė vertė, tuo konsistencija tirštesnė, tvirtesnė. Kreivės neigiama sritis, kuri gaunama zondui grįžtant atgal, parodo mėginio rišlumą/koheziją (cohesiveness) (N) ir klampumą ( $g \cdot s$ ) – kuo didesnė minusinė vertė, tuo mėginys rišlesnis ir klampesnis. Pagaminti geliai buvo analizuojami iškart po ataušinimo (1 val.) ir po 24 val.

Gelių klampumas buvo matuotas naudojant akustinį lygio matavimo aparatą „MATUOKLIS“. Analizei naudojama 30–50 g gelio. Matavimo kūnas sminga į gelį ir taip nustatomas gelio kietumas. Rezultatai gaunami naudojantis „MATUOKLIO“ programa.

Hidratuotų gelių struktūra buvo analizuota optiniu mikroskopu Nikon.

#### 2.4.8. Biologiškai aktyvių medžiagų *in vitro* atsipalaidavimo testas

Simuliuotos skrandžio sultys buvo sudarytos iš 9 g/l natrio chlorido ir 3 g/l pepsino. Tirpalo pH buvo nustatytas iki 2 su 1 M druskos rūgšties tirpalu (pH reguliuojamas prieš dedant fermentą). Į 50 ml terpę buvo įdėta apie 1 g tiriamosios medžiagos. Pagamintos skrandžio sultys buvo laikomos 37 °C temperatūroje. Mėginiai atpalaidavo tyrimui buvo imti po 5, 30, 60 ir 120 min. Buvo imta po 5 ml mėginio tolesniam tyrimui. Praėjus 120 min. buvo paimama skrandžio sulčių pH buvo nustatytas iki 7,5 su 0,2 M natrio karbonatu siekiant inaktyvuoti pepsiną.

Simuliuotos žarnyno sultys buvo gamintos iš 1,670 g/l kalio chlorido, 0,44 g/l kalcio chlorido, ir 2,772 g/l natrio hidrokarbonato. Pagamintos žarnyno sultys buvo laikomos 37 °C temperatūroje. Po skrandžio sulčių tyrimo, buvo imta 25 ml skrandžio sulčių ir maišyta su tokiu pačiu kiekiu žarnyno sulčių. Mėginiai atpalaidavimo tyrimui imti po 60, 90 ir 150 min. Buvo imta po 5 ml mėginio tolesniam tyrimui. *In vitro* atpalaidavimo tyrimui buvo atliekamas bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas Folin – Ciocalteu metodu (žr. 2.4.3. skyrių) [71, 72].

#### 2.5. Matematinė statistinė duomenų analizė

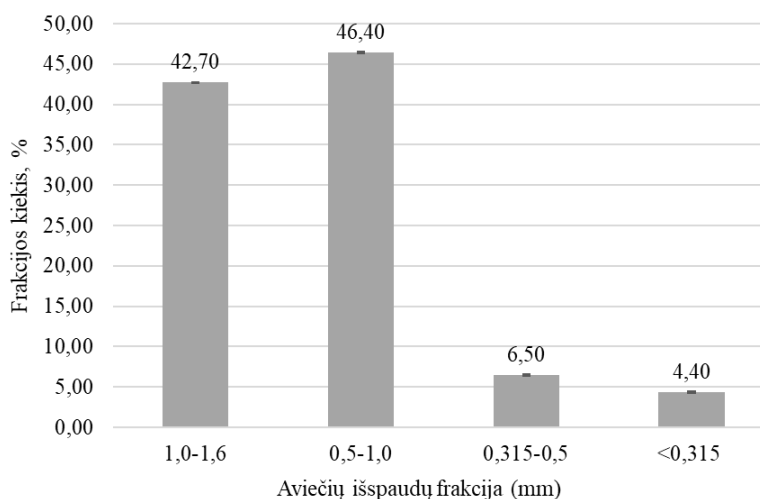
Eksperimentai kartoti tris kartus. Rezultatų vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai apskaičiuoti naudojant Microsoft Excel programinį paketą.

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Technologinis augalinės žaliavos funkcionalizavimas biologiškai aktyvių medžiagų imobilizavimui

##### 3.1.1. Sausojo separavimo taikymas aviečių antrinių perdirbimo produktų pridėtinės vertės didinimui

Aviečių išspaudoms buvo taikomas sausas separavimas, leidžiantis jas frakcionuoti pagal granulimetrinę sudėtį. Gautos frakcijos ir jose vyraujančių dalelių dydžiai pateikti 3.1. paveiksle.



**3.1. pav.** Granulimetrinė aviečių išspaudų frakcijų sudėtis

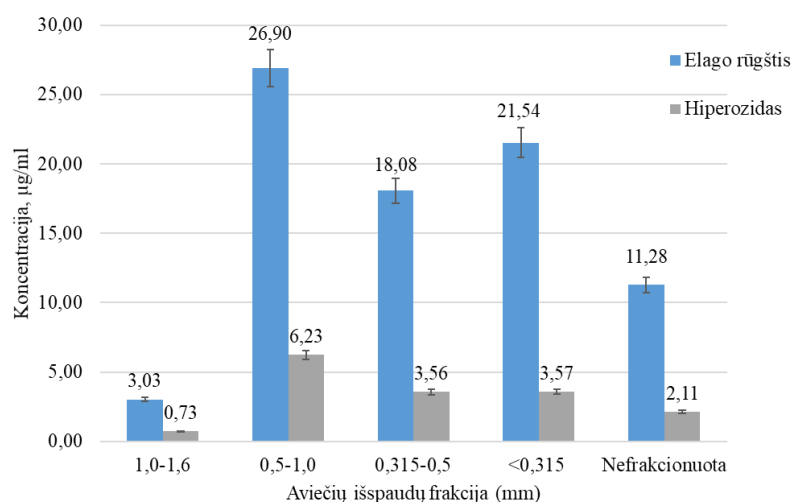
Aviečių išspaudose daugiausiai gauta frakcijos, kurioje vyraujančių dalelių dydis buvo 0,5–1,0 mm (46,40 %), mažiausiai buvo aptikta smulčiausios frakcijos (4,40 %).

##### 3.1.1.1. Fenolinių junginių aviečių išspaudų frakcijose kokybinė ir kiekybinė sudėtis

Šiame skyriuje pateikti fenolinių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties aviečių išspaudų frakcijose tyrimo rezultatai.

HPLC metodu tirtuose mėginiuose buvo identifikuoti du fenoliniai junginiai – elago rūgštis ir hiperozidas. Aviečių išspaudų frakcijos, gautos sausojo separavimo būdu, skyrėsi pagal gautas fenolinių junginių koncentracijas. Daugiausiai elago rūgšties ir hiperozido buvo nustatyta vidutinėje pagal stambumą aviečių išspaudų frakcijoje (atitinkamai 26,90 ir 6,23  $\mu\text{g/ml}$ ), kurioje dalelių dydis buvo 0,5–1,0 mm. Mažiausiai fenolinių junginių aptikta stambiausioje frakcijoje (3,03 ir 0,73  $\mu\text{g/ml}$ ), kurioje vyraujantis dalelių dydis – 1,0–1,6 mm. Vizualiai apžiūrint stambiausią frakciją, joje vyravo aviečių sėklos (žr. 3.2. pav.).





**3.2. pav.** Identifikuotų fenolinių junginių kiekiai aviečių išspaudų frakcijose

Bendro fenolinių junginių kiekio tyrimui aviečių išspaudų frakcijose buvo naudotas Fiolin – Ciocalteu metodas (žr. 3.1. lentelę).

**3.1. lentelė.** Bendras fenolinių junginių kiekis aviečių išspaudų frakcijose

Vidutinis dalelių dydis frakcijose, mm	Fenolinių junginių kiekis (galo rūgšties ekvivalentas), mg/g sausos medžiagos
<0,315	5,82 ± 0,00
0,315–0,5	16,87 ± 0,39
0,5–1,0	17,10 ± 0,39
1,0–1,6	19,16 ± 0,01
Aviečių išspaudos (nefrakcionuota kontrolė)	15,60 ± 0,03

Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis aptiktas frakcijose, kuriose dalelių dydis buvo 0,5–1,0 mm ir 1,0–1,6 mm (atitinkamai 17,10 mg/g ir 19,16 mg/g). Pastebėta, kad mažėjant frakcijos stambumui, bendras fenolinių junginių kiekis mažėja. Šio eksperimento metu mažiausias fenolinių junginių kiekis (5,83 mg/g) aptiktas smulkiausioje frakcijoje (<0,315). Kontroliniame mėginyje (nefrakcionuotose aviečių išspaudose) bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas vidutiniškai 11 % mažesnis nei gautose frakcijose (0,315–0,5; 0,5–1,0; 1,0–1,6 mm) po separavimo. Lyginant šiame eksperimente gautus tyrimų rezultatus su literatūra, tirtose liofilizuotų aviečių išspaudose bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas apie 2 kartus mažesnis nei J. J. Vulič ir kt. [73] darbe tirtose šviežiai skintose ir liofilizuotose avietėse [73]. Tokie, nustatyti fenolinių junginių skirtumai tarp išspaudų ir šviežių uogų, rodo, kad ~ 66 % fenolinių junginių patenka į sultis ir ~ 34 % į išspaudas.

### 3.1.1.2. Biologinis aviečių išspaudų aktyvumas ir jam įtakos turintys veiksniai

*Aviečių antioksidacinis aktyvumas* tirtas DPPH ir ABTS radikalų slopinimo metodais. Tyrimų rezultatai pateikti 3.2. lentelėje. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu abiem metodais pasižymėjo smulkiausia frakcija (<0,315 mm) ir vidutinė pagal stambumą (0,5–1 mm) frakcijos (žr. 3.2. lentelę). Tiriant antioksidacinį aktyvumą pagal ABTS radikalų slopinimą, buvo stebima, kad didėjant frakcijų stambumui mėginių antioksidacinė geba mažėja. Tuo tarpu, tyrimų rezultatai, gauti DPPH metodu, neparodė statistiškai reikšmingų skirtumų tarp mėginių.

### 3.2. lentelė. Aviečių frakcijų antioksidacinių tyrimų pagal DPPH ir ABTS vertės

Vidutinis dalelių dydis frakcijose, mm	DPPH (trolokso ekvivalentas mg/g ekstrakto)	ABTS (trolokso ekvivalentas mg/g ekstrakto)
<0,315	47,07 ± 0,18	41,2 ± 0,55
0,315–0,5	41,58 ± 0,36	39,91 ± 0,55
0,5–1,0	44,52 ± 0,54	39,77 ± 0,11
1,0–1,6	41,97 ± 0,18	40,12 ± 1,45
Aviečių išspaudos (nefrakcionuota kontrolė)	47,07 ± 0,18	36,22 ± 0,36

Lyginant gautus aviečių išspaudų tyrimų rezultatus su literatūroje pateiktais aviečių antioksidacinio aktyvumo rezultatais, įvertinta, kad aviečių išspaudos pasižymėjo apie 2–3 kartus mažesniu antioksidaciniu aktyvumu nei avietės. Todėl galima daryti prielaidą, kad į sultis pereina dauguma tirpių antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių. Be to, sulčių išgavimo procesas galėjo turėti įtakos antioksidacinio aktyvumo pokyčiams [74].

*Antibakterinis aviečių aktyvumas* buvo nustatytas prieš antibiotikams atsparius patogenus šulinėlių metodu (žr. 3.3. pav.). Aviečių išspaudų ekstraktas stipriausiai slopino *S. typhimurium* gramneigiamą bakteriją, o mažiausiai – *B. cereus* (metanolio kontrolė patogenų neslopino). Lyginant šiame eksperimente gautus liofilizuotų aviečių išspaudų tyrimų rezultatus su literatūroje pateiktais liofilizuotų aviečių tyrimais, abiem atvejais stebimos antimikrobinio aktyvumo tendencijos, tačiau avietės daugiausia slopino *S. aureus* ir *B. cereus* gramteigiamas bakterijas nei išspaudos [73].



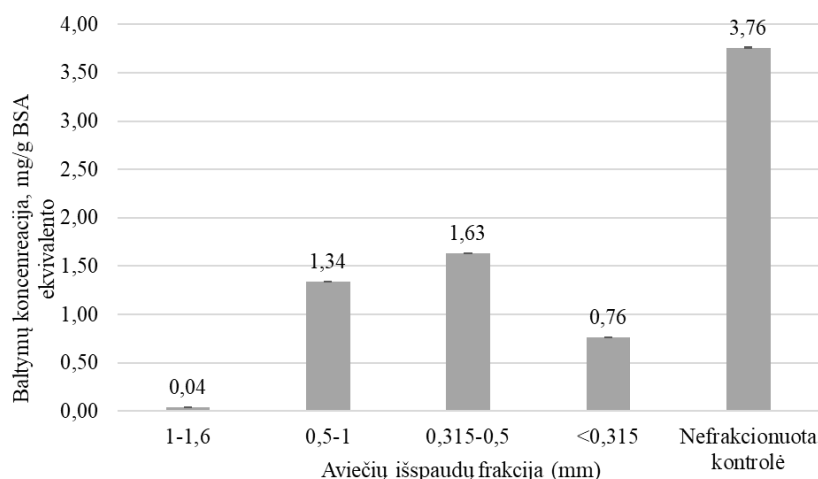
3.3. pav. Aviečių išspaudų ekstrakto (metanolyje) antibakterinis slopinimas prieš patogenines bakterijas

Aviečių antimikrobinio aktyvumo mechanizmas nėra visiškai išaiškintas, bet manoma, kad jis priklauso nuo aviečių sudėtyje esančių elagotaninų, antocianų ir organinių rūgščių. Šių junginių kiekiai avietėse priklauso nuo augimo sąlygų, genotipo, laikymo ir ekstrahavimo būdo [75]. Antimikrobinio aktyvumu pasižymintys antocianinai suteikia avietėms ryškiai raudoną spalvą. Šie junginiai yra stabilesni rūgštinėje terpėje, tačiau didėjant pH antocianinai skyla ir aviečių spalva keičiasi į tamsiai mėlyną. Dėl šios priežasties tyrimuose su aviečių produktais negali būti naudojami stipriai baziniai junginiai (pH 9), galintys turėti neigiamos įtakos aviečių spalvai [76].

#### 3.1.1.3. Aviečių išspaudų frakcijų baltyminės medžiagos ir technologinės savybės

Tiriant aviečių išspaudų pritaikymo galimybes hidratuotų gelių gamybai, šio eksperimento metu vertintas jose esančių baltymų kiekis (bendras kiekis ir tirpiųjų baltymų kiekis) bei funkcinės savybės (žr. 3.4. pav. ir 3.3. lentelę).

Kjeldalio metodu nustatytas vidutinis baltymų kiekis liofilizuotose aviečių išspaudose buvo  $9,54 \pm 0,09$  %.



**3.4. pav.** Bradford'o metodu nustatytas baltymų kiekis aviečių išspaudų frakcijose

Daugiausiai tirpiųjų baltymų Bradford'o metodu buvo nustatyta kontroliniame mėginyje – nefrakcionuotose avietėse (3,76 mg/g). Atlikus aviečių išspaudų separavimą, daugiausiai tirpiųjų baltymų buvo nustatyta aviečių frakcijose, kuriose dalelių dydis buvo 0,315–0,5 mm (1,63 mg/g – tirpūs baltymai 1,63 % nuo bendro baltymų kiekio) ir 0,5–1 mm (1,34 mg/g – tirpūs baltymai 1,34 % nuo bendro baltymų kiekio), (žr. 3.4. pav.). Mažiausiai baltyminių medžiagų aptikta smulkiausioje ir stambiausioje frakcijose (<0,315 ir 1–1,6) – atitinkamai 0,76 mg/g ir 0,04 mg/g.

Aviečių išspaudų frakcijų funkcines savybes buvo sprendžiama pagal vandens įgertį ir medžiagų ekstraktyvumą (žr. 3.3. lentelę).

**3.3. lentelė.** Tirpių medžiagų kiekis ir vandens absorbcija aviečių išspaudose

Vidutinis dalelių dydis frakcijose, mm	Vidutinis medžiagų ekstraktyvumas, %	Vidutinė vandens įgertis, %
<0,315	$13,60 \pm 0,85$	$404,9 \pm 0,61$
0,315–0,5	$14,20 \pm 2,83$	$434,9 \pm 0,90$
0,5–1,0	$12,60 \pm 0,85$	$387,0 \pm 0,53$
1,0–1,6	$7,50 \pm 0,71$	$236,9 \pm 1,14$
Aviečių išspaudos (nefrakcionuota kontrolė)	$11,30 \pm 0,99$	$327,1 \pm 1,10$

Didžiausias medžiagų ekstraktyvumas ir didžiausios vandens įgerties vertės tyrimo metu nustatytos <0,315 mm (13,6 % ir 404,9 %) ir 0,315–0,5 mm (14,2 % ir 434,9 %) dalelių dydžio frakcijose. Didėjant frakcijų stambumui, stebimas tiek medžiagų ekstraktyvumo, tiek vandens įgerties verčių mažėjimas. Mažiausiai tirpių medžiagų ir mažiausia vandens įgertis aptikta 1,0–1,6 mm frakcijoje (atitinkamai 7,5 % ir 236,9 %). Nefrakcionuotų aviečių išspaudų mėginys pagal funkcines savybes buvo artimos vidutinei pagal stambumą aviečių išspaudų frakcijai 0,5–1 mm. Šių išspaudų vidutinis medžiagų ekstraktyvumas buvo 12,6 %, o vandens įgertis – 387 %. Medžiagų ekstraktyvumą ir vandens įgertį reikia įvertinti sudarant hidratuotų gelių receptūras.

Pagal X. Zhang'ą ir kt. [77], bendras baltymų kiekis liofilizuotose avietėse sudaro ~ 10–11 % ir jam įtakos turi auginimo sąlygos [77]. Šio tyrimo metu aviečių išspaudose aptiktas bendras tirpių baltymų kiekis frakcijose buvo labai nedidelis. Tai rodo, kad didžioji dalis tirpiųjų baltymų aviečių perdirbimo

metu patenka į sultis. Išspaudose tirpiųjų baltymų lieka ~ 4 % ir didžiausią baltymų dalį sudaro netirpūs baltymai.

### 3.1.2. Sonifikacijos įtaka kokosų išspaudų baltyminių medžiagų pokyčiams

Kokosų išspaudos, gaunamos augalinių gėrimų gamybos metu, yra sudėtingos struktūros, sudarytos iš polisacharidų (lignino ir celiuliozės), lipidų ir baltymų. Kokosų išspaudų apdorojimu aukšto dažnio ultragarsu buvo siekta padidinti baltyminių medžiagų ekstraktyvumą ir tokias išspaudas panaudoti fermentacijos procesuose [78].

#### 3.1.2.1. Kokosų išspaudų sudėties ir savybių charakteristika

Pradiniame etape buvo tirta kokosų išspaudų sudėties pokyčiai esant įvairiems terpės pH ir skiriant dėmesį skaidulinių medžiagų sudėtyje asocijuotiems fenoliniams junginiams, jų biologiniam aktyvumui, ir kokosų išspaudų baltyminėms medžiagoms. Atlikus fenolinių junginių kokosų išspaudose nustatymą HPLC ir Folin – Ciocalteu metodais, fenolinių junginių nebuvo aptikta. Visi liofilizuotų kokosų išspaudų mėginiai, nepriklausomai nuo ekstrakto pH, pasižymėjo panašiu antioksidaciniu aktyvumu (žr. 3.4. lentelę).

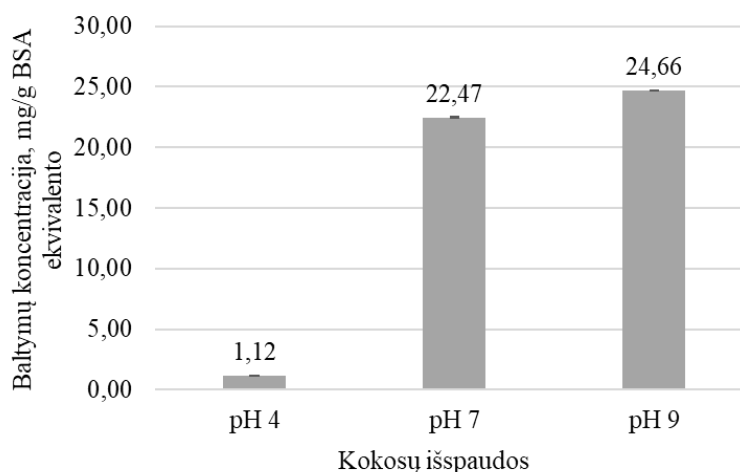
#### 3.4. lentelė. Kokosų išspaudų DPPH ir ABTS radikalų slopinimas

Mėginiai	DPPH (trolokso ekvivalentas $\mu\text{M/g}$ )	ABTS (trolokso ekvivalentas $\mu\text{M/g}$ )
Kokosų išspaudos pH 4	$0,0591 \pm 0,011$	$0,065 \pm 0,012$
Kokosų išspaudos pH 7	$0,0599 \pm 0,007$	$0,0677 \pm 0,004$
Kokosų išspaudos pH 9	$0,0616 \pm 0,009$	$0,069 \pm 0,007$

Lyginant gautus kokosų išspaudų antioksidacinio aktyvumo rezultatus su kokosų riešutų antioksidaciniu aktyvumu (pateiktu literatūroje), nustatyta, kad kokosų riešutų aktyvumas pagal DPPH ir ABTS radikalo slopinimo metodą yra apie 100 kartų didesnis nei išspaudų [79].

Kito etapo metu buvo analizuotas bendras baltymų kiekis ir tirpūs baltymai kokosų išspaudose, keičiant pH vertes.

Kokosų išspaudose bendras baltymų kiekis Kjeldalio metodu nustatytas  $24,68 \pm 0,31$  % . Tirpiųjų baltymų kiekybiniai pokyčiai kokosų išspaudose, esant skirtingiems pH (4; 7 ir 9) pateikti 3.5. paveikslėlyje.



#### 3.5. pav. pH įtaka tirpiųjų baltymų kokosų išspaudose pokyčiams

Nustatyta, kad daugiausiai tirpiųjų baltymų buvo gauta kokosų išspaudų suspensijoje esant pH 9 – 24,66 mg/g (žr. 3.5. pav.). Mažiausiai tirpiųjų baltymų aptikta, kai terpės pH 4 – 1,12 mg/g.

Vidutiniškai kokosų išspaudose yra randama 10–16 % baltymų. Pagal Y. Li ir kt. [44], pagrindiniai baltymai kokosų riešutuose yra tirpūs ir juos sudaro albuminai ir globulinai, aptinkami 21 ir 40 % nuo bendro baltyminių medžiagų kiekio [44].

Šio eksperimento tyrimų rezultatai rodo, kad kokosų išspaudose po vandeninės ekstrakcijos (augalinių gėrimų gamybos metu) daugiausiai lieka netirpių baltymų. Baltymų ekstraktyvumas kokosų išspaudose didėja keičiant terpės pH.

### 3.1.2.2. Ultragarinio apdorojimo įtaka kokosų baltyminių medžiagų pokyčiams

Siekiant padidinti tirpiųjų baltymų kokosų išspaudose ekstraktyvumą, kokosų suspensijos (7 % koncentracijos) skirtinguose pH (4; 7 ir 9) buvo apdorotos aukšto dažnio (850 kHz) ultragarsu esant 0,9 ir 2 W/cm<sup>2</sup> intensyvumams, trukmė – 10 ir 30 min. Apdorotos kokosų suspensijos buvo centrifuguotos ir supernatantas surinktas ir tiriamas.

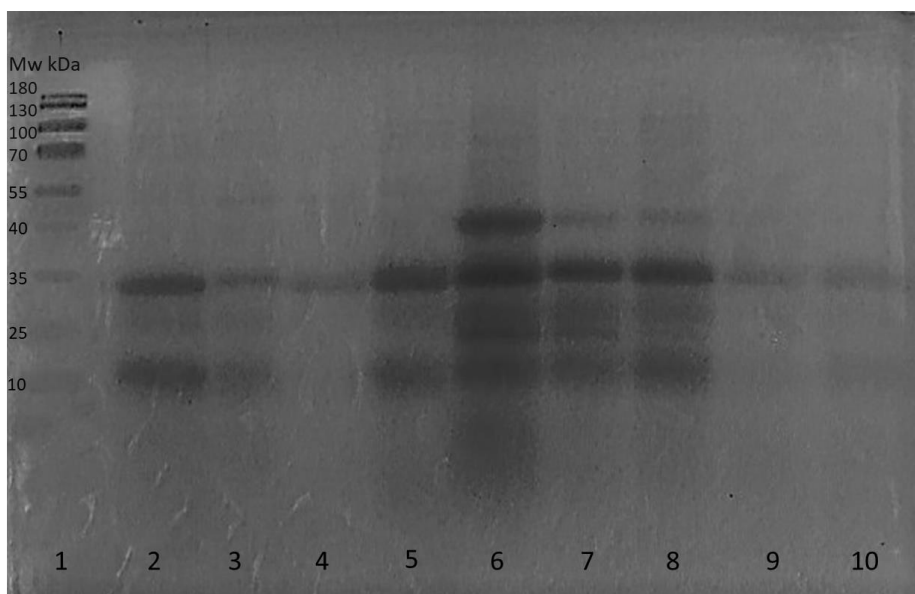
Bradford'o metodu buvo analizuotas apdorotų ultragarsu tirpiųjų baltymų kiekis kokosų išspaudų supernatantuose. Lyginant apdorotų ultragarsu kokosų išspaudų suspensijų supernatantuose aptiktus tirpių baltymų kiekius (žr. 3.5. lentelę) su kontroliniais mėginiais (žr. 3.5. pav.), nustatyta, kad sonifikacija padidina tirpiųjų baltymų ekstraktyvumą. Visuose tiriamuose sonifikuotose kokosų išspaudų mėginiuose įvertintas didesnis tirpiųjų baltymų kiekis nei kontroliniuose mėginiuose (be apdorojimo). Ultragarso intensyvumas taip pat turėjo reikšmingos įtakos baltymų tirpumo padidėjimui. Kokosų išspaudų suspensijos, apdorotos ultragarsu prie didžiausio intensyvumo (2 W/cm<sup>2</sup>), išsiskyrė vidutiniškai 12 % didesniu tirpiųjų baltymų kiekiu nei suspensijos, kurios buvo sonifikuojamos esant mažesniai intensyvumui (0,9 W/cm<sup>2</sup>).

### 3.5. lentelė. Aukšto dažnio ultragarinio apdorojimo įtaka kokosų išspaudų tirpiesiems baltymams

Intensyvumas, W/cm <sup>2</sup>	Suspensijos pH	Poveikio trukmė, min.	Baltymų koncentracija, mg/g BSA ekvivalento
0,9	4	10	7,60 ± 0,001
		30	4,98 ± 0,003
	7	10	24,58 ± 0,002
		30	24,58 ± 0,002
	9	10	27,08 ± 0,001
		30	22,16 ± 0,005
2	4	10	7,60 ± 0,003
		30	9,59 ± 0,002
	7	10	28,72 ± 0,001
		30	27,28 ± 0,003
	9	10	31,10 ± 0,001
		30	26,27 ± 0,001

Tirpieji baltymai buvo analizuoti SDS – PAGE elektroforezės metodu (žr. 3.6. pav.). Visos kokosų suspensijos buvo apdorotos aukšto dažnio ultragarsu (850 kHz; intensyvumas 2 W/cm<sup>2</sup>) keičiant terpės pH (4; 7; 9) ir apdorojimo trukmę (10; 30 min.). Daugiausiai skirtingų baltyminių medžiagų ir didžiausios jų koncentracijos nustatytos kokosų išspaudų supernatante (pH 9), sonifikuotame 10 min. (žr. 3.6. pav., Nr. 6). Ilginant kokosų suspensijos (pH 9) sonifikacijos trukmę iki 30 min, buvo

stebimas baltymų koncentracijos mažėjimas. Kokosų išspaudų supernatanto (pH 7) po 10 min. apdorojimo (žr. 3.6. pav., Nr. 8) baltymų koncentracijos nustatytos mažesnės nei pH 9 (po 10 min. apdorojimo) (žr. 3.6. pav., Nr. 6). Ilginant kokosų suspensijų (pH 7) sonifikacijos trukmę nuo 10 min. iki 30 min., skirtingai nei supernatante, kurio pH buvo 9, baltymų koncentracijos šiuose mėginiuose nepasikeitė (žr. 3.6. pav., Nr. 7 ir 8). Mažiausiai tirpiųjų baltymų nustatyta supernatantuose, kurių pH 4 (žr. 3.6. pav., Nr. 9 ir 10).

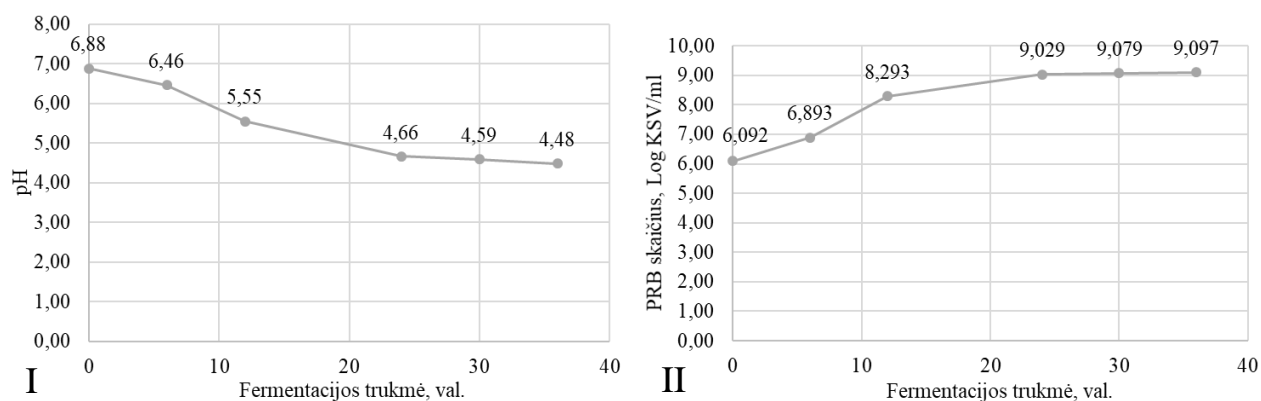


**3.6. pav.** Ultragarinio poveikio (850 kHz, intensyvumas 2 W/cm<sup>2</sup>) įtaka kokosų išspaudų (KI) baltyminėms medžiagoms (7 % koncentracija), 50 °C temperatūroje (poveikio trukmė –10 ir 30 min.): 1 – baltymo standartas SIGMA colorburst „Electrophoresis marker“; 2 – pH 9 neapdorotos KI; 3 – pH 7 neapdorotos KI; 4 – pH 4 neapdorotos KI; 5 – pH 9 apdorotos ultragarsu KI (30 min.); 6 – pH 9 apdorotos ultragarsu KI (10 min.); 7 – pH 7 suspensija apdorotos KI ultragarsu (30 min.); 8 – pH 7 apdorotos KI ultragarsu (10 min.); 9 – pH 4 apdorotos KI ultragarsu (30 min.); 10 – pH 4 apdorotos KI ultragarsu (10 min.)

Pagal N. Tangsuphoom‘ą ir kt. [80] bei J. Huang‘ą ir kt. [81], pagrindinis kokosų baltymas yra 11S globulinas, žinomas kaip kokosinas, 55 kDa heksameras, kurio kiekviename subvienete yra rūgštinių (32–34 kDa) ir bazinių (22–24 kDa) polipeptidų, sujungtų disulfidiniiais ryšiais. 11S globulino molekulinė masė yra 326 kDa ir jis sudaro 86 % visų globulinų. Kitas kokosų riešutuose aptinkamas baltymas yra 7S globulinas, kurio molekulinė masė yra 156 kDa. Šis baltymas gelio elektroforezės metu išsiskiria atskiromis 16, 22 ir 24 kDa frakcijomis [80, 81]. Pagal literatūrą, eksperimento metu gautame SDS – PAGE gelyje esantys baltymų fragmentai ties 35 kDa ir 24 kDa atitinka 11S globulinų, o fragmentai ties 24, 22 ir 16 kDa priklauso 7S globulinų polipeptidams.

### 3.1.2.3. Kokosų išspaudų ultragarinio apdorojimo įtaka PRB fermentacijai

Tiriant kokosų išspaudų ultragarinio apdorojimo įtaką PRB fermentacijos procesui, 7 % koncentracijos išspaudų suspensija buvo veikiamą aukšto dažnio ultragarsu (trukmė – 10 min.), naudojant didžiausią intensyvumą – 2 W/cm<sup>2</sup> (pH 7). Šis mėginys pasirinktas fermentavimui, nes jame nustatytas didelis tirpiųjų baltymų kiekis, kuris priklausomai nuo apdorojimo trukmės nepakito ir pH – palankus PRB dauginimuisi [82]. Kokosų išspaudos buvo fermentuotos 36 valandas, kol nusistovėjo pastovus pH (žr. 3.7. pav., I).



**3.7. pav.** pH (I) ir PRB dauginimosi (II) pokyčiai fermentacijos metu grafikai

Tyrimai rodo, kad kokosų išspaudų suspensija apdorota ultragarsu buvo palanki terpė *L. paracasei* dauginimuisi, tai rodo eksponentiškai didėjantis bakterijų dauginimasis iki 9,097 log KSV/ml (žr. 3.7. pav., II). Dėl susidariusių organinių rūgščių fermentacijos terpė pasiekė stabilias pH vertes (4,66) po 25 val. fermentacijos.

Papildomai analizuotas fermentacijos metu pieno rūgšties ir jos izomerų (*L*(+) ir *D*(-)) susidarymas (žr. 3.6. lentelę)

**3.6. lentelė.** Fermentacijos metu susidariusios pieno rūgšties kiekis

Fermentacijos trukmė, val.	<i>L</i> (+) pieno rūgštis, mg/l	<i>D</i> (-) pieno rūgštis, mg/l	Bendras kiekis, mg/l
6	90,353	136,06	226,416
12	318,478	547,99	866,468
24	718,016	731,69	1449,703
30	726,347	823,32	1549,668
36	757,105	816,70	1573,805

Ilgėjant fermentacijos trukmei nuo 6 iki 12 val. buvo stebimas intensyviausias pieno rūgšties susidarymas (*L*(+) – 318,478 mg/l; *D*(-) 547,99 mg/l), tačiau po 30 valandų *D*(-) izomero susidarymas pradėjo mažėti (iki 816,70 mg/l), nors *L*(+) izomero toliau didėjo (iki 757,105 mg/l). Literatūroje pateikta, kad fermentais apdorotose žaliavose, susidarius junginiams prieinamiems bakterijoms, pieno rūgšties gamyba (ypač *L*(+) pieno rūgšties izomero) yra intensyvesnė [83]. Pagal A. Matthews ir kt. [84], fermentacijos metu didėjant terpės rūgštingumui intensyviau vyksta PRB fermentų sintezė ir tuo pačiu angliavandenių ir baltymų hidrolizės procesai, kurių metų susidaro daugiau fermentuojamų sacharidų ir terpė praturtinama baltymų skylimo produktais [84].

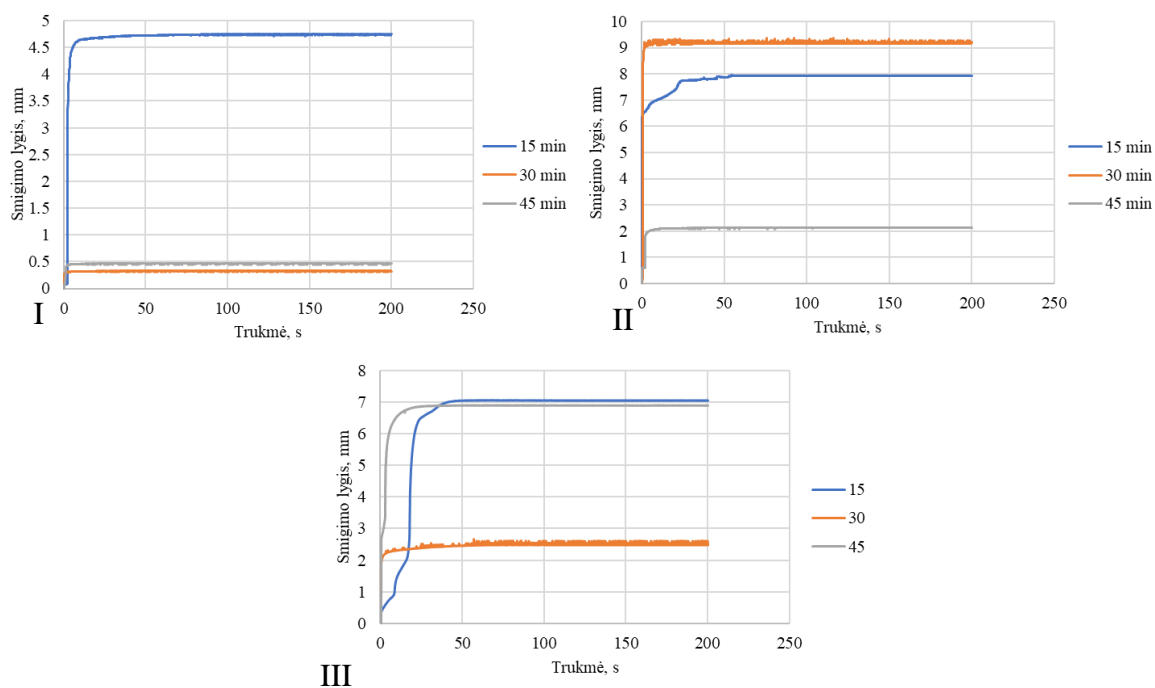
Šio eksperimento tyrimų rezultatai rodo, kad naudojama fermentacijai funkcionalizuota ultragarsu terpė (kokosų išspaudos), turtingesnė tirpiaisiais baltymais, turėjo teigiamą įtaką pieno rūgšties bakterijų dauginimuisi ir organinių rūgščių susidarymui. Sonifikuotose kokosų išspaudose po 12 val. fermentacijos metu susikaupė 8,293 log KSV/ml probiotinių bakterijų. Kokosų išspaudų fermentacijos metu pieno rūgšties susidarymo greitis – 43,7 mg/l/val.

Taigi, funkcionalizuotos terpės yra priimtinesnės norint pasiekti reikalingą probiotikams PRB skaičių ir intensyvesnį pieno rūgšties susidarymą.

### 3.1.3. Sonifikacijos įtaka krakmolo funkcinėms savybėms

#### 3.1.3.1. Krakmolo suspensijų tekstūros pokyčiai

Šio eksperimento metu analizuota ultragarsinio poveikio įtaka natyvinio krakmolo suspensijų klampos pokyčiams. Tiriamieji mėginiai apdoroti aukšto dažnio ultragarsu (850 kHz, intensyvumas  $2,0 \text{ W/cm}^2$ ),  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje, naudojant skirtingą terpės pH (4; 7; 9) ir poveikio trukmę (15; 30 ir 45 min.). Krakmolo suspensijos iškart po apdorojimo buvo tiriamos akustiniu tekstūros analizatoriumi (žr. 3.8. pav.). Krakmolo mėginiai su didžiausiais klampos pokyčiais buvo išbandyti, kaip alternatyva agarui, gelių tekstūros stabilizavimui.



**3.8. pav.** Krakmolo modifikacijos ultragarsu įtaka gelių klampai (I – pH 3; II – pH 7 ir III – pH 9)

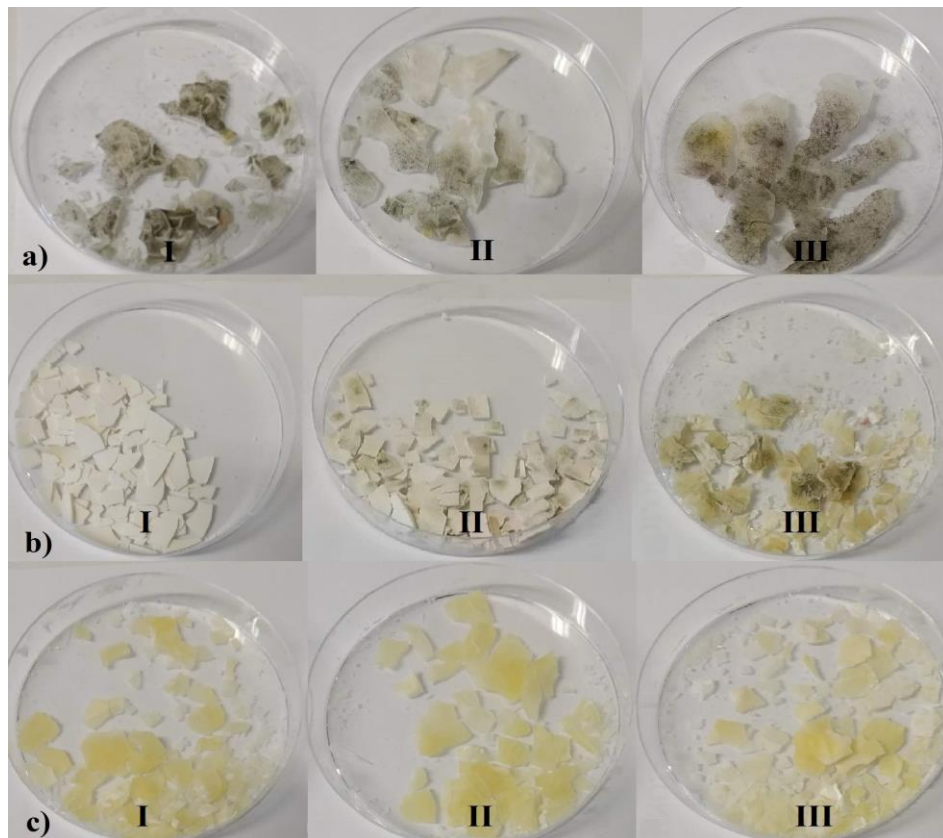
Nustatyta, kad ultragarsinis krakmolo suspensijų apdorojimas aukšto dažnio ultragarsu turėjo reikšmingą įtaką jų klampai. Ilgėjant tiriamų mėginių apdorojimui trukmei nuo 15 iki 45 min, visais atvejais buvo stebimas didesnis sonifikacijos efektas (klampa vidutiniškai sumažėjo 3,5 mm). Be to, eksperimento metu išryškėjo reikšminga pH faktorius įtaka gelių klampai. Kiečiausia gelių konsistencija buvo gauta, kai terpės pH 3, o mėginiai buvo apdorojami 30 ir 45 min. (žr. 3.8. pav., I). Mažiausias ultragarsinio poveikio efektas nustatytas, ruošiant gelius prie pH 9, kai jie buvo veikiami 15 ir 45 min. (žr. 3.8. pav., III).

Atliktas eksperimentas rodo, kad sonifikuojant ir keičiant technologinius parametrus, galima daryti įtaką natyvinio krakmolo savybėms. Kito eksperimento metu tirti įvairiai apdorotų krakmolo gelių mikrobiologiniai pokyčiai laikymo metu.

#### 3.1.3.2. Krakmolo gelių stabilumo pokyčiai laikymo metu

Tiriami mėginiai, apdoroti įvairiais režimais (žr. 3.1.3.1. skyrių), buvo laikomi 1 mėnesį termostate  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje ir periodiškai buvo vizualiai stebimi ar ant jų paviršių nesusidaro mikromicetų kolonijos (žr. 3.9. pav., a; b ir c atvejai).





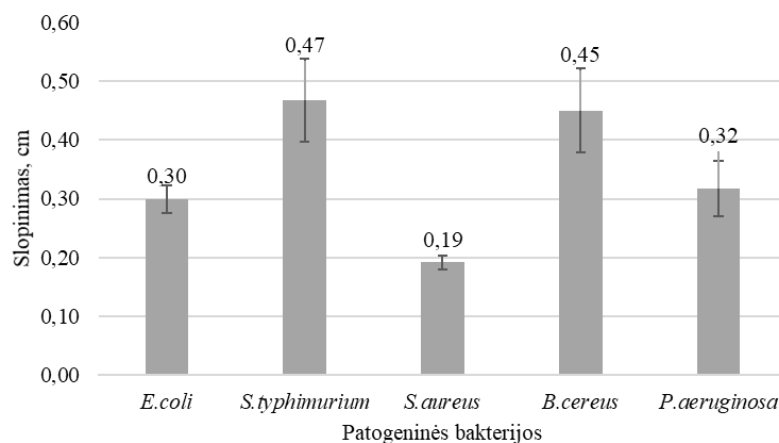
**3.9. pav.** Sonifikuoti skirtingą laiko trukmę (I – 15 min; II – 30 min; III – 45 min.) krakmolo geliai (a – pH 3; b – pH 7 ir c – pH 9)

Tyrimais pastebėta, kad mikrobiologiniam stabilumui įtakos turėjo naudota terpės pH. Sonifikuoti krakmolo geliai (pH 3) pasidengė mikromicetų kolonijomis greičiausiai – po 1 savaitės laikymo. Geliai, ruošti pH 9 terpėje, išliko mikrobiologiškai stabilūs viso tyrimo metu (vieną mėnesį), nepasireiškiant gedimo požymiams. Mikrobiologiniai gelių pokyčiai esant terpės pH 7 (žr. 3.9. pav., b) buvo nevienareikšmiški: sonifikuojant tiriamos mėginius trumpesnę laiką (15 min.), buvo gautos stabilesnės mikrobiologiniam gedimui gelių struktūros ir jos nepasidengė mikromicetų kolonijomis viso testuojamo periodo metu; skirtingai, apdorojant mėginius ilgesnį laiką (45 min.), geliai pradėjo pelyti po 1 savaitės laikymo. Tai reiškia, kad mikrobiologiniam gelių stabilumo užtikrinimui svarbus gelių ruošimui naudojamas pH. Pagal F., R. Passaman'ą ir kt. [85], palankiausia terpė mikromicetų kolonijų formavimuisi yra pH 3–6 ir tai patvirtino šio eksperimento metu gauti tyrimų rezultatai. Be to, tyrimo metu buvo stebima gelių sonifikacijos trukmės įtaka mikrobiologiniam gedimui. Manoma, kad prailginus sonifikacijos trukmę, prasideda krakmolo hidrolizės procesas ir jos metu susidarę produktai gali būti palanki terpė mikromicetų vystymuisi [85, 86].

### 3.2. Eterinių aliejų biologinis aktyvumas ir jam įtakos turintys veiksniai

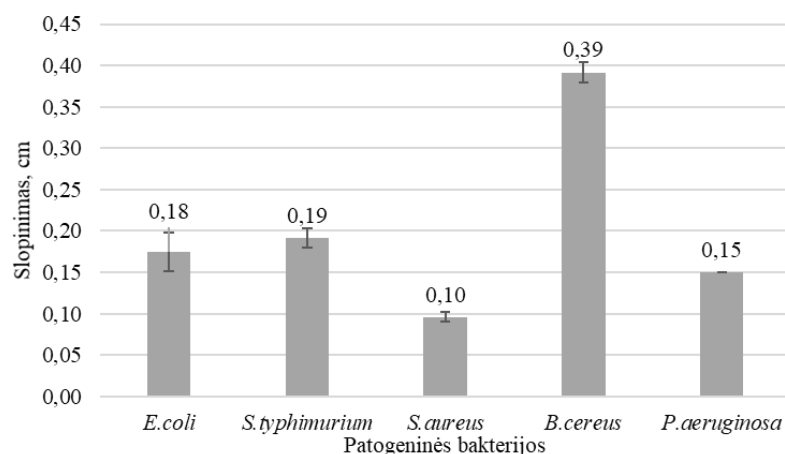
#### 3.2.1. Skirtingos kilmės eterinių aliejų antimikrobinio aktyvumo ir sudėties savitumai

*Arbatmedžių eteriniai aliejai*, tiriami agar difuziniu metodu, daugiausiai slopino *S. typhimurium* augimą (0,47 cm). Labai panašus slopinimas buvo stebimas ir prieš *B. cereus* (0,45 cm) (žr. 3.10. pav.). Mažiausias slopinimas buvo nustatytas prieš *S. aureus* (0,19 mm). Šie rezultatai sutapo su paskelbtais literatūroje, kur šis eterinis aliejus labiau slopino gramneigiamas bakterijas (*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*) nei gramteigiamas (*S. aureus*, *B. cereus*) [87].



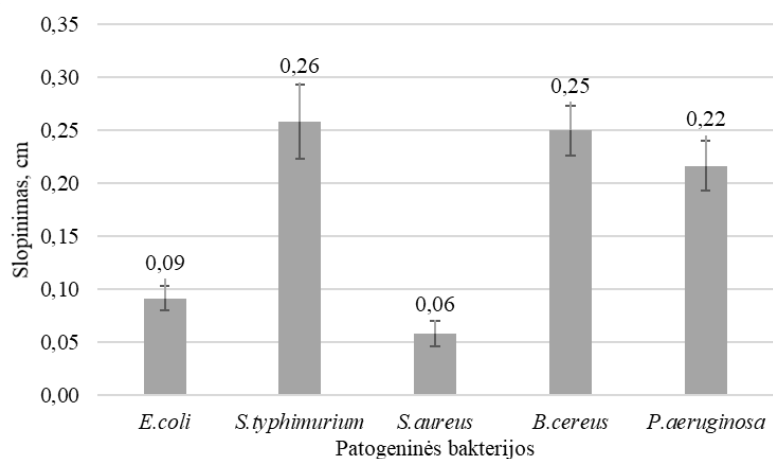
**3.10. pav.** Arbatmedžių eterinio aliejaus (1 % konc. DMSO tirpiklyje) antibakterinis slopinimas agaro difuziniu metodu

Panašus arbatmedžių eterinio aliejaus antimikrobinis efektas buvo stebimas vertinant jį šulinėlių metodu. Stipriausiai arbatmedžių eterinio aliejaus tirpalas slopino *B. cereus* (0,39 cm), o mažiausiai – *S. aureus* (0,10 cm) (žr. 3.11. pav.). Taip pat, šiuo metodu buvo stebimas mažesnis eterinių aliejų antimikrobinis efektas prieš *S. typhimurium* nei agaro difuziniu metodu. Pagal C. F. Carson'ą ir kt. [88], nustatyta, kad 4-terpinenolis yra pagrindinis junginys, sudarantis 30 % arbatmedžių eterinio aliejaus ir suteikia jam antibakterines savybes [88]. Šis terpenoidas sinergetiškai veikia su monoterpenoidu linalolu. Manoma, kad nuo šių junginių koncentracijos priklauso arbatmedžių eterinio aliejaus antibakterinės savybės [89].



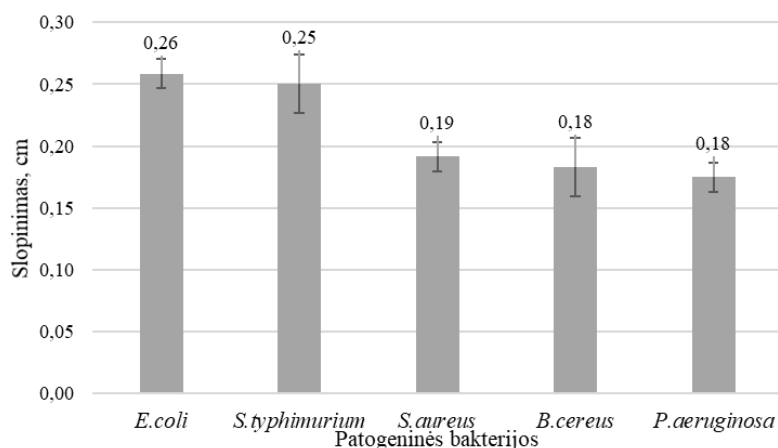
**3.11. pav.** Arbatmedžių eterinio aliejaus (1 % konc. DMSO tirpiklyje) antibakterinis slopinimas šulinėlių metodu

*Imobilizuotas OSA-krakmole ir aptrauktas enterosoliubilia medžiaga arbatmedžių eterinis aliejus* pasižymėjo geresniu antimikrobinium aktyvumu prieš *S. typhimurium* ir *P. aeruginosa* šulinėlių metodu, nei skystas eterinis aliejus (1 %) tirtas tuo pačiu metodu. Šiuo atveju, didžiausias slopinimas buvo stebimas prieš *S. typhimurium* ir *B. cereus* (atitinkamai 0,26 ir 0,25 cm), mažiausias slopinimas nustatytas prieš *S. aureus* bakteriją (0,06 cm) (žr. 3.12. pav.).



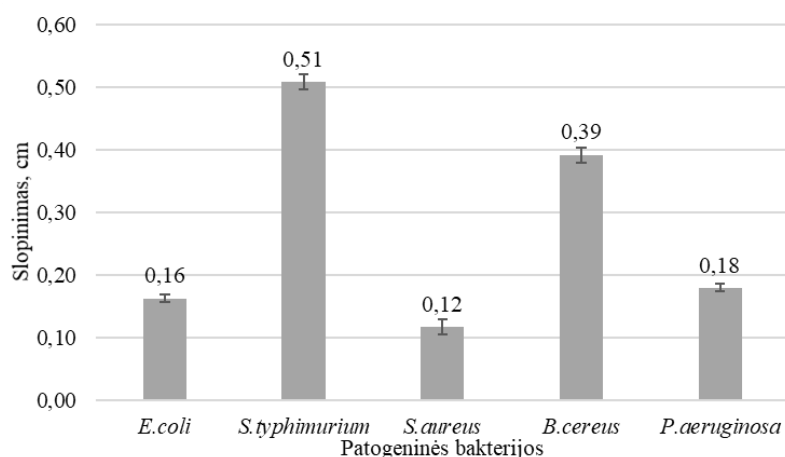
**3.12. pav.** Imobilizuoto (12 %) arbatmedžių eterinio aliejaus (0,03 % konc. DMSO tirpiklyje) antibakterinis slopinimas šulinėlių metodu.

*Pipirmėčių eterinio aliejaus antibakterinis aktyvumas.* Pipirmėčių eterinis aliejus, tirtas agaro difuziniu metodu, pasižymėjo tokiu pat antimikrobinio aktyvumu prieš *S. aureus*, kaip ir arbatmedžių eterinis aliejus. Šis eterinis aliejus buvo aktyvesnis slopinant gramneigiamas bakterijas nei gramteigiamas. Didžiausias šio eterinio aliejaus antimikrobinis aktyvumas buvo nustatytas prieš *E. coli* (0,26 cm) ir *S. typhimurium* (0,25 cm), o mažiausias prieš *P. aeruginosa* ir *B. cereus* (0,18 cm) (žr. 3.13. pav.). Pagal Z. H. Sun ir kt. [90], mentolis sudaro iki 75 % pipirmėčių eterinio aliejaus, mentonas – nuo 10 iki 30 %, todėl šie junginiai gali turėti didžiausią įtaką pipirmėčių eterinių aliejų antibakteriniam aktyvumui [90].



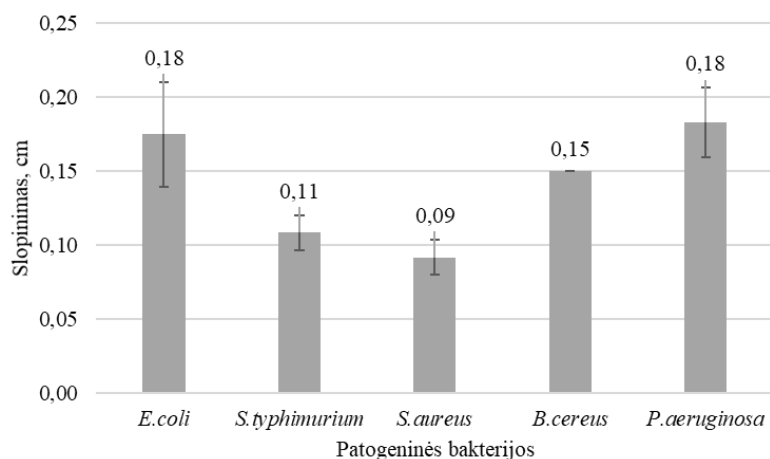
**3.13. pav.** Pipirmėčių eterinio aliejaus (1 % konc. DMSO tirpiklyje) antibakterinis slopinimas agaro difuziniu metodu

Antimikrobinio aktyvumo rezultatai skyrėsi priklausomai nuo jo vertinimui naudoto metodo (šulinėlių metodo ar agaro difuzinio). Tiriant antimikrobinį aktyvumą šulinėlių metodu, beveik visais atvejais buvo stebimas didesnis antibakterinis efektas nei analizuojant šulinėlių metodu, išskyrus prieš *E. coli* ir *S. aureus*. Pipirmėčių eterinis aliejus labiausiai slopino *S. typhimurium* (0,51 cm) augimą, o mažiausiai – *S. aureus* (0,12 cm) (žr. 3.14. pav.).



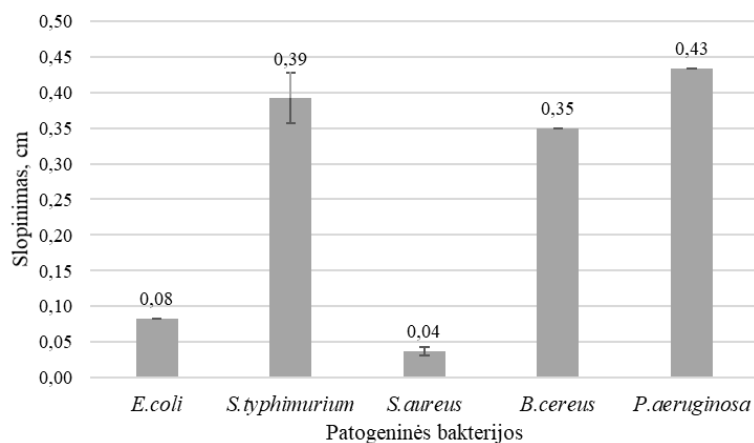
**3.14. pav.** Pipirmėčių eterinio aliejaus (1 % konc. DMSO tirpiklyje) antibakterinis slopinimas šulinėlių metodu.

*Imobilizuotas pipirmėčių eterinis aliejus*, kaip ir skystasis eterinis aliejus, vertinant šulinėlių metodu, blogiausiai slopino *S. aureus* augimą (0,09 cm). Efektyviausias šio eterinio aliejaus poveikis pasireiškė prieš *E. coli* ir *P. aeruginosa* (po 0,18 cm) (žr. 3.15. pav.).



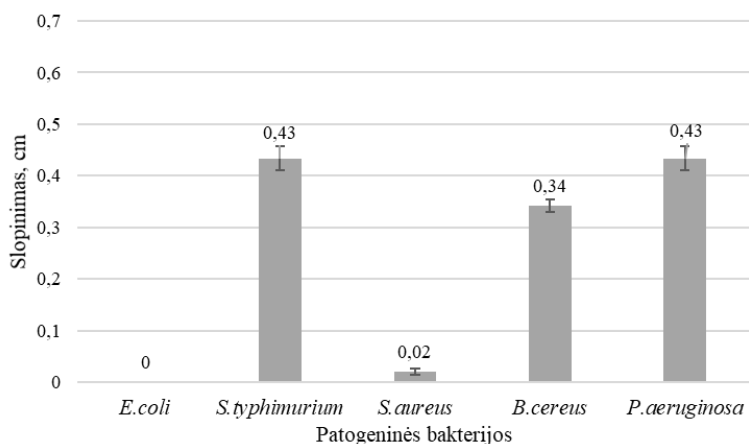
**3.15. pav.** Imobilizuoto (12 %) pipirmėčių eterinio aliejaus (0,03 % konc. DMSO tirpiklyje) antibakterinis slopinimas šulinėlių metodu.

*Greipfrutų eterinio aliejaus antibakterinis aktyvumas.* Greipfrutų eterinis aliejus, vertinant agarų difuziniu metodu, prasčiausiai slopino *E. coli* ir *S. aureus* augimą (atitinkamai 0,08 ir 0,04 cm). Stipriausiai buvo slopinami *P. aeruginosa* ir *S. typhimurium* patogenai (žr. 3.16. pav.). Pagal W. Okunow'ą ir kt. [91], citrusinių vaisių eterinių aliejų sudėtyje monoterpenas limonenas sudaro nuo 80 iki 90 %. Manoma, kad šis junginys yra vienas iš pagrindinių, galinčių turėti įtakos greipfrutų eterinio aliejaus antibakterinėms savybėms [91].



**3.16. pav.** Greipfrutų eterinio aliejaus (1 % konc. DMSO tirpiklyje) antibakterinis slopinimas agar difuziniu metodu

Greipfrutų eterinis aliejus (1 %) neslopino *E. coli* ir beveik neslopino *S. aureus* (0,02 cm), tai buvo fiksuota tiek agar difuziniu metodu, tiek ir šulinėlių metodu. Pakankamai stiprus antimikrobinis šio eterinio aliejaus efektas pasireiškė prieš *S. typhimurium* ir *P. aeruginosa* (po 0,43 cm) (žr. 3.17. pav.).



**3.17. pav.** Greipfrutų eterinio aliejaus (1 % konc. DMSO tirpiklyje) antibakterinis slopinimas šulinėlių metodu

Kadangi greipfrutų eterinis aliejus, naudojamas mažesnėmis nei 1 % koncentracijomis nepasižymėjo antibakteriniu aktyvumu, todėl jis nebuvo atrinktas imobilizavimui į krakmolą ir tolesniam gelių ruošimui.

### 3.2.2. Antioksidacinis eterinių aliejų aktyvumas ir jo ryšys su cheminės sudėties komponentais

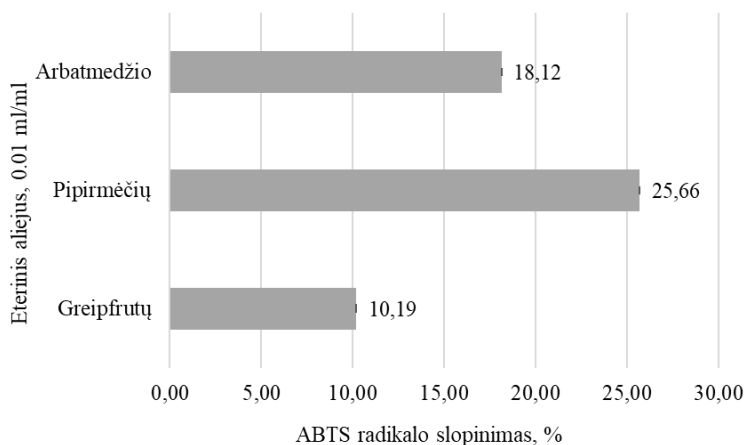
Didžiausias fenolinių junginių kiekis buvo aptiktas arbatmedžių eteriniame aliejuje – 14,839 mg/g galo rūgšties ekvivalento. Mažiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas pipirmėčių eteriniame aliejuje – 8,549 mg/g galo rūgšties ekvivalento (žr. 3.7. lentelę).

**3.7. lentelė.** Bendras fenolinių junginių kiekis eteriniuose aliejuose

Eteriniai aliejai	Fenolinių junginių kiekis (galo rūgšties ekvivalentas), mg/g
Arbatmedžių	14,839 ± 0,033
Greipfrutų	12,288 ± 0,022
Pipirmėčių	8,549 ± 0,038

Pagal C. Vasile'į ir kt. [92], pastebima, kad eteriniuose aliejuose fenolinių junginių kiekiai yra nedideli. Šių eterinių aliejų sudėtyse dominuoja terpenoidai ir terpenai [92]. Literatūroje pateikiama, kad terpenai ir jų dariniai terpenoidai yra pagrindiniai arbatmedžių, pipirmėčių ir greipfrutų eterinių aliejų komponentai, suteikiantys antimikrobines ir antioksidacines savybes [93, 94, 95].

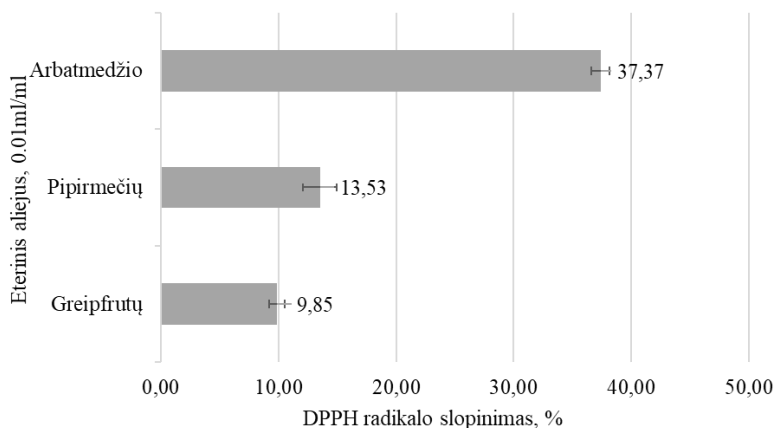
Didžiausiu ABTS radikalo slopinimu, kai eterinių aliejų koncentracija buvo 0,01 ml/ml (žr. 3.18. pav.), pasižymėjo pipirmėčių eterinis aliejus – 25,66 %. Greipfrutų eterinis aliejus pasižymėjo daugiau nei du kartus mažesniu radikalo slopinimu nei pipirmėčių eterinis aliejus (10,19 %).



**3.18. pav.** Eterinių aliejų ABTS radikalo slopinimas, procentais

DPPH radikalą stipriausiai slopino arbatmedžių eterinis aliejus (37,37 %) (žr. 3.19. pav.). Tuo tarpu, tiek pipirmėčių, tiek greipfrutų eteriniai aliejai DPPH radikalą slopino silpnai (atitinkamai 10,53 ir 9,85 %.).

Pagal gautus tyrimų rezultatus DPPH radikalą arbatmedžių eterinis aliejus slopino labiau nei ABTS radikalą, tokios tendencijos sutampa su literatūra [96]. Lyginant tarpusavyje eterinių aliejų antioksidacinio aktyvumo vertinimo metodus (ABTS radikalo slopinimo ir DPPH radikalo slopinimo), privalumas suteikiamas DPPH radikalo slopinimo metodui, kuris buvo stabilesnis ir patikimesnis [97].



**3.19. pav.** Eterinių aliejų DPPH radikalo slopinimas, procentais

Visų tirtų eterinių aliejų sudėtyje dominuoja monoterpenoidai ir monoterpenai. 4-terpinenolis yra arbatmedžių pagrindinis monoterpenoidas, o mentonas – pipirmėčių eterinio aliejaus. Greipfrutų eterinio aliejaus sudėties pagrindą sudaro monoterpenas limonenas. Literatūroje išskiriama, kad

monoterpenų ir monoterpenoidų, kurių struktūroje yra metileno fragmentas ir struktūra primena fenolius, antioksidacinis aktyvumas yra didžiausias iš terpenų ir jų darinių [98].

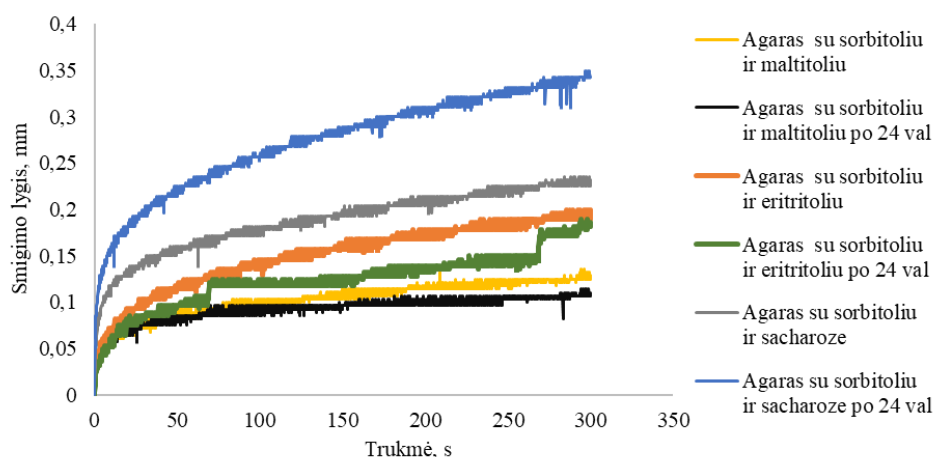
### 3.3. Hidratuotų gelių su funkcionalizuotų komponentų priedais struktūrizavimas, antimikrobinų komponentų imobilizavimo efektyvumo didinimui

#### 3.3.1. Gelių sudėties optimizavimas parenkant stabilizatorių

Šiame eksperimento etape buvo vystomos hidratuotų gelių receptūros (žr. 2.1., 2.2. ir 2.3. lentelės), išbandant jų ruošimui funkcionalizuotus komponentus: a) aviečių išspaudų produktus, b) baltymines medžiagas ir c) stabilizatorius. Tiriamų gelių ruošimui išbandyti įvairūs nefunkcionalizuoti stabilizatoriai (agaras, pektinas ir želatina), dažniausiai naudojami šios rūšies produktų struktūrizavimui ir biologiškai aktyvių medžiagų imobilizavimui. Kaloringumo mažinimui tirtos saldiklių (sorbitolio ir gliukozės sirupo kombinacijos su sacharozė, maltitoliu ir eritritoliu) panaudojimo galimybės gelių ruošimui, parenkant jų rūšį ir kiekį. Kontrolei buvo naudojamos tradicinių žaliavų kombinacija – sacharozė ir gliukozės sirupas. Gelių kokybė buvo įvertinta po visiško sustingimo ir po 24 val. laikymo akustiniu tekstūros analizatoriumi.

Hidratuotų gelių su aviečių išspaudų priedais formuluotėse buvo keičiamas aviečių išspaudų priedų kiekis (10 % ir 20 %) kombinacijose su įvairiais stabilizatoriais ir saldikliais.

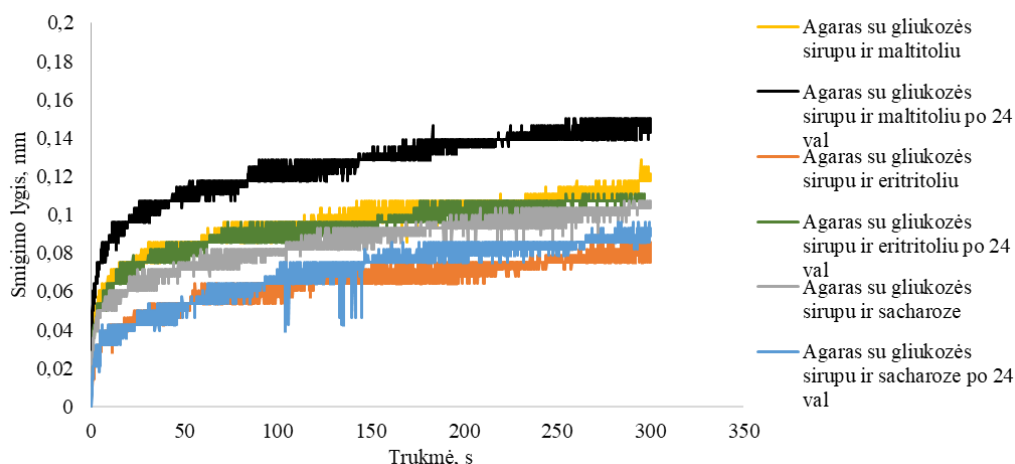
**Tiriant gelių, ruoštų su 10 % aviečių išspaudų priedu, tekstūrą, nustatyta (žr. 3.20. pav.), kad kiečiausios konsistencijos buvo tiriamieji mėginiai, kurių formuluotėse sorbitolis buvo kombinuojamas su maltitoliu. Šiuose geliuose buvo stebimas greitesnis struktūrizavimosi procesas ir geliai po aušinimo (24 val.) išsiskyrė kiečiausia tekstūra. Minkščiausios konsistencijos geliai buvo gauti, naudojant eritritolį, tačiau jis kristalizavosi, todėl šio gelio rezultatas nėra tikslus.**



**3.20. pav.** Sorbitolio gelių su įvairiais saldikliais klampos tyrimo akustiniu tekstūros prietaisu rezultatai

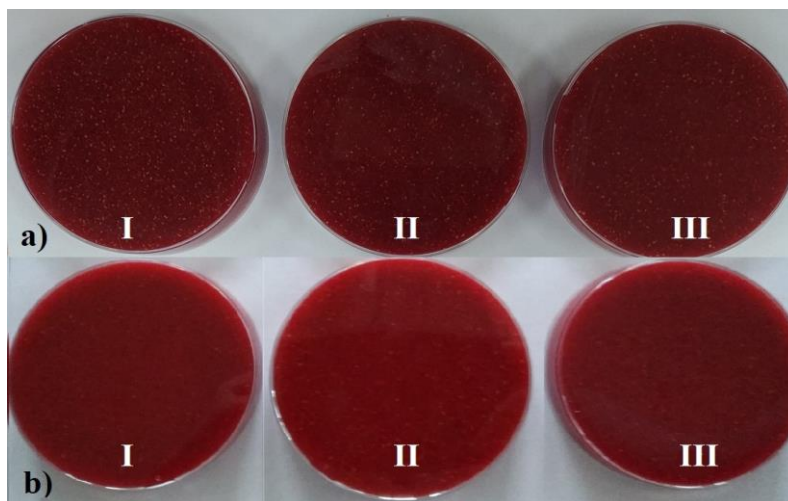
Kristalizacijos procesui sumažinti, saldikliai (sacharozė, maltitolis ir eritritolis) gelių formuluotėse naudoti kombinacijoje su gliukozės sirupu, žinomu konditerijos pramonėje antikristalizatoriumi. Naudojant gliukozės sirupą su skirtingų cukrų kombinacijomis ir 10 % aviečių išspaudų priedu, nustatyta (žr. 3.21. pav.), kad kiečiausia tekstūra išsiskyrė geliai, ruošti su eritritoliu ir sacharozė. Ruošiant gelius su eritritoliu ir gliukozės sirupo priedu, nepavyko visiškai išvengti kristalizacijos reiškinio, gelių struktūra išliko netolygi. Be to, po 24 valandų laikymo buvo stebimas visų gelių,

ruošų su gliukozės sirupo priedu, konsistencijos minkštėjimas. Šio reiškinio buvo išvengta, naudojant gelių formuluotėse sacharozę.



**3.21. pav.** Gliukozės sirupo gelių su įvairiais saldikliais klamos tyrimo akustiniu tekstūros prietaisu rezultatai

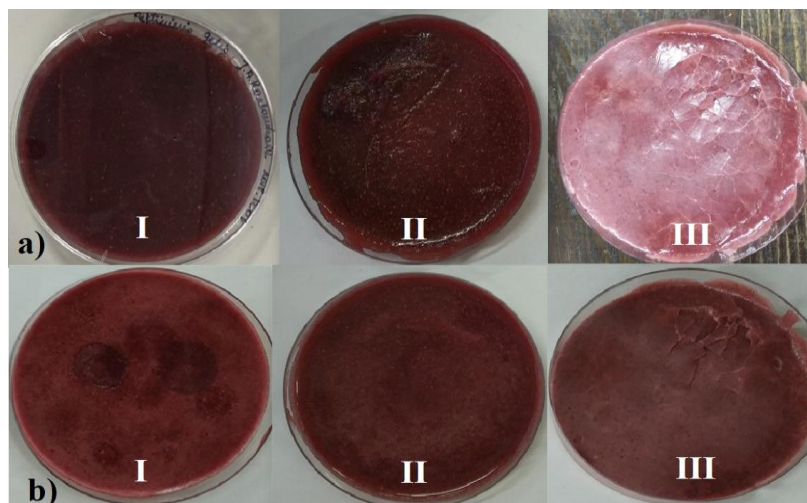
Geliai su sorbitolio (žr. 3.22. pav., a) ir sacharozės (I), maltitolio (II) ar eritritolio (III) kombinacijomis pagal struktūrą vizualiai nesiskyrė. Be to, nėra skirtumų tarp tiriamų gelių, ruošų su gliukozės sirupu kombinacijose su anksčiau paminėtais saldikliais, išvaizdos (žr. 3.22. pav., b). Pažymėtina, kad gliukozės sirupas geliams suteikia ryškesnę ir priimtinesnę vartotojui spalvą.



**3.22. pav.** Sorbitolio (a) ir gliukozės sirupo (b) kombinacijose su sacharozė (I), maltitoliu (II) ir eritritoliu (III) įtaka gelių, ruošų su 10 % aviečių išspaudų priedu, struktūrai

Papildomai, gelių su 10 % aviečių išspaudų priedu struktūrizavimui be agaro buvo išbandytas ir pektinas bei želatina (žr. 2.1. lentelę). Pektino geliai gauti skystos konsistencijos ir tamsios išvaizdos (žr. 3.23. pav., a). Tiriamieji mėginiai, ruošti su eritritoliu, išsiskyrė savo spalva ir kieta konsistencija, tačiau dėl kristalizacijos proceso struktūra buvo nevienalytė.

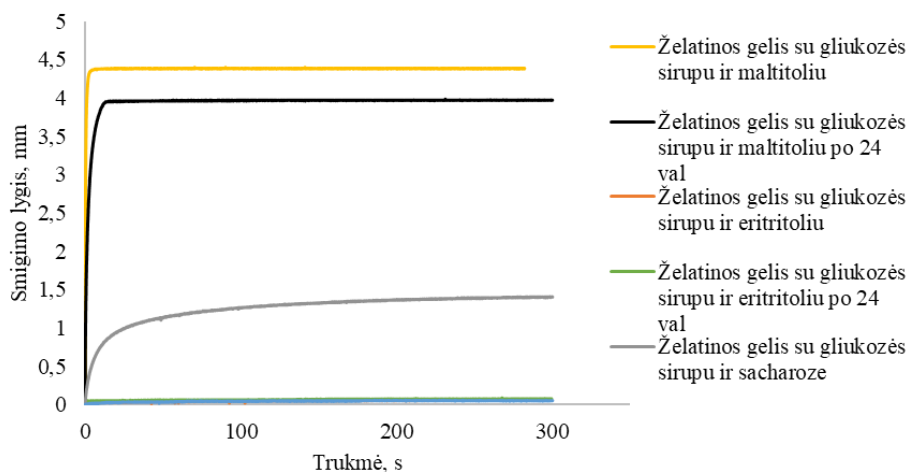




**3.23. pav.** Pektino (a) ir želatinos (b) gelių, ruoštų 10 % aviečių išspaudų priedu ir saldikliais ( I – sacharozė; II – maltitolis; III – eritritolis), struktūros

Geliai (su 10 % aviečių išspaudų priedu) ir želatina, ruošti su gliukozės sirupu ir sacharozė bei gliukozės sirupu kombinacijoje su maltitoliu, struktūra tarpusavyje beveik nesiskyrė (žr. 3.23. pav., b), tačiau buvo tamsūs ir nepriimtini vartotojui. Geliai su eritritoliu ir gliukozės sirupu kristalizavosi ir labai greitai kietėjo, tačiau buvo nevienalytės struktūros.

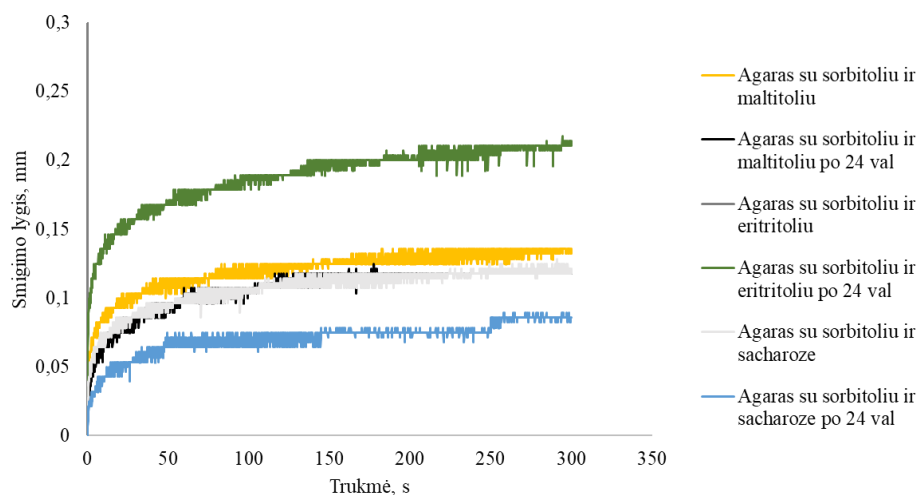
Tekstūros tyrimų rezultatai patvirtino, kad kiečiausi geliai buvo gaunami, jų ruošimui naudojant eritritolį (žr. 3.24. pav.). Minkščiausios konsistencijos buvo geliai, ruošti su maltitoliu ir šie mėginiai laikymo metu (24 val.) nesufurmavo tvirtos struktūros.



**3.24. pav.** Gelių, ruoštų 10 % aviečių išspaudų priedu ir struktūrizuotų su želatina, tekstūros tyrimo rezultatai

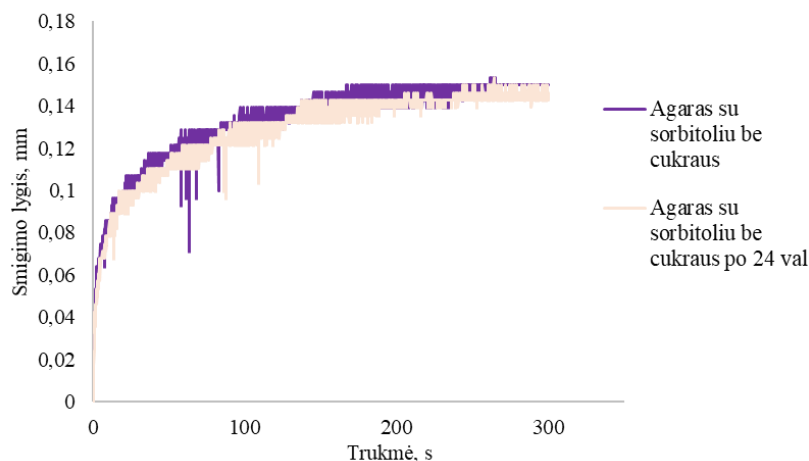
Gelių su aviečių išspaudų priedu ruošimui nepasiteisino nei pektinas, nei želatina. Geriausi pagal kokybę (tekstūrą ir mėginių išvaizdą) buvo gauti mėginiai, kurių ruošimui buvo naudojamas agaras, gliukozės sirupas ar sorbitolis kombinacijose su saldikliais. Jie tolesnio eksperimento metu bus naudojami formuluočių su padidintu aviečių išspaudų kiekiu (20 %) vystymui.

**Gelių, ruoštų su 20 % aviečių išspaudų priedu** ir skirtingais saldikliais buvo stebimi tekstūros pokyčiai (žr. 3.25., 3.26., 3.27. pav.). Naudojant sorbitolį kombinacijoje su sacharozė (žr. 3.25. pav.), po 24 valandų laikymo buvo fiksuota kiečiausia gelių tekstūra. Minkštesnė struktūra buvo sorbitolio gelio, ruošto kombinacijoje su maltitoliu. Pažymėtina, kad geliai ruošiami su padidintu aviečių išspaudų kiekiu (20 %) ir eritritoliu nesikristalizavo, tačiau buvo minkštos konsistencijos.



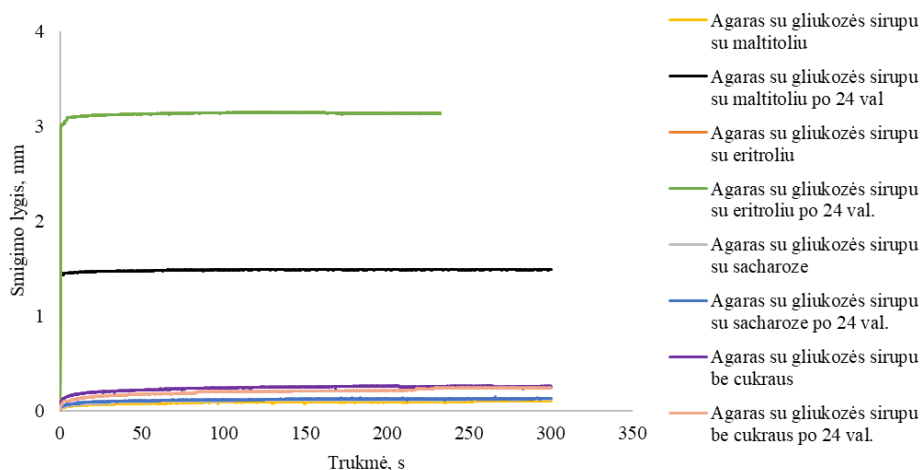
**3.25. pav.** Sorbitolio gelių su įvairiais saldikliais klampos tyrimo akustiniu tekstūros prietaisu rezultatai

Tiriant gelius (20 % aviečių išspaudų priedu) su sorbitoliu (nenaudojant papildomo cukraus) (žr. 3.26. pav.), stebima, kad eritritolis (formuluotėse) minkština gelių konsistenciją, o maltitolis ir sacharozė – kietina.



**3.26. pav.** Sorbitolio gelių be cukrų klampos tyrimo akustiniu tekstūros prietaisu rezultatai

Naudojant saldiklius kombinacijose su gliukozės sirupu, gelių, su 20 % aviečių išspaudų priedu, ruošimui (žr. 3.27. pav.), kiečiausia tekstūra po pagaminimo išsiskyrė geliai, ruošti su maltitoliu, tuo tarpu po 24 val. laikymo jie tapo minkštesni. Gliukozės sirupo priedai, ruošiant gelius tiek su padidintu aviečių išspaudų (20 %), tiek ir su mažesniu kiekiu (10 %), skystino konsistenciją. Šis efektas gelių, ruošiamų su didesniu aviečių išspaudų kiekiu (20 %), buvo didesnis nei su mažesniu šio priedo kiekiu (10 %).



**3.27. pav.** Gliukozės sirupo gelių su skirtingais cukrais klampos tyrimo akustiniu tekstūros prietaisu rezultatai

Nustatyta, kad aviečių išspaudų kiekis turėjo reikšmingos įtakos gelių (su agaru) tekstūrai: gelių, ruoštų su 10 % išspaudų priedu, kietumas fiksuotas vidutiniškai 10 % didesnis nei gelių, ruoštų su 20 % šio priedo kiekiu. Gelių su agaru tekstūrą galima modifikuoti, parenkant saldiklių rūšį. Tokios technologinės galimybės buvo stebimos, ruošiant gelius tiek su mažesniu (10 %), tiek su didesniu aviečių išspaudų kiekiu (20 %). Agaro gelių ruošimui su eteriniais aliejais ir PRB fermentuotomis kokosų išspaudomis buvo pasirinkta sorbitolio su maltitoliu kombinacija ir 20 % aviečių išspaudų priedu.

### 3.3.2. Funkcionalizuotų kokosų baltyminių medžiagų įtaka gelių tekstūrai ir struktūrai

Geliai su imobilizuotais krakmole eteriniais aliejais ir PRB fermentuotomis kokosų išspaudomis buvo tvirtesni nei kontroliniai mėginiai, ruošti be šių priedų (žr. 3.8. lentelę). Po 24 valandų buvo stebimas kontrolinių gelių tvirtumo didėjimas. Šių gelių konsistencija taip pat padidėjo po 24 val. laikymo. Gelių kohezija (rišlumas) ir klampa laikymo metu reikšmingai nekito visuose geluose.

**3.8. lentelė.** Agaro gelių tekstūros analizatoriaus rezultatai

Mėginiai	Tvirtumas, N	Konsistencija, g · s	Kohezija, N	Klampa, g · s
Kontrolė (be kokosų ir eterinių aliejų)	14,25	67,08	-0,28	-0,77
Kontrolė po 24 val.	16,33	68,1	-0,28	-0,76
Su arbatmedžių eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis	43,66	76,4	-0,23	-1,46
Su arbatmedžių eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis po 24 val.	33,83	80,6	-0,28	-1,57
Pipirmėčių eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis	42,67	75,65	-0,25	-1,7
Pipirmėčių eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis po 24 val.	32,18	79,12	-0,26	-1,68

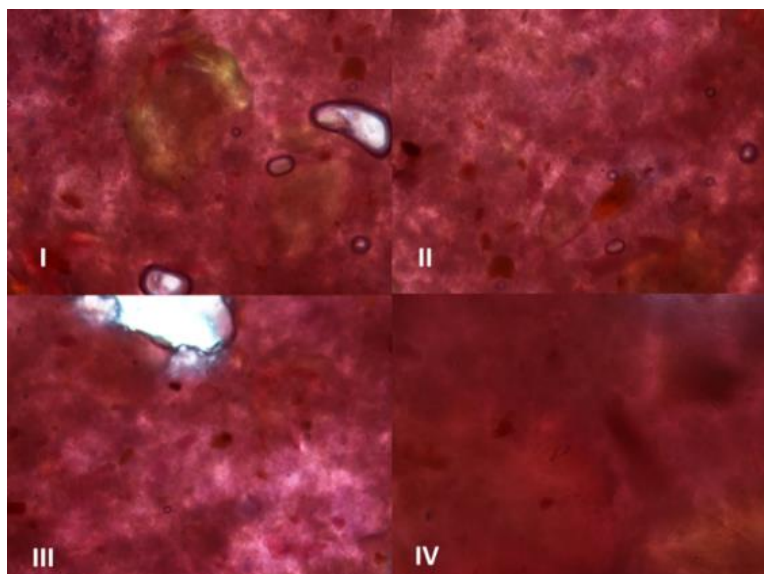
Nustatyta, kad eterinio aliejaus rūšis neturėjo reikšmingos įtakos gelių tekstūrai. Gelių su skirtingais eteriniais aliejais (arbatmedžių ir pipirmėčių) išvaizda taip pat nesiskyrė (žr. 3.28. pav.). Lyginant tiriamus gelius, ruoštus su skirtingais eteriniais aliejais ir PRB fermentuotomis kokosų išspaudomis,

su kontroliniu mėginiu (be kokosų išspaudų), pastebėta, kad fermentuotų kokosų išspaudų priedai kietina gelių tekstūrą, tačiau po 24 valandų mėginių laikymo buvo stebimas jų tvirtumo mažėjimas.



**3.28. pav.** Agaro geliai su imobilizuotais krakmole eteriniais aliejais I – arbatmedžių eteriniu aliejumi; II – pipirmėčių eteriniu aliejumi ir PRB fermentuotomis kokosų išspaudomis

Agaro geliai su imobilizuotais krakmole eteriniais aliejais (arbatmedžių ir pipirmėčių) ir PRB fermentuotomis kokosų išspaudomis pasižymėjo tolygia struktūra (žr. 3.29. pav.).



**3.29. pav.** Agaro gelių su imobilizuotais eteriniais aliejais ir PRB fermentuotomis kokosų išspaudomis struktūra: I – gelis su arbatmedžių eteriniu aliejumi, didinimas 4 kartai; II – gelis su arbatmedžių eteriniu aliejumi didinimas 10 kartų; III – gelis su pipirmėčių eteriniu aliejumi, didinimas 4 kartai; III – gelis su pipirmėčių eteriniu aliejumi, didinimas 10 kartų

Optimizuojant gelių receptūras didžiausias dėmesys buvo teiktas jų išvaizdai ir savybėms, kurios būtų priimtinos vartotojui. Gelių spalvą reikšmingai pagerino padidintas aviečių išspaudų priedo kiekis nuo 10 % iki 20 %. Saldikliai naudoti gelių gamyboje keitė gelių struktūros savitumus. Su sorbitoliu naudoti saldikliai pasižymėjo skirtingomis savybėmis. Geriausias savybes suteikė sorbitolis kombinacijoje su maltitoliu, geliai su šiais saldikliais buvo kiečiausi. Kokosų išspaudos ir parinktos teisingos cukrų kombinacijos suteikia geliui tvirtą struktūrą ir užtikrina, kad galutiniam produkte nebūs deformacijų.

### 3.3.3. Funkcionalizuoto krakmolo panaudojimo galimybės gelių struktūrizavimui

Krakmolo gelių, kurie buvo gaminami naudojant vienfazį gaminimo būdą, tvirtumas bei konsistencija didėjo po 24 val. (žr. 3.9. lentelę). Krakmolo geliai, kur krakmolas buvo veiktas aukšto dažnio ultragarsu (850 kHz, intensyvumas 2 W/cm<sup>2</sup>, 15 min., pH 7) atskirai nuo aviečių ir sorbitolio (dvifazis

ruošimo būdas), po paros prarado savo tvirtumą, nors konsistencijos vertės didėjo. Visų krakmolo gelių kohezija (rišlumas) ir klampa, kaip ir agarų gelių atveju, buvo panaši.

Geriausi krakmolo geliai buvo geliai su krakmole imobilizuotu eteriniu aliejumi (arbatmedžių ar pipirmėčių) ir su PRB fermentuotais kokosais, kurie buvo gaminami naudojant vienfazį gaminto būdą. Kontrolėi mėginiai, kurie buvo gaminti dvifaziu būdu be eterinių aliejų ir fermentuotų kokosų išspaudų, buvo stipresni nei naudojant eterinius aliejus ir fermentuotą produktą.

Lyginant geriausias rezultatus turinčius agarų ir krakmolo gelius, nustatyta, kad agarų geliai buvo tvirtesni, nors geresne konsistencija pasižymėjo krakmolo geliai. Abiejų tipų geliuose struktūra kietėjo po 24 valandų. Nors visų gelių kohezija buvo panaši, bet didesne klampa pasižymėjo agarų geliai.

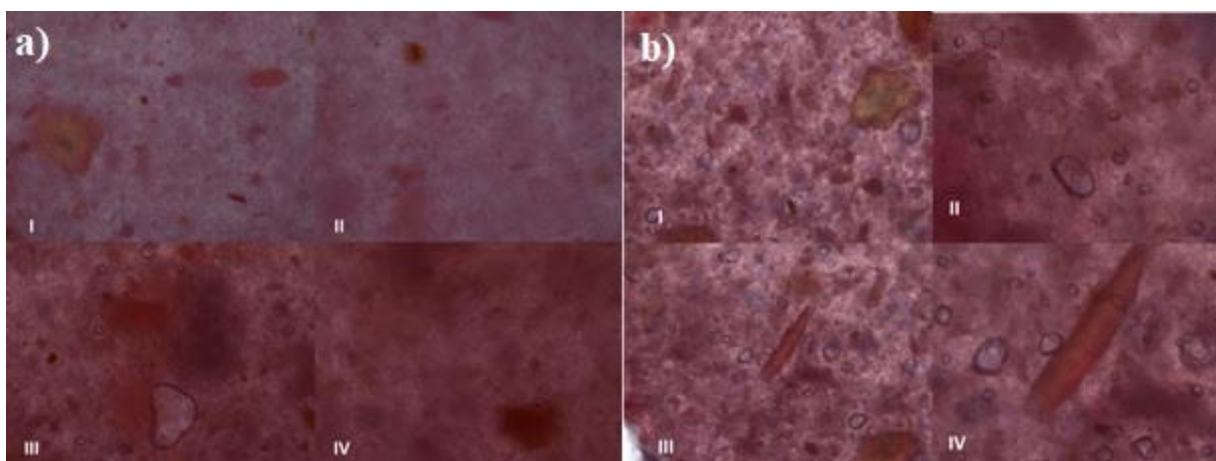
**3.9. lentelė.** Gelių su sonifikuoto krakmolo priedais tekstūros tyrimo rezultatai

Mėginiai	Tvirtumas, N	Konsistencija, g · s	Kohezija, N	Klampa, g · s
Kontrolė (be kokosų ir eterinių aliejų), veikta atskirai	33,72	65,02	-0,62	-0,82
Kontrolė, veikta atskirai, po 24 val.	25,47	86,74	-0,25	-0,66
Kontrolė, veikta kartu	4,66	6,09	-0,26	-0,64
Kontrolė, veikta kartu, po 24 val.	6,43	20,45	-0,28	-0,71
Su arbatmedžių eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis, veikta atskirai	8,75	28,31	-0,54	-0,6
Su arbatmedžių eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis, veikta atskirai po 24 val.	5,94	30,08	-0,28	-0,74
Su arbatmedžių eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis, veikta kartu	19,96	59,81	-0,23	-0,55
Su arbatmedžių eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis, veikta kartu, po 24 val.	25,45	101,98	-0,26	-0,67
Su pipirmėčių eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis, veikta atskirai	16,25	10,94	-0,23	-0,04
Su pipirmėčių eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis, veikta atskirai, po 24 val.	4,72	21,84	-0,34	-0,66
Su pipirmėčių eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis, veikta kartu	17,06	57,3	-0,27	-0,7
Su pipirmėčių eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis, veikta kartu, po 24 val.	19,63	99,43	-0,23	-0,83

Krakmolo geliuose su imobilizuotais krakmole eteriniais aliejais (arbatmedžių ir pipirmėčių) ir fermentuotomis kokosų išspaudomis nebuvo tolygios struktūros. Stebint pro mikroskopą krakmolo gelius su arbatmedžių ar pipirmėčių eteriniu aliejumi, kurie buvo pagaminti skirtingais būdais (vienfaziu ir dvifaziu būdu) buvo pastebėta krakmolo grūdelių (žr. 3.30. pav., a ir b). Vadinasi, kad įvyko ne visų krakmolo grūdelių želatinacija.



Veikiant krakmolą kartu su aviečių išspaudomis ir sorbitoliu aukšto dažnio ultragarsu, skiriasi gelio spalva – ji yra šiek tiek intensyvesnė (žr. 3.30. pav., III ir IV) nei sonifikuotų krakmolo gelių (be priedų) (žr. 3.30. pav., I ir II). Krakmolo geliuose su pipirmėčių ar arbatmedžių eteriniais aliejais buvo fiksuotos tos pačios tendencijos



**3.30. pav.** Krakmolo gelių su imobilizuotu arbatmedžių eteriniais aliejumi (a) ar pipirmėčių eteriniu aliejumi (b) bei PRB fermentuotomis kokosų išspaudomis (abiem atvejais) struktūros: I – gelis gamintas veikiant krakmolą ultragarsu atskirai nuo aviečių ir sorbitolio, didinimas 4 kartai; II – gelis gamintas veikiant krakmolą ultragarsu atskirai nuo aviečių ir sorbitolio, didinimas 10 kartų; III – gelis gamintas veikiant krakmolą ultragarsu kartu su aviečių išspaudomis ir sorbitoliu, didinimas 4 kartai; IV – gelis gamintas veikiant krakmolą ultragarsu kartu su aviečių išspaudomis ir sorbitoliu, didinimas 10 kartų

Lyginant agarą ir krakmolo gelius, agarą geliai buvo daug tolygesnės struktūros ir ryškesnės patrauklesnės spalvos.

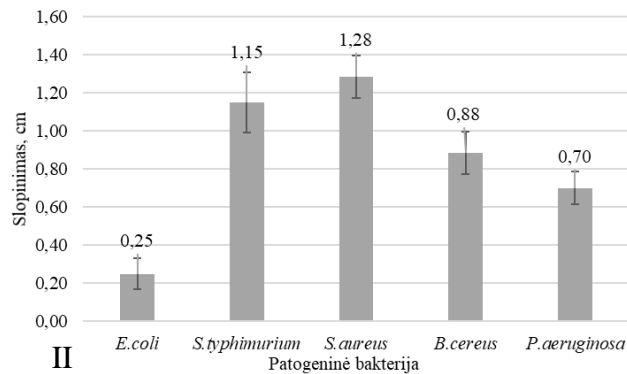
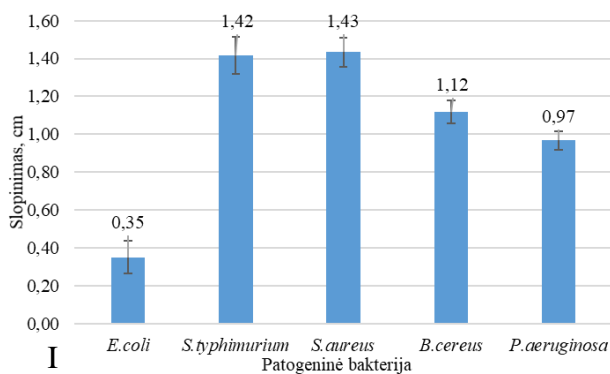
Agaras yra plačiai naudojamas maisto pramonėje, tačiau yra importinė brangi žaliava, kuriai būtų tikslinga ieškoti alternatyvų iš vietinių augalinių resursų. Pastaruoju metu vis didesnis dėmesys skiriamas prebiotinėmis savybėmis pasižyminčiam virškinimui atspariam krakmolui. Šio tyrimo metu išbandytas ultragarsas krakmolo modifikavimui ir įrodyta galimybė keisti krakmolo funkcines savybes. Geliai su modifikuotu krakmolu gali būti gaminami panašiai kaip ir su agaru, kaitinamas krakmolos kleisterizuojasi, o po to kietėja virsdama į gelį. Tačiau geliai, ruošti su fermentuotų kokosų išspaudų priedais ir modifikuotu krakmolu buvo minkštesnės konsistencijos nei ruošiant juos su agaru. Manoma, kad parinkus tinkamą krakmolo sonifikacijos būdą (vienfazį – kartu su kitais receptūriniais komponentais) gelių gamybai, galima būtų sumažinti neigiamą PRB fermentuotų kokosų išspaudų poveikį ir sustiprinti tekstūrą.

### 3.4. Gelių su imobilizuotais funkcionalizuotais komponentais antibakterinis aktyvumas

#### 3.4.1. Antimikrobinės funkcionalizuotų gelių savybės

Siekiant patikrinti antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių eterinių aliejų imobilizavimo struktūrizuotose geliuose efektyvumą, buvo atlikti hidratuotų gelių su veikliosiomis medžiagomis antimikrobinio aktyvumo tyrimai šulinėlių metodu.

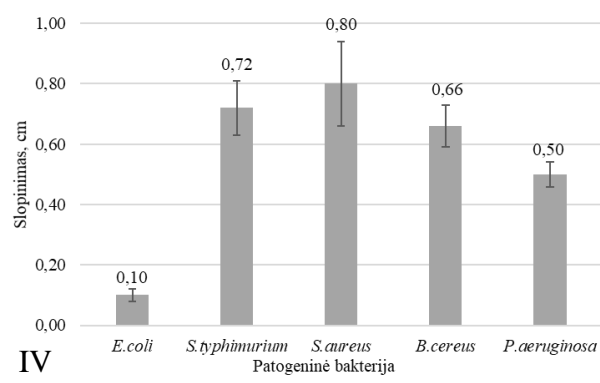
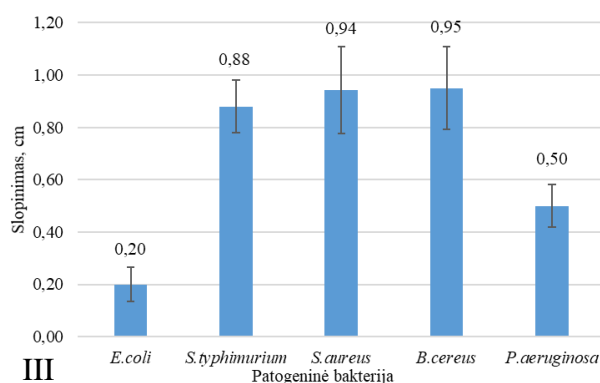
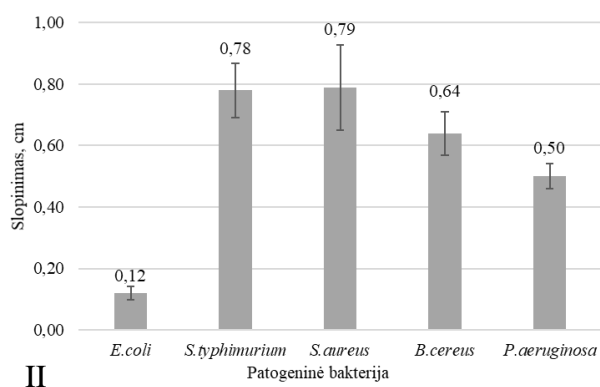
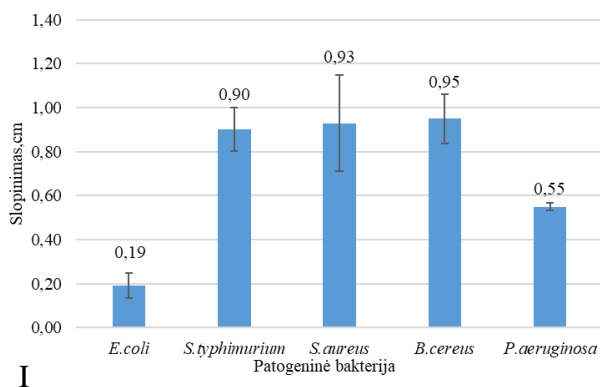
**Agarų geliai** su imobilizuotais arbatmedžių eteriniais aliejais ir PRB fermentuotais kokosų išspaudų priedais pasižymėjo stipriu antimikrobinio poveikiu (žr. 3.31. pav., I). Tiriama mėginiai geriausiai veikė prieš *S. typhimurium* (1,42 cm) ir *S. aureus* (1,43 cm). Mažiausiai šie geliai slopino *E. coli* – 0,35 cm.



**3.31. pav.** Agaro gelio (100 mg/ml), su imobilizuotu arbatmedžių (I) ar pipirmėčių (II) eteriniu aliejumi ir fermentuotomis kokosų išspaudomis (I ir II), antibakterinis aktyvumas

Geliai su pipirmėčių eteriniu aliejumi, kaip ir geliai su arbatmedžių eteriniu aliejumi, pakankamai stipriai slopino patogenus: *S. typhimurium* (1,15 cm) ir *S. aureus* (1,28 cm) (žr. 3.31. pav., II). Silpniausiai slopino – *E. coli* (0,25 cm). Lyginant agaro gelius ruoštus su skirtingais eteriniais aliejais, mėginiai, kurių ruošimui buvo naudoti arbatmedžių eteriniai aliejai, pasižymėjo didesniu antimikrobinu aktyvumu nei geliai su pipirmėčių eteriniu aliejumi.

**Krakkolo geliai** su arbatmedžių eteriniais aliejais ir PRB fermentuotomis kokosų išspaudomis geriausiai slopino *S. aureus* ir *B. cereus* (žr. 3.32. pav., I ir III). Mažiausias šių mėginių antimikrobinis aktyvumas, kaip ir agaro gelių atveju, buvo pastebėtas prieš *E. coli*.



**3.32. pav.** Krakkolo gelių, (100 mg/ml) su imobilizuotais arbatmedžių (I; III) ar pipirmėčių (II; IV) eteriniais aliejais bei PRB fermentuotų kokosų išspaudų priedais, antibakterinis aktyvumas, kai mėginiai su atitinkamais eteriniais aliejais buvo gaminami sonifikuojant krakkolą kartu su kitomis žaliavomis (I; II) ir atskirai be jų (III; IV)

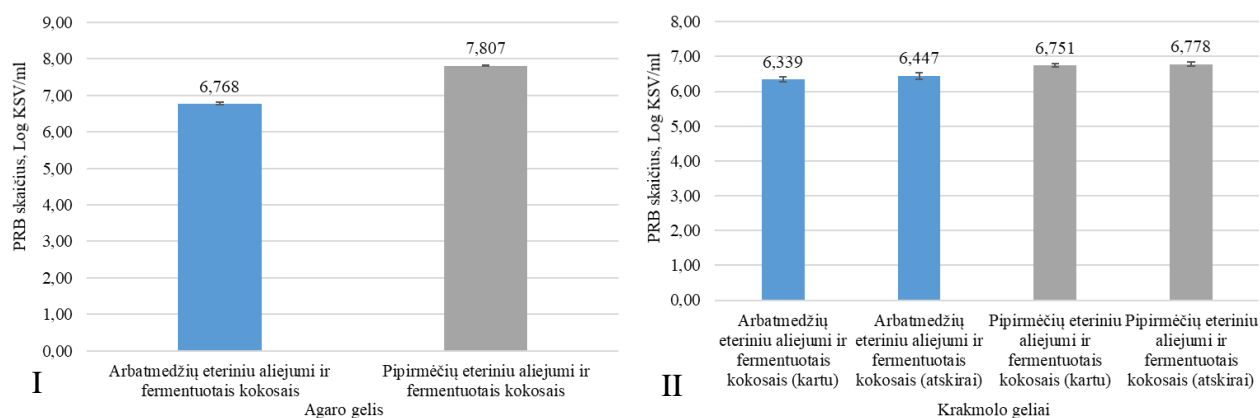
Kraskmolo geliai su pipirmėčių eteriniu aliejumi ir PRB fermentuotų kokosų išspaudų priedais, kaip ir mėginiai su arbatmedžių eteriniu aliejumi, geriausiai slopino *S. aureus* ir *S. typhimurium*. Mažiausias slopinimas buvo prieš *E. coli* (žr. 3.32. pav., II ir IV). Lyginant tarpusavyje mėginių, ruošų su skirtingais eteriniais aliejais, antimikrobinį aktyvumą, kraskmolo geliai su arbatmedžių eteriniu aliejumi pasižymėjo didesniu antibakteriniu aktyvumu nei su pipirmėčių (žr. 3.32. pav.).

Nustatyta, kad kraskmolo gelių gamybos būdas t. y. ar kraskmolas bus apdorojamas ultragarsu kartu su kitomis žaliavos (vienfazis) ar atskirai (dvifazis) neturėjo didelės įtakos mėginių antimikrobiniam aktyvumui. Ši tendencija buvo pastebėta tiek kraskmolo geliuose su arbatmedžių eteriniu aliejumi (žr. 3.32. pav., I ir III), tiek su pipirmėčių eteriniu aliejumi (žr. 3.32. pav., II ir IV).

Nustatyta, kad kraskmolo geliai su arbatmedžių bei pipirmėčių eteriniais aliejais ir fermentuotomis kokosų išspaudomis pasižymėjo mažesniu antibakteriniu aktyvumu prieš patogenines bakterijas nei agaro geliai.

### 3.4.2. PRB aktyvumas hidratuotose geliuose

Tiriant pieno rūgšties bakterijų panaudojimo galimybes antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių gelių ruošimui, šiame tyrimų etape vertintas PRB gyvybingumas įvairiai struktūrizuotuose ir skirtingos formuluotės mėginiuose (žr. 3.33. pav.).



**3.33. pav.** PRB gyvybingumas agaro geliuose (I) ir kraskmolo geliuose (II) su kraskmole imobilizuotais eteriniais aliejais

Tyrimų rezultatai rodo, kad PRB gyvybingumas pagamintuose geliuose sumažėjo (nuo 9,097 log KSV/ml (žr. 3.7. pav., II)): agaro geliuose iki 6,768 log KSV/ml (su arbatmedžių eteriniu aliejumi) ir 7,807 log KSV/ml (su pipirmėčių eteriniu aliejumi), o kraskmolo geliuose vidutiniškai iki 6,393 log KSV/ml (su arbatmedžių eteriniu aliejumi) ir KSV/ml 6,764 log KSV/ml (su pipirmėčių eteriniu aliejumi). Agaro geliuose su pipirmėčių eteriniu aliejumi PRB gyvybingumas buvo didesnis nei geliuose, ruoštuose su arbatmedžių eteriniu aliejumi (žr. 3.33. pav., I). Kraskmolo geliuose taip pat daugiau PRB bakterijų išliko geliuose, kurie buvo ruošti su pipirmėčių eteriniu aliejumi (žr. 3.33. pav., II).

Kraskmolo gelių gamybos būdas, sonifikuojant kraskmolą kartu ar atskirai su kitais receptūriniais komponentais, neturėjo reikšmingos įtakos PRB gyvybingumui. Lyginant išlikusių PRB skaičių agaro geliuose su kraskmolo geliais, nustatyta, kad agaro geliuose PRB išliko daugiau.

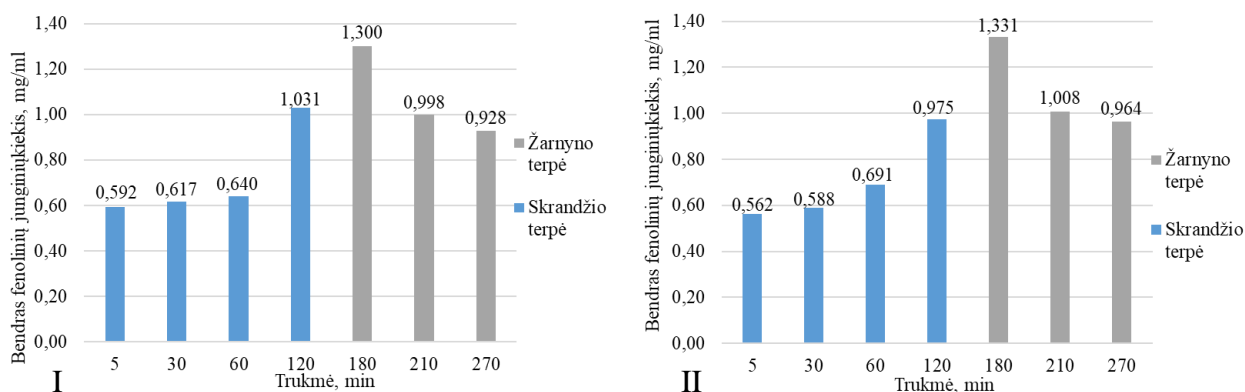


### 3.5. Biologiškai aktyviųjų komponentų struktūrizuotuose geliuose atsipalaidavimo *in vitro* savitumai

Fiziologinio gelių aktyvumo įvertinimui atlikti fenolinių junginių atsipalaidavimo iš skirtingai struktūrizuotų gelių *in vitro* tyrimai. Analizei mėginiai buvo ruošti su skirtingais stabilizatoriais (agaru ir funkcionalizuotu krakmolu), taip pat, išbandant įvairius krakmolo gelių ruošimo būdus (vienfazį ir dvifazį). Agaro geliai buvo ruošiami įvairiai išdėstant veikliąsias medžiagas (eterinius aliejus, PRB fermentuotas baltymines medžiagas): vienasluoksnėse struktūrose ir trisluoksnėse.

#### 3.5.1. Fenolinių junginių atsipalaidavimo *in vitro* iš skirtingos struktūros agaro gelių vertinimas

**Vienasluoksniai agaro geliai** buvo ruošti su imobilizuotais OSA-krakmole arbatmedžių ir pipirmėčių eteriniais aliejais. Fenoliniai junginiai, atsipalaidavę *in vitro* analizės metu iš modeliųjų gelių struktūrų, vertinti Fiolin – Ciocalteu metodu (žr. 3.34. pav.).



**3.34. pav.** Fenolinių junginių atsipalaidavimas *in vitro* agaro geliuose su arbatmedžių (I) ar pipirmėčių (II) eteriniu aliejumi ir PRB fermentuotomis kokosų išspaudų priedais (I; II)

Tyrimai rodo, kad fenoliniai junginiai skrandžio terpėje (pH 2) iš vienasluoksnių agaro gelių su arbatmedžių eteriniu aliejumi iki 60 min. neatsipalaiduoja ir reikšmingas jų padidėjimas stebimas tik po 120 min (1,031 mg/ml). Fenoliniai junginiai efektyviau pradėjo atsipalaiduoti nestipriai bazinėje terpėje (pH 7,5), būdingai žarnynui. Daugiausiai fenolinių junginių žarnyno terpėje nustatyta po 180 min. (1,300 mg/ml) (žr. 3.34. pav., I). Tolesnio mėginių laikymo bazinėje terpėje metu stebimas fenolinių junginių išsiskyrimo mažėjimo tendencija. Minimali fenolinių junginių vertė fiksuota po 270 min. mėginių išlaikymo žarnyno terpėje (0,928 mg/ml).

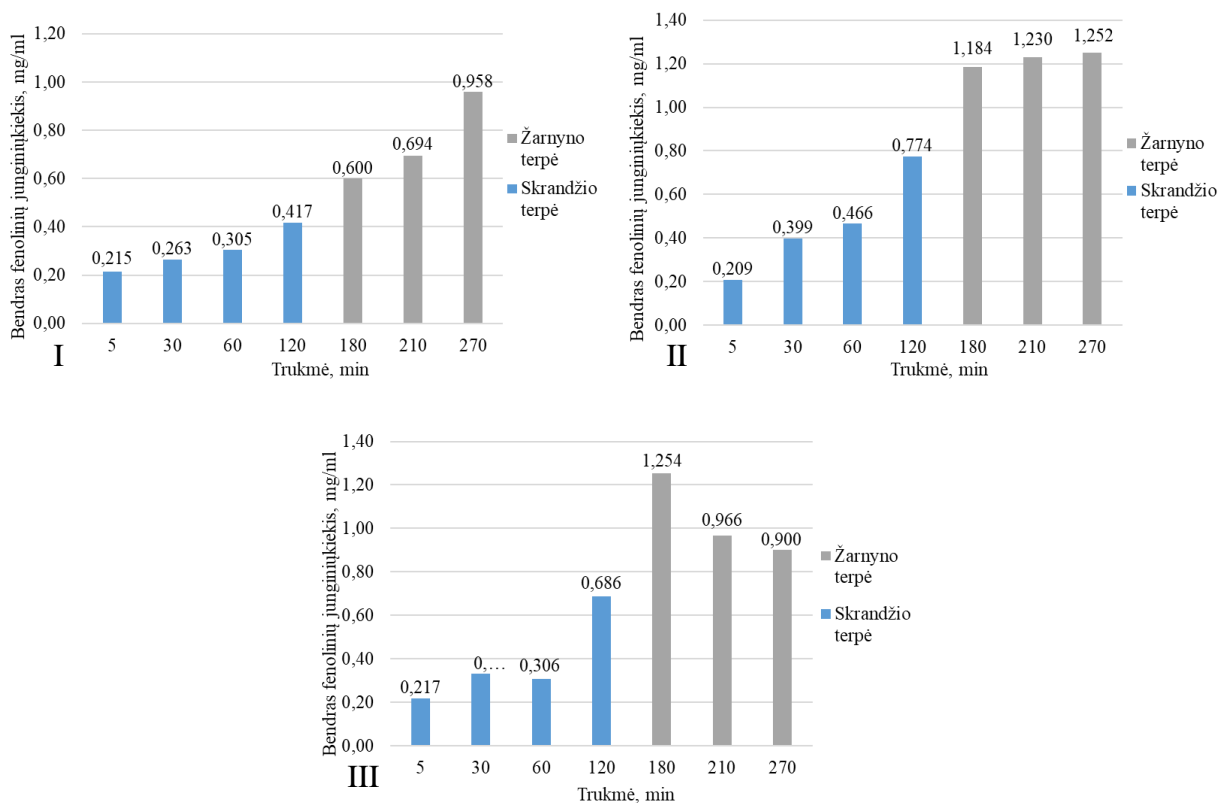
Tiriant agaro gelius su imobilizuotu pipirmėčių eteriniu aliejumi ir PRB fermentuotomis kokosų išspaudomis, buvo stebimas didesnis fenolinių junginių atsipalaidavimas rūgštinėje terpėje po 60 min. nei iš mėginių, ruošų su arbatmedžių eteriniu aliejumi (žr. 3.34. pav., II). Perkėlus mėginius iš pH 2 terpės į pH 7,5, buvo stebimas efektyvus fenolinių junginių atsipalaidavimas. Didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas žarnyno terpėje po 180 min. laikymo (1,331 mg/ml). Tolesnio šių mėginių laikymo metu stebimas fenolinių junginių koncentracijos mažėjimas po 270 min. pasiekiant 0,964 mg/ml.

Taigi, gelių su pipirmėčių eteriniu aliejumi fiziologinis aktyvumas didesnis bazinėje terpėje nei gelių, ruošų su arbatmedžių eteriniu aliejumi. Tuo tarpu gelių su arbatmedžių eteriniu aliejumi fiziologinis poveikis geriau pasireiškia rūgštinėje skrandžio terpėje.

*Trisluoksniuose agaro geliuose* išoriniai gelio sluoksniai gaminti su „Eunutritech“ eterinių aliejų preparatu, o vidurinis sluoksnis – su PRB fermentuotomis baltyminėmis medžiagomis (žr. 2.2. lentelę, V ir VIII receptūros).

Eksperimento metu analizuotas atskirų sluoksnių ir viso trisluoksniu gelio fiziologinis poveikis (žr. 3.35. pav.).

Vertinant fenolinių junginių kiekius, išsiskyrusius iš gelių išorinio sluoksnio su eterinių aliejų mišiniu, (žr. 3.35. pav., I) buvo stebimas jų koncentracijos didėjimas laikymo metu abiejuose terpėse (pH 2 ir pH 7,5). Rūgštinėje skrandžio terpėje fenolinių junginių atsipalaidavimas buvo mažesnis nei bazinėje žarnyno terpėje. Žarnyno terpėje (pH 7,5), viso tyrimo metu buvo stebimas pastovus fenolinių junginių koncentracijos didėjimas, pasiekiant maksimalią vertę po 270 min. (0,958 mg/ml).



**3.35. pav.** Fenolinių junginių atsipalaidavimas *in vitro* trisluoksniuose geliuose: viršutinio ir apatinio sluoksnio su eteriniais aliejais (I), vidurinio baltyminio sluoksnio (II) ir viso trisluoksniu gelio (III)

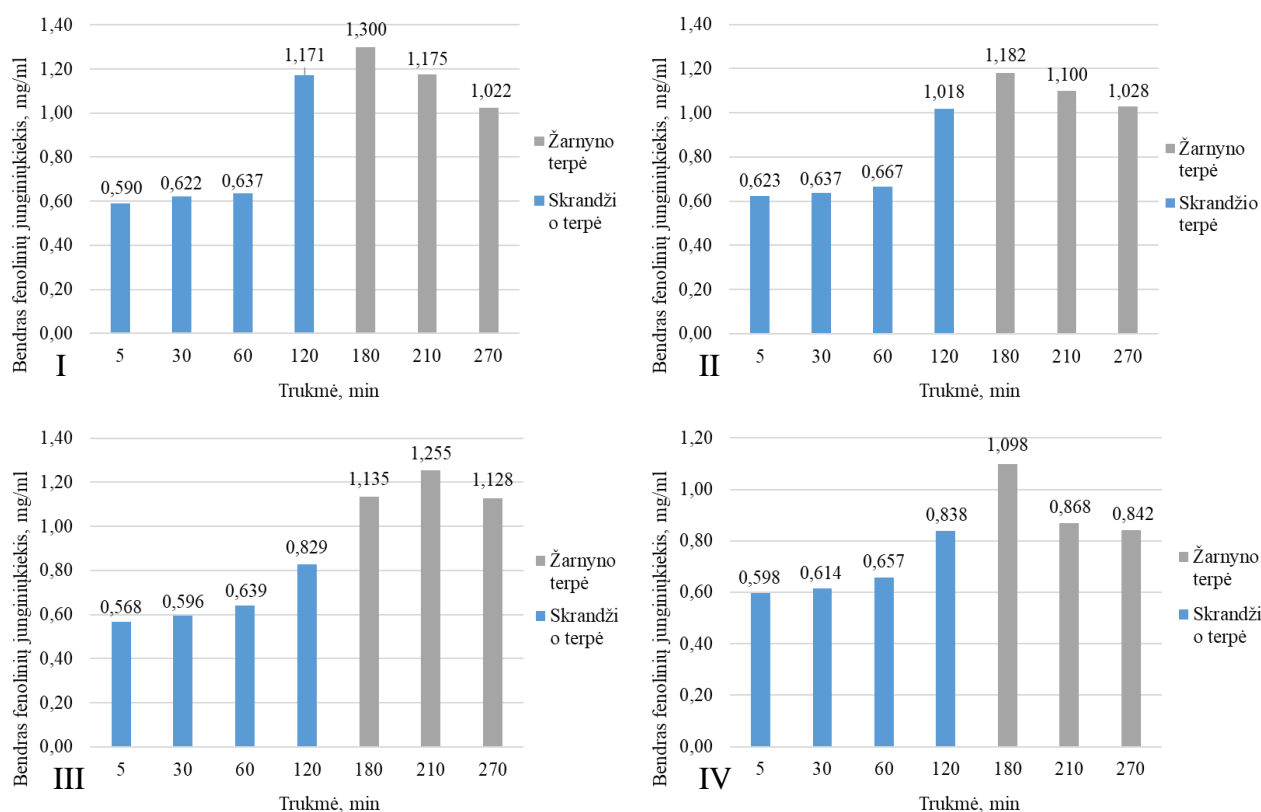
Tiriant fenolinių junginių atsipalaidavimą iš vidinių baltyminių sluoksnių, rūgštinėje terpėje buvo fiksuojama jų atsipalaidavimo didėjimo tendencija (žr. 3.35. pav., II). Kuo ilgiau šios rūšies mėginiai buvo rūgštinėje terpėje, tuo daugiau atsipalaidavo fenolinių junginių. Perkėlus šios rūšies mėginius iš pH 2 terpės į pH 7,5, buvo pastebėtas reikšmingas fenolinių junginių atsipalaidavimo padidėjimas. Daugiausiai fenolinių junginių atsipalaidavo žarnyno terpėje po 270 min (1,252 mg/ml). Pažymėtinas stabilus susidariusių fenolinių junginių koncentracijos bazinėje terpėje išsilaikymas viso testavimo metu.

Sluoksniuotose geliuose, ruoštuose su eteriniais aliejais ir baltyminėmis medžiagomis (žr. 3.35. pav., III) fenolinių junginių atsipalaidavimas nebuvo tolygus (pH 7,5), fiksuojant didžiausią fenolinių junginių koncentraciją po 180 min. (1,254 mg/ml) ir tolesnį jų mažėjimą iki 0,900 mg/ml (po 270 min.).

Naudojant „Eunutritech“ preparatą kartu su PRB fermentuotais produktais (vienasluoksneje struktūroje) buvo pastebėta, kad jie turi neigiamos įtakos PRB gyvybingumui. HPLC analizės metu įrodyta, kad „Eunutritech“ preparatas išlieka gelyje aktyvus ilgesnį laiką nei skysti eteriniai aliejai. Taigi, „Eunutritech“ eterinių aliejų mišiniai (tablečių formoje) gali būti naudojami kaip alternatyva sluoksniuotos struktūros gelių gamybai.

### 3.5.2. Fenolinių junginių atsipalaidavimo *in vitro* iš krakmolo gelių vertinimas

Krakmolo gelių su įvairiais imobilizuotais eteriniais aliejais (arbatmedžių ir pipirmėčių) ir PRB fermentuotomis išspaudomis ruošimo metu buvo varijuojamas technologinis procesas, apdorojant ultragarsu krakmolą kartu su aviečių išspaudomis ir sorbitoliu (vienfazis), o kitu atveju – ultragarsu veikiant tik krakmolą (dvifazis). Fenolinių junginių atsipalaidavimo *in vitro* tyrimo metu rezultatai pateikti 3.36. paveikslėlyje.



**3.36. pav.** Fenolinių junginių atsipalaidavimas *in vitro* iš krakmolo gelių, ruošų su imobilizuotu arbatmedžių (I; II) ar pipirmėčių eteriniu aliejumi (III; IV) ir PRB fermentuotų kokosų išspaudų priedais, kai krakmolas, gelių su atitinkamais eteriniais aliejais ruošimui, buvo apdorojamas ultragarsu atskirai nuo aviečių išspaudų (I; III) ar kartu (II; IV)

Tyrimai rodo, kad geliai, kurie buvo gaminami veikiant tik krakmolą (be kitų žaliavų) aukšto dažnio ultragarsu, atpalaidavo didesnę kiekį fenolinių junginių. Ši tendencija buvo stebima žarnyno terpėje (pH 7,5) ir vienareikšmė buvo tiek tiriant mėginius su arbatmedžių, tiek ir su pipirmėčių (žr. 3.36. pav., I ir III) eteriniu aliejumi. Iš krakmolo gelių su arbatmedžių ir pipirmėčių eteriniais aliejais bei PRB fermentuotomis kokosų išspaudomis (aukšto dažnio ultragarsu veikiant tik krakmolą) (žr. 3.36. pav., I ir III) daugiausiai fenolinių junginių atsipalaidavo pH 7,5 terpėje po 180 min. gelių su arbatmedžių eteriniais aliejais atveju (1,300 mg/ml) ir po 210 min geliuose su pipirmėčių eteriniais aliejais (1,255 mg/ml). Po to, atsipalaidavusių junginių kiekis mažėjo. Intensyvesnis fenolinių junginių kiekio mažėjimas buvo stebimas tiriant gelius, ruoštus su arbatmedžių eteriniu aliejumi.

Tiriamuose mėginiuose, kai krakmolas buvo veikiamas ultragarsu kartu su aviečių išspaudomis ir sorbitoliu, fiksuotas vidutiniškai ~ 13 % mažesnis fenolinių junginių išsiskyrimas žarnyno terpėje nei sonifikuojant krakmolą atskirai. Krakmolo geliuose su arbatmedžių eteriniu aliejumi daugiausiai fenolinių junginių atsipalaidavo po 180 min. – 1,300 mg/ml ir 1,182 mg/ml (žr. 3.36. pav., I ir II). Krakmolo geliuose su pipirmėčių eteriniu aliejumi (kai tik krakmolas veiktas aukšto dažnio ultragarsu), daugiausiai fenolinių junginių atsipalaidavo po 210 minučių – 1,255 mg/ml (žr. 3.36. pav., III).

Pažymėtina, kad rūgštinėje terpėje visais atvejais buvo stebimas tolygus fenolinių junginių koncentracijos didėjimas, tačiau jam neturėjo reikšmingos įtakos gelių gamybos būdas (vienfazis ar dvifazis).

Tokiu būdu, naudojant funkcionalizuotą krakmolą gelių stabilizavimui reikšmingą įtaką turi pasirinkti technologiniai sprendimai. Šio tyrimo metu išryškėjo teigiama funkcionalizuoto krakmolo, nepriklausomai nuo eterinio aliejaus rūšies, įtaka fenolinių junginių atsipalaidavimo efektyvumui žarnyno terpėje.

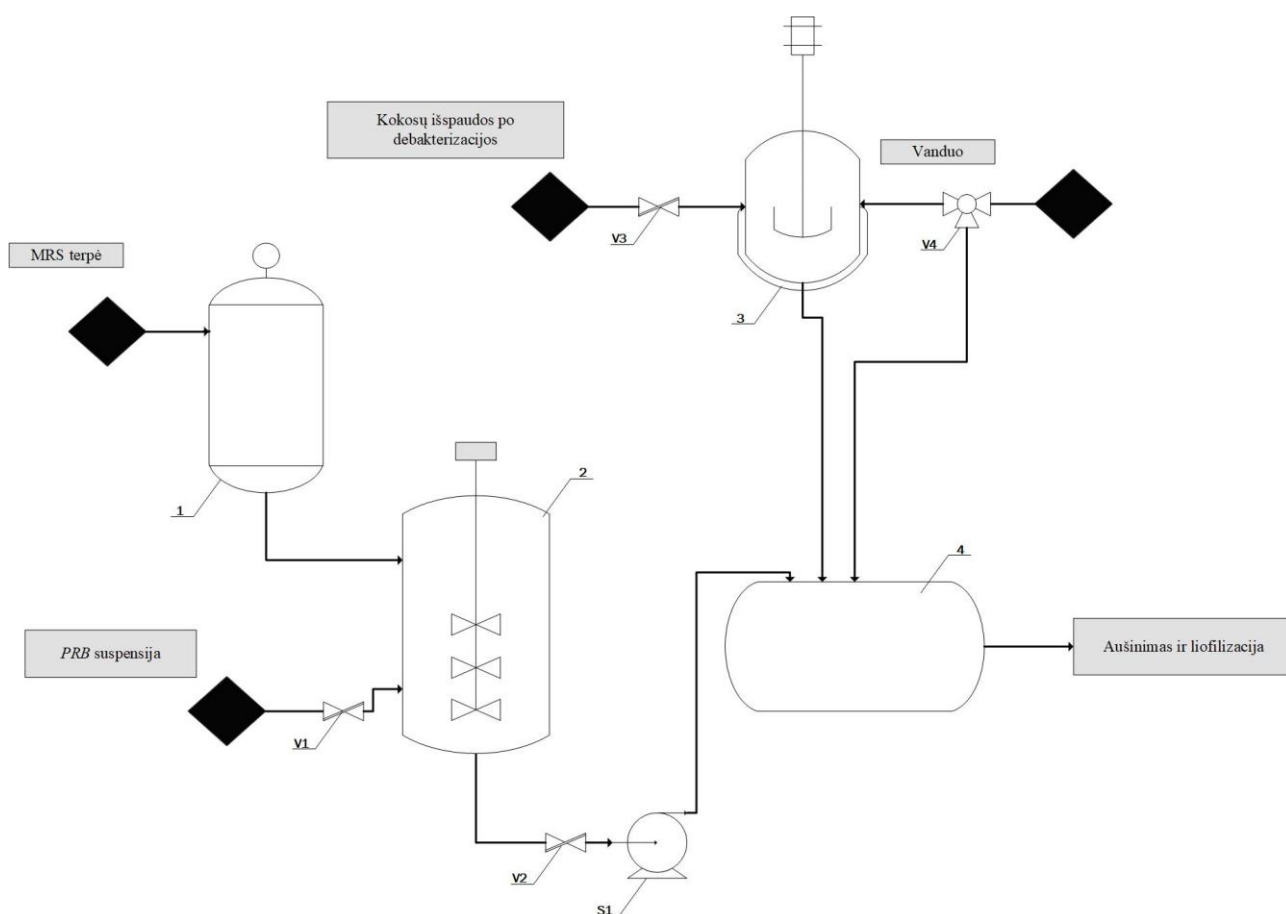
Agaro ir krakmolo geliai pasižymėjo antimikrobinėmis savybėmis, kurias suteikė OSA-krakmole imobilizuoti arbatmedžių ar pipirmėčių eteriniai aliejai. Nors arbatmedžių eterinis aliejus pasižymėjo didesniu antibakteriniu poveikiu nei pipirmėčių, tačiau jis slopino PRB gyvybingumą geliuose. Toks reiškinys buvo stebimas tiek agaro, tiek krakmolo geliuose. Fenolinių junginių iš eterinių aliejų atsipalaidavimui turi įtakos gelių rūšis: iš agaro gelių didesnis efektas gautas su imobilizuotu arbatmedžių eteriniu aliejumi, o krakmolo gelių atveju – su pipirmėčių eteriniu aliejumi. Lyginant agaro gelius pagal fiziologines ir tekstūros savybes (didesnis antibakterinis aktyvumas, PRB išliekamumas, fenolinių junginių atpalaidavimas, kietesnės konsistencijos) su funkcionalizuoto krakmolo geliais, nebuvo nustatytų reikšmingų skirtumų. Tai reiškia, kad modifikuotą krakmolą, pasižymintį prebiotinėmis savybėmis, būtų galima sėkmingai naudoti kaip alternatyvą agarui gelių struktūros stabilizavimui.

## 4. Rekomendacijų dalis

Gaminant augalinės kilmės gėrimus, kokosų produktų ekstrakcijos metu susidaro dideli antrinių produktų (išspaudų) kiekiai, kurie iki šiol neturi plataus pritaikymo ir kelia maisto pramonėje aplinkosaugos problemą. Kokosų išspaudose lieka didelis baltyminių medžiagų kiekis ~ 20 % [44]. Pagal literatūrą, ultragarsinis baltymais turtingų antrinių produktų apdorojimas žematemperatūriniu režimu leidžia padidinti tirpiųjų baltymų kiekį ir jų biopasisavinamumą [99]. Šiame darbe buvo ieškoma biotechnologinių sprendimų, siekiant funkcionalizuoti kokosų išspaudas ultragarsu ir jas pritaikyti antimikrobiniais bioproduktams gaminti.

Kokosų išspaudų funkcionalizavimui taikytas apdorojimas aukšto dažnio ultragarsu (850 kHz; intensyvumas  $2 \text{ W/cm}^2$ ) ir fermentacija antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčiomis pieno rūgšties bakterijomis – *L. paracasei*. Siekiant prailginti gauto bioprodukto realizacijos trukmę, numatytas jų liofilizavimas.

Kokosų išspaudų funkcionalizavimo principinė aparatūrinė schema pavaizduota 4.1. pav.



4.1. pav. Kokosų išspaudų funkcionalizavimo principinė aparatūrinė schema

### Aparatūra:

1 – autoklavas; S1 – siurblys; 2 – bioreaktorius mikroorganizmų dauginimui; V1–3 – vožtuvas; V4 – trijų kelių vožtuvas; 3 – ultragarsinė įranga; 4 – bioreaktorius (kietafazės fermentacijos).

Pirmiausiai vykdomas kokosų išspaudų debakterizavimas, naudojant infraraudonąją spinduliuotę. Kokosų išspaudos sietiniu transporteriu tiekiamos į infraraudonųjų spindulių poveikio zoną, kurioje apdorojamos iki kontroliuojamo mikrobiologinio taršos lygio (pagal BMS tyrimų rezultatus).

Debakterizuotos kokosų išspaudos tiekiamos sonifikacijai, kuri vykdoma ultragarsinėje įrangoje (3) žematemperatūriniu režimu (temperatūra <50 °C), naudojant 850 kHz dažnį, intensyvumas – 2 W/cm<sup>2</sup>. Ultragarso vonioje kokosų išspaudos sumaišomos su vandeniu (santykiu 1:14) ir veikiamos. Po sonifikacijos kokosų išspaudos tiekiamos kietafazei fermentacijai (4).

Tuo pačiu metu ruošiama PRB biomasė, skirta kokosų išspaudų fermentacijai. Biomasė gausinama su pamaitinimu, į bioreaktorių (2) periodiškai tiekiant mitybinę terpę (MRS). Mitybinė terpė (MRS) sterilizuojama autoklave (1) 121 °C temperatūroje (trukmė –15 min). Iš autoklavo, sterili, ataušinta terpė tiekama į bioreaktorių (2) *L. paracasei* pagausinimui. Bioreaktoriuje (2) PRB dauginamos 30 °C temperatūroje 48 val. iki nustatyto optinio tankio (0,7 abs prie 590 nm bangos ilgio). Pagausinta PRB biomasė (2 % nuo išspaudų masės) iš bioreaktoriaus (2) nukreipiama sonifikuotų kokosų išspaudų bioapdorėjimui, kuris vykdomas bioreaktoriuje (4) kietafazės fermentacijos sąlygose (drėgmės kiekis mažesnis nei 50 %). Bioreaktoriuje (4) masė maišoma ir vykdomas fermentacijos procesas 30 °C temperatūroje (trukmė – 36 val.). Pagamintas bioproduktas iškraunamas ir nukreipiamas liofilizavimui.

## Išvados

1. Ištyrus sausojo separavimo panaudojimo galimybes aviečių išspaudų pridėtinės vertės didinimui, nustatyta:
  - didžiausią antioksidacinį aktyvumą parodė smulkiausia (<0,315 mm) ir vidutinė pagal stambumą (0,5–1 mm) aviečių išspaudų frakcijos;
  - aviečių išspaudų frakcijose identifikuoti fenoliniai junginiai buvo elago rūgštis ir hiperozidas, kurių daugiausiai buvo 0,5–1 mm dydžio frakcijoje (atitinkamai 26,90 µg/ml ir 6,23 µg/ml);
  - didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis buvo 1,0–1,6 mm dydžio frakcijoje (19,163 mg/g), o mažiausias – <0,315 mm dydžio frakcijoje (5,829 mg/g);
  - aviečių išspaudos pasižymi antimikrobinu aktyvumu prieš patogenines bakterijas: *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus* ir *P. aeruginosa*.
2. Įvertinus sonifikacijos aukšto dažnio ultragarsu įtaką augalinės žaliavos funkcionalizavimui, įrodyta, kad didžiausias tirpių baltymų kiekis ir koncentracijos atsipalaiduoja kokosų išspaudas veikiant aukšto dažnio ultragarsu (850 kHz, intensyvumas 2 W/cm<sup>2</sup>), 10 min., esant pH 9.
3. Nustatyta, kad sonifikuota kokosų išspaudų suspensija (pH 7) buvo palanki terpė *L. paracasei* dauginimuisi, nustatytas bakterijų skaičius po fermentacijos buvo 9,097 log KSV/ml.
4. Iširta, kad ultragarsinis krakmolo suspensijų apdorojimas aukšto dažnio ultragarsu, reikšmingai mažino suspensijų klampą ir šis efektas priklausė nuo pH. Prailginus sonifikacijos trukmę (iki 45 min.) rūgštinėje terpėje (pH 3), mažėjo mikrobiologinis krakmolo stabilumas laikymo metu.
5. Nustatyta, kad didžiausiu antibakteriniu poveikiu pasižymėjo arbatmedžių eterinis aliejus, o eteriniai aliejai imobilizuoti į OSA-krakmolą buvo tinkamiausi hidrogelių ruošimui.
6. Atlikus agarą hidrogelių struktūrizavimą antimikrobinų komponentų imobilizavimui, nustatyta:
  - 20 % aviečių išspaudų priedas vienasluoksniuose ir trisluoksniuose geliuose (su atrinktu efektyviausiu stabilizatoriumi – agaru) minkštino struktūrą, bet sorbitolio ir maltitolio kombinacija ją stabilizavo;
  - didžiausiu antimikrobinu aktyvumu pasižymėjo vienasluoksniai agarų geliai su imobilizuotu OSA-krakmole arbatmedžių eteriniu aliejumi;
  - didžiausias PRB gyvybingumas buvo įvertintas vienasluoksniuose agarų geliuose su imobilizuotu pipirmėčių eteriniu aliejumi;
  - daugiausia fenolinių junginių atpalaiduota *in vitro* skrandžio terpėje (pH 2) iš agarų gelių su imobilizuotu arbatmedžių eteriniu aliejumi, o žarnyno terpėje (pH 7,5) iš gelių su pipirmėčių eteriniu aliejumi (vienasluoksniai agarų geliai).
7. Įvykdžius krakmolo hidrogelių struktūrizavimą antimikrobinų komponentų imobilizavimui, nustatyta:
  - didžiausiu antimikrobinu aktyvumu pasižymėjo krakmolo geliai, ruošti su imobilizuotu arbatmedžių eteriniu aliejumi;
  - didžiausias PRB gyvybingumas buvo įvertintas geliuose su imobilizuotu pipirmėčių eteriniu aliejumi;
  - daugiausiai fenolinių junginių *in vitro* skrandžio terpėje (pH 2) ir žarnyno terpėje (pH 7,5) atsipalaidavo geliuose su imobilizuotu arbatmedžių eteriniu aliejumi.

## Literatūros sąrašas

1. SCRINIS, G. Reformulation, fortification and functionalization: Big Food corporations' nutritional engineering and marketing strategies. *The Journal of Peasant Studies* [interaktyvus]. 2016, **43**, 17–37 [žiūrėta 2020-04-09]. Prieiga per doi: 10.1080/03066150.2015.1101455;
2. BARAKAT, A., H. VRES, X. ROUAU. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review. *Bioresource Technology* [interaktyvus]. 2013, **134**, 362–373 [žiūrėta 2020-04-10] Prieiga per doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.169;
3. SCHUTYSER, M., A., I., A. J. GOOT. The potential of dry fractionation processes for sustainable plant protein production. *Trends in Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2011, **4**(22), 154–164 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.1016/j.tifs.2010.11.006
4. SCHUTYSER, M., A., I., A. J. GOOT, R. M. BOOM. Dry fractionation for sustainable production of functional legume protein concentrates. *Trends in Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2015, **2**(45), 1–11 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.1016/j.tifs.2015.04.013;
5. KADAM, S., U., et al. Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2015, **46**, 60–67 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.1016/j.tifs.2015.07.012;
6. CHEMAT, F., et al. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* [interaktyvus]. 2011, **18**, 813–835. Prieiga per doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023;
7. WEN, C., J. ZHANG, H. YAO et al. Advances in renewable plant-derived protein source: The structure, physicochemical properties affected by ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry* [interaktyvus] 2019, **53**, 83–98 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ultsonch.2018.12.036
8. FUENTES-ZARAGOZA, E. et al. Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch* [interaktyvus]. 2011, **63**(7), 406–415 [žiūrėta 2020-05-11]. Prieiga per doi: 10.1002/star.201000099
9. ALSAFFAR, A., A. Effect of food processing on the resistant starch content of cereals and cereal products – a review. *Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2011, **46**, 455–462 [žiūrėta 2020-05-11]. Prieiga per doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02529.x;
10. PANDLEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* [interaktyvus]. 2003, **13**(2–3), 81–84 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.1016/S1369-703X(02)00121-3;
11. JUODEIKIENE, Gražina, et al. Fermentation Processes Using Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins for Preservation and Improving Functional Properties of Food Products. Iš: PETRE M., *Advances in Applied Biotechnology*. InTech, 2012, pp. 63–100. ISBN 978-953-51-5176-0;
12. SINGHANIA, R., R., A. K. PATEL, C. R. SOCCOL, A. PANDEY. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* [interaktyvus]. 2009, **44**(1), 13–18 [žiūrėta 2020-04-11]. Prieiga per doi: 10.1016/j.bej.2008.10.019;
13. VUYST, L., F. LEROY. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. 2007, **13**, 194–199 [žiūrėta 2020-04-30]. Prieiga per doi: 10.1159/000104752;
14. STANOJEVIC – NIKOLIC, A., G. DIMIC, L. MOJOVIC et al. Antimicrobial activity of lactic acid against pathogen and spoilage microorganisms. *Journal of Food Processing and Preservation* [interaktyvus]. 2015, **40**(5), 990–998 [žiūrėta 2020-04-30]. Prieiga per doi: 10.1111/jfpp.12679;



15. MIRDAMADI, S., H. SADEGI, N. SHARAFI et al. Comparison of Lactic Acid Isomers Produced by Fungal and Bacterial Strains. *Iranian Biomedical Journal* [interaktyvus], 2002, **6**(2-3), 69–75 [žiūrėta 2020-04-30]. Prieiga per: [ibj.pasteur.ac.ir/article-1-564-en.html](http://ibj.pasteur.ac.ir/article-1-564-en.html);
16. PRADO, F., C. et al. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International* [interaktyvus]. 2008, **41**, 111–123 [žiūrėta 2020-04-11]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodres.2007.10.010](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.010);
17. GUPTA P., D., T. J. BIRDI. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine* [interaktyvus]. 2017, **8**, 266–275 [žiūrėta 2020-04-04]. Prieiga per doi: [10.1016/j.jaim.2017.05.004](https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.05.004);
18. VENTOLA C., L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T* [interaktyvus]. 2015, **40**(4), 277–283 [žiūrėta 2020-04-04]. Prieiga per: [ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/](https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/);
19. DAS, L., E. BHAUMIK, U., RAYCHAUDHURI, R. CHAJRABORTY. Role of nutraceuticals in human health. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2012, **49**(2), 173–183, [žiūrėta 2020-04-04]. Prieiga per doi: [10.1007/s13197-011-0269-4](https://doi.org/10.1007/s13197-011-0269-4);
20. SHANTHA, L., Colon Targeted Delivery Systems: Review of Polysaccharides for Encapsulation and Delivery. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [interaktyvus]. 2007, **45**(4), 451–458 [žiūrėta 2020-04-05]. Prieiga per doi: [10.1080/10408690490478091](https://doi.org/10.1080/10408690490478091);
21. ZHANG, Z., R. ZHANG, E. A. DECKER, D. J. MCCLEMENTS. Development of food-grade filled hydrogels for oral delivery of lipophilic active ingredients: pH-triggered release. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2015, **44**, 345–352 [žiūrėta 2020-04-05]. Prieiga per doi: [10.1016/j.foodhyd.2014.10.002](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.002);
22. BANERJEE, S., BHATTACHARYA, S., Food gels: gelling process and new applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [interaktyvus]. 2012, **52**(4), 334–346, [žiūrėta 2020-04-06]. Prieiga per doi: [10.1080/10408398.2010.500234](https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500234);
23. PADHY, A., A. R. SAHU, S. GANGULY. Nutraceuticals and Their Importance in Health Promotion: A Review. *Journal of biological and chemical research* [interaktyvus], 2015, **32**, 631–634 [žiūrėta 2020-04-05]. Prieiga per doi: [10.22270/jddt.v8i4.1759](https://doi.org/10.22270/jddt.v8i4.1759);
24. BERGER., Ralf, Gunter, *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* [interaktyvus]. Berlin: Springer, 2007 [žiūrėta 2020-04-05]. ISBN 978-3-540-49338-9. Prieiga per: Google books;
25. BURT., S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *International Journal of Food Microbiology* [interaktyvus]. 2004, **94**, 223–253 [žiūrėta 2020-04-08]. Prieiga per doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022);
26. DHIFI, W., S. BELLILI, S. JAZI et. al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines (Basel)* [interaktyvus]. 2016, **3**(4), 25–41 [žiūrėta 2020-04-08]. Prieiga per doi: [10.3390/medicines3040025](https://doi.org/10.3390/medicines3040025);
27. MATOS, S., P., H. F. TEIXEIRA, A. N. LIMA et. al. Essential Oils and Isolated Terpenes in Nanosystems Designed for Topical Administration: A Review. *Biomolecules* [interaktyvus]. 2019, **9**(4), 138–157 [žiūrėta 2020-04-09]. Prieiga per doi: [10.3390/biom9040138](https://doi.org/10.3390/biom9040138);
28. OSUNTOKUN, O., T., A. J. OGUNLEYE. Prospects of essential oils in drug discovery. *Cytology & Pathology* [interaktyvus]. 2017, **2**(1), 17–19 [žiūrėta 2020-04-09]. Prieiga per doi: [10.15406/acp.2017.02.00010](https://doi.org/10.15406/acp.2017.02.00010);
29. ROBERFROID, M., B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *The American Journal of Clinical Nutrition* [interaktyvus]. 2000, **71**(6), 1682–1687 [žiūrėta 2020-04-09]. Prieiga per doi: [10.1093/ajcn/71.6.1682S](https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1682S);

30. KHALIGHI, A., R. BEHDANI, S. KOUHESTANI. Probiotics: A Comprehensive Review of Their Classification, Mode of Action and Role in Human Nutrition. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health* [interaktyvus]. 2016, **1**, 19–39 [žiūrėta 2020-04-08]. Prieiga per doi: 10.5772/63646;
31. MISHRA., S., R. C. RAY, P. K. BEHERA et al. Advances in Probiotics, Prebiotics and Nutraceuticals. *Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries* [interaktyvus]. 2018, 121–141 [žiūrėta 2020-04-08]. Prieiga per doi: 10.1007/978-3-319-74820-7\_7;
32. TERPOU A., A. PAPADAKI, I. K. LAPP A et al. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients* [interaktyvus]. 2019, **11**(7), 1591–1623. [žiūrėta 2020-04-27] Prieiga per doi: 10.3390/nu11071591;
33. SUN -WATERHOUSE, D., J., ZHOU, S. S. WADHWA. Effects of Adding Apple Polyphenols Before and After Fermentation on the Properties of Drinking Yoghurt. *Foods and Bioprocess Technology* [interaktyvus]. 2011, **5**(7), 2674–2686 [žiūrėta 2020-04-27]. Prieiga per doi: 10.1007/s11947-011-0563-1;
34. SLAVIN, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients* [interaktyvus]. 2013, **5**, 1417–1435 [žiūrėta 2020-04-07]. Prieiga per doi: 10.3390/nu5041417;
35. LOCKYER., S., S. STANNER. Prebiotics - an added benefit of some fibre types. *Nutrition Bulletin* [interaktyvus] 2019, **44**, 74–91 [žiūrėta 2020-04-06]. Prieiga per doi: 10.1111/nbu.12366;
36. DAVANI - DAVARI, D., M., NEGAHDARIPOUR, I. KARIMZADEH et al. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Food* [interaktyvus]. 2019, **8** (92), 2–27, [žiūrėta 2020-04-08]. Prieiga per doi: 10.3390/foods8030092;
37. LORDAN, C., D. THAPA, R. P. ROSS, P. D. COTTER. Potential for enriching next-generation health-promoting gut bacteria through prebiotics and other dietary components. *Gut Microbes* [interaktyvus]. 2019, **11**(1), 1–20 [žiūrėta 2020-04-09]. Prieiga per doi: 10.1080/19490976.2019.1613124;
38. PANDEY, K., R., S. R. NAIK, B. V. VAKIL. Probiotics, prebiotics and synbiotics - a review. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2015, **52**(12), 7577–7587 [žiūrėta 2020-04-09]. Prieiga per doi: 10.1007/s13197-015-1921-1;
39. AUGUSTIN, M. A., L. SANGUANSRI. Challenges and Solutions to Incorporation of Nutraceuticals in Foods. *Annual Review of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2015, **6**, 463–477 [žiūrėta 2020-04-09]. Prieiga per doi: 10.1146/annurev-food-022814-015507;
40. STEIN - CHISHOLM, R., C. et al. LC-MS/MS and UPLC-UV Evaluation of Anthocyanins and Anthocyanidins during Rabbiteye Blueberry Juice Processing. *Beverages* [interaktyvus]. 2017, **3**(56), 114–130 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.3390/beverages3040056;
41. VIŠKELIS, J., M. RUBINSKIENE, C. RUBINSKAS, R. BOBINAITĖ. Enrichment of fruit leathers with berry press cake powder increase product functionality. *Food science and technology in a changing world* [interaktyvus]. 2017, **11**, 75–79 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.22616/foodbalt.2017.011;
42. RODSAMRAN, P, R. SOTHORNVIT. Physicochemical and functional properties of protein concentrate from byproduct of coconut processing. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2018, **241**, 364–371 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.116;

43. MEPBA, H, D., ACHINEWHU, S, S. Effects of processing on protein nutritive quality of coconut *Cocos nucifera* products. *Plant Foods for Human Nutrition* [interaktyvus]. 2003, **58**, 15–25 [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per doi: 10.1023/A:1024006620501;
44. LI, Y., Y. ZHENG, J. XU et. al. Antioxidant Activity of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Protein Fractions. *Molecules* [interaktyvus]. 2018, **23**(3), 707–718, [žiūrėta 2019-03-19]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules23030707;
45. SANDHU, A., I. EDIRISINGHE. Red Raspberries and Their Bioactive Polyphenols: Cardiometabolic and Neuronal Health Links. *Advances in Nutrition* [interaktyvus]. 2016, **7**(1), 744–765 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: 10.3945/an.115.009639;
46. BOBINAITĖ, R., P. VIŠKELIS, L. BUSKIENĖ. Extraction of Phenolic Compounds from Raspberry Press Cake. *Sodininkystė ir daržininkystė* [interaktyvus]. 2010, **29**(2), 19–31 [Žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per: [lsdi.lt/straipsniai/29-2/3\\_Bobinaite.pdf](http://lsdi.lt/straipsniai/29-2/3_Bobinaite.pdf);
47. GIBBS, B., S. KERMASHA, A. INTEAZ, Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* [interaktyvus]. 1999, **50**, 213–224 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.1080/096374899101256;
48. PHILLIPS, G., O., P. A. WILLIAMS. *Handbook of Hydrocolloids: Second edition* [interaktyvus]. 2-oji laida. Oxford: Elsevier, 2009 [žiūrėta 2020-04-07]. ISBN 1845695879. Prieiga per: Science Direct;
49. KHANVILKAR, M., RANVEER, R., C., AKASHYA K. et al. Carrier Materials for Encapsulation of Bio-active Components of Food. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2016, **40**(1), 62–73. ISSN 0976 - 044X;
50. MOHNEN, D., Pectin structure and biosynthesis. *Physiology and metabolism* [interaktyvus]. 2008, **11**, 266–277 [žiūrėta 2020-04-07]. Prieiga per doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.006;
51. HOORFAR, Jeffry, *Global Safety of Fresh Produce: A Handbook of Best Practice, Innovative Commercial Solutions and Case Studies* [interaktyvus]. Denmark: Woodhead publisher, 2013 [žiūrėta 2020-04-07]. ISBN: 9781782420187. Prieiga per: Science Direct;
52. ZHU, Y., Bioprocessing for Value - Added Products from Renewable Resources. Iš: YANG, S., T., *New Technologies and Applications*. Ohio: Elsevier, 2007, 373–396. ISBN 978-0-444-52114-9;
53. SPERELAKIS, Nicholas. *Hydrocolloid Applications* [interaktyvus]. Boston: Springer, 1997 [žiūrėta 2020-04-07]. ISBN 978-1-4613-7933-1. Prieiga per: SpringerLink;
54. NEDOVIC, Victor, N., ZUIDAM. *Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* [interaktyvus]. London: Springer, 2010 [žiūrėta 2020-04-08]. ISBN 978-1-4419-1007-3. Prieiga per: SpringerLink;
55. BRUSCHI, Luciano. *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* [interaktyvus]. Paraná: Woodhead Publishing, 2015 [žiūrėta 2020-04-08]. ISBN 978-0-08-100092-2. Prieiga per: Science Direct;
56. WISE, Donald. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology* [interaktyvus]. New York: CRC press, 2000 [žiūrėta 2020-04-08]. ISBN 9780824703691. Prieiga per: Google books;
57. SOWJANYA, M., S. DEBNATH, P. LAVANYA et. al. Polymers used in the Designing of Controlled Drug Delivery System. *Research Journal of Pharmacy and Technology* [interaktyvus]. 2017, **10**(3), 903–912 [žiūrėta 2020-04-11]. Prieiga per doi: 10.5958/0974-360X.2017.00168.8;
58. VRIES M., C., E. E. VAUGHAN, M. KLEEREBEZEM et al, *Lactobacillus plantarum* — survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International*

- Dairy Journal, [interaktyvus]. 2006, **16**, 1018–1028 [žiūrėta 2020-02-18]. Prieiga per doi: 10.1016/j.idairyj.2005.09.003;
59. BARTKIENE, E., M., RUZGUS, V. LELE et al. Development of antimicrobial gummy candies with addition of bovine colostrum, essential oils and probiotics. *International Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2018, **53**, 1227–1235 [žiūrėta 2020-02-20]. Prieiga per doi: 10.1111/ijfs.13701;
  60. WALKER, M. Jonh. *The Protein Protocols Handbook: Second edition* [interaktyvus]. Hatfield: Springer, 2002 [žiūrėta 2020-02-18]. ISBN 0-89603-940-4. Prieiga per: Google books;
  61. GARCIA, N., R., R. V. AROCENA, A.C. LAURENA et al. 11S and 7S Globulins of Coconut (*Cocos nucifera* L.): Purification and Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2005, **53**, 1734–1739 [žiūrėta 2020-02-18]. Prieiga per doi: 10.1021/jf0402173;
  62. LST EN ISO 20483:2013. Varpinių ir ankštinių javų grūdai. Azoto kiekio nustatymas ir žalių baltymų kiekio skaičiavimas. Kjeldalio metodas (ISO 20483:2013). Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2014;
  63. CHUKU, L., C., G. I., KALAGBOR Protein and Mineral Element Content of Coconut (*Cocos nucifera*) Water from Different Species. *American Journal of Advanced Drug Delivery*. 2014, **2**(4), 451–453. ISSN: 2321-547X;
  64. MUMU, S. K., M. M. HOSSAIN. Antimicrobial Activity of Tea Tree oil against Pathogenic Bacteria and Comparison of Its Effectiveness with Eucalyptus Oil, Lemongrass Oil and Conventional Antibiotics. *American Journal of Microbiological Research*. [interaktyvus]. 2018, **6**(3), 73–78 [žiūrėta 2020-02-25]. Prieiga per doi: 10.12691/ajmr-6-3-2;
  65. GARG, Neelima et al. *Laboratory Manual of Food Microbiology* [interaktyvus]. New Delhi: I.K. International Publishing House PVT. Ltd., 2010 [žiūrėta 2020-02-25]. ISBN: 978-93-80578-01-9 Prieiga per: Google books;
  66. STANKOVIC, M., M., N. TOPUZOVIC, M. SOLUJIC. Total Phenolic Content, Flavonoid Concentrations and Antioxidant Activity, of The Whole Plant and Plant Parts Extracts from *Teucrium Montanum* L. Var. *Montanum*, *F. Supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnology & Biotechnological* [interaktyvus]. 2011, **25**(1), 2222–2227 [žiūrėta 2020-02-18]. Prieiga per doi: 10.5504/BBEQ.2011.0020;
  67. LIAUDANSKAS M., P. VIŠKELIS, V. JAKŠTAS, Application of an Optimized HPLC Method for the Detection of Various Phenolic Compounds in Apples from Lithuanian Cultivars. *Journal of Chemistry*, [interaktyvus]. 2014, **2014**(1), 1–10 [žiūrėta 2020-02-18]. Prieiga per doi: 10.1155/2014/542121;
  68. LAVELLI, V., S. CORTI. Phloridzin and other phytochemicals in apple pomace: Stability evaluation upon dehydration and storage of dried product. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2011, **129**, 1578–1583 [žiūrėta 2020-02-18]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2011.06.011;
  69. PREEDY, Victor, Ronald WATSON. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* [interaktyvus] London: Academic Press, 2010 [žiūrėta 2020-02-18]. ISBN 978-0-12-374420-3. Prieiga per: Science Direct;
  70. BARTKIENĖ, E., V. BARKEVICS, L. E. IKKERE et al., The effects of ultrasonication, fermentation with *Lactobacillus* sp., and dehydration on the chemical composition and microbial contamination of bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, [interaktyvus]. 2018, **101**(8), 6787–6798 [žiūrėta 2020-02-18]. Prieiga per doi: 10.3168/jds.2018-14692;
  71. CHAVARRI, M. et al. Mikroencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of*

- Microbiology [interaktyvus]. 2010, **142**, 185–189 [žiūrėta 2020-02-25]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022;
72. PLOVIC, N. et al. Acid-formed pectin gel delays major incomplete kiwi fruit allergen Act c 1 proteolysis in in vitro gastrointestinal digestion. Journal of the Science of Food and Agriculture [interaktyvus]. 2009, **89**, 8–14 [žiūrėta 2020-02-25]. Prieiga per doi: 10.1002/jsfa.3404;
  73. VULIČ J. J., A. S. VELIČANSKI, D. D. ČETOJEVIĆ-SIMIN et al., Antioxidant, antiproliferative and antimicrobial activity of freeze-dried raspberry. APTEFF [interaktyvus]. 2014, **45**, 99–115 [žiūrėta 2020-03-15]. Prieiga per doi: 10.2298/APT1445099V;
  74. GULC, I., F. TOPAL, R. CAKMAKCI et. al., Pomological Features, Nutritional Quality, Polyphenol Content Analysis, and Antioxidant Properties of Domesticated and 3 Wild Ecotype Forms of Raspberries (*Rubus idaeus* L.). Journal of food science [interaktyvus]. 2011, **76**(4), 585–593 [žiūrėta 2020-03-19]. Prieiga per doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02142.x;
  75. KRSTIC, T., S. LJILJANA, S. SRDJAN et. al. Different antimicrobial effects of raspberry depending on the method of active components isolation. Food and Feed Research [interaktyvus]. 2014, **41**, 125–130 [žiūrėta 2020-03-30]. Prieiga per doi: 10.5937/FFR1402125K;
  76. KHOO, H., E., A. AZLAN, S. T. TANG, S. M. LIM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. Food and nutrition research [interaktyvus]. 2017, **61**(1) [žiūrėta 2020-05-03]. Prieiga per doi: 10.1080/16546628.2017.1361779;
  77. ZHANG, X., J. K. C. AHUJA, B. M. BURTON-FREEMAN, Characterization of the nutrient profile of processed red raspberries for use in nutrition labeling and promoting healthy food choices. Nutrition and Healthy Aging [interaktyvus]. 2019, **5**, 225–236 [žiūrėta 2020-03-19]. Prieiga per doi: 10.3233/NHA-190072;
  78. Neto, J., C., et al. Nutritional value of whole coconut, coconut powder, and coconut fiber treated with sodium hydroxide for sheep. Ciência e Agrotecnologia [interaktyvus]. 2016, **40**(4), 475–483 [žiūrėta 2020-05-06]. Prieiga per doi: 10.1590/1413-70542016404039915;
  79. MAHAYOTHEE, B., I., KOOMAYART, P. KHUWIJITJARU et al. Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, and Medium Chain Fatty Acids Profiles of Coconut Water and Meat at Different Maturity Stages. International Journal of Food Properties. [interaktyvus]. 2016, **19**(9), 2041–2051, [žiūrėta 2020-03-19]. Prieiga per doi: 10.1080/10942912.2015.1099042;
  80. HUANG, J., et al. Proteomic profile of coconuts. European Food Research and Technology [interaktyvus]. 2016, **242**, 449–455, [žiūrėta 2020-03-20]. Prieiga per doi: 10.1007/s00217-015-2556-1;
  81. Tangsuphoom, N., COUPLAND, J., N. Effect of surface - active stabilizers on the surface properties of coconut milk emulsions. Food Hydrocolloids [interaktyvus]. 2009, **23**, 1801–1819, [žiūrėta 2020-03-20] doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.12.002;
  82. PIRET, K., R. MÄNDAR, H. MARCOTTE et. al. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. Oral microbiology and immunology [interaktyvus] 2008, **23**(2), 139–147 [žiūrėta 2020-03-20]. Prieiga per doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00402.x;
  83. JUODEIKIENĖ, G. et al. Bioconversion of agro-industrial by-products to lactic acid using *Lactobacillus sakei* and two *Pediococcus* spp. Strains. International Journal of Food Science and Technology [interaktyvus]. 2016, **51**, 2682–2691 [žiūrėta 2020-05-08]. Prieiga per doi: 10.1111/ijfs.13258;
  84. MATTHEWS, A. et al. Lactic Acid Bacteria as a Potential Source of Enzymes for Use in Vinification. Applied and Environmental Microbiology [interaktyvus]. 2004, **70**(10), 5715–5731 [žiūrėta 2020-05-08]. Prieiga per doi: 10.1128/AEM.70.10.5715-5731.2004;

85. PASSAMANI, F., R., T. HERNANDES, N. A. LOPEZ et. al. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. *Journal of Food Protection* [interaktyvus]. 2014, **77**(11), 1947–1952, [žiūrėta 2020-03-22]. Prieiga per doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-495;
86. PINGRET, D., A. S. FABIANO-TIXIER, F. CHEMAT. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control* [interaktyvus]. 2013, **31**, 593–606, [žiūrėta 2020-03-22]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.039;
87. PUVAČA, N., I. ČABARKAPA, A. PETROVIČ et. al. Tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and its essential oil: antimicrobial, antioxidant and acaricidal effects in poultry production *World's Poultry Science Journal*, [interaktyvus]. 2019, **75**, 235–246, [žiūrėta 2020-03-22]. Prieiga per doi: 10.1017/S0043933919000229;
88. CARSON, C., F., K. A. HAMMER, T. V. RILEY. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews* [interaktyvus]. 2006, **19**(1), 50–62 [žiūrėta 2020-03-22]. Prieiga per doi: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006;
89. CIESLA, L., M., et al. Antioxidant synergism and antagonism between selected monoterpenes using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Flavour and Frafrance Journal* [interaktyvus]. 2016, **31**(6), 412–419 [žiūrėta 2020-03-22]. Prieiga per doi: 10.1002/ffj.3330;
90. SUN Z., H. WANG, J. WANG et. al. Chemical Composition and Anti-Inflammatory, Cytotoxic and Antioxidant Activities of Essential Oil from Leaves of *Mentha piperita* Grown in China. *PLoS One* [interaktyvus]. 2014, **9** (12), 1–15 [žiūrėta 2020-03-27]. Prieiga per doi: 10.1371/journal.pone.0114767;
91. OKUNOWO, W., L. AFOLABI, E. MATANMI et. al. Essential Oil of Grape Fruit (*Citrus paradisi*) Peels and Its Antimicrobial Activities. *American Journal of Plant Sciences* [interaktyvus]. 2013, **4**(4), 1–9, [žiūrėta 2020-03-27]. Prieiga per doi: 10.4236/ajps.2013.47A2001;
92. VASILE, C. et al. Comparative Analysis of the Composition and ActiveProperty Evaluation of Certain Essential Oils toAssess their Potential Applications in ActiveFood Packaging. *Materials* [interaktyvus]. 2017, **10**(1), 45–69 [žiūrėta 2020-03-27]. Prieiga per doi: 10.3390/ma10010045;
93. ROHLOFF, J. Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*Mentha x piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 1999, **47**(9), 3782–3786 [žiūrėta 2020-03-27] Prieiga per doi: 10.1021/jf981310s;
94. [NINOMIYA, K., N. MARUYAMA, S. INOUE et. al. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* [interaktyvus]. 2012, **35**(6), 861–866 [žiūrėta 2020-03-27] Prieiga per doi: 10.1248/bpb.35.861;
95. [UYSAL, B., F. SOZMEN,1 O. AKTAS et. al. Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus Paradisi*. L) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *International Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2011, **46**, 1455–1461 [žiūrėta 2020-03-27] Prieiga per doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02640.x;
96. ZHAO, Q., E. J. BOWLES, H. Y. ZHANG. Antioxidant Activities of Eleven Australian Essential Oils. *Natural Product Communications* [interaktyvus]. 2008, **3**(5), 837–842 [žiūrėta 2020-03-23]. Prieiga per doi: 10.1177/1934578X0800300531;

97. SHAH, P., H. A. MODI. Comparative Study of DPPH, ABTS and FRAP Assays for Determination of Antioxidant Activity. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology*. 2015, **6**(4), 2321–2353. ISSN: 2321-9653;
98. GONZÁLEZ-BURGOS E., M.P. GÓMEZ-SERRANILLOS. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Current Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2012, **19**, 5319–5341 [žiūrėta 2019-04-05]. Prieiga per doi: 10.2174/092986712803833335;
99. JUODEIKIENE, G., D. ZADEIKE, K. GASAUSKAITE et al. Functionalization of flaxseed proteins assisted by ultrasonication to produce coatings enriched with raspberries phytochemicals. *LWT* [interaktyvus]. 2020, **124**, 1–10 [žiūrėta 2020-04-21]. Prieiga per doi: 10.1016/j.lwt.2020.109180.