



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Antimikrobinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis
pasižyminčių komponentų imobilizavimas ir struktūrinimas
obuolių išspaudų hidratuotuose geliuose**

Baigiamasis magistro projektas

Jurgita Kuknauzaitė

Projekto autorė

Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

Vadovė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Antimikrobinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis
pasižyminčių komponentų imobilizavimas ir struktūrinimas
obuolių išspaudų hidratuotuose geliuose**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Jurgita Kuknauzaitė

Projekto autorė

Prof. habil. dr. Gražina Juodeikienė

Vadovė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Recenzentė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Jurgita Kuknauzaitė

**Antimikrobinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis
pasižyminčių komponentų imobilizavimas ir struktūrinimas
obuolių išspaudų hidratuotuose geliuose**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Jurgitos Kuknauzaitės, baigiamasis projektas tema „Antimikrobinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių komponentų imobilizavimas ir struktūrinimas obuolių išspaudų hidratuotuose geliuose“ 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.

Jurgita Kuknauzaitė

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Turinys

Santrauka	6
Summary	7
Santrumpų ir terminų sąrašas	8
Įvadas	9
1. Literatūros apžvalga	11
1.1. Natūralios kilmės antimikrobinės ir antioksidacinės medžiagos.....	11
1.1.1. Biologiškai aktyvūs komponentai eteriniuose aliejuose ir jų savybės	11
1.1.2. Biologiškai aktyvūs junginiai obuolių išspaudose	15
1.1.3. Mikrobinės ir gyvūninės kilmės bioaktyvūs junginiai	16
1.2. Biologiškai aktyvių medžiagų aktyvumo didinimas	18
1.2.1. Įkapsuliavimo sistemos	18
1.2.2. Hidrogelinės sistemos.....	20
1.3. Hidrogelių struktūrinimo galimybės.....	21
1.3.1. Obuolių išspaudų panaudojimo galimybės hidrogelių ruošimui	21
1.3.2. Hidrokolidai gelių struktūrų formavimui	21
1.3.3. Saldinančiųjų medžiagų įtaka hidratuotų gelių struktūros formavimui	23
1.4. Biologiškai aktyvių medžiagų pernešimo sistemų atpalaidavimo savitumai	24
1.5. Literatūrinės apžvalgos apibendrinimas	25
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	27
2.1. Tyrimo objektai	27
2.2. Reagentai ir aparatūra	31
2.3. Tyrimų metodai	32
2.3.1. Fenolinių junginių įvertinimas	32
2.3.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.....	33
2.3.3. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas.....	35
2.3.4. Baltymų kiekybinis ir kokybinis įvertinimas priešpienyje.....	35
2.3.5. Vandens įgerties įvertinimas obuolių išspaudose bei milteliuose	38
2.3.6. Hidratuotų gelių struktūros ir tekstūros profilio analizė.....	39
2.3.7. Bioaktyvių komponentų atpalaidavimo testas <i>in vitro</i>	39
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	40
3.1. Eterinių aliejų biologinis aktyvumas	40
3.1.1. Eterinių aliejų antimikrobinis aktyvumas prieš antibiotikams atsparius patogenus.....	40
3.1.2. Eterinių aliejų savitumai pagal antioksidacines savybes.....	42
3.2. Fenolinių junginių sudėtis ir biologinis aktyvumas antriniuose obuolių perdirbimo produktuose	44
3.2.1. Fenolinių junginių sudėties obuolių perdirbimo produktuose palyginamasis įvertinimas	44
3.2.2. Biologinio aktyvumo pokyčiai obuolių perdirbimo metu	46
3.3. PRB fermentuoto priešpienio baltymai ir jų biologinis aktyvumas	47
3.3.1. PRB fermentuoto priešpienio baltymų sudėtis SDS-PAGE metodu.....	47
3.3.2. Priespienio baltymų biologinis aktyvumas.....	48
3.4. Hidratuotų gelių su obuolių perdirbimo produktais struktūrinimo galimybių paieška	49
3.4.1. Standiklio parinkimas gelių su obuolių milteliais struktūrizavimui.....	49

3.4.2. Saldiklio rūšies įtaka gelių su obuolių milteliais struktūrai ir tekstūrai	50
3.4.3. Gelių su obuolių išspaudų priedais struktūrinimo savitumai	52
3.5. Antimikrobinių komponentų imobilizavimas struktūrintuose geliuose su obuolių perdirbimo produktais	53
3.6. Fenolinių junginių atpalaidavimo <i>in vitro</i> struktūrintuose geliuose savitumai	54
4. Rekomendacijų dalis	58
Išvados	59
Literatūros sąrašas	60

Kuknauzaitė, Jurgita. Antimikrobinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių komponentų imobilizavimas ir struktūrinimas obuolių išspaudų hidratuotuose geliuose. 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: obuolių išspaudos, hidrogeliai, eteriniai aliejai, priešpienis.

Kaunas, 2020. 68 p.

Santrauka

Dauguma per maistą plintančių žarnyno infekcijų sukėlėjų yra atsparūs antibiotikų poveikiui. Todėl šiuo metu ypač trūksta naujų natūralios kilmės preparatų antibiotikams atsparių patogeninių bakterijų sukeltamų infekcijų gydymui. Vienas iš tokių sprendimų yra jautrių žarnyno terpei hidrogelinių struktūrų kūrimas, kartu imobilizuojant antimikrobinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčius eterinius aliejus bei pieno rūgšties bakterijomis fermentuotą karvės priešpienį. Be to, hidrogelių struktūrų vystymui šiuo metu atkreiptinas dėmesys į vaisių perdirbimo antrinius produktus, pasižyminčius dideliu skaidulinių medžiagų kiekiu, kaip obuolių išspaudos.

Darbo tikslas – įvertinti obuolių išspaudų, kombinacijoje su atrinktais hidrokoloidais ir mažo kaloringumo saldikliais, panaudojimo galimybes hidrogelių struktūrinimui ir pritaikymui biologiškai aktyvių komponentų, tokių kaip eteriniai aliejai ir pieno rūgšties bakterijomis fermentuotas karvės priešpienis, imobilizavimui.

HPLC metodu nustatyta, kad obuolių išspaudos yra turtingos stipriu antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčiais fenoliniais junginiais, kaip floridzinas (591,6 µg/g), chlorogeninė rūgštis (482,1 µg/g) ir hiperozidas (405,9 µg/g). Antioksidacinis obuolių išspaudų aktyvumas prieš DPPH ir ABTS radikalus nustatytas $63,19 \pm 0,35$ % ir $77,81 \pm 0,66$ %, atitinkamai. Iš tirtų gvazdikėlių, čiobrelių ir mandarinų eterinių aliejų, didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš indikatorinius mikroorganizmus pasižymėjo čiobrelių eterinis aliejus su minimalia 1 % veikliąja koncentracija. Atlikus fermentuoto *Lactobacillus uvarium* LUHS 245 karvės priešpienio baltymų analizę SDS-PAGE metodu, nustatyta tokia baltymų sudėtis: laktoferinas, jaučio serumo albuminas, α -S2 kazeinas, β -kazeinas, κ -kazeinas, β -laktoglobulinas ir α -laktoglobulinas. Geriausia hidrogelių su obuolių milteliais tekstūra išsiskyrė geliai su želatinos priedu. Be to, gelių tekstūrą gerino mažu kaloringumu pasižymintis sorbitolis. Tiriant biologiškai aktyvių medžiagų imobilizavimo hidrogeliuose efektyvumą HPLC metodu, nustatyta, kad daugiausiai „Eunutritech“ eterinių aliejų komponentų (12 kartų) išliko, gaminant sluoksniuotas struktūras. Siekiant optimizuoti hidrogelių gamybą su obuolių išspaudomis, optimalus obuolių išspaudų kiekis jų sudėtyje turėtų būti 10 %, o priešpienio 6 % nuo masės. Atliekant *in vitro* atpalaidavimo tyrimus, nustatyta, kad geriausiai fenoliniai junginiai atsipalaidavo pH 2 terpėje ir po 120 min. buvo pasiekta didžiausia jų koncentracija. Ši tendencija buvo stebima analizuojant hidrogelius, ruoštus tiek su gvazdikėlių, tiek ir su čiobrelių eteriniais aliejais. Pagal HPLC analizės rezultatus, iš šių struktūrų pH 2 terpėje daugiausiai atsipalaiduoja procianidino B1. Fenoliniai junginiai iš sluoksniuotų hidrogelių struktūrų su „Eunutritech“ eterinių aliejų mišiniu atsipalaidavo abiejose terpėse (pH 2 ir pH 7,5) ir po 210 min. buvo pasiekta didžiausia fenolinių junginių koncentracija. Pagal HPLC rezultatus, pH 7,5 terpėje 1,2 karto daugiau atsipalaidavo procianidino B1, katechino ir chlorogeninės rūgšties nei pH 2 terpėje.

Kuknauzaitė, Jurgita. Immobilization and Structuring of Components with Antimicrobial and Antioxidant Properties in Apple Press Cake Hydrated Gels. 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: apple pomace, hydrogels, essential oils, colostrum.

Kaunas, 2020. 68 p.

Summary

Nowadays, emergence of antibiotic resistant food-borne pathogens inspired the development of alternative therapies including nutraceuticals with selected natural antimicrobial compounds. One of possible solutions would be the development of hydrogels that are enriched with compounds that have antimicrobial and antioxidant properties such as essential oils and colostrum. These proposed hydrogels should be sensitive to digestive tract pH shifts. Furthermore, exceptional attention has been drawn to use of secondary waste from fruit processing that have high contents of dietary fibers. One of the possible materials is apple pomace.

This work aims to evaluate the possibility of hydrogel development from apple pomace along with low calorie sweeteners and selected hydrocolloids, which would be used for immobilization of essential oils and lactic acid bacteria fermented cow colostrum.

The HPLC analysis showed that apple pomace is rich in antioxidants such as phloridzin (591,6 µg/g), chlorogenic acid (482,1 µg/g) and hyperoside (405,9 µg/g). The apple pomace exhibited antioxidant activity against DPPH and ABTS radicals with scavenging capacities $63,19 \pm 0,35$ % and $77,81 \pm 0,66$ %, respectively. Among investigated clove, thyme and tangerine essential oils, the most significant antimicrobial activity showed thyme essential oil, which minimal inhibitory concentration was 1 %. The SDS-PAGE analysis showed that *Lactobacillus uvarium* LUHS 245 fermented cow colostrum contains proteins such as lactoferrin, BSA, α -S2 casein, β -casein, κ -casein, β -lactoglobulin and α -lactoglobulin. The best hydrogels texture with apple powder was obtained with gelatin. In addition, the hydrogels texture was improved when sorbitol was added into the composition. The HPLC analysis of “Eunutritech” essential oils components showed that in multi-layered gels structures about 12 times more components remained rather than single layered structures after immobilization. To improve hydrogels structure with apple pomace, the optimal colostrum quantity was 6 % and apple pomace 10 % in gels composition. *In vitro* phenolic compounds release studies showed that from apple pomace hydrogels with clove and thyme essential oils, the majority of phenolic compound from matrix was released at pH 2 after 120 min. According to the HPLC analysis, procyanidin B1 is the mainly component released from these structures in pH 2 medium. Phenolic compounds from multi-layered gel structure with “Eunutritech” essential oils mixture released in both media (pH 2 and pH 7,5) and after 210 min was reached the highest phenolic compounds concentration in pH 7,5 medium. According to HPLC results, procyanidin B1, catechin and chlorogenic acid were detected 1,2 times more in pH 7,5 medium rather than in pH 2.

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

ABTS – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfono rūgštis);

APS – amonio persulfatas;

ATP – adenzintrifosfatas;

BHA – butilintas hidroksianizolas;

BHT – butilintas hidroksitoluenas;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

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

EA – eterinis aliejus;

PRB – pieno rūgšties bakterijos;

GRE – galo rūgšties ekvivalentai;

HPLC – aukšto efektyvumo skysčių chromatografija;

JSA – jaučio serumo albuminas;

NDS – natrio dodecilsulfatas;

SDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė;

TRIS – tris(hidroksimetil)aminoetanas;

TEMED – tetrametiletilendiaminas.

Įvadas

Šiuo metu pasaulyje vis aktualesnė tampa bakterijų atsparumo antibiotikams problema, kuri siejama su gausiu antimikrobinų medžiagų vartojimu tiek medicinoje, tiek ir veterinarijoje. Antibiotikams atsparūs stafilokokai, enterokokai, o kai kuriais atvejais ir žarnyno lazdelės, yra svarbūs per maisto gamybos grandinę plintantys patogenai, kurie gali patekti per vartojamą maistą į žmogaus mikrobiotą. Bakterijos yra pasiskirsčiusios visame virškinimo trakte, tačiau didžiausias jų kiekis ir metabolinis aktyvumas aptinkamas storojoje žarnoje. Šiuo metu ypač trūksta naujų preparatų antibiotikams atsparių bakterijų sukeltamų infekcijų gydymui.

Antibiotikų skyrimo mažinimas gali būti koreguojamas tokiais daugiavais preparatais, kurie įvairiais poveikio mechanizmais sinergistiškai slopina potencialų patogenų augimą ir plitimą. Dauguma tyrimų yra skirti storojo žarnyno susirgimų prevencijai, vystant hidrogelius, gebančius pernešti ir atpalaiduoti veikliąsias medžiagas tikslingoje vietoje. Įprastai jų gamybai naudojamas pektinas, chitinas ir kt. Šiuo metu atkreiptas dėmesys į prebiotinėmis savybėmis pasižyminčias skaidulines medžiagas, kurios leistų optimizuoti inovatyvios sudėties hidrogelių struktūrinę formulę biologiškai aktyvių medžiagų imobilizavimui ir geresniam jų prieinamumui bei stabilumo produkte užtikrinimui.

Obuolių išspaudos – tai antrinis obuolių perdirbimo produktas, turtingas pektininėmis medžiagomis bei sveikatai naudingais fenoliniais junginiais. Kasmet susidaro didžiuliai kiekiai obuolių išspaudų (~ 10–12 mln. tonų), iš kurių tik mažoji dalis yra perdirbama į pridėtinės vertės produktus, o visa kita tampa atliekomis. Vis didesnis dėmesys yra skiriamas obuolių išspaudų panaudojimo galimybių didinimui ir funkcinių maisto produktų kūrimui. Vienas iš tokių produktų būtų antimikrobinų hidrogelių iš obuolių išspaudų kūrimas, imobilizuojant į jas antioksidacines bei antimikrobinines savybėmis pasižyminčias medžiagas, kaip eteriniai aliejai ir fermentuotas pieno rūgšties bakterijomis karvės priešpienis.

Gvazdikėlių bei čiobrelėlių eterinių aliejai, dėl juose esančių terpenoidų ir fenilpropanoidų, yra efektyvūs antimikrobiniai komponentai prieš maisto gamybos grandinę plintančius patogeninius mikroorganizmus. Be to, eteriniai aliejai pasižymi antioksidacinių savybių gausa prieš laisvuosius radikalus, kas yra svarbu apsaugant organizmo ląstelės nuo oksidacinio streso sukeltos žalos, dėl kurios didėja vėžinių susirgimų rizika. Eterinių aliejų antimikrobinis aktyvumas siejamas su jų chemine sudėtimi.

Kitas vertingas komponentas, kurio panaudojimas visame pasaulyje nepakankamai efektyvus, tai priešpienis. Jame gausu biologiškai aktyvių molekulių, kurios atsakingos už imuninio atsako veikimą, virškinamojo trakto mikrofloros atkūrimą bei audinių ląstelių regeneraciją. Priešpienio komponentai, veikdami sinergistiškai, mažina įvairių patogenezinių klinikinius simptomus ir kai kurių vaistų šalutinį poveikį. Priešpienio apdorėjimui tikslinga pritaikyti biotechnologinius sprendimus – fermentacija antimikrobinėmis pieno rūgšties bakterijomis, kurie padidins žaliavos biosaugą ir leis padidinti vystomo hidrogelio pridėtinę vertę. Fermentuotame karvės priešpienyje esančios pieno rūgšties bakterijos yra ypač naudingos sveikai žarnyno mikroflorai palaikyti.

Taigi, imobilizuojant šiuos komponentus į hidrogelines obuolių išspaudų struktūras būtų galima vystyti funkcinėmis savybėmis pasižyminčius produktus. Gelių struktūrinimui galėtų būti efektyviai išnaudotos obuolių išspaudose esančios pektininės medžiagos kombinuojant su mažo kaloringumo

saldikliais. Tokių nutraceutikų kūrimas galėtų būti efektyvi priemonė žarnyno ligų prevencijai bei kontrolei.

Darbo tikslas – įvertinti obuolių išspaudų, kombinacijoje su atrinktais hidrokoloidais ir mažo kaloringumo saldikliais, panaudojimo galimybes hidrogelių struktūrinimui ir pritaikymui biologiškai aktyvių komponentų, tokių kaip eteriniai aliejai ir pieno rūgšties bakterijomis fermentuotas karvės priešpienis, imobilizavimui.

Darbo uždaviniai:

1. įvertinti obuolių produktų (išspaudų ir miltelių) panaudojimo galimybes hidratuotų gelių gamybai;
2. nustatyti gvazdikėlių, čiobrelėlių ir mandarinų eterinių aliejų biologinį aktyvumą ir palyginti jų savybes;
3. nustatyti *Lactobacillus uvarium* fermentuoto karvės priešpienio baltymų sudėtį ir biologinį aktyvumą;
4. įvertinti biologiškai aktyvių komponentų imobilizavimo efektyvumą hidrogeliuose;
5. atlikti fenolinių junginių atpalaidavimo *in vitro* tyrimą.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Natūralios kilmės antimikrobinės ir antioksidacinės medžiagos

Šiuo metu dauguma patogeninių mikroorganizmų, sukeliančių visuomenėje plintančias ligas, tapo atsparūs antibiotikams, todėl vis didesnis dėmesys skiriamas natūralių antimikrobiniu aktyvumu pasižyminčių medžiagų vystymui [1]. Prie tokių žmogaus sveikatai pavojingiausių ligų platintojų šiuo metu priskiriami: *B. cereus*, *C. jejuni*, *C. botulinum*, *C. Perfringens*, *C. sakazakii*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Y. enterocolitica*, *Vibrio spp.* ir *S. aureus*. Per maisto gamybos grandinę plintančios ligos yra skirstomos į: a) infekcijas, kai į žmogaus organizmą patogenai patenka kartu su maistu, b) intoksikacijas, kada užsikrečiama patogenų gaminamais toksiniais ir c) intoksikacines infekcijas, kai suvartojamas maistas kartu su patogenais ir jų išskirtais toksiniais. Suvartojus užkrėsto maisto, mikroorganizmai pirmiausia pereina rūgštinę skrandžio terpę, kol pasiekia žarnyną. Patogenai yra išvystę įvairius kolonizacijos žarnyne mechanizmus, tokius kaip patogeno adhezija prie žarnyno epitelio (žiuželiais ar pilėmis), adhezija prie epitelio naudojant metabolitus, pvz., baltymus, ir bioplėvelių formavimasis ant žarnyno sienelių. Be to, dalis patogenų gali pereiti žarnyno barjerą per aktyviosios ir pasyviosios medžiagų pernašos mechanizmus, ir pasklisti į kitus organus, kaip plaučius, kepenis, blužnį ar smegenis [2]. Priklausomai nuo apsinuodijimo būdo, inkubacinis periodas, per kurį pasireiškia simptomai, gali varijuoti nuo kelių valandų ar dienų iki kelių mėnesių. Pagrindiniai požymiai būdingi patogenezei yra pykinimas, vėmimas, viduriavimas, pilvo skausmas ir karščiavimas. Itin sunkiais atvejais gali išsivystyti organų nepakankamumas ar net mirtis [3].

Siekiant išvengti maisto užterštumo patogenais, maisto pramonėje laikomasi įvairių prevencijos priemonių, pvz.: terminio produktų apdoravimo, vandens aktyvumo sumažinimo, įvairių pakavimo metodų, cheminių konservantų naudojimo (BHT, BHA, apsauginės dujos ir kt.) [4, 5]. Tačiau, mokslininkai siekia pateisinti ir vartotojų lūkesčius, kurių neigiamas požiūris į maisto pramonėje naudojamus sintetinius konservantus ir noras propaguoti sveiką gyvenseną, verčia ieškoti naujų natūralios kilmės alternatyvių sprendimų [6, 7]. Todėl vis intensyviau yra ieškoma augalinės, gyvūninės ir mikrobinės kilmės maisto priedų, kurie pasižymėtų plačiu antimikrobinių ir antioksidacinių savybių spektru [6]. Be to, antibiotikams atsparių mikroorganizmų problema verčia atsigręžti ne tik į natūralių maisto priedų paiešką, tačiau ir į naujų, terapiniams tikslams kuriamų, preparatų kūrimą [1]. Vienas iš tokių pavyzdžių yra nutraceutikų (angl. *nutraceutics*) kūrimas. Nutraceutikai – tai bioaktyvios medžiagos, kurios būdamos maisto sudedamoji dalis, teikia naudą sveikatai arba gerina sveikatos būklę t. y. naudojami ligų prevencijai ar gydymui [8, 9]. Nutraceutikų, kaip produktų, forma gali varijuoti nuo atskirų junginių (pvz., eugenolis, kurkurminas), augalinių preparatų (pvz., eteriniai aliejai), probiotikų iki maisto produktų, kaip dribsniai, sriubos ar gėrimai [9]. Todėl tolimesnėje literatūros apžvalgoje pateikta detalesnė augalinės (eterinių aliejų ir obuolių išspaudų), gyvūninės (karvės priešpienio) ir mikrobinės kilmės (probiotikų) bioaktyvių medžiagų ir komponentų, naudojamų tiek natūralių maisto priedų vystymui, tiek nutraceutikų gamybai, apžvalga.

1.1.1. Biologiškai aktyvūs komponentai eteriniuose aliejuose ir jų savybės

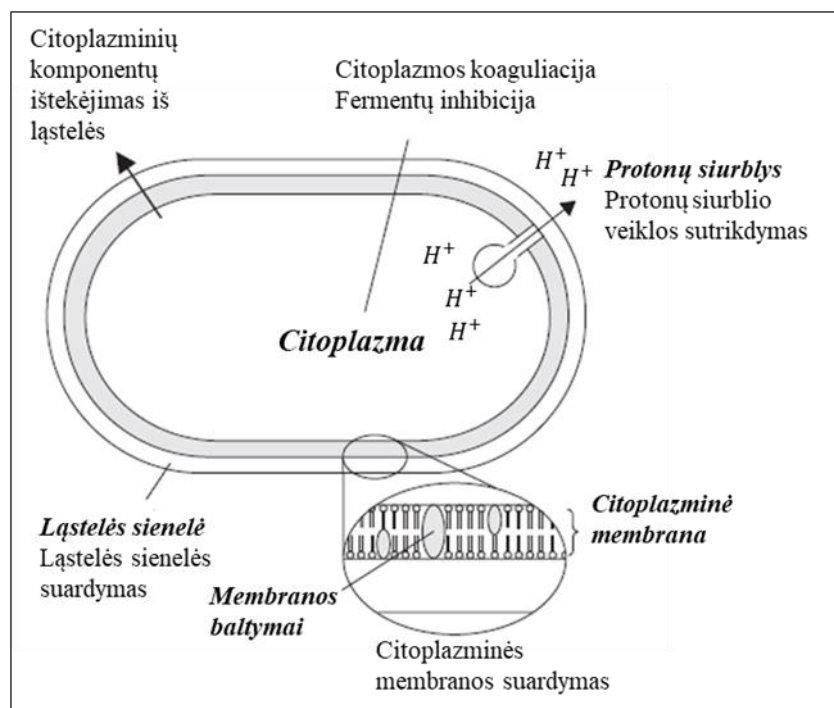
Eteriniai aliejai (toliau – EA) – tai lakūs, skleidžiantys aromata, kompleksinės sudėties produktai, gaunami iš augalinės žaliavos. EA yra antriniai augalų metabolitai, išsiskiriantys augale, kaip atsakas į aplinkos sukeltą stresą arba siekiant apsisaugoti nuo aplinkos poveikio [10]. EA yra hidrofobinės kilmės medžiagos, kurios tirpsta organiniuose tirpikliuose, tačiau nesimaišo su vandeniu. EA sudaro

daugiau nei 300 skirtingų mažos molekulinės masės junginių (< 1000 Da). Šie junginiai skirstomi į tokias klases, kaip terpenai, terpenoidai ir fenilpropanoidai [11]. EA kiekybinė ir kokybinė cheminė sudėtis skiriasi priklausomai nuo augalo augimo sąlygų (sezoniškumo, geografinės padėties) ir naudojamo ekstrakcijos būdo [1]. Čiobrelių [12, 13, 14, 15], gvazdikėlių [16, 17] ir mandarinų [18, 19] EA pagrindiniai komponentai, suteikiantys jiems antimikrobines, antioksidacines ir kitas farmakologines savybes, pateikti 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. Čiobrelių, gvazdikėlių ir mandarinų EA pagrindiniai bioaktyvūs junginiai

Eterinis aliejus	Komponentai	Kiekis, %
Čiobrelių (<i>Thymus vulgaris</i>)	Timolis	3,82–41,6
	Karvakrolis	12,0–81,2
	γ-terpinenas	1,18–7,3
	p-kumenas	2,77–5,7
	Linalolas	6,8
	Borneolas	8,9
Gvazdikėlių (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Eugenolis	56,06–88,5
	Eugenolio acetatas	5,6
	β-kariofilenas	1,38–39,63
Mandarinų (<i>Citrus reticulata</i>)	Limonenas	21,11–41,79
	Ksantatoksinas	12,62–18,40

Antimikrobinės EA savybės priklauso nuo juos sudarančių komponentų lipofilinių savybių, taip pat patogenų tipo ir jų ląstelės sienelės struktūros [4]. Aktyvūs antimikrobiniai junginiai, esantys EA sudėtyje, gali būti suskirstyti į 4 grupes pagal jų cheminę struktūrą: terpenoidai (pvz., timolis, karvakrolis ir kt.), fenilpropanoidai (pvz., eugenolis, vanilinas ir kt.), terpenai (pvz., p-kumenas, limonenas ir kt.), ir kiti junginiai, kaip alicinas ir izotiocianatai [20]. Išskiriama keletas EA antibakterinio veikimo mechanizmų, susijusių su skirtingomis bakterinėse ląstelėse veikimo vietomis (žr. 1.1 pav.) [4]. EA gali suardyti ląstelių sienelės ir citoplazminę membraną, pakeisdami juose esančių struktūrų, kaip polisacharidų, riebalų rūgščių ir fosfolipidų, konformacijas. Ląstelių sienelių ir citoplazminių membranų pažeidimai sąlygoja didesnę jų pralaidumą (makromolekulių ir jonų netekimą), membranos potencialo sumažėjimą, protonų veiklos sutrikdymą ir ATP gamybos sutrikdymą. Taip pat EA gali sukelti citoplazmos komponentų (lipidų ir baltymų) pokyčius, pvz., baltymų koaguliaciją. Visi šie EA veikimo mechanizmai stabdo esminius ląstelėje vykstančius procesus ir galiausiai sukelia ląstelės lizę. Yra žinoma ir kitų EA poveikio mechanizmų, kurie dar nėra iki galo iširti [21]. Vienas iš jų yra specifinių fermentų veiklos inhibicija. Pavyzdžiui, Šarac ir kt. [22] ištyrė, jog pušų EA esantis terpenoidas (germakrenas D-4-olis) inhibuoja fermentą (FtsZ), kuris yra atsakingas už bakterinių ląstelių dalijimosi procesą [22]. Manoma, kad EA yra efektyvesni prieš gramteigiamas bakterijas nei prieš gramneigiamas, nes šios patogenų grupės pasižymi skirtinga ląstelių sienelių struktūra. Gramteigiamų bakterijų ląstelių sienelės sudaro peptidoglikano sluoksnis (90–95%) su lipoteicho rūgštimis, kurių lipofilinės sritys sąlygoja EA prasiskverbimą per ląstelės sienelę ir citoplazminę membraną. Gramneigiamų bakterijų ląstelės sienelės sandara yra sudaryta iš peptidoglikano monosluoksnio, kurį dengia papildoma membrana, sudaryta iš baltymų ir lipopolisacharidų. Manoma, kad ši išorinė membrana sulėtina EA hidrofobinių komponentų difuziją į bakterijos ląstelę [4, 21].



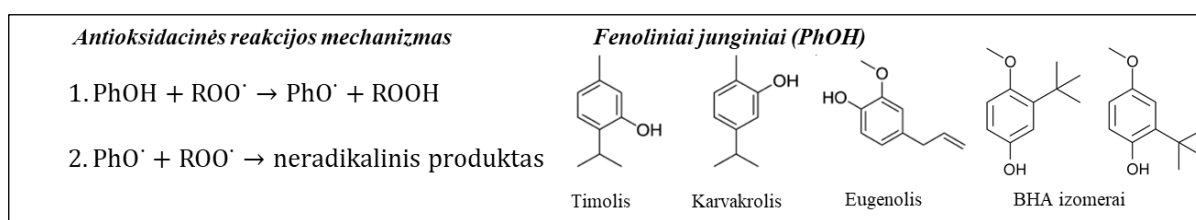
1.1 pav. EA antibakterinio poveikio vietas bakterijų ląstelėse [23]

Patys aktyviausi antibakteriniu aktyvumu pasižymintys EA junginiai yra fenoliniai terpenoidai, ypač karvakrolis ir timolis [20, 23]. Karvakrolio ir timolio, kurių gausu čiobrelių ir raudonėlių EA, antibakterinis aktyvumas, manoma, kad yra susijęs su hidroksigrupe ir elektronų delokalizuota sistema [23, 24]. Tiek timolis, tiek karvakrolis, sąveikaudami su fosfolipidų dvisluoksniu, sąlygoja membranų pralaidumo padidėjimą [23]. Šie junginiai gali sąveikauti su membranų baltymais ir fermentais, dalyvaujančiais ATP gamyboje, taip sutrikdydami patogeninių ląstelių funkcijas. Be to, karvakrolis gali dalyvauti monovalentinių katijonų (H^+ ir K^+) pernašoje per membraną [20]. Tyrimai su *B. cereus* parodė, jog karvakrolis destabilizuoja citoplazminę ląstelės membraną ir vykdo protonų pernašą, kartu sumažinant vandenilio jonų gradientą ir sutrikdant atitinkamai ATP gamybą, o tai sąlygoja ląstelės žūtį [24]. Pagal N. Gavaric ir kt. [12] bei P. Penalver'o ir kt. [25] tyrimus, EA, kuriuose gausu timolio bei karvakrolio (pvz., raudonėlių ar čiobrelių EA) pasižymi geromis antimikrobinėmis savybėmis prieš patogenus, kaip *S. aureus*, *S. infantis*, *E.coli*, *S. enteridis*, *S.typhimurium* ir *S. choleraesuis* [12, 25]. Kitas svarbus antibakterinis EA komponentas yra fenilpropanoidas eugenolis, kurio daugiausiai aptinkama gvazdikėlių EA. Eugenolio antibakterinės savybės taip pat yra grindžiamos membranų pralaidumo didinimu ir sąveika su ląstelės baltymais. Eugenolis pasižymi savita sąveika su citoplazmine membrana. Šis junginys padidina kalio ir ATP pralaidumą iš ląstelių vidaus į išorę. Manoma, kad eugenolio hidroksilo grupė sąveikauja su bakterijų ląstelės baltymais ir gali inhibuoti ląstelinių fermentų, kaip adozintrifosfatazių, histidino dekarboksilazių, amilazių ir proteazių, veiklą. Slopinant adozintrifosfatazes yra sutrikdomas ląstelės energinis balansas, kuris sąlygoja ląstelės žūtį [20]. Mokslinėje literatūroje paskelbta, kad gvazdikėlių EA yra efektyvus prieš antibiotikui metiliclinui atsparias stafilokokų padermes, kaip *S. epidermis* bei *S. aureus* [17] ir prieš dantų kariesą sukeliančius patogenus [26]. Įrodyta, kad antibakterinis EA aktyvumas priklauso nuo jų sudėtyje esančių komponentų sinergetinio poveikio. Vienas iš pavyzdžių yra p-kumenas [21]. Karvakrolio prekursorius p-kumenas yra hidrofobinis monoterpenas. Šis junginys pats vienas nepasižymi antimikrobinio poveikiu, tačiau jis sustiprina

karvakrolio antibakterinį poveikį. Šis monoterpenas įsiterpia į ląstelių membranas ir pakeičia jų struktūrą (jas išplečia) [20, 23]. Taip pat buvo nustatyta, kad pridėjus linalolo į gvazdikėlių EA padidėjo antibakterinio poveikio aktyvumas prieš *P. aeruginosa*, *S. aureus* ir *E. coli* [27].

Antioksidacinės EA savybės lemia jų cheminė sudėtis. Kaip ir antimikrobinų savybių atveju, didžiausia antioksidacinę potencialą turi tie EA, kurių sudėtyje dominuoja fenoliniai junginiai (pvz., timolis, karvakrolis ir eugenolis) [10, 28]. Be to, EA aliejų antioksidacinis aktyvumas, kaip ir antimikrobinio aktyvumo atveju, priklauso ne vien tik nuo atskirų fenolinių junginių, tačiau ir bendro EA sudėtyje esančių junginių sinergetinio poveikio. Tiriant čiobrelių EA antioksidacinę poveikį ir tiriant atskirai timolio ir karvakrolio aktyvumą, nustatyta, jog pavienių komponentų aktyvumas buvo mažesnis nei EA [12].

Fenolinių junginių antioksidacinės savybės yra siejamos su jų geba dalyvauti oksidacijos-redukcijos reakcijose ir taip neutralizuoti laisvuosius radikalus bei peroksirus [10]. Tiek natūralios kilmės fenolinių junginių, tiek sintetinių (pvz., BHA), antioksidacinis poveikis aiškinamas vandenilio atidavimu peroksilo radikalui (žr. 1.2 pav.). Susidaręs fenoksilo radikalas yra stabilus ir negali pradėti naujos radikalinės reakcijų sekos. Reakcijos vyksmui reikia „laukti“ kito peroksilo radikalo. Susidaręs neutralus produktas užbaigia radikalinę reakcijų seką [28].



1.2 pav. EA sudėtyje esančių fenolinių junginių antioksidacinio poveikio mechanizmas (modifikuota pagal [28])

Čiobrelių bei gvazdikėlių EA pasižymi ne tik antimikrobinėmis, tačiau ir stipriomis antioksidacinėmis savybėmis. Nustatyta, jog šie EA efektyviai neutralizuoja DPPH, superoksido anijono ir hidroksilo radikalus, stabdo lipidų oksidaciją, ir yra geras Fe^{2+} jonų chelatorius [12, 15, 26, 29]. M. Martos'as ir kt. [15] nustatė, jog čiobrelių ir gvazdikėlių EA pasižymi panašiu lipidų oksidacijos slopinimo efektyvumu, kaip BHT ir didesniu Fe^{2+} chelavimo efektu nei askorbo rūgštis ir BHT. Lipidų oksidacija, vykstanti maisto produktų laikymo metu, gali sukelti nepageidautinus skonio, tekstūros bei spalvos pokyčius, riebalų rūgščių ir vitaminų nuostolius. Lipidų oksidaciją sukelia lipoksigenazės, taip pat tam įtakos turi aukšta temperatūra, jonizacinė radiacija, šviesa ir metalų jonai. Todėl lipidų oksidacijos slopinimui yra naudojami sintetiniai antioksidantai, kaip BHT ar BHA [15]. Pagal I. Gulcin'o ir kt. [26] bei L. Jirovetz'o ir kt. [29] autorių darbus, gvazdikėlių EA pasižymi didesniu DPPH ir superoksido anijono slopinimo aktyvumu nei BHA ir BHT [26, 29]. Šie tyrimų duomenys patvirtina, jog čiobrelių ir gvazdikėlių EA galėtų pakeisti sintetinius maisto pramonėje naudojamus konservantus, kaip BHT ir BHA, kurie gali sukelti kepenų pažeidimus ir skatinti vėžinius susirgimus [26]. Be to, EA galėtų praturtinti gaminamus maisto produktus žmogaus sveikatai palankiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčiomis medžiagomis. Taip būtų galima apsaugoti organizmo ląsteles nuo oksidacinio streso, dėl kurio padidėja tikimybė susirgti vėžiu, diabetu bei širdies ir kraujagyslių sistemos ligomis [15, 30, 31].

1.1.2. Biologiškai aktyvūs junginiai obuolių išspaudose

Obuoliai, palyginti su kitais vaisiais, yra antroje vietoje po spanguolių pagal jų sudėtyje esančių antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių medžiagų kiekį. Šias antioksidacines savybes, kaip ir EA atveju, lemia fenoliniai junginiai. Obuoliuose nustatyti fenoliniai junginiai yra skirstomi į tokias grupes, kaip: hidroksibenzoinės rūgštys (galo rūgštis, siringino rūgštis ir kt.), hidroksicinamono rūgštys (p-kumarino rūgštis, kofeino rūgštis ir kt.), flavonoliai (kvercitrinas ir jo glikozilinti dariniai), dihidrochalkonai (floridzinas ir jo dariniai), antocianai, monomeriniai flavanoliai (epikatecinas ir katechinas), oligomeriniai flavanoliai (procianidiniai). Yra žinoma, kad obuolių, ar iš jų išskirtų fenolinių junginių vartojimas gali sumažinti cholesterolio kiekį kraujyje, taip pat šie produktai naudojami širdies ir kraujagyslių ligų, plaučių ir gaubtinės bei tiesiosios žarnos vėžinių susirgimų, antro tipo diabeto, demencijos, ir Alzheimerio ligų susirgimų prevencijai. Dėl natūralios prigimties, obuolių fenoliniai junginiai sulaukia vis platesnio pritaikymo ir naudojami antioksidacinėmis bei antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių maisto papildų ir farmacinių preparatų gamybai [32]. Be to, obuoliuose yra skaidulinių medžiagų (2–3 g/100 g), kurios taip pat teigiamai veikia širdies ir kraujagyslių sistemą, bei turi teigiamos įtakos žarnyno mikroflorai [33, 34].

Fenolinių junginių kiekis obuoliuose priklauso nuo jų veislės, kultivavimo sąlygų, obelų ligų, obuolių subrendimo laipsnio ir vaisių sandėliavimo sąlygų. Be to, fenolinių junginių pasiskirstymas yra skirtingas ir pačiame obuolyje. Obuolio odelė yra turtingesnė bendru fenolinių junginių kiekiu (nuo 2 iki 6 kartų), procianidiniais ir kitais flavanoidais (nuo 6 iki 7 kartų) nei minkštimas [32, 35]. Tačiau tam tikrų fenolinių junginių kiekis, gali būti aptinkamas didesnis minkštyme nei odelėje ir tai priklauso nuo obuolio veislės, pvz., *Idared* ir *Golden Delicious* veislės obuoliuose chlorogeninės rūgšties minkštyme aptinkama daugiau nei odelėje. Visumoje, daugiau dideliu antioksidaciniu aktyvumu turinčių junginių (kvercitrino, katechino, epikatechino, procianidinių B₂ ir C₁, floridzino ir kt.) randama obuolio odelėje nei minkštyme, nepriklausomai nuo obuolio veislės. Be to, obuolių antioksidacinės savybės priklauso nuo vietos obuolyje ir pasiskirsto tokiu eiliškumu: obuolio odelė > obuolio šerdis > obuolio minkštymas [32].

Obuolių išspaudas sudaro odelių, šerdies, sėklų ir minkštimo audinių likučiai. Obuolių išspaudos, dėl šiose sudedamosiose dalyse likusių medžiagų (dihidrochalkonų, flavonolių, flavanolių ir fenolinių rūgščių), pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu [36]. Tiriant skirtingų obuolių veislių išspaudas, likusias po sidro gamybos, nustatyta, kad daugiausiai jose yra floridzino ir chlorogeninės rūgšties. Be to, jose identifikuoti ir kiti junginiai, kaip procianidinas B₂, floridzino glikozilinti dariniai, hiperozidas ir epikatechinas. Taip pat buvo nustatytas ryšys tarp floridzino, procianidino B₂, rutino, izokvercitrino, protokatechino ir hiperozido kiekio išspaudose, ir šių junginių antioksidacinio aktyvumo [37]. Kitų autorių (Yinrong Lu ir kt.) darbuose nustatyta, kad epikatechino, procianidino B₂, kvercitrino glikozidų, chlorogeninės rūgšties, floridzino ir jo darinių antiradikalinis aktyvumas prieš DPPH buvo 2–3 kartus didesnis nei vitaminų C ir E poveikis [38].

Mokslinėje literatūroje pateikiami duomenys ir apie kitas šių junginių naudingąsias savybes. Pavyzdžiui, floridzino 5 mg/ml konc. tirpalas pasižymėjo antimikrobinu poveikiu prieš *S. aureus* ir *E. coli*, sudarydamas slopinimo zonas $30,15 \pm 1,66$ mm ir $17,05 \pm 1,04$ mm, atitinkamai [39]. Taip pat floridzinas yra laikomas potencialiu komponentu su antidiabetiniu efektu, kadangi floridzinas geba sumažinti gliukozės kiekį kraujyje, blokuodamas natrio / gliukozės pernašos sistemas žarnyne ir inkstuose [40]. Chlorogeninė rūgštis, turi stiprų antioksidacinį aktyvumą prieš peroksilo radikalus, kurie susiję su auglių ir vėžinių ląstelių vystymusi [41]. Kaip ir floridzinas, chlorogeninė rūgštis

mažina gliukozės absorbciją žarnyne t. y. pasižymi antidiabetinėmis savybėmis. Be to, chlorogeninė rūgštis gali sumažinti kraujo spaudimą hipertenzija sergantiems žmonėms. Taip pat buvo nustatyta, jog chlorogeninė rūgštis baktericidiškai veikia patogeninius mikroorganizmus, kas leidžia manyti, jog ši rūgštis būtų puikus maisto priedas bei konservantas. Fenoliniai junginiai, tarp jų ir chlorogeninė rūgštis, nesukelia jautrumo probiotikams, o tokia savybė lemia dar didesnę šių junginių patrauklumą vartojimui [42]. Procianidinas B2 ir epikatechinas, manoma, jog daugiausiai apsprendžia obuolių antioksidacines savybes [43]. Procianidinai yra naudojami kaip natūralūs antioksidantai, siekiant apsaugoti nesočiąsias riebalų rūgštis nuo oksidacinio poveikio. Taip pat buvo nustatyta, kad procianidinai stabdo įvairių vėžinių ląstelių augimą *in vitro* ir *in vivo* [44, 45]. Epikatechino turintys produktai yra naudingi širdies ir kraujagyslių sistemos ligų bei smegenų ligų prevencijai, apsaugo nuo hipertenzijos bei krešulių susidarymo. Be to, epikatechinas naudingas gerai psichologinei būklei ir kognityvinėms funkcijoms palaikyti [46].

Šių ir kitų obuoliuose aptinkamų junginių biologinis aktyvumas rodo, jog obuoliai yra vertingi ne tik maistiniu požiūriu, tačiau pasižymi ir plačiu farmakologinių savybių spektru. Obuolių sulčių gamybos metu per metus susidaro ~ 10–12 mln. tonų atliekų (obuolių išspaudų), kurios, kaip jau minėta anksčiau, yra turtingos bioaktyviomis medžiagomis ir skaidulinėmis medžiagomis, todėl ši žaliava turi daug potencialaus panaudojimo galimybių maisto ir farmacijos pramonėje [47, 48].

1.1.3. Mikrobinės ir gyvūninės kilmės bioaktyvūs junginiai

Probiotinės bakterijos – tai mikrobinės kilmės bioaktyvūs komponentai, kurie vartojami atitinkamais kiekiais teikia naudą organizmui. Jų nauda siejama su virškinamojo trakto ligų prevencija, t. y. probiotikai apsaugo nuo infekcijų, uždegiminių procesų, diarėjos ir dirgliosios žarnos sindromo. Taip pat probiotikai sumažina laktozės netoleravimo, alergijos simptomus, gali sumažinti cholesterolio kiekį kraujyje ir sumažina vėžinių susirgimų riziką [49]. Probiotiniai mikroorganizmai, labiausiai naudojami maisto pramonėje, yra pieno rūgšties bakterijos (toliau – PRB), priklausančios *Lactobacillus* genčiai kaip *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ir kt. Taip pat prie probiotikų priskiriami ir *Bifidobacterium* genčiai priklausančios bakterijos: *B. bifidum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. thermophilum* ir kt. [50, 51]. PRB maisto pramonėje yra plačiai naudojamos fermentuotiems produktams gaminti daugiau nei 4000 metų. Fermentuoti produktai, kaip jogurtas, kefyras ar sūris, yra žinomi kaip puikūs probiotikų šaltiniai galintys pagerinti virškinamojo trakto funkcijas [51]. Tikslus probiotikų veikimo mechanizmas prieš tam tikrus žarnyno sutrikimus nėra visiškai išaiškintas, tačiau pagal klinikinių tyrimų rezultatus teigiamas probiotikų poveikis sveikatai pasireiškia taip: probiotikai slopina patogeninių mikroorganizmų augimą, pagerina epitelinio audinio barjerines funkcijas ir palengvina diarėjos bei dirgliosios žarnos sindromo simptomus, išskirdami trumpos grandinės riebalų rūgštis [52]. Patogenų dauginimosi slopinimas pasireiškia dėl probiotikų gebėjimo gaminti bakteriocinus ir išskirti metabolitus, kurie sudaro nepalankią rūgštinę terpę uždegimą sukeliantiems mikroorganizmams, tačiau kartu skatina ir gerųjų žarnyno bakterijų (*Lactobacillus* ir *Bifidobacterium* genčių) vystymąsi. Be to, probiotikų priešuždegiminis poveikis siejamas su jų gebėjimu aktyvinti imuninių ląstelių veiklą [53]. Taip pat PRB fermentuoti maisto produktai gali suteikti organizmui naudingų medžiagų, pvz.: B grupės vitaminų; gama amino butirinės rūgšties, kuri veikia atpalaiduojančiai centrinę nervų sistemą; bioaktyvių peptidų, pasižyminčių antioksidaciniu, antimikrobiniu ir antidiabetiniu aktyvumu; ir polinesočių riebalų rūgščių, kurios pasižymi antivėžiniu, priešuždegiminiu ir antidiabetiniu poveikiu [51].

Karvių priešpienis – tai yra didelės maistinės vertės „pirmasis pienas“, gaminamas karvių pieno liaukose pirmosiomis valandomis po gimdymo. Priešpienyje yra gausu imunoglobulinų, antimikrobinių baltymų, augimo faktorių ir kitų didelę maistinę vertę turinčių junginių, kurie yra svarbūs naujagimio imuninės sistemos bei virškinamojo trakto funkcijų vystymuisi [54]. Karvės priešpienį išskiria nuo 2 iki 7 parų po veršiamosios ir tai sudaro 0,5 % metinės pieno gamybos [55]. Karvės priešpienis yra laikomas perspektyviu nutraceutikų sudėtinu komponentu, kuris padėtų išvengti bei gydyti imuninės sistemos sutrikimus, virškinamojo trakto sutrikimus, virusines, bakterines bei grybelines infekcijas, širdies ir kraujagyslių sistemos ligas ir diabetą. Tai pat tiriant sportininkus, vartojančius karvės priešpienį, buvo pastebėta, jog jis yra naudingas siekiant sureguliuoti kūno svorį bei raumenų masę [56]. Karvės priešpienio naudingąsias savybes lemia jo sudėtiniai komponentai, o ypač baltyminės medžiagos, kurių 100 ml priešpienio yra 14,9 %, kai piene paprastai būna 3,2 % baltymų. Priešpienyje taip pat yra aptinkama daugiau riebalų, vitaminų ir mineralų nei paprastai yra karvės piene. Be to, laktozės kiekis priešpienyje yra 1,8 karto mažesnis nei piene [54, 57].

Kaip jau minėta anksčiau, baltymai priešpienyje yra pagrindinis imunitetą stiprinantis komponentas. Imunoglobulinai (IgG, IgM ir IgA), sudaro ~ 70–80 % visų priešpienyje esančių baltymų, kurie yra svarbūs gimusio jauniklio sveikatai ir jo imuniteto stiprinimui [55]. Imunoglobulinų (dar vadinamų antikūnais) koncentracija priešpienyje yra 100 kartų didesnė nei piene ir jų koncentracija mažėja ilgėjant pogimdyminiui laikotarpiui [58]. Priešpienyje daugiausiai yra imonoglobulinų IgG (51 mg/ml), kai kitų imunoglobulinų IgA ir IgM aptinkama mažesniais koncentracijomis (1,7 mg/ml ir 4,3 mg/ml, atitinkamai) [56]. Antikūnai atlieka svarbų vaidmenį, apsaugant organizmą nuo patogeninių bakterijų, virusų bei toksinių medžiagų poveikio. Antikūnai IgG ir IgM gali paskatinti patogenų fagocitozę, stabdyti patogenų adheziją prie audinių ląstelių, sukelti bakterijų agliutinaciją ir neutralizuoti toksines medžiagas. IgA tipo antikūnai daugiausiai dalyvauja virškinamojo trakto apsauginiuose procesuose, neleisdami bakterijoms prisitvirtinti prie virškinamojo trakto epitelio sluoksnio, slopindami virusų veiklą ir neutralizuodami toksinus [58].

Kitas imuniteto stiprinimui svarbus baltymas, aptinkamas priešpienyje, yra laktoferinas. Laktoferinas yra geležį surišantis 80 kDa glikoproteinas, pasižymintis antibakterinėmis, antioksidacinėmis bei antivirusinėmis savybėmis [59, 60, 61]. Laktoferino antimikrobinis poveikis pasireiškia tuo, jog šis baltymas prisijungia Fe^{3+} jonus, kurie yra svarbūs bakterijų augimui ir dauginimuisi. Dėl geležies deficito bakterijos toliau negali daugintis [59]. Laktoferinas pasižymi antimikrobiniu poveikiu prieš *E. coli*, *S. mutants*, *C. Albicans* ir kt. patogenus [62]. Taip pat laktoferinas veikia, kaip antioksidantas, apsaugant lipidus nuo geležies jonų sukeltos peroksidacijos [61]. Laktoferino kiekis priešpienyje yra nuo 30 iki 100 kartų didesnis nei piene [54, 57].

Taip pat priešpienyje gausu ir kitų baltymų, kaip kazeino, jaučio serumo albumino (toliau – JSA), alfa-laktoglobulino, beta-laktoglobulino, fermentų bei citokinų [55]. Kazeino baltymai yra laikomi svarbūs piene dėl antioksidacinių savybių. Manoma, kad kazeine esančios amino rūgštys, kaip tirozinas, triptofanas ir fosfoferinas, neutralizuoja laisvuosius radikalus, oksiduojantis šioms amino rūgštims [63]. Nustatyta, kad tiek iš priešpienio išskirti kazeino baltymai, tiek išrūgų baltymai pasižymi DPPH radikalo neutralizavimo geba, slopina lipidų peroksidacijos procesą ir teigiamai veikia geležies apykaitą [64]. Be to, buvo nustatyta, kad κ -kazeinas pasižymi priešvirusinėmis savybėmis (prieš rotovirusą) [65].

Priešpienyje taip pat gausu ir kitų organizmui naudingų medžiagų, kaip riebaluose tirpių vitaminų (A, E, D, K₁, β-karoteno), vitamino C, mineralų (kalcio, fosforo, magnio, natrio, kalio, cinko, geležies, vario, sieros, mangano ir seleno) [56, 61]. Tai įrodo, jog priešpienis galėtų būti puikus maisto papildas ar komponentas nutraceutikų sudėtyje, padedantis sustiprinti tiek imuninę sistemą, tiek bendrą sveiko žmogaus fiziologinę būklę [56].

1.2. Biologiškai aktyvių medžiagų aktyvumo didinimas

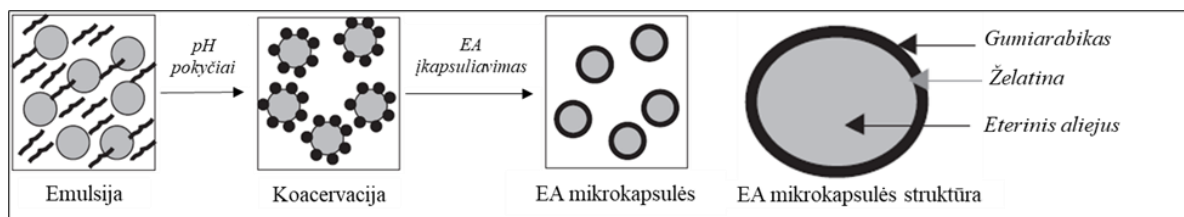
Biologiškai aktyvios medžiagos yra jautrios fizinei, cheminei ar fermentinei degradacijai paruošimo, laikymo, transportavimo ir vartojimo metu. Be to, kai kurie junginiai pasižymi mažu tirpumu vandenyje, yra jautrūs karščiui, šviesai bei deguonies poveikiui (pvz., EA, baltymai) [49]. Dėl šios priežasties, tam, kad būtų išvengta biologiškai aktyvių medžiagų degradacijos ir būtų išlaikytas šių medžiagų aktyvumas iki kol pasieks žmogaus organizme įsisavinimo ar veikimo žarnyne vietą, yra pasitelkiami įvairūs imobilizavimo bei įkapsuliavimo (angl. *encapsulation*) metodai. Imobilizavimas – tai bioaktyvių medžiagų ar ląstelių fizinis įtvirtinimas tam tikroje struktūroje, išsaugant jų biologinį aktyvumą bei stabilumą. Įkapsuliavimas – tai fizinio barjero sudarymas, kai bioaktyvios medžiagos ar ląstelės yra apgaubiamos tam tikra barjerine membrana ir apsaugomos nuo bet kokio sąlyčio su aplinka [66]. Taigi, vadovaujantis imobilizavimo bei įkapsuliavimo principais kuriamos įvairios bioaktyvių komponentų nešiklių sistemos, kaip kapsulės, lipidinės sistemos (pvz., emulsijos, liposomos ir kt.) ar hidrogeliai, kurios užtikrintų ne tik biologiškai aktyvių medžiagų saugų patekimą į žarnyną, bet ir patogų vartojimo būdą [49].

1.2.1. Įkapsuliavimo sistemos

Kapsulės – tai vienos iš plačiausiai naudojamų bioaktyvių medžiagų pernešimo sistemų. Biologiškai aktyvūs komponentai, kurie gali būti tiek hidrofilinės, tiek hidrofobinės prigimties, yra apsupami biopolimerine membrana, apsaugančia juos nuo išorės poveikio. Dažnai kapsulės yra gaminamos taikant kompleksinės koacervacijos (angl. *coacervation*) metodą [49]. Koacervacija – tai procesas, kurio metu koloidinė sistema, varijuojant sąlygas (pH, joninę jėgą, temperatūrą, komponentų tirpumą), yra išskirstoma į dvi fazes. Fazę turinti daugiau koloidinių dalelių vadinama koacervatu, o likusi tirpalo dalis – pusiausvirąja faze. Koacervatai gaunami į polimero tirpalą pridėjus dehidratuojančio agento (pvz., natrio sulfato ar etanolio) – tai paprastoji koacervacija. Kompleksinės koacervacijos atveju koacervatai gaunami, kai dvi priešingų krūvių dalelės (pvz., baltymai, polisacharidai, paviršiaus aktyviosios medžiagos) dėl elektrostatiinių jėgų vandeniniame tirpale sudaro kompleksus [67].

Bioaktyvių medžiagų įkapsuliacijai dažniausiai taikomas kompleksinės koacervacijos principas. Šis būdas taikomas liuteino, likopeno, vitaminų, antioksidantų, probiotikų, EA, skoninių bei aromatinių komponentų įkapsuliavimui į mikrokapsules [49, 68]. Kompleksinės koacervacijos metodo taikymas mėtų EA įkapsuliacijai pavaizduotas 1.3 pav.

Metodo principas yra paprastas. Į vandeninį želatinos tirpalą (1–10 %, 40–60 °C temperatūros) įlašinama šiek tiek etanolio, kad susidarytų dvi fazės. EA gali būti pridamas fazių atskyrimo metu arba po jos, bet kokiu atveju mišinį nepertraukiamai maišant. Vėliau į koloidinį tirpalą papildomai pridama anijoninio polimero (šiuo atveju gumiarabiko). Sumažinus pH iki 4,5, pradeda formuotis koacervatų aplink EA lašelius mikrokapsulės, t. y. teigiamai įkrautos želatinos molekulės suformuoja kompleksus su neigiamai įkrautu gumiarabiku ir jos padengia EA lašelius. Svarbu paminėti, jog įkapsuliuojama medžiaga turi būti netirpi koloidinėje terpėje [68].



1.3 pav. Kompleksinės koacervacijos mechanizmas mėtų EA įkapsuliacijai (modifikuota pagal [68])

Kompleksinės koacervacijos taikymas turi ir minusų. Dėl proceso metu naudojamų aukštų temperatūrų, galimi lakiųjų komponentų nuostoliai. Be to, šių dalelių stabilumo padidinimui dažnai naudojamas glutaraldehidas, kuris yra toksiškas [68].

Emulsijos – tai dispersinė sistema, sudaryta iš dviejų tarpusavyje nesimaišančių skysčių, t. y. dispersinės fazės, kuri yra smulkiais lašeliais pasiskirsčiusi dispersinėje terpėje. Pagal dispersiškumą susidariusios emulsijos yra skirstomos taip: paprastosios, mikroemulsijos ir nanoemulsijos. Mikroemulsijos ir nanoemulsijos ypač patrauklios naudojimui dėl savo gebėjimo išlaikyti stabilumą. Dalelės dėl mažo dydžio pasižymi silpnesnėmis Van der Valso traukos jėgomis, todėl jos neagreguoja viena su kita ir emulsijos neišsisluoksniuoja [49]. Be to, nanoemulsijos laikomos potencialiomis bioaktyvių medžiagų pernašos sistemomis, kadangi dėl mažo lašelių dydžio (20–200 nm) pagerina lipofilinių medžiagų perdavimą per biologines membranas [69]. Nanoemulsijos plačiai naudojamos lipofilinių medžiagų (EA, polifenolinių junginių, antioksidantų bei antimikrobinių medžiagų) stabilizavimui [49, 69].

Emulsijų stabilumui ir jų savybėms įtakos turi: emulsiklis, kuris naudojamas tarpfazinio paviršiaus stabilizavimui; emulsijos sudėtis; emulsiklio ir lipofilinės medžiagos santykis; papildomos medžiagos ir homogenizacijos sąlygos [49]. Emulsijų stabilumui yra svarbu parinkti tinkamą stabilizatorių. Maisto pramonėje dažniausiai naudojamos paviršiaus aktyviosios medžiagos yra įvairūs polisorbatai, cukraus esteriai, lecitinas arba biopolimerinės medžiagos (natūralios gumos, augalinės ar gyvūninės kilmės baltymai ir modifikuotas krakmolos). Taip pat svarbu ir pasirinktas emulsijų gamybos būdas, nes nuo jo priklauso susidarančių dalelių dydis. Emulsijų (ypatingai nanoemulsijų) gamybai dažniausiai yra naudojami daug energijos reikalaujantys procesai, kaip homogenizacija aukštu slėgiu ar naudojant greitaeiges rotorines sistemas. Taip pat stabilioms emulsijoms gauti gali būti naudojami ir mažai energijai imlūs metodai, kaip tirpiklių sumaišymas, spontaniškas emulsifikavimas ir fazių inversija [69].

Emulsinės sistemos dažnai naudojamos EA stabilizavimui. Šios sistemos leidžia užtikrinti EA biologinio aktyvumo išsaugojimą bei lengvą įterpimą į maisto produktų struktūras, paslepiant stiprų skonį bei aromatą. Tiek mikrokapsulių gamyba, tiek emulsijų ruošimas gali paskatinti platesnį lipofilinių medžiagų panaudojimą skystuose produktuose, t. y. lipofilines medžiagas galima paversti tirpiomis [70]. Pavyzdžiui, eugenolio nanodalelės sėkmingai buvo disperguotos piene [71], terpenų ir D-limoneno nanoemulsijos buvo įterptos į kriaušių ir apelsinų sultis [72], o pagamintos metilceliuliozės dangos su gvazdikėlių ir raudonėlių EA nanoemulsijomis, buvo panaudotos pjaustytos duonos realizacijos laiko prailginimui [73].

1.2.2. Hidrogelinės sistemos

Hidrogeliai – tai tridimensinės struktūros, sudarytos iš hidrofiliinių polimerinių molekulių. Šios struktūros formuojasi, kai tarp polimerų susidaro kovalentinis ryšys arba nekovalentinė sąveika. Šios struktūros geba kaupti didelį vandens kiekį, t. y. gelių tūris gali padidėti iki 30 kartų ir vis dar išlaikyti savo struktūrą [49]. Hidrogeliai gali būti gaminami iš sintetinių polimerų arba natūraliai gamtoje randamų polimerų. Hidrogeliai gaminami iš sintetinių polimerų pasižymi tikslia chemine struktūra, tačiau jie žmogaus organizme gali sukelti uždegimines reakcijas ir būti toksiškais [74]. Dėl šių priežasčių, kuriant nešiklių sistemas naudojami hidrogeliai iš natūralių polimerų, kaip chitinas, pektinas, alginatas, agaras, želatina ir kt. [74, 75]. Iš šių polimerų pagaminti hidrogeliai pasižymi suderinamumu su organizmu, yra netoksiški ir dėl organizmo fermentų yra efektyviai hidrolizuojami [74]. Be to, šie natūralūs polimerai jau seniai naudojami maisto pramonėje, siekiant pagerinti maisto gaminių tekstūros ar juslines savybes. Dėl gamtinių polimerų gebėjimo formuoti hidrogelines struktūras, jų panaudojimo įvairovė didėja tokiose srityse, kaip farmacija, medicina, kosmetikos pramonė ar net žemdirbystė. Hidrogelinės sistemos naudojamos ne tik veikliųjų medžiagų nešiklių kūrimui, bet ir kaip lėto vandens atpalaidavimo sistemos, skirtos augalų drėkinimui žemės ūkyje [75].

Hidrogeliai yra gaminami iš makromolekulių, turinčių savo sudėtyje hidrofiliines grupes (OH, COOH, SO₃H, CONH ir CONH₂). Iš šių polimerų paprastai formuojamos gelių struktūros, kurios naudojamos baltymų, probiotikų imobilizavimui bei kitų farmacinių preparatų gamybai [74]. Vaistų pramonėje hidrogeliai struktūrinami įvairiai: mikroskalėje (1–1000 μm) ir nanoskalėje (50–200 nm) [76]. Skirtingai nei kitų medžiagų nešiklių sistemos (mikrodalėlės ar emulsijos), hidrogelių gamyba pasižymi švelniomis temperatūrinėmis sąlygomis, reikalingomis jautrių šiam faktoriui komponentų (pvz., baltymų ar peptidų) imobilizavimui. Hidrogelių gamyba gali būti vykdoma žemose temperatūrose ir vandeninėje aplinkoje. Tuo tarpu emulsijų ar mikrodalelių gamybos metu taikomos sąlygos galėtų pakenkti baltymams, nes jų gamybos metu naudojami organiniai tirpikliai ar homogenizacijos procesai [77]. Hidrogelių, kaip medžiagų pernešimo sistemų, savybės leidžia kontroliuoti medžiagos atpalaidavimą iš jų struktūros priklausomai nuo aplinkos pH, temperatūros ar joninės jėgos. Šie veiksniai, priklausomai nuo hidrogelio sudėties, gali turėti įtakos hidrogelių struktūros pokyčiams, t. y. skatinti jų susitraukimą arba brinkimo procesą. Dažniausiai šiuo tikslu naudojami pH jautrūs hidrogeliai, kurie geba nunešti bioaktyvų komponentą iki atitinkamos žarnyno dalies, pvz., plonosios žarnos ar storosios žarnos. Atsidūręs plonojoje ar storosioje žarnoje nešiklis dėl pH poveikio ima brinkti ir atpalaiduoti iš struktūros bioaktyvius komponentus [76].

Hidrogelių savybės priklauso nuo naudojamo polimero tipo, gelių struktūros formavimosi mechanizmo ir dalelių jame formavimosi būdo [77]. Yra išskiriami cheminiai ir fiziniai gelių gamybos būdai. Taikant cheminius gamybos būdus, papildomai naudojami reagentai sudaryti kovalentinius ryšius tarp polimerų funkcinių grupių, pvz., glutaraldehidą, adipo rūgšties dihidrazidą. Fiziniai gelių gamybos būdai naudojami baltymų ir ląstelių imobilizavimui bei kitų produktų maisto pramonėje gamybai [78]. Gelių porėtą struktūrą formuoja nekovalentiniai ryšiai (hidrofobinė sąveika, joninės sąveika, vandeniliniai ryšiai) [77]. Išskiriami tokie fiziniai gelių formavimosi būdai: kaitinant ir šaldant polimero tirpalą; joninės sąveikos formavimasis, pridėdant divalenčių ar trivalenčių jonų; kompleksinė koacervacija; vandenilinių ryšių formavimas reguliuojant pH ir aukštos temperatūros naudojimas [78].

1.3. Hidrogelių struktūrinimo galimybės

1.3.1. obuolių išspaudų panaudojimo galimybės hidrogelių ruošimui

Apie 25–30 % obuolių pasaulinės produkcijos yra perdirbama į produktus, kaip sultys, vynas, džemas ir kt. obuolių sulčių gamyba sudaro didžiausią rinkos dalį ir sunaudoja ~ 65 % perdirbimui skirtų obuolių [79]. Po sulčių gamybos lieka apie 20–30 % antrinių obuolių produktų (išspaudų), sudarytų iš minkštimo audinių, odelių (~ 13%), sėklų (4–7 %) ir stiebų likučių [47]. Išspaudos, kaip antriniai produktai sudaro ~ 10–12 mln. tonų per metus ir tik mažoji dalis išspaudų yra panaudojama gyvulių pašarams gaminti ar atskirų komponentų ekstrakcijai, kaip fenoliniai junginiai ar maistinės skaidulos (šiuo metu perdirbama į pektiną) [37, 47, 79, 80].

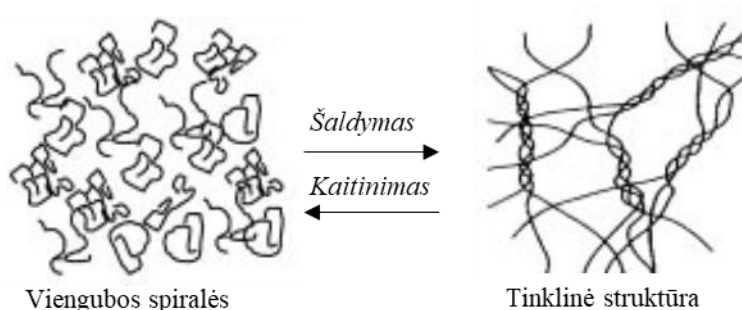
Obuolių išspaudose, kaip jau minėta 1.1.2. skyrelyje, yra gausu ne tik antioksidantų, bet ir maistinių skaidulų (pektino, celiuliozės, hemiceliuliozės ir lignino), ir mažais kiekiais baltymų, vitaminų bei mineralų. Todėl vis didesnis dėmesys skiriamas obuolių išspaudų platesniam panaudojimui vystant funkcionalių maisto produktus. Be to, obuolių išspaudos pasižymi mažu kaloringumu ir funkcinėmis savybėmis. obuolių išspaudos gali būti naudojamos, kaip tirštinimo ar gelinimo agentas bei drėkiklis (angl. *humectant*). Taip pat obuolių išspaudos produktui gali suteikti spalvą, aromatą bei pagerinti skonines savybes [79]. obuolių išspaudų priedai buvo panaudoti kepinų [79, 81], vaisinių drebučių [82], džemų gamyboje [79] bei pieno pramonėje tekstūros stabilizavimui [83]. Taip pat obuolių išspaudos buvo panaudotos konditerijos, mėsos bei ekstruduojamų gaminių sudėtyje, siekiant juos praturtinti maistinėmis skaidulomis [79]. G. Royer ir kt. [82] pagamino iš obuolių išspaudų ir svarainių drebučius (be papildomo tirštiklio), keičiant svarainių kiekį, cukraus koncentraciją ir terminio apdorojimo trukmę. X. Wang ir kt. [83] ištyrė, jog liofilizuotų obuolių išspaudų miltelių priedas (1 %), įbertas į jogurto gamybai skirtą pieną, leido išgauti tvirtesnės konsistencijos jogurto gelius. Šias obuolių išspaudų struktūrinimo savybes lemia jų sudėtyje esančios pektininės medžiagos, kurios maisto pramonėje seniai naudojamos, kaip geliacijos, tirštinimo, stabilizavimo ir emulgavimo priedas [84]. obuolių išspaudose pektino kiekis svyruoja nuo 13–39 % [83]. Iš obuolių išskirtas pektinas pasižymi geresnėmis gelių formavimo savybėmis nei citrusinių vaisių pektinas (plačiau apie pektino gelių formavimąsi 1.3.2. skyrelyje) [85]. Taip pat pektinas, dėl gelinimo savybių, biologinio suderinamumo ir skaidumo naudojamas farmacijos pramonėje, kuriant veikliųjų medžiagų nešiklius bei kitus produktus [47].

1.3.2. Hidrokolidai gelių struktūrų formavimui

Maisto pramonėje gelių formavimui dažniausiai yra naudojami polisacharidų ir baltyminių medžiagų hidrokolidai [86]. Hidrokolidai – tai hidrofiliniai polimerai, gebantys formuoti gelių struktūrą vandenyje [75, 87]. Guminukų ir drebučių gamyboje dažniausiai yra naudojami tokie hidrokolidai, kaip želatina, krakmolai ir pektinas. Taip pat maisto tikslams naudojami ir kiti gelius formuojantys hidrokolidai, kaip agaras, gumiarabikas, karagenanas ir kt. [86]. Be to, kaip jau minėta 1.2.2. skyrelyje, įvairūs hidrokolidai yra naudojami hidrogelių gamybai, kuriant bioaktyvių medžiagų pernešimo sistemas. Tokių nešiklių gamybai dažniausiai yra naudojami polisacharidai, kaip chitozanas, alginatas, pektinas, dekstranas ir kt. [66, 88]. Kiekvienas hidrokolidas pasižymi savitu gelių formavimosi mechanizmu bei įtaka ne tik formuojamo gaminio tekstūrai, bet ir jo juslinėms savybėms [86].

Želatina – tai dalinės kolageno hidrolizės produktas, gautas iš gyvulių kaulų, odos ir jungiamųjų audinių [86]. Pats kolagenas yra trigubos spiralinės struktūros baltymas (300 kDa), sudarytas iš trijų

tarpusavyje susijungusių segmentų (α -grandinių). Kolageno trigubą spiralinę struktūrą lemia trijose α -grandinėse pasikartojančios glicino, prolino ir hidroksiprolino amino rūgščių sekos. Kolagenas želatinos gamybos metu yra suhidrolizuojamas į skirtingo molekulinio svorio baltymų fragmentus: α -grandinę (90–110 kDa), β -grandinę (dvi kovalentiškai sujungtos α -grandinės, 180–220 kDa) ir γ -grandinę (tris kovalentiškai sujungtas α -grandinės, 270–300 kDa) [89]. Trigubos kolageno spiralės segmentai yra svarbūs formuojant želatinos gelius, kadangi jie sudaro kryžmines jungtis ir taip suformuoja trimatę gelių struktūrą. Želatina formuoja temperatūrai jautrius gelius, kaitinant ir vėsinant vandeninį želatinos tirpalą. Pašildžius želatinos tirpalą virš 40 °C temperatūros, išyra trigubos spiralės struktūra želatinos gelyje, o suirus intramolekuliniams ir intermolekuliniams vandeniliniams ryšiams susidaro viengubos spiralinės polipeptidinės grandinės. Vėsinant želatinos tirpalą (~ 36 °C), šios viengubos grandinės atgal susisuka į trigubą spiralinę struktūrą (žr. 1.4 pav.). Be to, jei želatinos koncentracija tirpale viršija kritinę ribą, trigubos spiralinės struktūros persidengia, suformuodamos tinklinę struktūrą. Susiformavę želatinos geliai pakaitinti praranda standumą, t. y. tinklinę struktūrą ir trigubos spiralės suyra [75, 89].



1.4 pav. Želatinos gelių susidarymas [89]

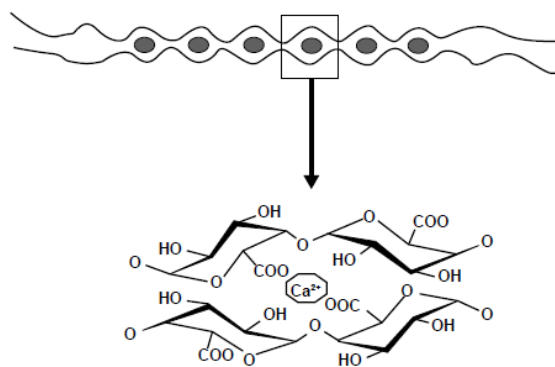
Želatinos gelių susidarymui įtakos turi želatinos koncentracija, temperatūra, pH ir medžiagų priedai [89]. Želatinos stingimo temperatūra yra šiek tiek aukštesnė nei kambario temperatūra, todėl tai sąlygoja ilgą gelio susidarymo trukmę (12–16 val.) [75]. Želatinos tirpalas yra stabiliausias esant 5–6 pH vertėms. Nukrypęs nuo šių pH verčių, želatinos gelių tvirtumas mažėja [86].

Maisto pramonėje drebučiams sudaryti naudojama želatinos koncentracija yra ribose nuo 1 iki 5 %, o guminukų gamybai, siekiant sudaryti tvirtą ir elastingą tekstūrą, naudojamas didesnis želatinos kiekis (5–10 %) [75, 86]. Želatina taip pat naudojama ir farmacijos pramonėje kietųjų bei minkštųjų kapsulių gamyboje [89].

Pektinas – tai augalinės kilmės polimeras, sudarytas iš linijinės struktūros makromolekulių grandžių. Pektinas sudarytas iš D-galakturono rūgšties likučių, sujungtų α -1,4 glikozidiniu ryšiu. Šios rūgštys turi karboksigrupių, kurios pektine natūraliai gali būti pakeistos metilo esteriais arba ekstrakcijos metu papildomai amidintos [90].

Pektino gelių savybės priklauso nuo esterifikacijos laipsnio. Jei daugiau nei 50 % pektine esančių karboksigrupių yra metilintos (aukšto metoksilinimo laipsnio pektinas), tai gelių susidarymui reikia rūgštinės terpės (pH 3) ir papildomai cukraus (~65 %). Jei pektine yra mažiau nei 50 % metilintų karboksigrupių (žemo metoksilinimo laipsnio pektinas), tai gelių formavimuisi reikia Ca^{2+} jonų [91]. Aukšto metoksilinimo laipsnio pektine gelių struktūros formavimą lemia vandenilinių ryšių susidarymas tarp laisvų karboksilo ir hidroksilo grupių kaimyninėse pektino molekulėse. Pektino

molekulėse laisvos karboksigrupės neutraliuose ar lengvai parūgštintuose tirpaluose yra jonizuotos (turi neigiamą krūvį). Mažinant tirpalo pH karboksigrupės protonizuojasi, todėl sumažėja makromolekulių neigiamas krūvis ir stūmos jėgos tarp jų. Taip pat sumažėja ir hidratacija, nes sacharozė konkuruoja dėl vandens surišimo su pektinu. Tokios sąlygos neleidžia pektinui būti disperguotoje būsenoje, todėl vėstant pektino tirpalui dehidratuotos pektino molekulės formuoja vandenilinius ryšius ir persidengimo zonas, tokiu būdu susidarant gelių struktūrai [86, 90]. Optimalus pH gelių formavimui varijuoja tarp pH 2,9 ir pH 3,6. Esant žemesnei pH vertei nei pH 2,9 gali įvykti pektino hidrolizė ir gaminyje pasireikšti sinerezės procesas. Taip pat metoksilinimo laipsnis turi įtakos ir stingimo temperatūrai. Kuo didesnis esterifikacijos laipsnis, tuo aukštesnė stingimo temperatūra (75–85 °C), taip pat, kuo didesnė cukraus koncentracija, tuo aukštesnė stingimo temperatūra [86]. Žemo metoksilinimo laipsnio pektinas gelius formuoja dėl susidariusios sąveikos tarp gretimų pektino polimerinių grandinių per Ca^{2+} jonus. Ca^{2+} sąveikauja su poligalakturonato molekulėse esančiomis karboksirūgštimis (žr. 1.5 pav.) [90]. Gelių susidarymui cukrus nėra būtinas komponentas, tačiau nedidelis cukraus kiekis (10–20 %) gali sumažinti sinerezę ir suteikti gaminiui norimas tekstūros savybes.



1.5 pav. Gelių susidarymas žemo metoksilinimo laipsnio pektine [90]

Maisto pramonėje daugiausiai yra naudojamas aukšto metoksilinimo laipsnio pektinas. Guminukų gamyboje tvirtos gelių struktūros formavimui yra naudojama 1–2 % pektino. Žemo metoksilinimo laipsnio pektinas taip pat yra naudojamas, kai norima eliminuoti gaminyje rūgštų skonį [86].

Agaras – kompleksinis polisacharidų (agarozės ir agaropektino) mišinys, išgaunamas iš jūros dumblių [75]. Agaras, kaip želatina ir pektinas, maisto pramonėje yra naudojamas gelių tipo struktūros saldainių gamyboje [86].

Agaro geliams susidaryti užtenka 1–2 % agaro. Agaro gelių susidarymo mechanizmas yra panašus į želatinos gelių susidarymo mechanizmą. Pirmiausia agaras brinkinamas, tirpinamas kaitinant (iki virimo), po to aušinamas. Auštant (~35–40 °C temperatūroje) susiformuoja dvigubos spiralinės struktūros, kurios vėliau sudaro tridimensinę gelių struktūrą. Agaras sustingsta 12–16 val. laikotarpyje. Agaras suformuoja skaidrius, kietus ir trapius gelius, kuriems būdinga sinerezė [75, 86].

1.3.3. Saldinančiųjų medžiagų įtaka hidratuotų gelių struktūros formavimui

Daugumos maisto pramonėje gaminamų gelinės struktūros produktų (želės, guminukų, saldymedžio saldainių) ruošimui naudojami saldikliai bei saldinančios medžiagos (pvz., cukrus). Saldikliai

gaminiai suteikia ne tik malonų saldų skonį, bet ir turi įtakos gelių struktūros formavimuisi, lemia galinio produkto tekstūrą bei išvaizdą [92].

Tradiciskai hidratuotų gelių gamybai, be pasirinkto hidrokoloido, yra naudojamos saldinančios medžiagos, kaip sacharozė ir gliukozės sirupas [86]. Gaminant guminukus ar želė saldinius dažnai naudojami šių dviejų medžiagų mišiniai, pvz., gaminant saldinius su želatina sacharozės naudojama 31–34 %, o gliukozės sirupo 37–42 %; gaminant saldinius su pektinu sacharozė sudaro 30–36 %, o gliukozės sirupas 36–40 % [86]. Cukrus padidina gelio tvirtumą bei paaukština stingimo ir lydymosi temperatūras. Gliukozės sirupas neleidžia kristalizuotis sacharozei, taip pagerinama gaminio struktūrą (nesijaučia cukraus grūdelių). Kaip jau minėta, kai kuriais atvejais cukrus netgi būtinas gelių struktūrai susidaryti (pvz., pektino atveju) [86, 90]. Taip pat ir želatinos gaminių ruošimo metu buvo stebima teigiama sacharozės ir gliukozės sirupo įtaką struktūros formavimuisi ir jos pokyčiams laikymo metu. Cukraus priedas į želatinos gelius padidina gelio tvirtumą. Tai aiškinama tuo, kad susidarius vandeniliniams ryšiams tarp vandens ir hidrokoloido molekulių, pagerėja tinklinės struktūros formavimasis [93, 94]. Taip pat dėl cukraus poveikio padidėja ir gelio stabilumas laikymo metu, nes cukrus padidina stingimo bei lydymosi temperatūras [86].

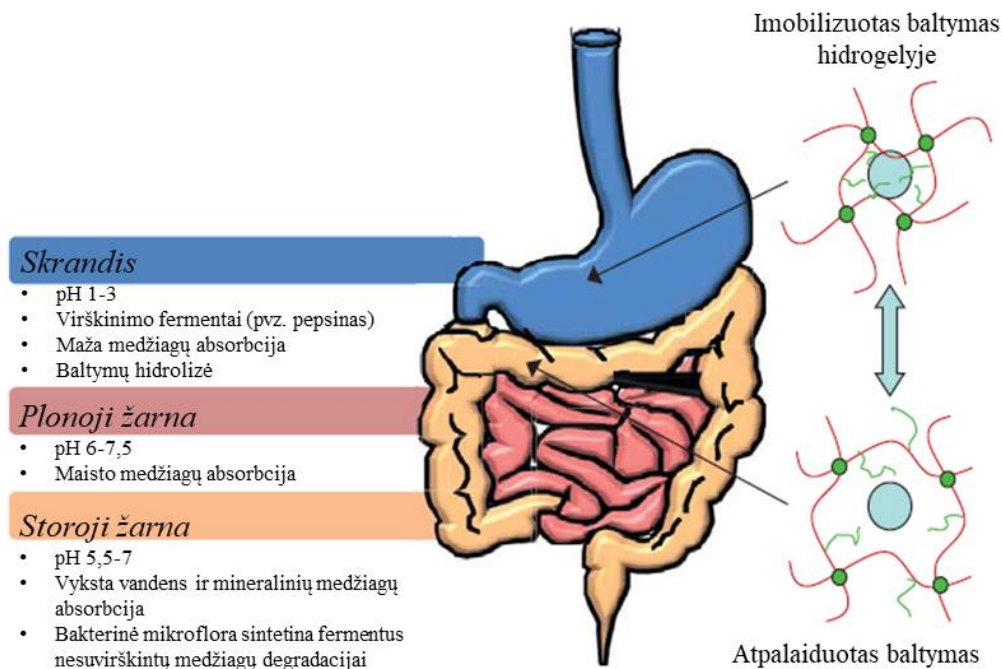
Be to, kuriami ir becukriai gelių struktūros gaminiai su saldikliais (polioliais). Tuo tikslu cukrus dažniausiai yra keičiamas mažo kaloringumo saldikliais, kaip maltitolis ar sorbitolis. Saldiklio pasirinkimas priklauso nuo norimo gaminio saldumo, kaloringumo, tekstūros savybių ir kainos [86]. Sorbitolis yra vienas iš labiausiai naudojamų poliolių, leidžiantis pakeisti cukrų kramtomosiose gumose, tabletėse ar saldainiuose. Taip pat jis naudojamas ir kitų produktų, skirtų diabetu sergantiems žmonėms ruošimui, kadangi sorbitolis nesukelia staigaus gliukozės kiekio padidėjimo kraujyje [95].

1.4. Biologiškai aktyvių medžiagų pernešimo sistemų atpalaidavimo savitumai

Žmogaus organizme didžioji dalis maistinių medžiagų yra įsisavinama žarnyne, o tiksliau - didžioji dalis medžiagų (~ 95 %) yra absorbuojama plonojoje žarnoje [76]. Dėl šios priežasties, daugumos kuriamų bioaktyviųjų komponentų imobilizavimo bei įkapsuliavimo sistemų tikslas yra apsaugoti veikliąją medžiagą (pvz., baltymus, peptidus, probiotikus, vitaminus ir kt.) nuo viršutinio virškinamojo trakto dalies poveikio, kad nepakitęs ir išlaikęs savo biologinį aktyvumą pasiektų įsisavinimo bei fiziologinio veikimo vietą [49, 76].

Kaip jau minėta (žr. 1.2. skyrių), kuriamos įvairios įkapsuliavimo bei imobilizavimo sistemos bioaktyviųjų komponentų apsaugai. Svarbiausi aspektai renkantis medžiagas šių sistemų gamybai yra mechaninis atsparumas, jautrumas pH ir jautrumas žarnyno mikroflorai. Medžiagos, iš kurių gaminami bioaktyviųjų medžiagų nešėjai, turi būti atsparūs slėgiui, kuris susidaro viršutinėje virškinamojo trakto dalyje, tačiau turi sugebėti suirti prie to slėgio, kuris yra plonojoje žarnoje ar storiojoje žarnoje. Taip pat svarbus jautrumas pH. Medžiagos, kurios naudojamos kapsulių ar hidrogelių gamyboje, turi būti atsparios rūgštiniam skrandžio pH, tačiau iširti šarminėje terpėje, būdingoje žarnynui [49]. Pastaruoju metu didžiausias dėmesys yra skiriamas storosios žarnos, kur esant šarminėi terpei gali pasireikšti sunkiai kontroliuojami puvinio bakterijų sukelti procesai, susirgimų prevencijai. Tuo tikslu didelis dėmesys telkiamas sukurti hidrogelines bioaktyviųjų medžiagų imobilizavimo struktūras, leidžiančias atsipalaiduoti veikliosioms medžiagoms šarminėje terpėje. Hidrogelius formuojančios medžiagos (priklausomai nuo pH) geba jonizuotis ir įgyti tam tikrą krūvį. Tai lemia elektrostatinį stūmos jėgų atsiradimą tarp struktūrą formuojančių makromolekulių ir struktūros suirimą esant atitinkamai pH terpei (žr. 1.6 pav.) [76]. Taip pat,

kiekvienoje žarnyno dalyje yra tam tikra specifinė mikroflora, todėl parenkant medžiagas imobilizavimui svarbu, kad jas skaidytų specifiniai mikrofloros išskirti fermentai (pvz.: β -gliukuronzidazė, β -ksilozidazė, α -arabinozidazė, β -galaktozidazė, nitroreduktazė, azoreduktazė, deaminazė ir kt.) [66]. Tokiu būdu galima pasiekti, kad nešiklis suirtų atitinkamoje žarnyno dalyje, kurioje bus pasiektas pageidaujamas veikliosios medžiagos poveikis [49].



1.6 pav. Virškinamojo trakto sudėtis ir savybės [76].

Biologiškai aktyvių medžiagų atpalaidavimo vertinimui yra naudojami *in vitro* virškinimo sistemos modeliai ir *in vivo* eksperimentai. *In vivo* eksperimentai yra tikslesni, nes eksperimentams naudojami gyvūnai (kiaulės, pelės, žiurkės ir triušiai), kuriuose atitinkamo preparato bioaktyvios medžiagos įsisavinimas stebimas kraujyje [76]. Tačiau dažniausiai naudojami *in vitro* tyrimo metodai, kurie pagal sudėtingumą yra skirstomi į statinius ir dinامينius. Statiniai atpalaidavimo metodai yra praktiški, nebrangūs ir nereikalauja specialios įrangos [49]. Užtenka suspenduoti tiriamąjį mėginį simuliacinėse skrandžio (~ pH 1,2) ar žarnyno sultyse (~ pH 7,5) ir tirti atpalaiduotų medžiagų koncentracijas tirpaluose [76]. Naudojant statinius modelius, galima vienu metu vertinti kelis mėginius. Kita vertus, dinaminiai virškinimo sistemos modeliai leidžia tiksliau imituoti žmogaus virškinamojo trakto darbą, t. y. gali imituoti peristaltikos judesius, realiu laiku reguliuoti pH ir virškinimo fermentų koncentracijas. *In vitro* eksperimentai, atlikti tiek statinėse tiek dinaminėse sąlygose, dažnai yra pranašesni nei *in vivo*, nes nėra etinių problemų dėl gyvūnų naudojimo, rezultatai gaunami greitai, galima imti mėginius bet kuriuo proceso metu ir galima gauti atsikartojančius rezultatus [79].

1.5. Literatūrinės apžvalgos apibendrinimas

Dauguma per maistą plintančių patogeninių mikroorganizmų, kaip *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* ir kt., yra išvystę atsparumą antibiotikams. Šie patogenai patekę į žmogaus organizmą kolonizuojasi žarnyne ir sukelia pavojingus gyvybei virškinamojo trakto sutrikimus. Todėl intensyviai ieškoma natūralios kilmės antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių medžiagų, kurios stabdytų patogenų dauginimąsi ir neturėtų nepageidaujamų šalutinių efektų. Eteriniai aliejai ir priešpienis, dėl savo

cheminės sudėties pasižymi ne tik antibakteriniu poveikiu prieš patogenines bakterijas, bet kartu pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu prieš laisvuosius radikalus. Todėl šių medžiagų potencialus panaudojimas prasiplečia ne tik kuriant alternatyvius antimikrobinius priedus, bet ir kuriant nutraceutikus, praturtintus naudingais antioksidantais ir baltymais. Vienas iš galimų sprendimų būtų efektyvių ir patogių vartojimui hidrogelių tipo nutraceutikų kūrimas. Hidrogelių struktūros farmacijoje yra plačiai vystomos bioaktyvių komponentų pernešimui į jų tikslinę vietą – žarnyną. Hidrogelių struktūroms kurti įprastai naudojami hidrokoloidai, kaip pektinas, agaras, želatina, chitinas ir kt. Tačiau šiuo metu yra atkreipiamas dėmesys į prebiotinėmis savybėmis pasižyminčias skaidulines medžiagas, kurios galėtų būti panaudojamos hidrogelių struktūrinimui ir atliktų savo fiziologinę paskirtį. Vienas iš tokių sprendimų būtų obuolių išspaudų panaudojimas, kurios maisto pramonėje kasmet sudaro milijonus tonų atliekų, taip kuriant aplinkai tvarius sprendimus. Siekiant suteikti produkto vartotojui priimtinas savybes, obuolių išspaudose esančios pektininės medžiagos gali būti kombinuojamos su įprastiniais hidrokoloidais. Mažo kaloringumo saldikliai (pvz., sorbitolis ir kiti polioliai) gali būti puiki alternatyva juslinių savybių gerinimui, pakeičiant saldinančiąsias medžiagas, tokias kaip cukrus ar gliukozės sirupas.

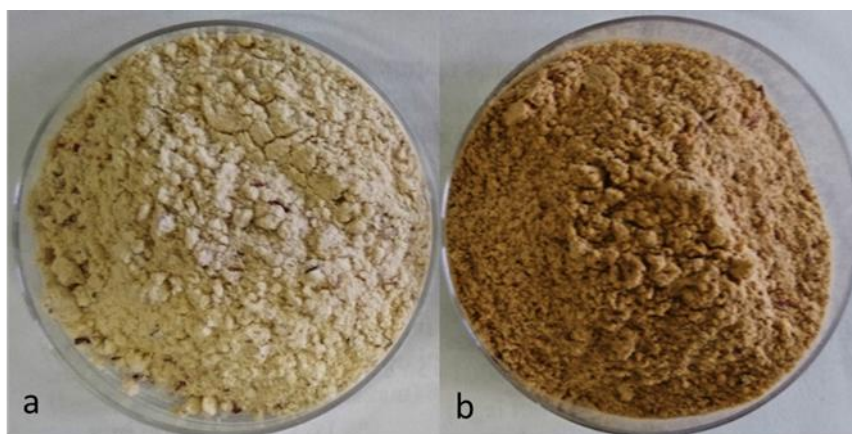
2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimo objektai

Tyrimų objektu buvo hidratuoti geliai, skirti potencialių augalinės ir gyvūninės kilmės antimikrobinų bei antioksidacinių komponentų imobilizavimo galimybių paieškai įvairių obuolių perdirbimo produktų (obuolių miltelių ir obuolių išspaudų) struktūrose.

Hidratuotų gelių ruošimui naudotos tokios pagrindinės medžiagos:

1. gvazdikėlių, čiobrelėlių, mandarinų EA ir „Eunutritech“ EA preparatas, gauti iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Farmacijos fakulteto Vaistų technologijos ir socialinės farmacijos katedros (Sukilėlių pr. 13, LT – 50166, Kaunas);
2. PRB *Lactobacillus uvarium* (LUHS 245) fermentuotas karvės priešpienis, gautas iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos fakulteto Maisto saugos ir kokybės katedros (Tilžės g. 18, LT – 47181, Kaunas);
3. gelių struktūrinimui išbandyti įvairūs liofilizuoti obuolių produktai: obuolių milteliai (2018 m.) ir obuolių išspaudos (2019 m.) pagaminti iš *Ligol* veislės obuolių Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centre Sodininkystės ir daržininkystės institute (Kauno g. 30, LT – 54333, Babtai) (žr. 2.1 pav.). Kaip matyti iš 2.1 pav. obuolių produktai skyrėsi spalva. Obuolių milteliai buvo šviesios spalvos, o išspaudų tamsesnė.



2.1 pav. Liofilizuoti *Ligol* obuolių produktai: a) milteliai ir b) išspaudos

Papildomai gelių struktūrinimui naudoti įvairūs stabilizatoriai: agaras, gautas iš UAB „Mondelez Lietuva Production“ (Taikos pr. 88, LT – 51501, Kaunas); pektinas gautas iš UAB „Delona“ ir želatina „Dr. Oetker“. Taip pat struktūrai sukurti buvo naudoti ir saldikliai (sorbitolis, maltitolis, eritrolis) gauti iš UAB „Mondelez Lietuva Production“ (Taikos pr. 88, LT – 51501, Kaunas).

Be to, gelių ruošimui naudota citrinų rūgštis gauta iš UAB „Eurochemicals“, cukrus „Panevėžio plius“ (AB „Nordic Sugar“) ir gliukozės sirupas gautas iš UAB „Mondelez Lietuva Production“ (Taikos pr. 88, LT – 51501, Kaunas).

Emulsijos eterinių aliejų imobilizavimui ruoštos emulsijos sumaišant 1,94 g kukurūzų OSA-krakmolo „Emsland grup“ su 33,3 ml vandens (temperatūra 90 °C) iki vienalytės konsistencijos. Po to masė ataušinta iki 30 °C temperatūros ir į ją pridėta 4,8 g skysto EA (čiobrelėlių ar gvazdikėlių).

Turinys homogenizuotas „IKA T25 digital Ultra Turrax“ tipo homogenizatoriumi (greitis – 10000 aps./min, trukmė – 5 min.) [96].

Paruoštų EA emulsijų imobilizavimas atliktas Lietuvos sveikatos mokslų universitete Farmacijos fakultete naudojant enterosoliubilią (angl. *enterosoluble*) medžiagą „Eudragit S 100“. Imobilizuoti EA liofilizuoti laboratoriniu „LyoQuest Telstar“ tipo liofilizatoriumi (temperatūra -53 °C, trukmė – 24 val.). Imobilizuoti EA mėginiai sudėti į sandarius plastiko indelius ir pristatyti tyrimams į KTU.

Hidratuotų gelių ruošimui (sudėties ir technologinių parametru parinkimui) buvo renkami struktūriniai stabilizatoriai ir saldikliai bei optimalūs jų kiekiai. Taip pat siekiant nustatyti įvairių obuolių produktų (miltelių ir išspaudų) įtaką hidratuotų gelių struktūrizavimui, buvo atlikti gamybos bandymai dvejais pagrindiniais etapais laboratorinėmis sąlygomis Maisto mokslo ir technologijos katedroje.

I etapo metu buvo struktūrizuoti geliai su obuolių milteliais, o **II etapo** metu gelių struktūrinimui buvo naudotos obuolių išspaudos.

I etape geliai ruošti iš obuolių miltelių, išbandant įvairius stabilizatorius (agarą, pektiną ar želatiną) ir jų kiekius pagal [75, 86]: ~1 % agarą arba ~1–2 % pektino, arba ~1–5 % želatinos (žr. 2.1 lentelę). Cukraus ir gliukozės sirupo kiekis gelių sudėtyse varijavo priklausomai nuo stabilizatoriaus rūšies (10–60 % ir 20–60 %, atitinkamai). Citrinos rūgšties kiekis gamintuose geliuose buvo pastovus (1%).

2.1 lentelė. Gelių su įvairiais stabilizatoriais (agaru, želatina ir pektinu) sudėtys, % nuo masės

Gelio kodas Komponentas	OMA1	OMA2	OMZ1	OMZ2	OMP1	OMP2
Obuolių milteliai	10	10	10	10	10	10
Agaro tipalas (1,3 % koncentracijos)	20	20	–	–	–	–
Želatina	–	–	2	2	–	–
Pektinas	–	–	–	–	2	2
Cukrus	10	–	35	–	60	–
Gliukozės sirupas	30	40	20	55	–	60
Citrinų rūgštis (50 % koncentracijos)	1	1	1	1	1	1
Vanduo	29	29	32	32	27	27

*OMA1 / OMA2 – geliai iš obuolių miltelių ir agarą; OMZ1 / OMZ2 – geliai iš obuolių miltelių ir želatinos; OMP1 / OMP2 – geliai iš obuolių miltelių ir pektino. Skaičiai nurodo gamintus gelinių struktūrų variantus.

Gelių ruošimas priklausė nuo naudoto stabilizatoriaus rūšies. Ruošiant gelius su **agaru ir želatina**, galima išskirti tris technologines operacijas:

1. pirmiausiai buvo ruošiamos žaliavos (brinkinami ir tirpinami stabilizatoriai bei ruošiami saldiklių ir citrinos rūgšties tirpalai);
2. ruošiamą masę, sumaišant visus receptūros komponentus (obuolių miltelius, saldiklį, vandenį ir galiausiai išbrinkusį stabilizatorių,) bei kaitinant ir koncentruojant iki ~70 % s. m.;

3. galiausiai masė buvo ataušinta iki 70 °C temperatūros ir sumaišyta su 50 % citrinos rūgšties tirpalu.

Gelių su **pektinu** ruošimo metu galima išskirti dvi technologines operacijas:

1. mišinio iš liofilizuotų obuolių miltelių, cukraus / gliukozės sirupo, pektino ir vandens ruošimas kaitinant ir koncentruojant iki ~ 70 % s. m.;

2. masės atvėsėjimas iki 70 °C temperatūros ir maišymas su citrinų rūgšties priedu (50 % koncentracijos tirpalu).

Toliau pateiktas išsamus gelių su įvairiais stabilizatoriais aprašymas.

Ruošiant gelius su **agaru**, pirmiausiai buvo ruoštas 1,3 % agaro tirpalas, brinkinant agarą kambario temperatūros vandenyje (trukmė – 1 val.). Po to ruoštas agaro sirupas, kaitinant brinkintą agarą (su vandeniu) 100 °C temperatūroje. Lygiagrečiai buvo ruoštas sirupas iš cukraus ir gliukozės sirupo, kaitinant 90 °C temperatūroje. Po to į paruoštą sirupą sudėti obuolių milteliai, agaro sirupas, citrinų rūgšties tirpalas ir vanduo. Gautas receptūrinis mišinys kaitintas iki virimo (trukmė – 1 min.), maišant iki vienalytės konsistencijos. Gauta masė išpilstyta į *petri* lėkšteles ir mėginiai palikti 1 val. ataušti kambario temperatūroje ir struktūrinimui 24 val. šaldytuve (+4 °C temperatūroje).

Ruošiant gelius su **želatina**, pirmiausiai želatina buvo brinkinama šaltame vandenyje (trukmė – 30 min.) ir po to tirpinama kaitinant ~ 60–70 °C temperatūroje, kol suskystės. Lygiagrečiai ruoštas sirupas iš cukraus, gliukozės sirupo ir vandens, kaitinant 90 °C temperatūroje. Į pagamintą sirupą sudedami obuolių milteliai ir želatinos tirpalas. Gautas receptūrinis mišinys buvo kaitinamas iki 90 °C temperatūros (trukmė – 1 min.) maišant iki vienalytės konsistencijos. Galiausiai buvo įpiltas 50 % citrinų rūgšties tirpalas. Paruošti gelių su želatina mėginiai buvo išpilstyti į *petri* lėkšteles ir palikti 1 val. ataušti kambario temperatūroje ir struktūrinimui 24 val. šaldytuve (+4 °C temperatūroje).

Geliams su **pektinu** buvo ruošiami du skirtingi sirupai: su cukrumi, arba su gliukozės sirupu. Pirmiausiai buvo sumaišomi visi sausi ingredientai, po to įpylus vandens mišinys buvo kaitinamas (100 °C temperatūroje, trukmė – 5 min), maišant iki vienalytės konsistencijos. Paruošta masė buvo atvėsinta ir sumaišyta su citrinos rūgšties tirpalu. Paruošti gelių su pektinu mėginiai buvo išpilstyti į *petri* lėkšteles ir palikti 1 val. ataušti kambario temperatūroje ir struktūrinimui 24 val. šaldytuve (+4 °C temperatūroje).

Palyginus pagamintų gelių su įvairiais stabilizatoriais tekstūrą akustiniu lygio matuokliu (pagamintu IDV „Matmuo“), tolesnio eksperimento metu pasirinkta gelius ruošti su želatina.

Toliau geliams ruošti buvo renkami mažo kaloringumo saldikliai (sorbitolis, maltitolis ir eritritolis) ir jų kiekiai, sąlygojantys geriausios gelio struktūros susidarymą. Taip pat buvo tikslinami sudėtyse želatinos ir obuolių miltelių kiekiai (žr. 2.2 lentelę). Kontroliniai hidrogelių mėginiai ruošti su gliukozės sirupu ir cukrumi. Gelių gamyba su želatina ir testuojamais saldikliais vyko analogišku būdu, kaip aprašyta I etapo metu.

Paminėtina, kad gelių tekstūra su kai kuriais saldikliais buvo per kieta ir jos vertinimui netiko akustinis klamos matuoklis (IDV „Matmuo“). Įvertinant tai, šio ir kitų eksperimento etapų metu gelių tekstūros vertinimui naudotas „TAXT plus Texture Analyser“ tipo tekstūros analizatorius.

2.2 lentelė. Gelių su įvairiais saldikliais (sorbitoliu, eritroliu ir maltitoliu) sudėtys, % nuo masės

Komponentas	Gelio kodas				
	OMG1	OMC1	OMS1	OME1	OMM1
Obuolių milteliai	20	18,2	20	18,2	18,2
Želatina	2	1,8	2	1,8	1,8
Gliukozės sirupas	55	–	–	–	–
Cukrus	–	50	–	–	–
Sorbitolis	–	–	55	–	–
Eritrolis	–	–	–	50	–
Maltitolis	–	–	–	–	50
50 % citrinų r. tirpalas	1	1	1	1	1
Vanduo	22	29	22	29	29

*OMG1 – gelis iš obuolių miltelių ir gliukozės sirupo; OMC1 – geliai iš obuolių miltelių ir cukraus; OMS1 – gelis iš obuolių miltelių ir sorbitolio sirupo; OME1 – gelis iš obuolių miltelių ir eritrolio; OMM1 – gelis iš obuolių miltelių ir maltitolio.

Eterinių aliejų ir priešpienio imobilizavimas geliuose iš obuolių miltelių

Eterinių aliejų preparato „Eunutritech“ ir priešpienio imobilizavimo efektyvumo tyrimui (naudojantis OMS1 struktūra) buvo gaminamos įvairios gelių struktūros (vienasluoksnės ir daugiassluoksnės). Iš pradžių gaminant tiriamus mėginius OMS1 pagrindu, į ruošiamo 50 g tokio gelio buvo pridėta 500 mg EA miltelių „Eunutritech“. Siekiant nustatyti EA komponentų imobilizavimo hidrogeliuose efektyvumą, buvo atlikta šių gelių HPLC analizė. Vėliau sluoksniuotų gelių sudėtis buvo papildyta ir 14 % pagal masę fermentuoto priešpienio priedu.

II etape buvo siekiama optimizuoti gelių su obuolių išspaudomis gamybą (sudėtis ir technologines operacijas). Kadangi, obuolių išspaudos, lyginant su obuolių milteliais, pasižymėjo 1,8 karto didesne vandens įgertimi, receptūrose (žr. 2.3 lentelę) buvo renkamas obuolių išspaudų kiekis, taip pat tikslinami sorbitolio ir želatinos kiekiai tiriamųjų mėginių ruošimui. Iš viso išbandytos 4 skirtingos komponentų (želatinos, obuolių išspaudų ir vandens) kombinacijos. Tinkamiausia tekstūra pasižymėjo OIS3 gelis (4 % želatinos, 15 % obuolių išspaudų, 41 % sorbitolio ir 39 % vandens).

2.3 lentelė. Gelių, ruoštų su obuolių išspaudomis, sudėtys, % nuo masės

Komponentas	Gelio kodas			
	OIS1	OIS2	OIS3	OIS4
Obuolių išspaudos	20	18	16	15
Želatina	2	2	4	4
Sorbitolis	55	50	45	41
50 % citrinų r. tirpalas	1	1	1	1
Vanduo	22	29	34	39

* OIS1 / OIS2 / OIS3 / OIS4 – geliai iš obuolių išspaudų ir sorbitolio sirupo. Skaičiai (1–4) nurodo gamintus skirtingus gelių struktūrinius variantus.

Toliau gelių su obuolių išspaudomis ruošimui buvo naudotas PRB *Lactobacillus uvarium* (LUHS 245) fermentuotas ir liofilizuotas karvių priešpennis, keičiant jo kiekį receptūrose nuo 2 % iki 8 % (kas 2 %), kartu koreguojant obuolių išspaudų kiekį nuo 14 % iki 8 % (kas 2 %) (žr. 2.4 lentelę).

Hidratuotų gelių gamyba su priešpieniu vyko analogiška eiga, kaip aprašyta I etapo metu, tik priešpienis į receptūrinę masę buvo įmaišytas, kaip paskutinis komponentas, kai receptūrinis mišinys buvo artaušintas iki 50 °C temperatūros.

2.4 lentelė. Gelių, ruošų su fermentuotu LUHS 245 karvės priešpieniu, sudėtys, % nuo masės

Komponentas	Gelio kodas			
	OIP1	OIP2	OIP3	OIP4
Obuolių išspaudos	14	12	10	8
Priešpienis	2	4	6	8
Želatina	4	4	4	4
Sorbitolis	45	45	45	45
50 % citrinų r. tirpalas	1	1	1	1
Vanduo	34	34	34	34

* OIP1 / OIP2 / OIP3 / OIP4 – geliai iš obuolių išspaudų ir priešpienio. Skaičiai (1–4) nurodo gamintus skirtingus gelių struktūrinius variantus.

Struktūroms su EA ruošti buvo pasirinktas gelis su obuolių išspaudomis (OIP 3 variantas). Gelių gamybai išbandyti miltelių pavidalo čiobrelių bei gvazdikėlių EA (imobilizuoti į žarnyne tirpstančią medžiagą „Eudragid S100“). Šių imobilizuotų EA į gelį buvo dėta 0,3 % pagal masę. Imobilizuoti EA į gelinę struktūrą šiame etape buvo įmaišyti kartu su priešpieniu, t. y. receptūrinę masę ataušinus iki 50 °C temperatūros.

2.2. Reagentai ir aparatūra

Analitiniams tyrimams naudoti reagentai

Fenolinių junginių nustatymui Folino-Kiokalto metodu naudota : Folino-Kiokalto reagentas 2 N „Sigma“; natrio karbonatas „Eurochemicals“; DMSO „Eurochemicals“; metanolis „Eurochemicals“; galo rūgštis „Sigma“.

Antioksidacinio aktyvumo įvertinimui DPPH radikalo slopinimo metodui naudota: DPPH „Sigma“; troloksas „Sigma“; DMSO „Eurochemicals“; metanolis „Eurochemicals“.

Antioksidacinio aktyvumo įvertinimui ABTS radikalo slopinimo metodu naudota: ABTS „Sigma“; troloksas „Sigma“; kalio persulfatas „Sigma“; DMSO „Eurochemicals“; metanolis „Eurochemicals“.

Antibakterinio aktyvumo nustatymui agaru difuzijos metodais naudota: *Nutrient agar* „Liofilchem“, patogeninės bakterijos: *S. aureus*, *S. typhimurium*, *B.cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* gautos iš KTU Maisto mokslo ir technologijos katedros, natrio chloridas „Biolife“, McFarland 0.5 standartas „Liofilchem“.

Bendro baltymų kiekio nustatymui Kjeldalio metodu naudota: sieros rūgštis „Eurochemicals“; Kjeldalio tabletės „Merck“; boro rūgštis „Eurochemicals“.

Baltymų koncentracijos nustatymui Bradford'o metodu naudota: druskos rūgštis „Eurochemicals“; natrio šarmas „Eurochemicals“, JSA „Sigma“; kumasi briliantinis mēlis G-250

„Biochemical“; fosforo rūgštis „Eurochemicals“; žemės ūkio kilmės etanolis „Stumbras“ ; TRIS bazė „Sigma“; natrio fosfatas „Eurochemicals“; natrio hidrofosfatas „Eurochemicals“;

Baltymų elektroforezės SDS–PAGE metodui naudota: standartinių baltymų mišinys 10–220 kDa „BenchMark™ Unstained Protein Ladder“; ; TEMED „Eictron“; akrilamidas „Sigma“; N,N – metilenbisakrilamidas „Sigma“, amonio persulfatas „Sigma“; natrio dodecilsulfatas „Sigma“; TRIS bazė „Sigma“; druskos rūgštis „Eurochemicals“.

In vitro atpalaidavimo tyrimui naudota: kiaulių pepsinas „Sigma“; natrio chloridas „Eurochemicals“; druskos rūgštis „Eurochemicals“; natrio karbonatas „Eurochemicals“; kalio chloridas „Eurochemicals“; natrio hidrokarbonatas „Penta“; kalcio chloridas „Delta Chemi“; tulžies druskos „Sigma“.

Analitiniams metodams naudoti prietaisai

- Analitinės svarstyklės 0,1 g – 620 g „Kern EG620 – 3NM ir „Vibra“.
- Reguliuojamo tūrio automatinės pipetės „Ependorf“.
- Magnetinė maišyklė ir kaitinimo plytelė „Biosan MSH 300“.
- Stalinės centrifūgos: 50 ml mėgintuvėliams „MPW – 260RH“, 15 ml mėgintuvėliams „Orto alresa microcen 23“, „ependorf“ tipo mėgintuvėliams „VWR Galaxy MiniStar“.
- Spektrofotometras „Thermo Scientific“.
- Termostatas „Salvis LAB“.
- Laboratorinis autoklavas „Vapor Matic 770“.
- Laminaras „Telstar BV-100“.
- Akustinis lygio matuoklis „Matmuo“.
- Tekstūros analizatorius „TAXT plus Texture Analyser“.
- Optinis mikroskopas su fotografavimo funkcija „Nikon“.
- Vertikalūs baltymų elektroforezės aparatas ir priedai „Clever Scientific“.
- Kratytuvas „IKA KS 130 basic“.
- Purtyklė „Vibrofix VFC 1“.
- Kjeldalio sistema: hidrolizės prietaisas „in Kjeld“ ir distiliatoriaus „Behr Distillation Unit S4, T-Optimus“.
- pH matuokliai „HANNA instruments“ ir „Sartorius PB – 11“.

2.3. Tyrimų metodai

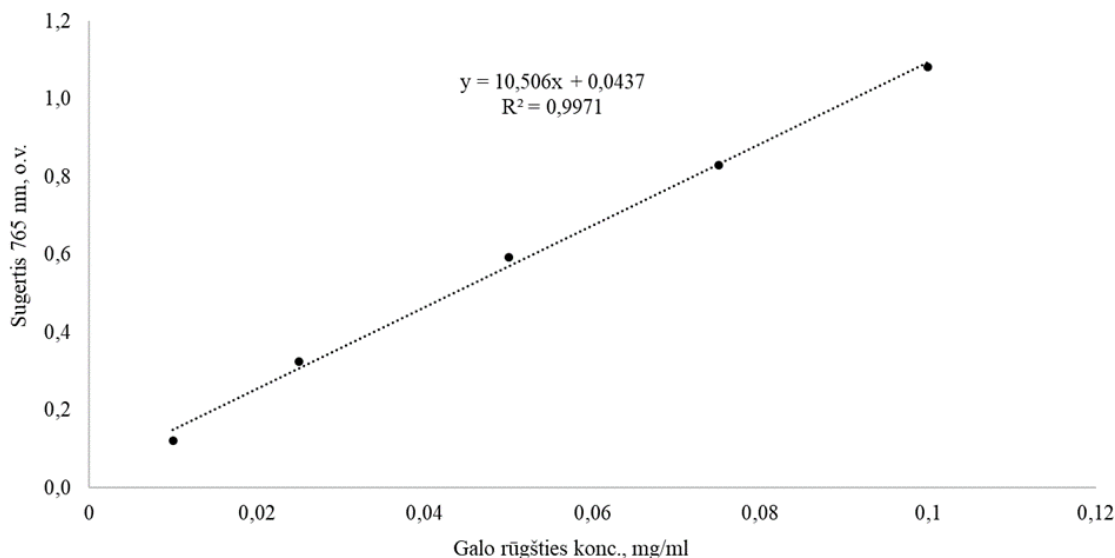
2.3.1. Fenolinių junginių įvertinimas

Bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas Folino-Kiokalto metodu

Pirmiausiai buvo paruoštas Folino-Kiokalto reagentas jį skiedžiant distiliuotu vandeniu (santykiu 1:9). Taip pat buvo paruoštas 7,5 % natrio karbonato tirpalas. Darbiniai tiriamųjų EA mėginiai buvo ruošiami prieš analizę gaminant 1 % koncentracijos tirpalus DMSO. Darbiniai tiriamųjų *Ligol* obuolių išspaudų ir obuolių miltelių mėginiai buvo ruošti vykdant ekstrakciją 70 % metanolyje (santykis 1:10) 500 rpm greičiu ant magnetinės maišyklės 1 val. kambario temperatūroje. Po ekstrakcijos vykdytas centrifūgavimas 7000 rpm 10 min. Surinkti supernatantai toliau buvo naudojami analizei. Reakcijos mišinys buvo ruoštas sumaišant 0,5 ml tiriamojo mėginio su 2,5 ml skiesto Folino-Kiokalto reagento ir 2 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Sumaišytas mišinys

inkubuotas 1 val. kambario temperatūroje tamsioje vietoje. Po 1 val. buvo matuota tiriamųjų tirpalų sugertis 765 nm bangos ilgyje [97]. Suminis fenolinių junginių kiekis apskaičiuotas iš galo rūgšties kalibracinės kreivės (žr. 2.2 pav.) pagal lygtį (2.1):

$$y = 10,506x + 0,0437. \quad (2.1)$$



2.2 pav. Galo rūgšties kalibracinė kreivė

Fenolinių junginių įvertinimas aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos metodu

Liofilizuotose obuolių išspaudose, obuolių milteliuose ir hidrogelinėse struktūrose buvo vertinti kiekybiškai ir kokybiškai esantys fenoliniai junginiai HPLC metodu. HPLC analizė buvo atlikta Lietuvos sveikatos mokslų universitete Farmacijos fakultete Farmacinių mokslų institute (Sukilėlių pr. 13, LT – 50166, Kaunas). Tyrimui buvo ruoštas ekstraktas iš 1 g liofilizuotų obuolių miltelių ir obuolių išspaudų „Ligol“ ir 20 ml 70 % metanolio, atitinkamai. Fenolinių junginių chromatografinis atskyrimas buvo atliktas naudojant ACE C18 kolonėlę (250 mm x 4,6 mm, 5,0 μm). 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.

2.3.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH radikalo slopinimo metodu

EA ir obuolių išspaudų bei obuolių miltelių *Ligol* antiradikalinis aktyvumas buvo įvertintas pagal V. Lavelli ir kt. [98] su nedideliais pakeitimais. Pirmiausiai buvo paruoštas 6×10^{-5} M konc. DPPH darbinis tirpalas metanolyje. Skirtingų konc. (0,1 %; 0,3 %; 0,5 % ir 1 %) tiriamųjų čiobrelių, gvazdikėlių ir mandarinų EA tirpalai ruošti DMSO. Liofilizuotų obuolių miltelių bei išspaudų darbiniai mėginiai paruošti vykdant ekstrakcija 70 % metanolyje (santykis 1:10) 500 rpm greičiu ant

magnetinės maišyklės 1 val. kambario temperatūroje. Po ekstrakcijos vykdytas centrifūgavimas 7000 rpm 10 min. Surinkti supernatantai toliau buvo naudojami analizei.

Reakcijos mišinys ruoštas sumaišant 0,5 ml tiriamojo mėginio su 1,25 ml paruošto DPPH reagento. Reakcijos mišinys inkubuotas 30 min. kambario temperatūroje tamsioje vietoje. Kontrolinis reakcijos mišinys ruoštas sumaišant 0,5 ml DMSO / metanolio su 1,25 ml paruošto DPPH reagento. Po inkubacijos matuota reakcijos mišinio sugertis 517 nm bangos ilgyje. DPPH radikalo slopinimas (%) buvo apskaičiuotas pagal formulę (2.2):

$$I, \% = [(A_0 - A_i)/A_0] \times 100; \quad (2.2)$$

čia I – DPPH radikalo slopinimas (%);

A₀ – kontrolinio tirpalo sugerties vertė;

A_i – tiriamojo tirpalo sugerties vertė.

Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS radikalo slopinimo metodu

EA, obuolių išspaudų ir obuolių miltelių *Ligol* bei fermentuoto PRB (LUHS 245) karvių priešpienio antiradikalinis aktyvumas prieš ABTS radikalą buvo įvertintas pagal R. Re ir kt. [99]. ABTS radikalo tirpalas buvo paruoštas sumaišant 7mM ABTS tirpalą su 2,45 mM kalio persulfato tirpalu santykiu 1:1. Paruoštas tirpalas prieš naudojimą buvo paliktas 12–16 val tamsioje vietoje kambario temperatūroje. ABTS radikalo tirpalas prieš analizę buvo praskiestas su DMSO / metanolium arba atitinkamu buferiniu tirpalu iki kol radikalo tirpalo sugertis 734 nm bangos ilgyje pasiekė 0,7 (±0,02) sant. vnt. Skirtingų konc. (0,1 %; 0,3 %; 0,5 % ir 1 %) tiriamųjų čiobrelių, gvazdikėlių ir mandarinų EA tirpalai buvo ruošti DMSO. Liofilizuotų obuolių miltelių bei išspaudų darbiniai mėginiai buvo paruošti vykdant ekstrakcija 70 % metanolyje (santykis 1:10) 500 rpm greičiu ant magnetinės maišyklės 1 val. kambario temperatūroje. Po ekstrakcijos vykdytas centrifūgavimas 7000 rpm 10 min. Surinkti supernatantai toliau buvo naudojami analizei. Darbiniai fermentuoto priešpienio tirpalai buvo ruošti ištirpinant 0,1 g liofilizuotų priešpienio miltelių 20 ml distiliuotame vandenyje; 0,5 M NaCl 0,1 M Tris-HCl pH 8,2 buferyje ir 0,5 M natrio fosfatiniame pH 7 buferyje, atitinkamai. Ekstrakcija vykdyta 1 val. ledo vonioje ant magnetinės maišyklės. Po baltymų ekstrakcijos vykdytas centrifūgavimas 7000 rpm 10 min. Surinkti supernatantai toliau buvo naudojami analizei.

ABTS analizei reakcijos mišinys buvo paruoštas sumaišant 20 µl tiriamojo mėginio ir 2 ml praskiesto ABTS radikalo tirpalo. Kontrolinis reakcijos mišinys buvo ruoštas sumaišant 20 µl DMSO / metanolium arba atitinkamu buferiniu tirpalu su 2 ml praskiesto ABTS tirpalo. Reakcijos mišinys buvo inkubuotas 30 min tamsioje vietoje kambario temperatūroje. ABTS radikalo slopinimas apskaičiuojamas pagal formulę (2.3):

$$I, \% = [(A_0 - A_i)/A_0] \times 100; \quad (2.3)$$

čia: I – ABTS radikalo slopinimas (%);

A₀ – kontrolinio tirpalo sugerties vertė;

A_i – tiriamojo tirpalo sugerties vertė.

2.3.3. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas

Antibakterinio aktyvumo įvertinimas agaro difuzijos metodais

Antibakterinis EA, obuolių išspaudų ir obuolių milelių *Ligol* bei fermentuoto karvių priešpienio įvertinimas atliktas prieš indikatorinius mikroorganizmus: *S. typhimurium*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ir *B. cereus*. Koncentruotų EA (čiobrelių, gvazdikėlių ir mandarinų) antibakterinis aktyvumas buvo įvertintas diskelių difuzijos metodu, o siekiant nustatyti veikliąją minimalią koncentraciją buvo taikomas šulinėlių difuzijos metodas. EA darbiniai tirpalai šiuo tikslu buvo ruošti skirtingų koncentracijų (0,3 %, 0,5 %, 0,75 % ir 1 %) DMSO.

Antibakterinis obuolių išspaudų ir obuolių milelių *Ligol* bei fermentuoto karvių priešpienio įvertinimas buvo atliktas taikant šulinėlių difuzijos metodus. Darbiniai obuolių išspaudų ir obuolių miltelių tirpalai ruošti vykdant ekstrakciją 70 % metanolyje (santykis 2:10) 500 rpm greičiu ant magnetinės maišyklės 1 val. kambario temperatūroje. Po ekstrakcijos vykdytas centrifūgavimas 7000 rpm 10 min. Surinkti supernatantai toliau buvo naudojami analizei. Darbinis fermentuoto priešpienio tirpalas paruoštas pagaminant 23 % priešpienio suspensiją distiliuotame vandenyje.

Antibakterinio aktyvumo įvertinimui atlikti pirmiausiai patogeninės bakterijos buvo atgaivintos pasėjant jas su sterilia kilpele ant sterilios *Nutrient agar* terpės ir inkubuotos 37°C temperatūros termostate 24 val.

Diskelių difuzijos metodas. Į *petri* lėkšteles su sterilia ir sustingusia *Nutrient agar* terpe buvo įpilta 100 µl indikatorinių mikroorganizmų suspensijos paruoštos 9 % NaCl tirpale pagal 1×10^{-8} KSV/ml 0,5 McFarland standartą. Įpilta patogeninių bakterijų suspensija buvo švelniai įtrinama Grigalskio skleistuvu į terpę. Po to ant *petri* lėkštelių 6 skirtingose vietose uždedami sterilūs filtro popierėlio 6 mm skersmens diskeliai ant kurių užpilama po 10 µl tiriamojo koncentruoto EA [100].

Šulinėlių difuzijos metodas. Į *petri* lėkšteles su sustingusia sterilia *Nutrient agar* terpe buvo įpilta 100 µl indikatorinių mikroorganizmų suspensijos paruoštos 9 % NaCl tirpale pagal 1×10^{-8} KSV/ml 0,5 McFarland standartą. Įpilta patogeninių bakterijų suspensija buvo švelniai įtrinama Grigalskio skleistuvu į terpę. Po to *petri* lėkštelėse 5 skirtingose vietose steriliu metaliniu 6 mm skersmens strypu padarytos skylės, į kurias dozuota po 100 µl atitinkamo tiriamojo tirpalo [101].

Antibakterinis tiriamųjų mėginių aktyvumas įvertintas matuojant inhibicinę zoną aplink šulinėlį ar diskelį.

2.3.4. Baltymų kiekybinis ir kokybinis įvertinimas priešpienyje

Bendro baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu

Bendras baltymų kiekis priešpienyje buvo nustatytas Kjeldalio metodu naudojant automatinį baltymų mineralizavimo įrenginį „in Kjel“. Į Kjeldalio kolbas buvo sudėta po 1 g (0,002g tikslumu) pasverto liofilizuoto priešpienio miltelių. Į Kjeldalio kolbas su priešpieniu įpilta 20 ml koncentruotos sieros rūgšties ir įdėta katalizatoriaus tabletė. Bandiniai buvo mineralizuojami kolbose, kol tirpalai tapo skaidrūs. Atvėsusios Kjeldalio kolbos buvo įstatytos į distiliavimo vandens garais įrenginį „Behr Distillation Unit S4, T-Optimus“. Kondensatoriaus išėjimo vamzdelio galas buvo pamerktas į kūginę 250 ml talpos kolbą distiliatui surinkti su 25 ml 3 % boro rūgšties tirpalu. Viena Kjeldalio kolba

distiliuota 5 min. Į gautą distiliatą įlašintas vienas lašas Taširo indikatoriaus ir titruota 0,1 N HCl tirpalu, kol distiliato spalva tapo rausva.

Azoto kiekis (N), išreikštas procentais apskaičiuotas pagal formulę:

$$N = [(0,014 \times V)/m] \times 100 ; \quad (2.4)$$

Čia V – 0,1 N HCl kiekis, sunaudotas titruojant bandinio distiliatą, ml;

m – bandinio svoris, g;

0,0014 – azoto kiekis, ekvivalentiškas 1 ml 0,1 N HCl [102].

Baltyminių medžiagų kiekis apskaičiuotas padauginus nustatytą azoto kiekį iš perskaičiavimo koeficiento pienui ir jo produktams – 6,38 [103].

$$B = N \times k ; \quad (2.5)$$

čia N – azoto kiekis, %;

k – atitinkamas koeficientas perskaičiuoti azoto kiekį į baltymų kiekį, k = 6,38 [103].

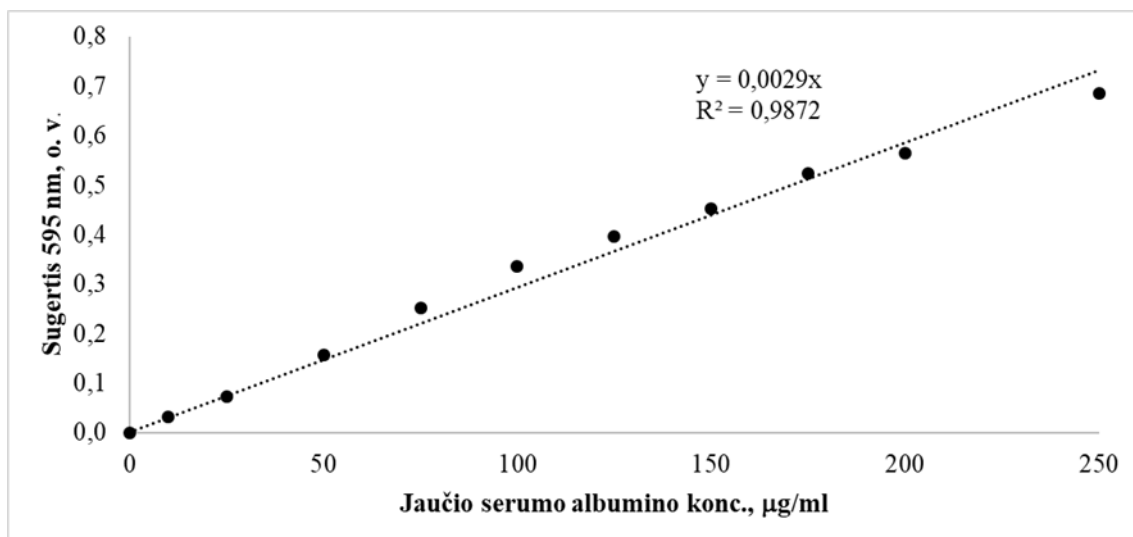
Baltymų koncentracijos nustatymas Bradford'o metodu

Tirpių baltymų kiekis priešpienyje buvo įvertintas Bradford'o metodu [104]. Bradford'o reagentas buvo paruoštas ištirpinant 50 mg kumasi brilantinio mėlio G250 25 ml 95 % etilo alkoholyje ir sumaišant su 50 ml 85 % fosforo rūgštimi. Gautas tirpalas tada praskiestas su distiliuotu vandeniu iki 0,5 l ir filtruotas per popierinį filtrą.

Kalibracinei kreivei sudaryti buvo paruoštas 1 mg/ml JSA distiliuotame vandenyje ir ruošti skiedimai 0–250 µg/ml ribose.

Baltymų ekstrakcijai paimta 0,1 g liofilizuotų priešpienio miltelių ir ištirpinta 20 ml distiliuotame vandenyje; 0,5 M NaCl 0,1 M Tris-HCl pH 8,2 buferyje ir 0,5 M natrio fosfatiniame pH 7 buferyje, atitinkamai. Ekstrakcija vykdyta 1 val. ledo vonioje ant magnetinės maišyklės. Po baltymų ekstrakcijos vykdytas centrifūgavimas 7000 rpm 10 min. Surinkti supernatantai toliau buvo naudojami analizei. Reakcijos mišinys buvo sudarytas iš 50 µl tiriamojo mėginio tirpalo ir 500 µl paruošto Bradford'o reagento. Mišinio sugertis matuota 595 nm bangos ilgyje. Tirpių baltymų koncentracija apskaičiuota pagal kalibracinės kreivės (žr. 2.3 pav.) tiesės lygtį (2.6) ir rezultatai išreikšti mg JSA ekvivalento 1 ml ruošto tirpalo:

$$y=0,0029x \quad (2.6)$$



2.3 pav. Jaučio serumo albumino kalibracinė kreivė

Baltymų elektroforezė SDS-PAGE

Priešpienio baltymų ekstrahavimui buvo paimta 0,1 g liofilizuotų priešpienio miltelių ir ištirpinta 20 ml distiliuotame vandenyje; 0,5 M NaCl 0,1 M Tris-HCl pH 8,2 buferyje ir 0,5 M natrio fosfatiniame pH 7 buferyje, atitinkamai. Ekstrahavimas vykdytas 1 val. ledo vonioje ant magnetinės maišyklės. Po baltymų ekstrahavimo vykdytas centrifūgavimas 7000 rpm 10 min. Surinkti supernatantai toliau buvo naudojami SDS-PAGE analizei.

Priešpienio baltymų elektroforezės analizei atlikti naudoti tirpalai ir jų ruošimas:

1. 30 % akrilamido/0,8 % N,N-metilenbisakrilamido tirpalas. Ištirpinta 30 g akrilamido ir 0,8 g N,N- bisakrilamido ir pripilta distiliuoto vandens iki 100 ml. Gautas tirpalas perfiltruotas pro 0,45 µm porų dydžio filtrą.
2. 1,5 M TRIS – HCl, pH 8,8 buferinis tirpalas. Buvo ištirpinta 18,15 g TRIS 80 ml distiliuoto vandens. pH sureguliuotas su konc. HCl tirpalu iki 8,8 pH vertės ir praskiestas iki 100 ml.
3. 0,5 M TRIS – HCl, pH 6,8 buferinis tirpalas. Buvo ištirpinta 6 g TRIS bazės 80 ml distiliuoto vandens. pH sureguliuotas iki 6,8 su konc. HCl tirpalu ir praskiestas iki 100 ml.
4. 2X baltymų denatūravimo buferis. Buferis sudarytas iš 0,004 % bromofenolio mėlio, 2 % 2 – merkaptoetanolio, 20 % glicerolio, 4 % NDS ir 0,125 M TRIS – HCl, pH 6,8 buferio. Paruoštas baltymų denatūravimo buferis išpilstytas į 1 ml *ependorf* mėgintuvėlius ir laikomas -70 °C temperatūroje.
5. 10 % natriododecilsulfatas (toliau – NDS). Ištirpinta 1g NDS ir praskiesta iki 10 ml distiliuotu vandeniu.
6. 10 % amonio persulfato tirpalas (toliau – APS). 1 g APS ištirpinta ir praskiesta iki 10 ml distiliuotu vandeniu.
7. TEMED.

8. Elektroforezės buferis. Ištirpinta 3 g TRIS, 14,4 g glicino, 1 g NDS ir praskiesta iki 1000 ml su distiliuotu vandeniu.

9. Kumasi baltymų dažymo tirpalas: 0,25 g Kumasi brilliantinio mėlio G250 , 50 ml acto rūgštis ir 450 ml distiliuoto vandens.

10. Gelio skalavimo tirpalas: 400 ml metanolis, 530 ml distiliuotas vanduo ir 70 ml acto rūgštis.

11. Standartinių baltymų mišinys „BenchMark™ Unstained Protein Ladder“.

Elektroforezės metu buvo paruošti 2 geliai: skiriamasis ir koncentruojamasis.

12 % skiriamojo gelio ruošimas. Į švarią ir sausą stiklinę buvo įpilta 3,2 ml distiliuoto vandens, 4 ml 30 % akrilamido/0,8 % N,N – metilenbisakrilamido tirpalo, 2,6 ml 1,5 M TRIS pH 8,8 buferio, 0,1 ml 10 % NDS, 10 µl TEMED ir 50 µl 10 % APS. Skiriamasis gelis buvo supiltas tarp elektroforezės prietaiso stiklo plokštelių ir gelio paviršius sulygintas užpilant distiliuoto vandens. Gelis paliktas sustingti 30 – 40 min.

5 % koncentruojamojo gelio paruošimas. Buvo įpilta 3,65 ml distiliuoto vandens, 0,625 ml 30 % akrilamido/0,8 % N,N – metilenbisakrilamido tirpalo, 0,625 ml 0,5M TRIS pH 6,8, 50 µl 10 % NDS, 5 µl TEMED, 25 µl 10 % APS. Koncentruojamasis gelis atsargiai įpiltas ant sustingusio skiriamojo gelio paviršiaus. Į supiltą skiriamąjį gelį buvo atsargiai įsmeigtos 10 šulinėlių šukutės.

Tiriamųjų baltymų paruošimas elektroforezei: tiriamasis baltymų tirpalas santykiu 1:2 skiestas su 2X baltymo denatūravimo buferiniu tirpalu ir kaitintas 5 min verdančio vandens vonelėje. Tolimesnei analizei buvo naudota 20 µl paruošto baltymų mėginio.

Į gelyje esančius šulinėlius buvo supilta po 20 µl paruoštų priešpienio baltymų mėginių. Elektroforezės prietaisais užpildytas elektroforezės buferiu iki tol kol visas gelis buvo juo apsemtas. Paruoštas elektroforezės prietaisas prijungtas prie elektros srovės šaltinio. Elektroforezei vykti nustatytos šios sąlygos 40 mA stiprumo srovė ir 120 V įtampa. Elektroforezė sustabdyta, kai mėlynoji dažo juostelė pasiekė skiriamojo gelio apačią.

Gelio baltymų dažymas po elektroforezės. Po elektroforezės gelis atsargiai buvo atskirtas nuo elektroforezės stiklo plokštelių ir įdėtas į plastiko vonelę. Gelis užpiltas Kumasi baltymų dažymo tirpalu paliekamas dažymui per naktį. Baigus dažyti, dažai nupilti ir ant gelio užpilta gelio skalavimo tirpalo. Vonelė su geliu purtyta kambario temperatūroje, kol iš gelio išsiplovė nesusirišę su baltymais dažai (~ 2 val.) [105].

2.3.5. Vandens įgerties įvertinimas obuolių išspaudose bei milteliuose

Vandens įgerties įvertinimui į sausą žinomos masės mėgintuvėlį buvo pasverta po 0,5 g analizuojamos žaliavos ir įpilta 4 ml distiliuoto vandens. Mėgintuvėliai buvo inkubuoti 30 °C temperatūros vandens vonelėje 30 min. Po inkubavimo mėgintuvėliai buvo centrifuguoti 4000 rpm 20 min. Po centrifūgavimo susidaręs supernatantas buvo išpiltas, o mėgintuvėlis su likusia mase pasvertas. Vandens įgėrimas apskaičiuotas pagal (2.7) formulę:

$$VAI = M_1/M_0 ; \quad (2.7)$$

čia VAI – vandens absorbcijos indeksas;

M_1 – medžiagos masė po įgėrimo, g;

M_0 – sausos medžiagos masė, g.

2.3.6. Hidratuotų gelių struktūros ir tekstūros profilio analizė

Struktūra pirmiausiai vertinta akustiniu ultragarsinį sensorių turinčiu įrenginiu „Matmuo“. Akustinis įrenginys matuoja laisvai krintančio kūno smigimo atstumą (mm) į gelinę masę per fiksuotą 300 sek. laiką. Mažesnis smigimo gylys mm, nurodo standesnę struktūrą. Matavimai atlikti su pagamintais geliais iškart po ataušinimo (1 val.) ir po 24 val., siekiant nustatyti struktūros tekstūros pokyčius skirtingais laiko momentais.

Papildomai hidratuotų gelių struktūra analizuota optiniu mikroskopu Nikon Lietuvos sveikatos mokslų universitete Farmacijos fakultete.

Pagaminti geliai buvo analizuojami tekstūros analizatoriumi „TAXT plus Texture Analyser“.

Matavimo kūnas 20 mm skersmens aliuminis cilindras, matavimo greitis 1 mm/s. Kai matavimo cilindras pasiekė mėginio paviršių matavimo geometrijoje sminga 5 mm. Pagaminti geliai buvo analizuojami iškart po ataušinimo (1 val.) ir po 24 val. Tvirtumo parametras rodo mėginio kietumą ir jo pasipriešinimą deformacijai. Konsistencija nusako mėginio kietumą, tankumą bei klampumą. Kohezija nurodo mėginio lipnumą ir rišlumą. Tarpmolekulinė trauka, kuri medžiagos masę laiko kartu, lemia jos vientisumą. Kohezija yra išmatuojama nustatant, kiek reikia jėgos, norint atskirti zondą nuo tiriamosios gelinės masės. Kuo kohezijos skaitinė vertė didesnė, tuo mėginys pasižymi didesniu lipnumu bei rišlumu [106, 107, 108].

2.3.7. Bioaktyvių komponentų atpalaidavimo testas *in vitro*

Atpalaidavimo testas atliktas remiantis literatūroje nurodytais metodais [109, 110] su nedideliais pakeitimais. 1 g pagaminto gelio buvo veikiamas imitacinėmis skrandžio sultimis (terpė pH 2) 37 °C temperatūroje skirtingais laiko intervalais 5, 30, 60, 120 min. Imitacinėje žarnyno terpėje pH 7,5 mėginiai buvo laikomi 37 °C temperatūroje 60, 90, 150 min.

Imitacinės skrandžio terpės sudėtis: 9 g/L NaCl; 3 g/L pepsinas; pH buvo sureguliuotas iki pH 2 naudojant 1 M HCl.

Žarnyno imitacinės terpės sudėtis: 1,67 g/L KCl; 2,77 g/L NaHCO₃; 0,44 g/L CaCl₂; tulžis 6 g/L; pH buvo sureguliuotas iki pH 7,5 naudojant 0,2 M Na₂CO₃.

Iš pradžių atitinkamas kiekis paruošto gelio buvo veikiamas 50 ml paruoštos skrandžio imitacinės terpės. Atitinkamais laiko intervalais 5, 30, 60 ir 120 min. buvo imti mėginiai. Po 120 min. terpės pH buvo sureguliuota iki pH 7,5 ir įpilta imitacinė žarnyno terpė santykiu 1:1 su skrandžio sulčių terpe. Toliau nuo terpės pH pokyčio po 60, 90 ir 150 min. buvo imti mėginiai. Iš *in vitro* atpalaidavimo tyrimo metu paimtų mėginių, buvo atliekamas bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas Folino-Kiokalto metodu ir taip pat buvo atliktas atskirų fenolinių junginių kiekio nustatymas HPLC metodu Lietuvos sveikatos mokslų universitete Farmacijos fakultete.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Eterinių aliejų biologinis aktyvumas

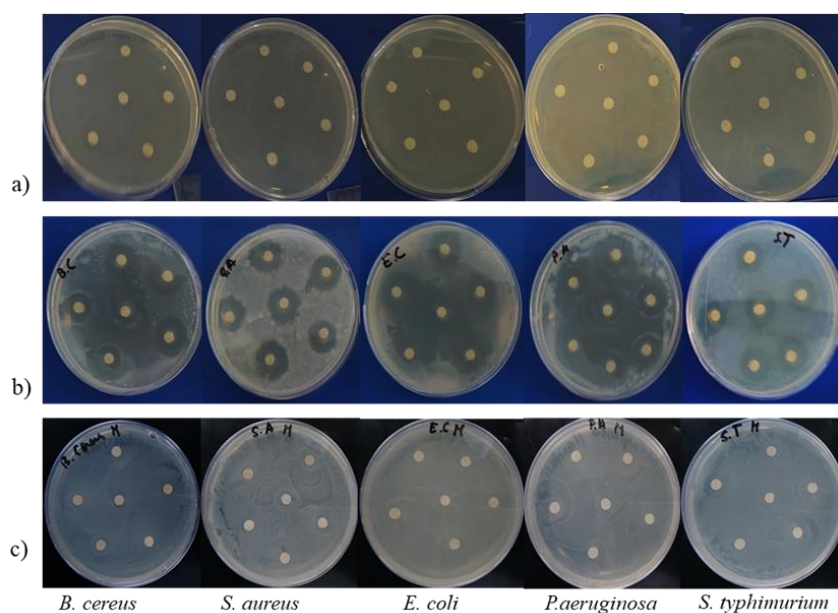
Šiame etape tirti trys skirtingi EA (čiobrelių, gvazdikėlių ir mandarinų), siekiant nustatyti, kurie iš jų gali būti potencialiai panaudoti tolimesnėje nutraceutikų gamyboje pagal išreikštas antibakterines ir antioksidacines savybes.

3.1.1. Eterinių aliejų antimikrobinis aktyvumas prieš antibiotikams atsparius patogenus

Antibakterinis EA poveikis pirmiausiai vertintas, naudojant diskelių difuzijos metodą su koncentruotais EA. Iš tirtųjų EA stipriausiu antibakteriniu poveikiu pasižymėjo čiobrelių EA, kuris visiškai sustabdė indikatorinių mikroorganizmų augimą (žr. 3.1 pav. a), t. y. tiriamosiose lėkštelėse visiškai nebuvo pastebėta mikroorganizmų augimo požymių. Koncentruotas gvazdikėlių EA gerokai silpniau baktericidiškai veikė indikatorinius mikroorganizmus nei čiobrelių EA (žr. 3.1 lentelę). Gvazdikėlių EA stipriausiai veikė prieš *S. aureus* (slopinimo zona $13,33 \pm 2,12$ mm), o silpniausiai – prieš *P. aeruginosa* (slopinimo zona $10,67 \pm 2,64$ mm). Koncentruotas mandarinų EA patogeninių bakterijų augimo visiškai neslopino (žr. 3.1 pav. c).

3.1 lentelė. Antibakterinis koncentruotų eterinių aliejų aktyvumas. (--) – antibakteriniu poveikiu nepasižymėjo; s. p. – stiprus poveikis, nepavyko išmatuoti slopinimo zonų

Mėginys	Slopinimo zona, mm				
	Gramteigiamos bakterijos		Gramneigiamos bakterijos		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Čiobrelių eterinis aliejus	s. p.	s. p.	s. p.	s. p.	s. p.
Gvazdikėlių eterinis aliejus	$13,33 \pm 2,12$	$11,96 \pm 2,77$	$13,96 \pm 2,35$	$11,42 \pm 1,74$	$10,67 \pm 2,64$
Mandarinų eterinis aliejus	--	--	--	--	--



3.1 pav. a) Čiobrelių EA; b) gvazdikėlių EA ir c) mandarinų EA antibakterinio aktyvumo įvertinimas diskelių difuzijos metodu

Kadangi koncentruotas mandarinų EA nepasižymėjo antimikrobinėmis savybėmis, tolesnio eksperimento metu nuspręsta antimikrobinis tyrimus tęsti su čiobrelių ir gvazdikėlių EA. Kitame eksperimento etape, remiantis mokslinės literatūros duomenimis apie EA antibakterines savybes, buvo nuspręsta tirti keletą EA koncentracijų (žr. 3.2 ir 3.3 lenteles), kurioms esant nutraceutikai išlaikytų savo savybes ir dar būtų priimtinos pagal juslines savybes [96]. Šiame eksperimento etape antimikrobiniai EA tyrimai buvo atlikti, taikant šulinėlių difuzijos metodą.

3.2 lentelė. Čiobrelių eterinio aliejaus antibakterinio aktyvumo vertinimas. (--) – slopinimu nepasižymėjo

Patogeninės bakterijos	Slopinimo zona, mm			
	Čiobrelių eterinis aliejus			
	0,3 %	0,5 %	0,75 %	1 %
<i>S. aureus</i>	--	--	6,20 ± 0,79	12,30 ± 2,20
<i>B. cereus</i>	--	--	--	7,55 ± 1,28
<i>E. coli</i>	4,50 ± 0,35	4,70 ± 0,67	4,95 ± 0,60	8,25 ± 1,57
<i>S. typhimurium</i>	--	--	--	8,70 ± 0,84
<i>P. aeruginosa</i>	--	--	--	7,55 ± 0,69

3.3 lentelė. Gvazdikėlių eterinio aliejaus antibakterinio aktyvumo vertinimas. (--) – slopinimu nepasižymėjo

Patogeninės bakterijos	Slopinimo zona, mm			
	Gvazdikėlių eterinis aliejus			
	0,3 %	0,5 %	0,75 %	1 %
<i>S. aureus</i>	--	--	--	4,20 ± 0,63
<i>B. cereus</i>	--	--	--	--
<i>E. coli</i>	--	--	--	--
<i>S. typhimurium</i>	--	--	--	--
<i>P. aeruginosa</i>	--	--	--	--

Kaip matyti iš rezultatų (žr. 3.2 ir 3.3 lenteles) stipresnėmis antibakterinėmis savybėmis pasižymėjo čiobrelių EA, kurio net 0,75 % tirpalo koncentracija jau parodė slopinimą prieš *S. aureus*, o 0,3 % slopino ir *E. coli* augimą. Vis dėl to, 1 % čiobrelių EA parodė antibakterinį slopinimą prieš visus tirtus patogeninius mikroorganizmus. Gvazdikėlių EA mažomis koncentracijomis buvo neveiksmingas. Tik gvazdikėlių EA 1 % tirpalas silpnai veikė prieš *S. Aureus*, susidarant slopinimo zonai (4,20 ± 0,63 mm).

Mokslinėje literatūroje taip pat yra nurodyta, jog koncentruoto čiobrelių EA antibakterinis poveikis prieš patogeninius mikroorganizmus yra gana stiprus ir net stipriau veikia nei komerciniai antibiotikai [111]. B. Cetin'as ir kt. [111] nustatė, jog čiobrelių EA slopinimo zonos prieš *S. aureus* padermes buvo 44–56 mm, prieš *B. cereus* – 36 mm, prieš *E. coli* padermes kito tarp 35–42 mm, prieš *S. typhimurium* – 20 mm, o prieš *P. aeruginosa* padermes slopinimo zonos buvo 50–55 mm. Gvazdikėlių EA slopinimo zonų vertės nustatytos K. Chaeb'o ir kt. [17] tyrime buvo panašios su nustatytomis 3.1 lentelėje, gvazdikėlių EA poveikis prieš *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* ir *P. aeruginosa* buvo atitinkamai: 14,66 mm; 13,66 mm; 15,66 mm ir 9 mm. Tačiau literatūroje yra nurodyti ir didesni gvazdikėlių EA slopinimo aktyvumai pvz., prieš *S. aureus* slopinimo zona buvo 28,3 mm, prieš *E. coli* – 28,1 mm, o prieš *S. typhimurium* – 22,2 mm [16]. Taip pat tiriant mandarinų

EA, mokslinėje literatūroje pateikiama duomenų, jog mandarinų eterinis aliejus efektyviausiai veikia prieš gramneigiamas bakterijas, kaip *E. coli* ir *S. typhimurium* (slopinimo zonos 25 mm), o prieš gramteigiamus patogenus – silpniau, pvz., prieš *S. aureus* mandarinų EA slopinimo zona buvo 11 mm [112].

Antibakterinis EA aktyvumas daugiausiai siejamas su fenoliniais junginiais, kaip karvakrolis, eugenolis ir timolis. Todėl skirtumus tarp tirtųjų EA pajėgumų slopinti patogenų augimą, galima būtų paaiškinti skirtinga EA chemine sudėtimi. Mokslinės literatūros teigimu, čiobrelių EA daugiausiai nustatyta timolio ir karvakrolio, kurie suardo bakterijų ląstelių membranas. Gvazdikėlių EA gausu eugenolio, kuris inhibuoja bakterijose fermentų veiklą [23]. Mandarinų EA šių antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių komponentų praktiškai nėra nustatyta, todėl žymesnis antibakterinis aktyvumas mandarinų EA aiškinamas kitų junginių (terpenų, flavanoidų ir alkaloidų) sinergetiniu poveikiu [112]. Apibendrinant čiobrelių ir gvazdikėlių EA poveikį abu tirti EA efektyviausiai slopino gramteigiamų *S.aureus* bakterijų augimą. Tai yra svarbus rodiklis, kadangi *S. aureus* sukelta stafilokokinė liga yra viena iš labiausiai paplitusių pasaulyje per maistą plintančių ligų, kuri atsiranda dėl maisto užteršimo stafilokokų gaminamais enterotoksinais. Enterotoksinais patekę į žmogaus organizmą sukelia toksinio šoko sindromą [113]. Be to, *S. aureus* yra išsivysčiusi mechanizmus antibiotikų atsparumui įgyti, dėl to infekcijos, kurias sukelia antibiotikams atsparios *S. aureus* padermės dažnai pasireiškia epidemijų bangomis [114]. Vadinasi, čiobrelių ir gvazdikėlių EA galėtų potencialiai apsaugoti maisto produktus nuo užsiteršimo *S. aureus* bakterijomis, kartu sumažinant tikimybę apsikrėsti per maistą plintančiomis ligomis.

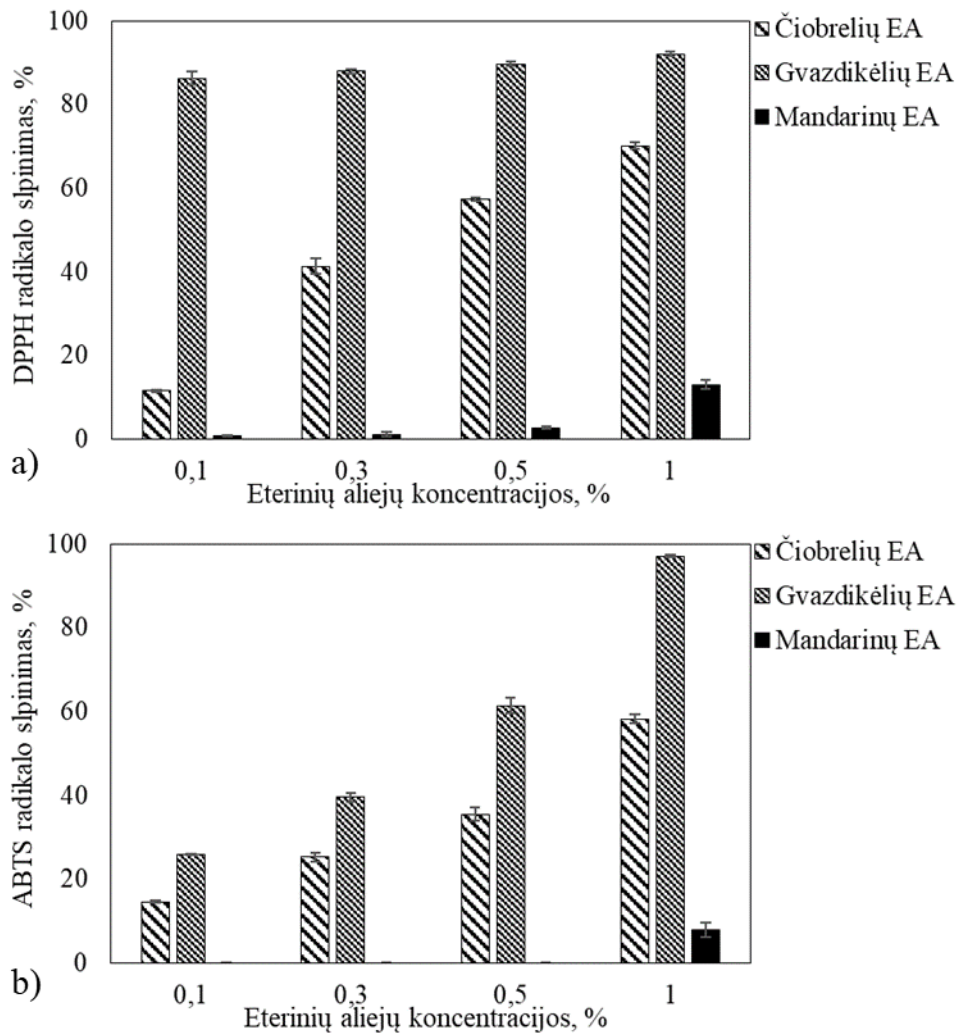
3.1.2. Eterinių aliejų savitumai pagal antioksidacines savybes

Bendras fenolinių junginių kiekis tirtuose EA yra pateiktas 3.4 lentelėje. Iš gautų rezultatų matyti, jog gvazdikėlių EA turėjo daugiausiai fenolinių junginių ($9,86 \pm 0,60$ GRE mg/ml), beveik ~2,3 kartus mažiau fenolinių junginių buvo aptikta čiobrelių EA. Mandarinų EA turėjo mažiausią kiekį fenolinių junginių ($0,14 \pm 0,02$ GRE mg/ml).

3.4 lentelė. Bendras fenolinių junginių kiekis eteriniuose aliejuose

Eterinis aliejus	Koncentracija, %	Bendras fenolinių junginių kiekis, GRE mg/ml
Čiobrelių	1	$4,34 \pm 0,30$
Gvazdikėlių	1	$9,86 \pm 0,60$
Mandarinų	1	$0,14 \pm 0,02$

EA antioksidacinis aktyvumas buvo tirtas DPPH ir ABTS radikalų slopinimo metodais (žr. 3.2 pav. a ir b). Šio eksperimento metu buvo tirtos įvairios EA koncentracijos, siekiant įvertinti, ar naudojant efektyvias, pagal antioksidacines savybes, EA koncentracijas, gautas produktas bus priimtinas vartotojui. Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad efektyvioji antioksidanto koncentracija yra tuomet, kai geba slopinti 50 % radikalo reakcijos mišinyje [15].



3.2 pav. EA antioksidacinis aktyvumas: a) prieš DPPH radikalą ir b) prieš ABTS radikalą

Gauti rezultatai parodė, kad didžiausią antioksidacinį poveikį prieš DPPH ir ABTS radikalus turėjo gvazdikėlių EA, o silpniausiu aktyvumu pasižymėjo mandarinų EA. DPPH radikalo slopinimo atveju visos tirtos gvazdikėlių EA koncentracijos parodė didelius radikalo slopinimo aktyvumus. Net gvazdikėlių EA 0,1 % koncentracija slopino $86,31 \pm 0,06$ % DPPH radikalo. Čiobrelių EA tik 1 % koncentracija slopino stipriausiai ($70,13 \pm 0,85$ %), o mandarinų EA 1 % koncentracija tik $13,02 \pm 1,14$ %. Čiobrelių EA daugiau nei 50 % DPPH radikalo slopino, esant 0,5 % koncentracijai. Tiriant antioksidacinį aktyvumą pagal ABTS radikalo slopinimą, mandarinų EA pasižymėjo silpniausiu radikalo slopinimu, kadangi tik 1 % koncentracija mandarinų EA pasižymėjo slopinimu ($7,84 \pm 1,69$ %), kai čiobrelių ir gvazdikėlių EA minimalų aktyvumą parodė jau 0,1 % šių EA koncentracija. Gvazdikėlių EA daugiau nei 50 % ABTS radikalo slopino esant 0,5 % koncentracijai ($61,41 \pm 1,91$ %), o čiobrelių EA – 1 % koncentracijai ($58,26 \pm 0,97$ %). Tokiu būdu, galima teigti, jog didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo gvazdikėlių EA, o mandarinų EA antioksidacinis aktyvumas yra silpnas. Todėl tolimesnei nutraceutikų gamybai ir imobilizavimui į enterosoliubilią medžiagą, atsižvelgiant į antimikrobines ir antioksidacines savybes, buvo pasirinkti čiobrelių ir gvazdikėlių EA.

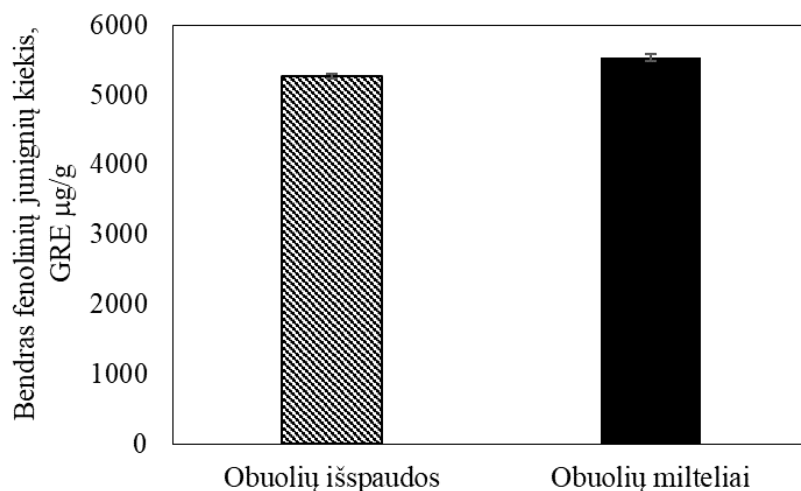
Apibendrinant gautus rezultatus matyti, jog gvazdikėlių EA turėjo tiek didžiausią fenolinių junginių kiekį, tiek pasižymėjo didžiausiu antioksidaciniu poveikiu prieš DPPH ir ABTS radikalus. Panašios fenolinių junginių ir antioksidacinio aktyvumo tendencijos buvo nurodytos M. Martos 'o ir kt. [15]

tyrime. Gvazdikėlių EA taip buvo nustatyta daugiau fenolinių junginių nei čiobrelėlių EA (0,898 GRE mg/ml ir 0,783 GRE mg/ml, atitinkamai). Be to, gvazdikėlių EA DPPH radikalo slopinimo tendencijos buvo panašios, kaip nurodyta 3.2 pav., kuomet tiriant skirtingas gvazdikėlių EA koncentracijas (5–50 g/l), DPPH radikalo slopinimas buvo aukštas (97,85–98,74 %). Tuo tarpu čiobrelėlių EA antioksidacinis poveikis varijavo tarp 62,87–93,94 % prieš DPPH [15]. Todėl atsižvelgiant tiek į gautus šiame tyrime, tiek į kitų autorių darbuose gautus tyrimų rezultatus, galima daryti preliminarią prielaidą, jog tiriamųjų eterinių aliejų antioksidacinis aktyvumas tiesiogiai priklauso nuo fenolinių junginių koncentracijos. Tai pat svarbu paminėti, jog EA fenolinių junginių kiekis priklauso ne tik nuo EA rūšies, bet ir nuo ekstrakcijos būdo bei augalo augimo sąlygų [17].

3.2. Fenolinių junginių sudėtis ir biologinis aktyvumas antriniuose obuolių perdirbimo produktuose

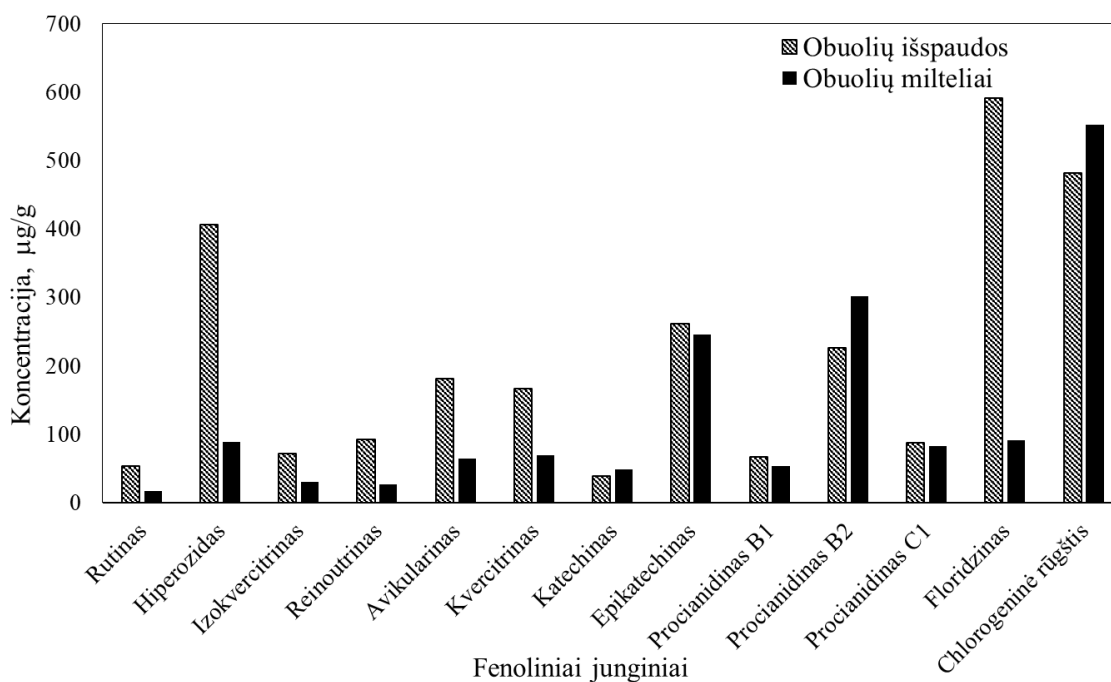
3.2.1. Fenolinių junginių sudėties obuolių perdirbimo produktuose palyginamasis įvertinimas

Vertinant obuoliuose ir jų antriniuose produktuose (išspaudose) bendrą fenolinių junginių kiekį metanoliniuose ekstraktuose, reikšmingų skirtumų tarp tiriamų mėginių nebuvo nustatyta (žr. 3.3 pav.). Iš gautų rezultatų matyti, jog bendras fenolinių junginių kiekis obuolių išspaudose yra šiek tiek mažesnis ($5266,51 \pm 28,56 \mu\text{g/g}$) nei obuolių milteliuose ($5533,03 \pm 47,59 \mu\text{g/g}$).



3.3 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis obuolių išspaudose ir milteliuose

HPLC analizės metu (žr. 3.4 pav.) buvo identifikuoti būdingiausi obuoliuose ir jų perdirbimo produktuose randami skirtingų klasių fenoliniai junginiai – flavonoliai (kvercitrinas, izokvercitrinas, rutinas), flavan-3-oliai (katechinas ir epikatechinas), procianidiniai (polimeriniai flavan-3-oliai), dihidrochalkonai (daugiausiai floridzinas) ir fenolinės rūgštys (daugiausiai chlorogeninė rūgštis). Atlikus HPLC analizę metanoliniuose ekstraktuose buvo nustatyta, jog suminis identifikuotų fenolinių junginių kiekis obuolių išspaudose buvo $2724,2 \mu\text{g/g}$, o obuolių milteliuose nustatytas suminis fenolinių junginių kiekis buvo 1,6 karto mažesnis ($1673,1 \mu\text{g/g}$). Tirtose *Ligol* obuolių išspaudose reikšmingais kiekiais buvo aptikta floridzino $591,6 \mu\text{g/g}$, chlorogeninės rūgšties $482,1 \mu\text{g/g}$ ir hiperozido $405,9 \mu\text{g/g}$. Obuolių milteliuose gausiausiai aptikti tokie junginiai: chlorogeninė rūgštis $552,6 \mu\text{g/g}$, procianidinas B2 $302,1 \mu\text{g/g}$ ir epikatechinas $246,3 \mu\text{g/g}$.



3.4 pav. Fenolinių kokybinis ir kiekybinis įvertinimas obuolių išspaudose ir obuolių milteliuose

Daugumos aptiktų fenolinių junginių kiekiai obuolių išspaudose buvo didesni nei obuolių milteliuose, pvz., kvercitrino ir kvercitrino glikozilintų darinių: rutino, izokvercitrino, reinourino, avikularino ir hiperozido. Šių junginių suminis kiekis buvo ~ 3,4 kartus didesnis obuolių išspaudose (970,4 µg/g) nei obuolių milteliuose (283,9 µg/g). Flavan-3-olių monomerų katechino ir epikatechino kiekiai tiek obuolių išspaudose, tiek milteliuose reikšmingai nesiskyrė. Katechino obuolių išspaudose buvo nustatyta šiek tiek mažiau (39,2 µg/g) nei obuolių milteliuose (48,2 µg/g). Epikatechino kiekis obuolių išspaudose – 261,5 µg/g, o milteliuose buvo 246,3 µg/g. Iš procianidinių daugiausiai nustatyta procianidino B2, kurio obuolių išspaudose buvo 225,7 µg/g, o milteliuose buvo ~ 1,3 karto daugiau (302,1 µg/g). Dihydrochalkonų klasės atstovo floridzino net ~ 6,5 kartus daugiau identifikuota išspaudose (591,6 µg/g), o obuolių milteliuose šio junginio buvo 90,8 µg/g. Chlorogeninės rūgšties, vieno pagrindinių obuoliuose aptinkamų fenolinių komponentų, obuolių išspaudose buvo 482,1 µg/g, kai obuolių milteliuose šio junginio buvo identifikuota daugiausiai (552,6 µg/g). Tokie atskirų fenolinių junginių skirtumai tarp tirtų obuolių produktų gali būti paaiškinami tuo, jog didžioji dalis fenolinių junginių būna susitelkę vaisiaus odelėje ir sėklose, o minkštyme jų kiekiai yra gerokai mažesni, išskyrus chlorogeninės rūgšties, kurios paprastai daugiau nustatoma obuolio minkštyme [32, 35].

Gauti rezultatai preliminariai patvirtina kitų autorių gautus duomenis, jog skirtingų veislių obuolių išspaudose, susidariusiose obuolių sidro gamybos metu, daug buvo nustatyta floridzino (587,2–1435,4 µg/g), hiperozido (175,3–462,9 µg/g) ir chlorogeninės rūgšties (393,2–1415,5 µg/g) [37]. Taip pat fenolinių junginių kiekiai, nustatyti *Ligol* obuolių milteliuose patvirtina M. Liaudansko ir kt. [115] tyrimus, apibendrinusius įvairių fenolinių junginių pasiskirstymą populiariausiuose Lietuvoje aptinkamose obuolių veislėse: *Aldas*, *Auksis*, *Ligol* ir *Šampion*. Šiame darbe, tiriant *Ligol* obuolių veislę taip pat daugiausiai buvo aptikta tokių junginių, kaip chlorogeninė rūgštis (687,2 µg/g), procianidinas B2 (320,9 µg/g) ir epikatechinas (236,5 µg/g) [115]. Pažymėtina, jog fenolinių junginių kiekybinę ir kokybinę sudėtį obuoliuose lemia jų veislė, geocheminė dirvožemio sudėtis, geografinė

padėtis, klimato sąlygos (temperatūra, kritulių kiekis, saulės spinduliuotė) ir kultivavimo bei derliaus laikymo sąlygos [32, 115]. Be to, bendras fenolinių junginių kiekis Folino-Kiokalto metodu buvo gautas didesnis nei suminis HPLC analizės metu nustatytas fenolinių junginių kiekis. Tai gali būti aiškinama tuo, jog obuoliuose be identifikuotų fenolinių junginių (žr. 3.4 pav.), yra ir kitų biologiškai aktyvių fenolinių junginių. Mokslinėje literatūroje yra duomenų, jog obuoliuose nedideliais kiekiais nustatoma hidroksibenzoinių rūgščių, kaip galo, protokatecho ir siringino rūgštys. Taip pat nustatomos hidroksicinamono rūgštys, kaip kavos, ferulo, p-kumaro ir sinapo rūgštys. Be to, obuoliuose nedideliais kiekiais nustatoma ir antocianų bei kitų dihidrochalkonams priklausančių junginių [32]. Būtent kiti autoriai obuolių išspaudose nustatė nemažai protokatecho rūgšties, kurios kiekis priklausomai nuo veislės kito 1,7–144,7 μg/g ribose, kavos rūgšties (10,5–25,1 μg/g) bei kitų detaliau neidentifikuotų fenolinių rūgščių, kurių suminis kiekis kito nuo 109,7 iki 409,5 μg/g. Taip pat buvo nustatyta ir kitų floridzino darinių, kurių kiekiai išspaudose kito nuo 82,9 iki 457,2 μg/g [37].

3.2.2. Biologinio aktyvumo pokyčiai obuolių perdirbimo metu

3.2.2.1. Obuolių perdirbimo produktų palyginimas pagal antibakterinį aktyvumą

Buvo tirtas obuolių miltelių ir obuolių išspaudų ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš indikatorinius mikroorganizmus *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* ir *S. aureus* (žr. 3.5 lentelę).

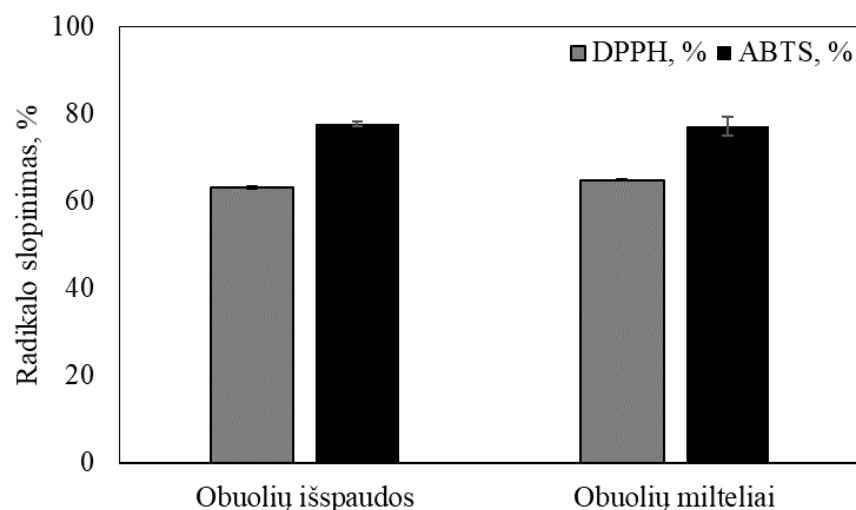
3.5 lentelė. Antibakterinis obuolių perdirbimo produktų aktyvumas. (--) – antibakteriniu aktyvumu nepasižymėjo

Mėginys	Slopinimo zona, mm				
	Gramteigiamos bakterijos		Gramneigiamos bakterijos		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Obuolių išspaudos	13,55 ± 1,09	--	--	--	--
Obuolių milteliai	15,50 ± 1,03	--	5,40 ± 1,10	--	--

Tyrimo metu nustatyta, kad obuolių milteliai pasižymėjo 1,14 karto didesniu antibakteriniu aktyvumu prieš *S. aureus* nei obuolių išspaudos. Be to, tik obuolių milteliai turėjo poveikį ir prieš žarnyno lazdeles *E. coli*. Prieš kitus patogeninius mikroorganizmus poveikio nebuvo pastebėta.

3.2.2.2. Obuolių perdirbimo produktų antioksidacinio aktyvumo savybės

Obuolių perdirbimo produktų antioksidacinis aktyvumas vertintas DPPH ir ABTS radikalų slopinimo metodais (žr. 3.5 pav.). Iš gautų rezultatų matyti, jog tiek obuolių išspaudos, tiek obuolių milteliai pasižymėjo panašiu ir gan aukštu radikalų slopinimo aktyvumu. Antioksidacinis obuolių išspaudų aktyvumas prieš DPPH ir ABTS buvo 63,19 ± 0,35 % ir 77,81 ± 0,66 %, atitinkamai. Antioksidacinis obuolių miltelių poveikis prieš DPPH ir ABTS radikalus buvo 64,93 ± 0,35 % ir 77,35 ± 2,13 %, atitinkamai. Kadangi, bendras fenolinių junginių kiekis tarp obuolių perdirbimo produktų reikšmingai nesiskyrė, tai galima preliminariai teigti, kad dėl to tarp obuolių išspaudų ir obuolių miltelių nebuvo didelio skirtumo pagal jų antioksidacinį aktyvumą. Vadinas, tirti obuolių perdirbimo produktai pasižymėjo beveik vienodai potencialiomis antioksidacinėmis savybėmis prieš laisvuosius DPPH ir ABTS radikalus.



3.5 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas obuolių perdirbimo produktuose DPPH ir ABTS metodais

Mokslinėje literatūroje yra teigiama, jog obuolių antibakterinis ir antioksidacinis aktyvumas tiesiogiai priklauso nuo juose esančių fenolinių junginių [39]. Vertinant antibakterinį aktyvumą, kitų autorių darbuose taip pat buvo pastebėta tendencija, jog obuolių ekstraktai turtingi fenoliniais junginiais efektyviausiai slopina *S. aureus* ir *E. coli*. [39, 116]. T. Zhang'as ir kt. [39] tyrė *Golden Delicious* veislės obuolių išspaudų ekstraktus, nustatė jų antibakterinį aktyvumą prieš maisto patogenus *S. aureus* ir *E. coli* (slopinimo zonos: $16,09 \pm 1,07$ mm ir $12,57 \pm 1,24$ mm, atitinkamai). Pagal C. Raffaelli ir kt. [116] *Gala* veislės obuolių antimikrobinis aktyvumas nustatytas prieš *S. aureus* ir *E. coli*, matuojant slopinimo zonas buvo $17,68 \pm 0,09$ mm ir $7,5 \pm 0,06$ mm, atitinkamai. Vertinant antioksidacinį aktyvumą, mokslinėje literatūroje nustatyta, jog obuolių frakcijos, kurios turėjo didžiausią fenolinių junginių kiekį pasižymėjo didžiausiomis DPPH ir ABTS radikalų slopinimo vertėmis, t. y. obuolių frakcijoje, kurioje buvo 1,48 GRE g/kg fenolinių junginių DPPH radikalo slopinimas buvo 90,96 %, o ABTS slopinimas – 89,78 % [117]. Taigi, remiantis mokslinės literatūros duomenimis, galima teigti, jog *Ligol* obuolių išspaudos yra turtingos stiprų antiradikalinių poveikį turinčiais fenoliniais junginiais, galinčiais slopinti vieną labiausiai antibiotikams atsparių bakterijų *S. aureus* augimą.

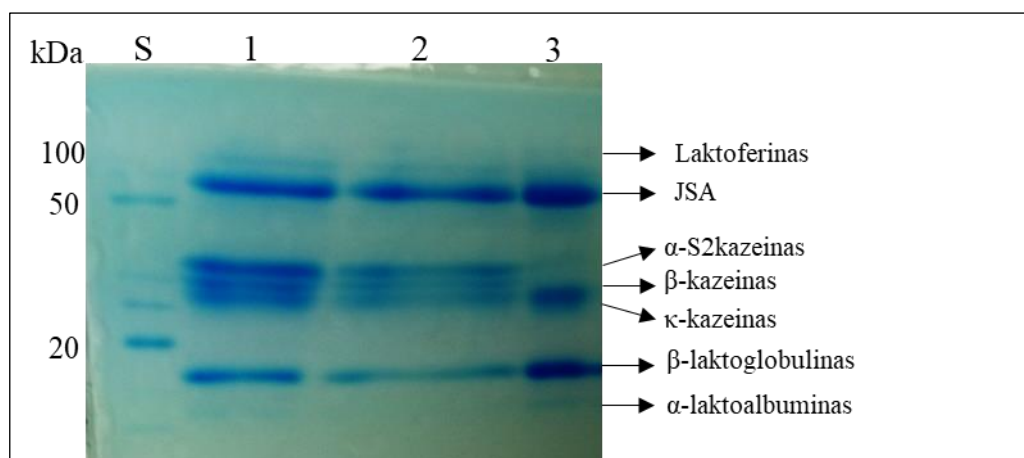
3.3. PRB fermentuoto priešpienio baltymai ir jų biologinis aktyvumas

3.3.1. PRB fermentuoto priešpienio baltymų sudėtis SDS-PAGE metodu

Bendras baltymų kiekis PRB (LUHS 245) fermentuotame priešpienyje ($45,64 \pm 1,14$ %) buvo nustatytas Kjeldalio metodu. Tirpių baltymų kiekis pagal Bradford'o metodą šiame produkte sudarė 153,56 mg JSA ekvivalento 1 grame mėginio.

Mokslinėje literatūroje nurodyta, jog įprastai nenuriebalintuose pieno milteliuose bendras baltymų kiekis sudaro $25,4 \pm 0,7$ % [118]. Tai įrodo, jog priešpienyje nustatytas baltymų kiekis buvo didesnis (1,7 karto), lyginant su įprastu karvės pienu. Kadangi, priešpienio milteliuose yra didesnis kiekis baltymų, vadinasi, tai būtų vertinga žaliava, kurią būtų galima panaudoti praturtinant hidratuotus gelius pilnaverčiais baltymais.

PRB fermentuoto priešpienio baltymų sudėtis vertinta SDS-PAGE metodu. Palyginus gautą elektroforegramą (žr. 3.6 pav.) su literatūroje pateiktais duomenimis, atliktas preliminarus baltymų tirname mėginyje identifikavimas [64].



3.6 pav. PRB fermentuoto priešpienio baltymų SDS-PAGE (12 % akrilamido gelis). Takeliai: S – standartas (10–220 kDa), 1 – priešpienis tirpintas Tris-HCl pH 8,2 buferyje, 2 – priešpienis tirpintas natrio fosfatiniame pH 7 buferyje, 3 – priešpienis tirpintas distiliuotame vandenyje

Iš rezultatų matyti, kad baltymų juostelės matomos iki 20 kDa žymi α -laktoalbuminą ir β -laktoglobuliną. Baltymų juostelės, patenkančios į 20–50 kDa diapozoną, priklauso kazeino baltymams. Baltymų juostelės, patenkančios į 50–100 kDa diapozoną, priklauso jaučio serumo albuminui ir laktoferinui. Pažymėtina, kad geriausiai baltymai gelyje frakcionuojasi, tirpinant mėginį 0,5 M NaCl 0,1 M Tris-HCl pH 8,2 buferiniame tirpale (žr. 3.6 pav. takelis nr. 1) nei vandenyje (žr. 3.6 pav. takelis nr. 3). Vertinant baltymų koncentracijas skirtinguose buferiuose Bradford'o metodu, nustatyta, jog vandenyje ištirusių baltymų koncentracija sudaro $0,77 \pm 0,04$ mg JSA/ml; 0,5 M natrio fosfatiniame buferyje (pH 7) koncentracija siekė $3,06 \pm 0,05$ mg JSA/ml; o 0,5 M NaCl 0,1 M Tris-HCl pH 8,2 buferiniame tirpale koncentracija buvo $3,91 \pm 0,07$ mg JSA/ml. Gautus rezultatų skirtumus būtų galima paaiškinti tuo, jog kazeino tirpumas šarminėje terpėje (šiuo atveju pH 8,2) padidėjo, nes kazeinas yra mažai tirpus vandenyje. Remiantis moksline literatūra galima preliminariai teigti, jog kazeinas esant pH 8,2 įgijo neigiamą krūvį, kuris sąlygojo kazeino molekulės subvienetų atsiskyrimą ir kartu geresnį tirpumą [119].

3.3.2. Priešpienio baltymų biologinis aktyvumas

PRB fermentuoto priešpienio antibakterinio aktyvumo vertinimo rezultatai (žr. 3.6 lentelę) rodo, kad priešpienis, lyginant su prieš tai aprašytais obuoliais ir eteriniais aliejais, pasižymėjo silpnesniu antibakteriniu aktyvumu. Didžiausias priešpienio antimikrobinis aktyvumas nustatytas prieš *S. typhimurium* ($5,10 \pm 0,74$ mm), o silpniausiu slopinimu pasižymėjo prieš *P. aeruginosa* ($3,90 \pm 0,32$ mm).

3.6 lentelė. PRB fermentuoto priešpienio (23 %) suspensijos slopinimo zonos

Mėginys	Slopinimo zona, mm				
	Gramteigiamos bakterijos		Gramneigiamos bakterijos		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Priešpienis	$4,60 \pm 0,84$	$4,50 \pm 0,97$	$4,20 \pm 1,03$	$5,10 \pm 0,74$	$3,90 \pm 0,32$

R. Yadav ir kt. [120] tyrime buvo fiksuotas stipresnis karvės priešpienio antibakterinis aktyvumas nei nustatytas šio eksperimento metu. Pagal tyrėjus stipriausias antibakterinis aktyvumas buvo prieš *E. coli* (slopinimo zona 13 mm), o šiek tiek silpnesni aktyvumai buvo prieš *S. aureus* ir *S. typhimurium* (slopinimo zonos 11 mm, atitinkamai) [120].

Priešpienio antioksidacinio aktyvumo vertinimas ABTS metodu. Ištyrus *Lactobacillus uvarium* LUHS 245 fermentuoto karvės priešpienio antioksidacinį aktyvumą, nustatyta, kad didėjant ekstrakcijos terpėje tirpiųjų baltymų koncentracijai, ABTS radikalo slopinimas taip pat didėjo (žr. 3.7 lentelę).

Kaip jau minėta 3.3.1. skyriuje, didžiausia tirpiųjų baltymų koncentracija (Bradford'o metodu) buvo fiksuota Tris-HCl pH 8,2 buferyje. Analizuojant antioksidacinį aktyvumą, ABTS radikalo slopinimas šioje terpėje taip pat buvo didžiausias ($70,7 \pm 0,26$ %). Vadinasi, sprendžiant iš SDS-PAGE rezultatų, galima daryti preliminarią prielaidą, jog priešpienio antioksidacinį aktyvumą galimai padidina ištirpę kazeino baltymai.

3.7 lentelė. PRB fermentuoto priešpienio antioksidacinis aktyvumas pagal ABTS

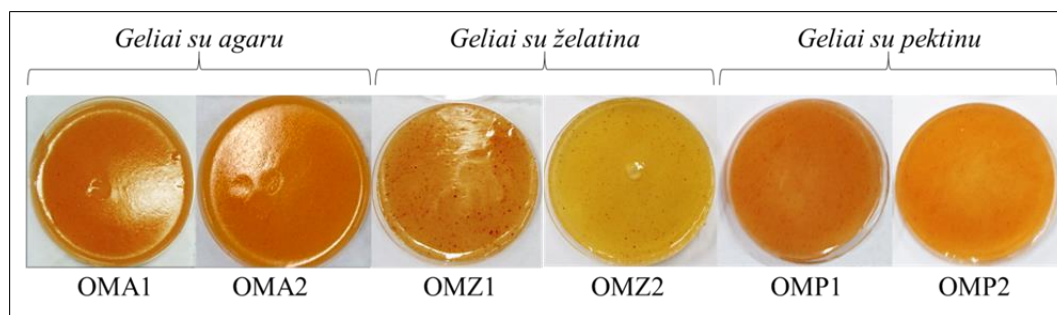
Terpė	JSA mg/ml	ABTS slopinimas, %
Vanduo	$0,77 \pm 0,04$	$4,7 \pm 0,73$
0,5 M natrio fosfatinis buferis pH 7	$3,06 \pm 0,05$	$43,1 \pm 3,60$
0,5 M NaCl 0,1 M Tris-HCl buferis pH 8,2	$3,91 \pm 0,07$	$70,7 \pm 0,26$

Mokslinės literatūros teigimu, priešpienio tiek antibakterinį, tiek antioksidacinį aktyvumą daugiausia lemia baltymas laktoferinas. Manoma, kad laktoferino antibakterinės savybės pasireiškia dėl jo gebos surišti geležies jonus, kurių trūkumas gali slopinti patogenų augimą. Be to, laktoferinas sąveikaudamas su patogeno plazmine membrana gali pakeisti jos pralaidumą. Priešpienio antibakteriniam aktyvumui įtakos taip pat turi trumpos grandinės riebalų rūgštys [121]. Antioksidacinis priešpienio aktyvumas, be laktoferino, siejamas su kazeinu ir kitais išrūgų baltymais. Kitų autorių darbuose pažymimas priešpienio baltymų antioksidacinis aktyvumas ne tik prieš ABTS, bet ir kitus radikalus (pvz., DPPH, laisvąsias deguonies formas, peroksidus ir kt.) [61, 64, 122].

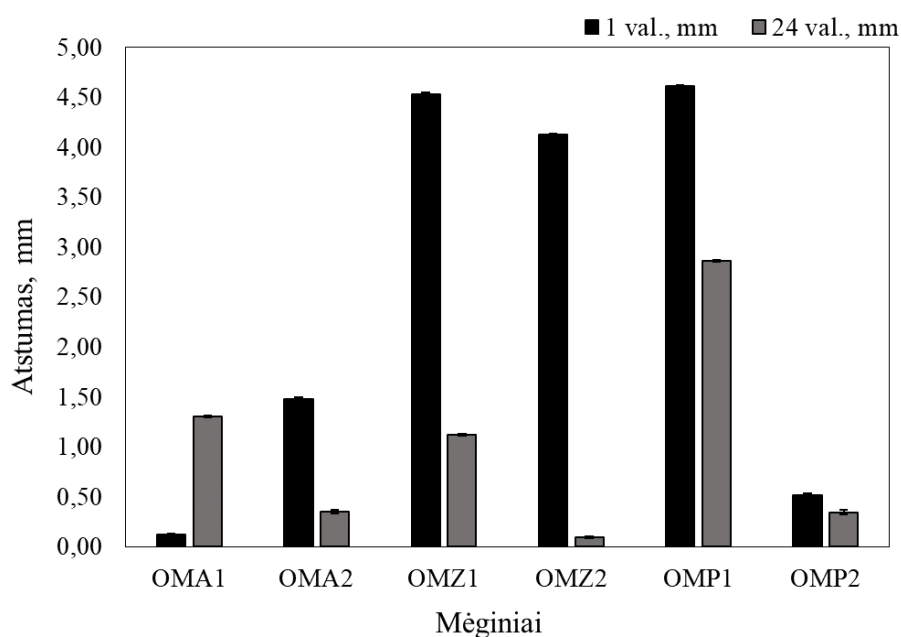
3.4. Hidratuotų gelių su obuolių perdirbimo produktais struktūrinimo galimybių paieška

3.4.1. Standiklio parinkimas gelių su obuolių milteliais struktūrizavimui

Hidratuotų gelių iš obuolių miltelių ruošimui pirmiausiai buvo renkamas stabilizatorius, išbandant jų struktūrinimui agarą, želatiną ir pektiną (žr. 3.7 pav.). Be to, gelių ruošimui išbandyti skirtingi ir gliukozės sirupo bei cukraus kiekiai. Gelių priimtumas buvo vertinamas pagal tekstūrą vizualiai, taip pat ir akustiniu prietaisu, t. y. kuo mažiau matavimo kūnas smigo į gelį, tuo standesnė buvo susidariusio gelio struktūra. Iš 3.8 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad pradiniu laiko momentu (po pagaminimo) kiečiausios struktūros susiformavo su agaru ruošti geliai (OMA1 ir OMA2), o mažiausiu standumu pasižymėjo geliai, ruošti su želatina. Paminėtina, kad kiečiausias buvo OMA1 gelis, ruoštas su agaru ir cukraus bei gliukozės sirupo kombinacija. Agarą, lyginant su kitais standikliais (želatina ir pektinu), pasižymėjo palyginti aukšta stingimo temperatūra ($\sim 45^{\circ}\text{C}$), o kartu ir greitesniu stingimu.



3.7 pav. Pradinės gelių (po pagaminimo) iš obuolių miltelių struktūros. OMA1 / OMA2 – geliai su obuolių milteliais ir agaru; OMZ1 / OMZ2 – geliai su obuolių milteliais ir želatina, OMP1 / OMP2 – geliai su obuolių milteliais ir pektinu



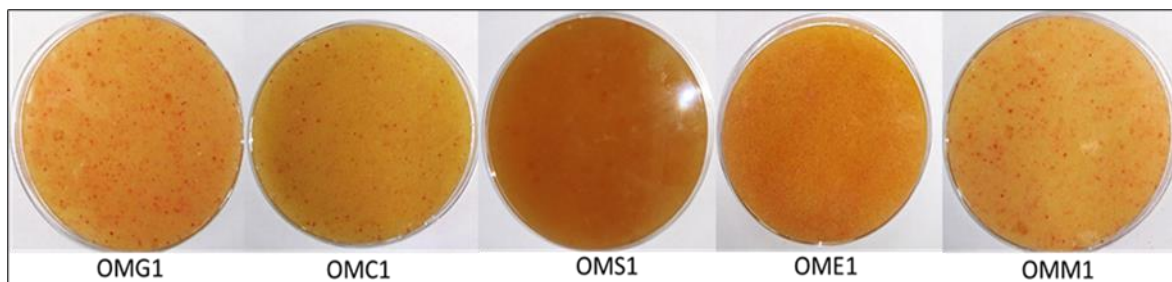
3.8 pav. Įvairių standiklių (kombinacijose su cukraus ir gliukozės sirupu), įtaka hidratuotų gelių tekstūrai, vertintai akustiniu prietaisu „Matmuo“. Čia: OMA1 / OMA2 – geliai su obuolių milteliais ir agaru; OMZ1 / OMZ2 – geliai su obuolių milteliais ir želatina, OMP1 / OMP2 – geliai su obuolių milteliais ir pektinu

Praėjus 24 val. po gelių pagaminimo, gelių konsistencija pasikeitė ir kietesniu fiksuotas OMZ2 gelis, ruoštas su želatina ir gliukozės sirupu. Taip pat buvo pastebėta reikšminga cukraus bei gliukozės sirupo įtaka gelių struktūrų formavimuisi. Visi geliai (OMA1, OMZ1 ir OMP1), kurių ruošimui buvo naudotas cukrus po 24 val. buvo minkštesni nei geliai, ruošti tik su gliukozės sirupu: OMA2 gelis buvo 3,6 karto kietesnis nei OMA1; OMZ2 gelis buvo 12 kartus kietesnis nei OMZ1, OMP2 gelis buvo 8,4 karto kietesnis nei OMP1. Vadinas, gelinių struktūrų kompozicijų sudarymui reikšmingą įtaką turi ne tik pasirinktas standiklis, tačiau ir saldinančioji medžiaga – cukrus arba gliukozės sirupas. Įvertinant gautus tyrimų rezultatus, toliau nuspręsta optimizuoti OMZ2 gelio struktūrą.

3.4.2. Saldiklio rūšies įtaka gelių su obuolių milteliais struktūrai ir tekstūrai

Kadangi, gelinių struktūrų sudarymui reikšmingą įtaką turėjo cukraus ir gliukozės sirupas, tolimesnio tyrimų etapo metu siekta pakeisti tradicines saldinimąsias medžiagas mažo kaloringumo saldikliais:

sorbitoliu, eritritoliu ir maltitoliu (žr. 3.9 pav.). Šiame etape buvo atlikta tekstūros analizė, vertinant gelių tekstūrą pagal tvirtumo, konsistencijos bei kohezijos parametrus.



3.9 pav. Gelių iš obuolių miltelių struktūros derinant įvairius saldiklius

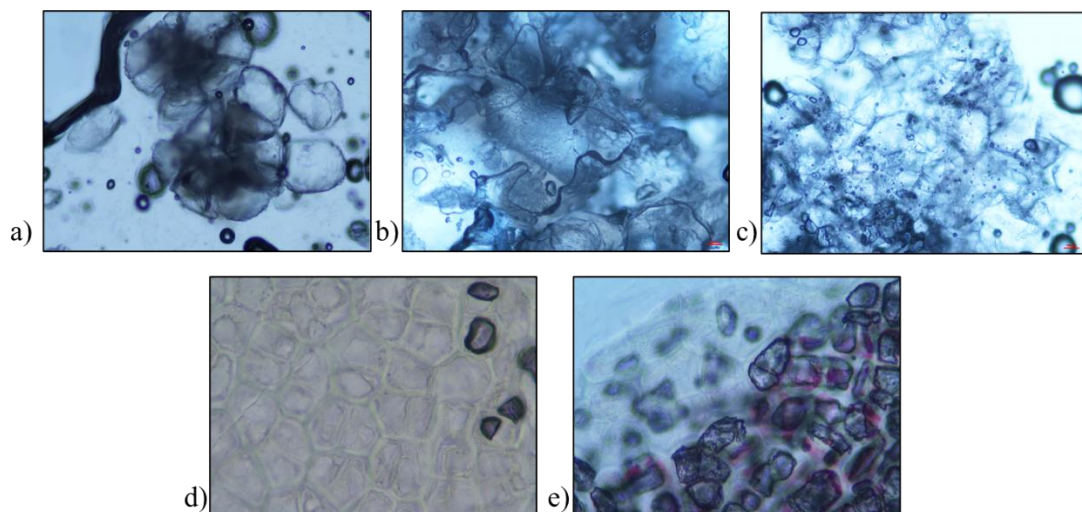
Iš 3.8 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, jog pradiniu momentu po pagaminimo tvirčiausią struktūrą (pagal tvirtumo bei konsistencijos parametrus) sudarė gelis, ruoštas su eritritoliu (OME1). Lyginant su gelių kontroliniais variantais OMG1 ir OMC1 (geliais, ruoštais su gliukozės sirupu ir cukrumi, atitinkamai), OME1 gelis pagal tvirtumo parametą pasižymėjo ~7,5 kartus tvirtesne sandara nei OMG1 ir 4,3 kartus tvirtesne sandara nei OMC1 gelis. Vertinant tiriamus mėginius pagal kohezijos parametą, didžiausiu lipnumu išsiskyrė OME1 gelis. Po 24 val. laikymo visų tirtų gelių tvirtumas reikšmingai padidėjo, o kohezijos vertės – nežymiai pasikeitė. Tvirčiausia struktūra išliko OME1 gelio, tačiau vertinant vizualiai šio gelio struktūra buvo išsikristalizavusi (žr. 3.10 pav. b). Taip pat išsikristalizavę buvo geliai, ruošti su cukrumi (OMC1) ir maltitoliu (OMM1). Mažiausiai vizualiai pakito (išsikristalizavo) po 24 val. laikymo gelis, ruoštas su sorbitoliu. Be to, OMS1 gelis pasižymėjo ~2 kartus didesniu tvirtumu nei kontrolinis OMG1 gelis. Be to, OMS1 gelio tvirtumas nedaug skyrėsi nuo OMC1 gelio, bet jam buvo būdingas mažesnis lipnumas nei kontrolinio mėginio (OMC1).

Tokiu būdu tirtų hidratuotų gelių tekstūrai reikšmingą įtaką turi saldikliai ir jų kompozicijos. Iš jų efektyviausiai tvirtumą ir konsistenciją gerina sorbitolis. Eritritolis ir maltitolis susikristalيزuoja ir blogina vizualiai gelių tekstūrą, tačiau šis poveikis naudojant eritrolį pasireiškia didesniu laipsniu nei naudojant gelių ruošimui maltitolį.

3.8 lentelė. Saldiklių rūšies įtaka gelių su obuolių milteliais tekstūrai, vertintai „TAXT plus Texture Analyser“ tekstūros analizatoriumi

Mėginiai	Pradiniu laiko momentu (1 val. po pagaminimo)			Po 24 val. laikymo		
	Tvirtumas, N	Konsistencija, gxs	Kohezija, N	Tvirtumas, N	Konsistencija, gxs	Kohezija, N
OMG1	1,19	2,83	-0,52	5,1	11,57	-0,58
OMC1	2,09	4,91	-0,63	13,89	28,51	-0,71
OMS1	2,78	7,58	-0,60	11,2	26,8	-0,59
OME1	8,98	30,68	-0,77	38,63	126,9	-0,61
OMM1	2,57	7,26	-0,62	8,58	22,01	-0,70

*OMG1 – gelis iš obuolių miltelių ir gliukozės sirupo; OMC1 – geliai iš obuolių miltelių ir cukraus; OMS1 – gelis iš obuolių miltelių ir sorbitolio sirupo; OME1 – gelis iš obuolių miltelių ir eritrolio; OMM1 – gelis iš obuolių miltelių ir maltitolio.



3.10 pav. Gelių struktūros mikroskopiniai vaizdai: a) OMM1 gelis, didinimas 10 kartų, b) OME1 gelis, didinimas 4 kartus, c) OMC1 gelis, didinimas 10 kartų, d) OMS1 gelis, didinimas 40 kartų, e) OMG1, didinimas 40 kartų

Mokslinėje literatūroje taip pat yra minimas sorbitolio, lyginant su tradiciškai pramonėje naudojamu cukrumi, gebėjimas pagerinti želatinos gelių formavimąsi. Teigiama, kad pridėjus poliolinių saldiklių pasikeičia želatinos trigubos spiralės struktūra ir susidaro daugiau jungčių, dėl kurių gelio struktūra tvirtėja [95].

3.4.3. Gelių su obuolių išspaudų priedais struktūrinimo savitumai

Geliams su obuolių išspaudomis gaminti buvo pasirinkta OMS1 gelio struktūra su sorbitoliu. Kadangi, obuolių išspaudos pasižymėjo 1,8 karto didesne vandens įgertimi nei obuolių milteliai, tai optimaliai gelių struktūrai gauti buvo naujai derinami želatinos, obuolių išspaudų, sorbitolio ir atitinkamai vandens kiekiai (žr. 2 skyriaus 2.3 lentelę).

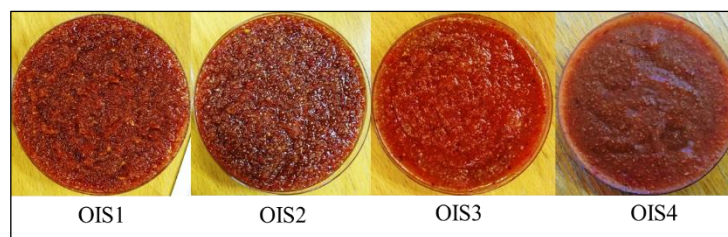
Iš 3.9 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad didžiausiu tvirtumu (iš visų tirtų gelių) tiek pradinio momentu, tiek po 24 val. laikymo pasižymėjo OIS3 gelis. Taip pat ir pagal konsistencijos vertes, ši struktūra buvo tankiausia ir klampiausia. Didžiausia koheziją iš tirtų mėginių išsiskyrė OIS1 gelis.

3.9 lentelė. Gelių su obuolių išspaudomis tekstūros analizės rezultatai

Mėginiai	Pradinio laiko momentu 1 val.			Po 24 val.		
	Tvirtumas, N	Konsistencija, g·s	Kohezija, N	Tvirtumas, N	Konsistencija, g·s	Kohezija, N
OIS1	8,79	26,67	-0,85	11,09	34,19	-0,73
OIS2	4,92	16,59	-0,70	8,71	22,17	-0,68
OIS3	20,98	48,57	-0,64	39,55	87,67	-0,69
OIS4	15,12	38,13	-0,76	27,00	55,62	-0,63

* OIS1 / OIS2 / OIS3 / OIS4 – geliai iš obuolių išspaudų ir sorbitolio sirupo.

Be to, iš 3.11 pav. matyti, jog geliai, ruošti su obuolių išspaudomis skiriami vizualiai nuo gelių, ruošų su obuolių milteliais, jų paviršius yra mažiau tolygus nei gelių ruošų su obuolių milteliais (žr. 3.9 pav.). Geliai, ruošti su obuolių išspaudomis, buvo rausvesni, nei geliai, kurių ruošimui naudoti obuolių milteliai. Pastarieji mėginiai buvo šviesiai oranžinės spalvos.



3.11 pav. Geliai su obuolių išspaudomis

Taigi, pagal tekstūros ir juslinio vertinimo rezultatus, antimikrobinių komponentų imobilizavimui pasirinktas OIS3 gelis.

3.5. Antimikrobinių komponentų imobilizavimas struktūrintuose geliuose su obuolių perdirbimo produktais

Šiame etape EA imobilizavimui buvo išbandytos dvi skirtingos gelių struktūros: 1) vienasluoksniai geliai ir 2) daugiasluoksnės gelių struktūros.

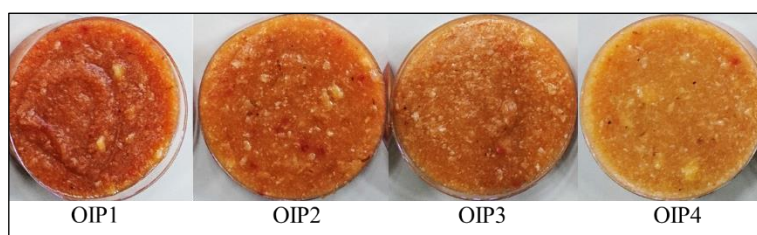
Eterinių aliejų mišinio „Eunutritech“ imobilizavimo obuolių miltelių geliuose efektyvumas, vertintas pagal jų sudėtyje esančių pagrindinių biologiškai aktyvių komponentų koncentracijas, tirtas aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos (HPLC) metodu (žr. 3.10 lentelę).

3.10 lentelė. Eterinių aliejų mišinio „Eunutritech“ komponentų imobilizavimo efektyvumo įvairiose gelių su obuolių milteliais struktūrose tyrimų rezultatai

Eterinio aliejaus komponentas	Vienasluoksnis gelis, mg	Daugiasluoksnis gelis, mg
Mentolis	3,9	50,7
Karvakrolis	0,1	1,2
Timolis	10,5	122,4

Nustatyta, kad eterinių aliejų imobilizavimo efektyvumas priklausė nuo gelių struktūrinių savitumų. Daugiausiai biologiškai aktyvių komponentų (timolio, mentolio ir karvakrolio) išliko gelių **daugiasluoksnėse** struktūrose nei **vienasluoksnuose geliuose**, leidžiant tuo padidinti imobilizavimo efektyvumą vidutiniškai 12 kartų.

Siekiant įvertinti priešpienio imobilizavimo obuolių išspaudų geliuose galimybes, keistos dviejų komponentų koncentracijos: obuolių išspaudų (mažinant nuo 14 % iki 8 %, kas 2 %) ir priešpienio (didinant nuo 2 % iki 8 %, kas 2 %), t. y. vienu metu buvo keičiamas abiejų sausų komponentų santykis. Tokiu būdu gauti 4 gelių su priešpienio priedais kombinacijos (žr. 3.12 pav.).



3.12 pav. Geliai su obuolių išspaudomis ir priešpienio priedu

Atlikus tekstūros profilio analizę (žr. 3.11 lentelę), nustatyta, kad tvirčiausia struktūra išsiskyrė OIP2 gelis tiek pradiniu laiko momentu, tiek po 24 val. laikymo. Pagal kohezijos vertes tirti geliai reikšmingai nesiskyrė tarpusavyje ir tai fiksuota abiem laiko momentais. Taip pat iš rezultatų matyti, jog tirtų mėginių tvirtumo parametras tai pat kito nežymiai.

3.11 lentelė. Gelių su obuolių išspaudomis ir priešpieniu tekstūros analizės rezultatai

Mėginiai	Pradiniu laiko momentu 1 val.			Po 24 val.		
	Tvirtumas, N	Konsistencija, g×s	Kohezija, N	Tvirtumas, N	Konsistencija, g×s	Kohezija, N
OIP1	25,24	46,66	-0,22	37,18	84,8	-0,28
OIP2	28,76	71,76	-0,27	38,53	100,32	-0,27
OIP3	26,96	77,68	-0,3	32,97	73,35	-0,3
OIP4	26,49	73,45	-0,28	32,21	83,42	-0,29

*OIP1 / OIP2 / OIP3 / OIP4 – geliai iš obuolių išspaudų ir priešpienio.

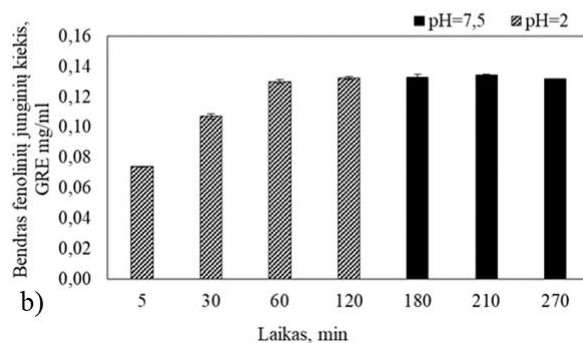
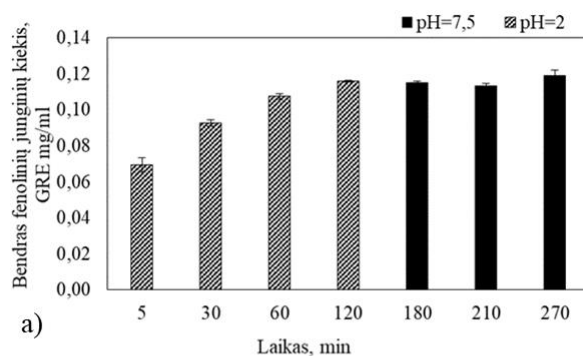
Po 24 val. didesni skirtumai buvo fiksuoti, tiriant įvairių gelių konsistenciją. Pagal jį tvirčiausia ir tankiausia struktūra buvo OIP2 mėginio, o mažiausiu tvirtumu ir tankumu pasižymėjo OIP3 gelis. Be to, OIP3 mėginys pagal tvirtumą ir konsistenciją (po 24 val.) buvo artimas optimalios tekstūros OIS3 geliui (39,55 N ir 87,67 g·s). Taigi, eterinių aliejų (čiobrelių ir gvazdikėlių) imobilizavimui buvo pasirinkta OIP3 struktūra, kurią sudarė 10 % obuolių išspaudų ir 6 % priešpienio. Tokiu būdu, tinkamiausios tekstūros buvo gauti du hidratuoti geliai, kurie tolimesniame etape buvo papildyti 0,3 % pagal masę, imobilizuotais į žarnynę tirpią medžiagą „Eudragid S 100“ ir po to liofilizuotais, čiobrelių ir gvazdikėlių eteriniais aliejais.

3.6. Fenolinių junginių atpalaidavimo *in vitro* struktūrintuose geliuose savitumai

Fenolinių junginių atpalaidavimo *in vitro* tyrimas buvo atliktas siekiant nustatyti, kaip iš sukurtų gelinių struktūrų atsipalaiduoja fenoliniai junginiai, kurių gausu obuolių produktuose ir EA, ir kurie pasižymi plačiu biologinio aktyvumo spektru. Tokiu būdu, pagal fenolinių komponentų atsipalaidavimą būtų galima suprasti apie tiriamų gelių poveikį žmogaus virškinimo sistemai.

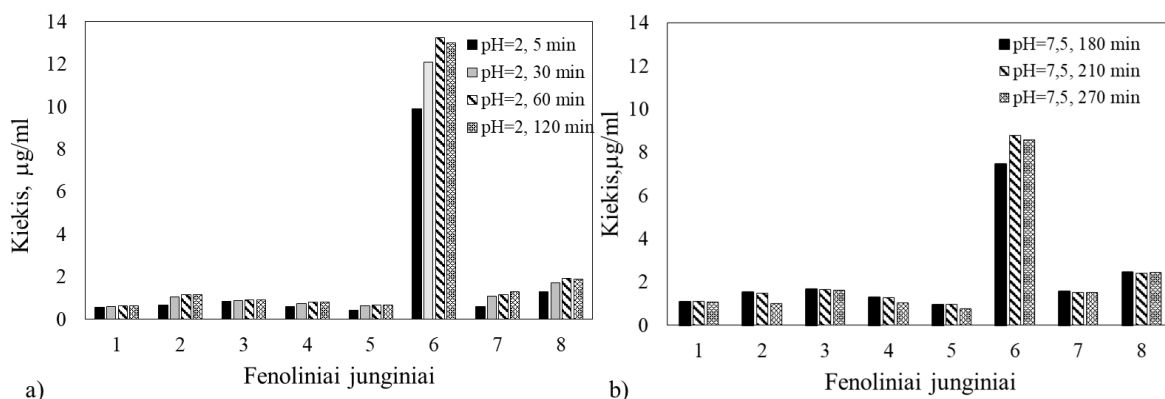
Fenolinių junginių atpalaidavimo tyrimas vykdytas skirtingose pH terpėse (pH 2 ir pH 7,5) ir skirtingais laiko intervalais 5, 30, 60, 120 min. ir 180, 210, 270 min. Eksperimentui pasirinkti trys hidratuoti geliai: a) gelis iš obuolių išspaudų su priešpieniu bei čiobrelių EA, b) gelis iš obuolių išspaudų su priešpieniu bei gvazdikėlių EA ir c) sluoksniuotos struktūros gelis iš obuolių miltelių su priešpieniu ir „Eunutritech“ EA preparatu.

Vertinant fenolinių junginių atsipalaidavimą iš gelinių struktūrų, ruošų su obuolių išspaudomis (žr. 3.13 pav. a ir b.), nustatyta, kad intensyviausiai fenoliniai junginiai atsipalaidavo per pirmas 60 min. pH 2 terpėje, kai po 120 min. buvo pasiektas išsiskyrusių fenolinių junginių koncentracijos maksimumas. Iš gautų rezultatų taip pat matyti, jog daugiau fenolinių junginių buvo aptikta geliuose su gvazdikėlių EA (po 120 min.). Iš gelių su gvazdikėlių EA išsiskyrusių į terpę fenolinių junginių buvo 0,132 GRE mg/ml, o iš gelių su čiobrelių į terpę išsiskyrė 0,116 GRE mg/ml fenolinių junginių. Reikšmingų fenolinių junginių kiekio pokyčių pH 7,5 terpėje nebuvo pastebėta. Pakeitus terpės pH stebėtais laiko momentais (180–270 min.), fenolinių junginių kiekis geliuose su gvazdikėlių EA kito nuo 0,133 iki 0,134 GRE mg/ml, o su čiobrelių EA bendras fenolinių junginių kiekis kito nuo 0,113 iki 0,119 GRE mg/ml.

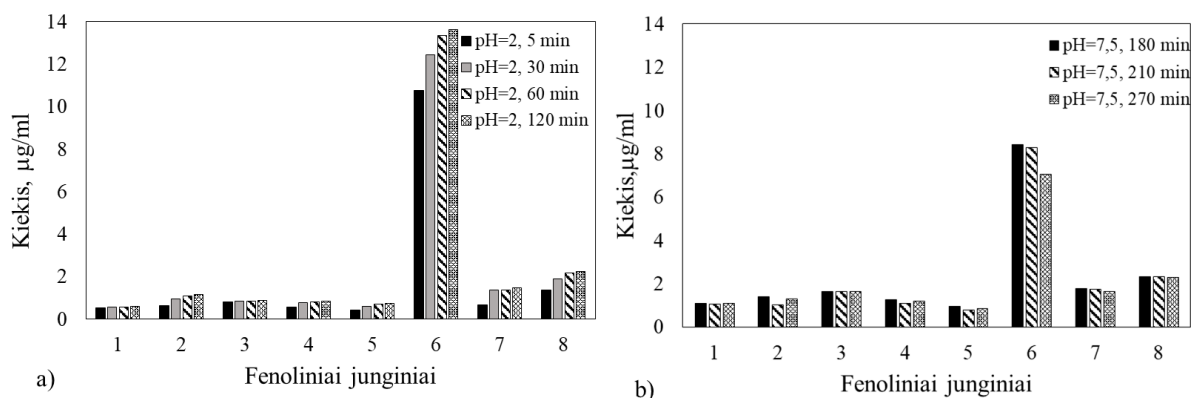


3.13 pav. Bendro fenolinių junginių kiekio pokytis *in vitro* modeliniuose geliuose, ruoštuose iš obuolių išspaudų kombinacijoje su priešpieniu ir EA a) ėiobrelė EA ir b) gvazdikėlių EA

Taip pat HPLC metodu buvo įvertintas ir atskirų obuolių išspaudose esančių fenolinių junginių kiekio kitimas geliuose su ėiobrelė EA (žr. 3.14 pav. a ir b) ir su gvazdikėlių EA (žr. 3.15 pav. a ir b). Iš rezultatų matyti, jog abiem atvejais daugiausiai atsipalaiduoja procianidino B1 pH 2 terpėje. Gelių su ėiobrelė EA atveju procianidino B1 kiekis pH 2 terpėje nustatytas 12,06 µg/ml, o gelių su gvazdikėlių EA – 12,53 µg/ml. Kitų identifikuotų junginių koncentracijos pH 2 terpėje tirtais laiko momentais (5–120 min.) kito nežymiai. Terpėje pH 7,5 po 180 min., lyginant su atsipalaidavimu pH 2 terpėje, buvo pastebėtas visų junginių koncentracijų padidėjimas, išskyrus procianidino B1. Šių junginių suminis kiekis pH 7,5 terpėje, lyginant su pH 2, nustatytas didesnis: geliuose su ėiobrelė EA aptiktas 1,6 karto daugiau, o geliuose su gvazdikėlių EA – 1,5 karto daugiau. Procianidino B1 suminis kiekis buvo 1,5 karto ir 1,6 karto didesnis pH 2 terpėje nei pH 7,5, atitinkamai gelių su ėiobrelė EA ir gvazdikėlių EA atvejais.



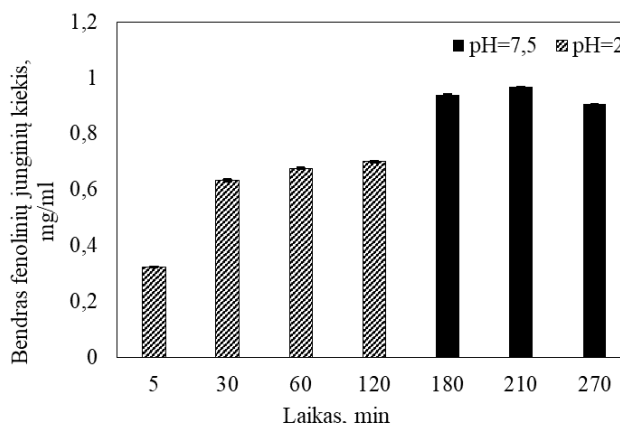
3.14 pav. Obuolių išspaudų fenolinių junginių kitimas geliuose su ėiobrelė EA: a) pH 2 terpėje ir b) pH 7,5 terpėje. Ąia: 1 – rutinas, 2 – hiperozidas, 3 – izokvercitrinas, 4 – avikularinas, 5 – kvercitrinas, 6 – procianidinas B1, 7 – floridzinas ir 8 – chlorogeninė rūgštis



3.15 pav. Obuolių išspaudų fenolinių junginių kitimas geliuose su gvazdikėlių EA: a) pH 2 terpėje ir b) pH 7,5 terpėje. Čia: 1 – rutinas, 2 – hiperozidas, 3 – izokvercitrinas, 4 – avikularinas, 5 – kvercitrinas, 6 – procianidinas B1, 7 – floridzinas ir 8 – chlorogeninė rūgštis

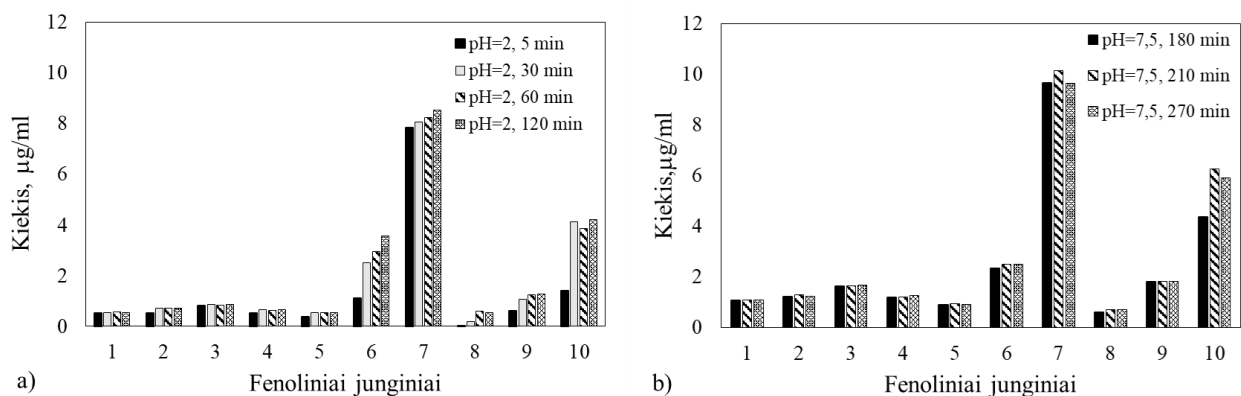
Vertinant fenolinių junginių atsipalaidavimą iš sluoksniuotų gelių struktūrų, ruošų su obuolių milteliais ir „Eunutritech“ eteriniais aliejais (žr. 3.16 pav.), buvo stebima tendencija, jog fenoliniai junginiai intensyviau atsipalaidavo iš tirtų gelių esant pH 2 nei pH 7,5. Esant pH 7,5 nustatytas didžiausias fenolinių junginių kiekis 210 min. (0,968 GRE mg/ml).

Tai rodo, jog sluoksniuotos struktūros geliai palaipsniui viso proceso metu atpalaidavo fenolinius junginius pH 2 ir pH 7,5 terpėse.



3.16 pav. Bendro fenolinių junginių kiekio pokytis *in vitro* modeliniuose geliuose, ruošuose iš obuolių miltelių kombinacijoje su priešpieniu ir „Eunutritech“ EA preparatu

Vertinant tirtų mėginių kokybinę fenolinių junginių sudėtį HPLC metodu (žr. 3.17 pav. a ir b), nustatyta, kad daugiausiai atsipalaiduoja iš gelių tokie komponentai, kaip procianidinas B1, katechinas ir chlorogeninė rūgštis. Lyginant pagal kiekybinę sudėtį, skirtingose terpėse aptiktus šiuos komponentus, reikšmingas didesnis atsipalaidavimas (1,2 karto) fiksuotas esant pH 7,5 nei pH 2.

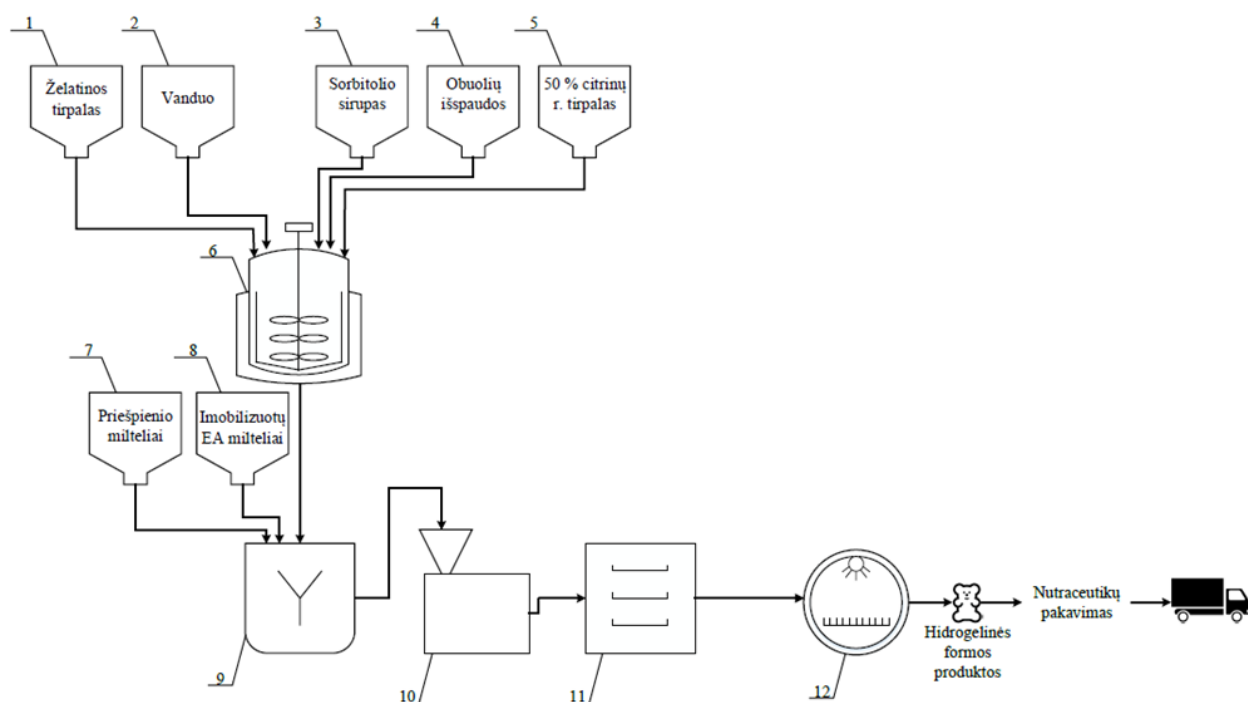


3.17 pav. obuolių fenolinių junginių kitimas geliuose su „Eunutritech“ EA preparatu: a) pH 2 terpėje ir b) pH 7,5 terpėje. Čia: 1 – rutinas, 2 – hiperozidas, 3 – izokvercitrinas, 4 – avikularinas, 5 – kvercitrinas, 6 – katechinas, 7 – procianidinas B1, 8 – procianinidinas C1, 9 – floridzinas ir 10 – chlorogeninė rūgštis

Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad fenoliniai junginiai iš struktūrų, formuotų su obuolių išspaudomis, atsipalaidavo po 120 min. esant pH 2. Tai reiškia, kad suformuotos struktūros galėtų būti irios imitacinėje skrandžio sulčių terpėje, o tai galėtų būti rekomenduojama virškinimo funkcijai pagerinti. Norint efektyvesnio fenolinių junginių atsipalaidavimo žarnyno (pH 7,5) terpėje, reiktų tobulinti vienasluoksnių gelių struktūras. Sluoksniuotos struktūros geliai, skirtingai nei vienasluoksniai, palapsniui viso proceso metu atpalaidavo fenolinius junginius pH 2 ir pH 7,5 terpėse.

4. Rekomendacijų dalis

Pagal optimaliausią tiriamojo darbo metu gautą hidrogelių su obuolių išspaudomis (OIP3) struktūrą, siūloma tokia (žr. 4.1 pav.) hidrogelių su PRB *Lactobacillus uvarium* (LUHS 245) fermentuotu priešpieniu ir imobilizuotais EA gamybos principinė aparatūrinė schema.



4.1 pav. Hidrogelių su obuolių išspaudomis ir PRB (LUHS 245) fermentuotu priešpieniu bei imobilizuotais EA rekomenduojama gamybos aparatūrinė schema. Čia: 1,2,3,4,5,7,8 – žaliavų talpyklos, 6 – maišyklė su apgauba, 9 – maišyklė, 10 – dozatorius, 11 – patalpa hidrogelių struktūrinimui, 12 – formavimo būgnas

Į kaitinamą maišyklę 6 pirmiausiai yra dozuojamas vanduo, sorbitolio sirupas ir obuolių išspaudos. Mišinys kaitinamas ir maišomas iki vienalytės masės. Po to, į gautą receptūrinį mišinį supilamas kambario temperatūros vandenyje brinkintos želatinos tirpalas. Mišinys trumpai pakaitinamas (trukmė – 1 min.), kad želatina nedegraduotų ir galiausiai supilamas 50 % citrinų rūgšties tirpalas. Gautas mišinys perpilamas į maišyklę 9, kurioje jam atvėsus iki 50 °C temperatūros yra dozuojami fermentuoto priešpienio ir imobilizuotų EA milteliai. Išmaišytas iki vienalytės konsistencijos mišinys dozatoriumi 10 yra atseikėjamas į dėklus su krakmole išspaudomomis formomis. Dėklai su pripildyta hidrogelio mase sukraunami į stelažus struktūrinimui, kuris bus vykdomas patalpoje 11. Hidrogeliams, ruoštiems su želatina, struktūrinimas bus vykdomas patalpoje 11 kambario temperatūroje, trukmė – 24 val. Papildomai patalpoje 11 yra numatytas santykinio oro drėgnio reguliavimas (<50 %) ir įrengta ventiliacijos sistema (tiekiamoji ir ištraukiamoji). Struktūrinti hidrogeliai perkeliama iš dėklų į būgną 12, kur šepetiais ir ventiliatoriumi nuo hidrogelių atskiriami krakmolo likučiai. Po to hidrogeliai apipurškiami aliejaus ir vaško apvalkalu, kad įgytų patrauklią išvaizdą (būtų blizgūs). Pagaminti hidrogeliai nukreipiami pakavimui ir perduodami laikymui.

Išvados

1. Tiriant obuolių produktų (išspaudų ir miltelių) panaudojimo galimybes hidrogelių gamybai, nustatyta:
 - tiriant HPLC metodu, obuolių išspaudose fenolinių junginių aptikta 1,6 karto daugiau nei obuolių milteliuose ir išspaudose daugiausiai aptikta: floridzino (591,6 µg/g), chlorogeninės rūgšties (482,1 µg/g) ir hiperozido (405,9 µg/g);
 - obuolių išspaudos ir obuolių milteliai, pasižymėjo antimikrobiniu aktyvumu prieš *S. aureus*, slopinimo zonos – 13,55 ± 1,09 mm ir 15,50 ± 1,03 mm, atitinkamai;
 - obuolių išspaudoms ir milteliams taip pat buvo būdingas antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH (63,19 ± 0,35 % ir 64,93 ± 0,35 %, atitinkamai) ir ABTS (77,81 ± 0,66 % ir 77,35 ± 2,13 %, atitinkamai) radikalus;
 - hidrogelių iš obuolių miltelių struktūrą ir tekstūrą efektyviausiai iš tiriamų saldiklių gerino sorbitolis, o iš geliacinių agentų tvirčiausia konsistencija gauta su želatina.
2. Atlikus gvazdikėlių, čiobrelių ir mandarinų eterinių aliejų biologinio aktyvumo palyginamąjį įvertinimą, nustatyta:
 - didžiausiu antimikrobiniu aktyvumu pasižymėjo čiobrelių eterinis aliejus, kurio minimali veiklioji koncentracija (1 %) efektyviausiai slopino *S. aureus* augimą;
 - stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo gvazdikėlių eterinis aliejus, kurio 0,1 % koncentracija slopino DPPH radikalą (86,31 ± 0,06 %), o 0,5 % koncentracija efektyviai slopino ABTS radikalą (61,41 ± 1,91 %).
3. Ištyrus *Lactobacillus uvarium* LUHS 245 fermentuotą karvės priešpienį, nustatyta:
 - karvės priešpienį (baltymų kiekis 45,64 ± 1,14 %) sudaro tokie baltymai: laktoferinas, jaučio serumo albuminas, α-S2 kazeinas, β-kazeinas, κ-kazeinas, β-laktoglobulinas ir α-laktoglobulinas;
 - didžiausiu antibakteriniu aktyvumu pasižymėjo prieš *S. typhimurium* bakterijas;
 - didžiausias fermentuoto priešpienio ABTS radikalo slopinimas (70,7 ± 0,26 %) nustatytas, vykdant baltymų ekstrakciją pH 8,2 TRIS-HCl buferiniame tirpale.
4. Biologiškai aktyvių medžiagų imobilizavimo obuolių hidrogeliuose efektyvumo tyrimais, nustatyta:
 - Daugiasluoksnėse, gelių iš obuolių miltelių, struktūrose timolio, mentolio ir karvakrolio išliko 12 kartų daugiau nei vienasluoksnėse struktūrose;
 - geriausia tekstūra išsiskyrė hidrogeliai, kai 6 % priešpienio buvo imobilizuojama į obuolių išspaudų struktūras (10 %) pagal masę.
5. Atlikus fenolinių junginių iš įvairių hidrogelių atsipalaidavimo *in vitro* tyrimą, nustatyta:
 - maksimali fenolinių junginių koncentracija iš gelių, ruošų su obuolių išspaudomis ir gvazdikėlių bei čiobrelių eteriniais aliejais, buvo esant pH 2 120 tyrimo minutę: 0,132 GRE mg/ml ir 0,116 GRE mg/ml, atitinkamai ir daugiausiai atsipalaidavo procianidino B1;
 - maksimali fenolinių junginių koncentracija iš gelių, ruošų su obuolių milteliais ir „Eunutritech“ eterinių aliejų mišiniu, buvo aptikta esant pH 7,5 210 tyrimo minutę (0,968 GRE mg/ml) ir daugiausiai atsipalaidavo tokie junginiai, kaip procianidinas B1, katechinas ir chlorogeno rūgštis, kurių koncentracija pH 7,5 terpėje buvo 1,2 karto didesnė nei pH 2 terpėje.

Literatūros sąrašas

1. CALO, J. R., P. G. CRANDALL, C. A. OBRYAN, and S. C. RICKE. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control* [interaktyvus]. 2015, 54, 111-119 [žiūrėta 2020-01-19]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodcont.2014.12.
2. BHUNIA, Arun K. *General Mechanism of Pathogenesis for Foodborne Pathogens: Foodborne Microbial Pathogens* [interaktyvus]. New York: Springer, 2008 [žiūrėta 2020-04-10]. ISBN 978-0-387-74537-4. Prieiga per doi: 10.1007/978-0-387-74537-4_4.
3. BINTSIS, T. Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology* [interaktyvus]. 2017, 3 (3), 529-563 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.3934/microbiol.2017.3.529.
4. KHORSHIDIAN, K., M. YOUSEFI, E. KHANNIRI, and A. M. MORTAZAVIAN. Potential application of essential oils as antimicrobials preservatives in cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* [interaktyvus]. 2018, 45, 62-72 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ifset.2017.09.020.
5. PARKE, D. V., and D. F. V. LEWIS. Safety aspects of food preservatives. *Food Additives And Contaminants* [interaktyvus]. 1992, 9 (5), 561-577 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.1080/02652039209374110.
6. JUNEJA, V. K., H. P. DWIVEDI, and X. YAN. Novel Natural Food Antimicrobials. *Annual Review of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2012, 3, 381-403 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.1146/annurev-food-022811-101241.
7. CAROCHO, M., P. MORALES, and I. C. F. R. FERREIRA. Natural food additives: Qua vadis?. *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2015, 45, 284-295 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: /10.1016/j.tifs.2015.06.007.
8. BIESALSKI, H.K., et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition* [interaktyvus]. 2009, 25, 1202-1205 [žiūrėta 2018-10-20]. Prieiga per doi: 10.1016/j.nut.2009.04.023.
9. DAS, L., et al. Role of nutraceuticals in human health. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2012, 49 (2), 173-183 [žiūrėta 2020-04-10]. Prieiga per doi: 10.1007/s13197-011-0269-4.
10. BHAVANIRAMYA, S., et al. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology* [interaktyvus]. 2019, 2, 49-55 [žiūrėta 2019-10-15]. Prieiga per doi: 10.1016/j.gaost.2019.03.001.
11. ZUZARTE, M, and L. SALGUERO. Essential Oils Chemistry. In de Sousa D., eds. *Bioactive Essential Oils and Cancer* [interaktyvus]. Cham: Springer, 2015, pp. 19-61 [žiūrėta 2019-10-20]. ISBN 978-3-319-19144-7. Prieiga per doi: DOI 10.1007/978-3-319-19144-7_2.
12. GAVARIC, N., et al. Chemical Profile, Antioxidant and Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils, Thymol and Carvacrol and Their Possible Synergims. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* [interaktyvus]. 2015, 18 (4), 1013-1021 [žiūrėta 2020-03-12]. Prieiga per doi: 10.1080/0972060X.2014.971069.
13. AL-ASMARI, A. B., et al. Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [interaktyvus]. 2017, 7 (2), 147-150 [žiūrėta 2020-03-12]. Prieiga per doi: 10.1016/j.apjtb.2016.11.023.
14. ZANTAR, S., et al. Effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum compactum* essential oils on the shelf life of fresh giat cheese, *Journal of Essential Oil Research* [interaktyvus]. 2014, 26 (2), 76-84 [žiūrėta 2020-03-12]. Prieiga per doi: 10.1080/10412905.2013.871673.

15. MARTOS, M. V., et al. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal* [interaktyvus]. 2010, 25, 13-19 [žiūrėta 2019-11-12]. Prieiga per doi: 10.1002/ffj.1951.
16. RADUNZ, M., et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2019, 276, 180-186 [žiūrėta 2020-04-13]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.173.
17. CHAIEB, K., et al. The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. *PHYTOTHERAPY RESEARCH* [interaktyvus]. 2007, 21, 501-506 [žiūrėta 2020-03-29]. Prieiga per doi: 10.1002/ptr.2124.
18. SOBHANI, L., and P. ZIARATI. Study on potential bio-adsorption of Tangerine peel in removal of heavy metals: Pb, Cd and Ni of vegetable coriander. *Journal of Scientific Discovery* [interaktyvus]. 2017, 1(2), 1–8 [žiūrėta 2020-03-13]. Prieiga per doi: 10.24262/jsd.1.2.17020.
19. KAMALIROOSTA, L., et al. Chemical Identification of Citrus Peels Essential Oils. *Journal of Food Biosciences and Technology* [interaktyvus]. 2016, 6(2), 69-76 [žiūrėta 2020-03-13]. Prieiga per: http://jfbt.srbiau.ac.ir/article_8913.html.
20. HYLDGAARD, M., T. MYGIND, and R. L. MEYER. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology* [interaktyvus]. 2012, 3 (12), 1-24 [žiūrėta 2020-04-14]. Prieiga per doi: 10.3389/fmicb.2012.00012.
21. GUTIERREZ DEL RIO, I., J. FERNANDEZ, and F. LOMBO. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. *International Journal of Antimicrobial Agents* [interaktyvus]. 2018, 52, 309-315 [žiūrėta 2020-04-14]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.04.024.
22. ŠARAC, Z., et al. Biological activity of *Pinus nigra* terpenes – Evaluations of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Computers in Biology and Medicine* [interaktyvus]. 2014, 54, 72-78 [žiūrėta 2020-04-13] prieiga per doi: 10.1016/j.combiomed.2014.08.022.
23. BURT, S., et al. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* [interaktyvus]. 2004, 94, 223-253 [žiūrėta 2020-04-14]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
24. ULTEE, A., M. H. BENNIK, and R. MOEZELAAR. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied And Environmental Microbiology* [interaktyvus]. 2002, 68 (4), 1561-1568 [žiūrėta 2020-04-14]. Prieiga per doi: 10.1128/AEM.68.4.1561–1568.2002.
25. PELNAVER, P., et al. Antimicrobial activity of five essential oils against strains of the Enterobacteriaceae family. *APMIS* [interaktyvus]. 2005, 113, 1-6 [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per doi: 10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130101.x.
26. GULCIN, I., et al. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.) Food Chemistry [interaktyvus]. 2004, 87, 393-400 [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2003.12.008.
27. PEREIRA, I., et al. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [interaktyvus]. 2018, 171, 566-578 [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.001.

28. AMORATI, R., M. C. FOTI, and L. VALGIMIGLI. Antioxidant Activity of Essential Oils. *Agricultural And Food Chemistry* [interaktyvus]. 2013, 61, 10835-10847 [žiūrėta 2014-04-15]. Prieiga per doi: 10.1021/jf403496k.
29. JROVETZ, L., et al. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* [interaktyvus]. 2006, 64, 6303-6307 [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per doi: 10.1021/jf060608c.
30. LIGUORI, I., et al. Oxidative stress, aging and diseases. *Clinical Interventions in Aging* [interaktyvus]. 2018, 13, 757-772 [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per doi: 10.2147/CIA.S158513.
31. EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutical Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy Research* [interaktyvus]. 2007, 21, 308-323 [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per doi: 10.1002/ptr.2072.
32. KALINOWSKA, M., et al. Apples: Content of phenolic compounds vs. Variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry* [interaktyvus]. 2014, 84, 169-188 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: 10.1016/j.plaphy.2014.09.006.
33. KOUTSOS, A., et al. Apples and Cardiovascular Health – Is the Gut Microbiota a Core Consideration?. *Nutrients* [interaktyvus]. 2015, 7, 3959-3998 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: 10.3390/nu7063959.
34. SOLER, C., J. M. SORIANO, and J. MANES. Apple – Products Phytochemicals and Processing: A review. *Natural Product Communications* [interaktyvus]. 2009, 4 (5), 659-670 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: 10.1177/1934578X0900400504.
35. SEKHON–LOODU, S., et al. Antioxidant ability of fractionated apple peel phenolics to inhibit fish oil oxidation. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2013, 140, 189-196 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2013.02.040.
36. RANA, S., et al. Functional properties, phenolic constituents and antioxidant potential of industrial apple pomace for utilization as active food ingredient. *Food Science and Human Wellness* [interaktyvus]. 2015, 4, 180-187 [žiūrėta 2020-03-30] Prieiga per doi: 10.1016/j.fshw.2015.10.001.
37. Y. D. GARCIA, B. S. VALLES, and A. P. LOBO. Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2009, 117, 731-738 [žiūrėta 2020-03-17]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.049.
38. Y. LU, and L. Y. FOO. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2000, 68, 81-85 [žiūrėta 2020-04-17]. Prieiga per doi: 10.1016/S0308-8146(99)00167-3.
39. ZHANG, T., et al. Screening for antioxidant and antibacterial activities of phenolics from *Golden Delicious* apple pomace. *Chemistry Central Journal* [interaktyvus]. 2016, 10 (47), 1-9 [žiūrėta 2020-04-17]. Prieiga per doi: 10.1186/s13065-016-0195-7.
40. NAJAFIAN, M., et al. Phloridzin reduces blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular Biology Reports* [interaktyvus]. 2012, 39, 5299-5306 [žiūrėta 2020-04-17]. Prieiga per doi: 10.1007/s11033-011-1328-7.
41. BOYER, J., and R. H. LIU. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutritional journal* [interaktyvus]. 2004, 3 (5), 1-15 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per doi: 10.1186/1475-2891-3-5.

42. NAVEED, M., et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [interaktyvus]. 2018, 97, 67-74 [žiūrėta 2020-04-17]. Prieiga per doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.064.
43. TSAO, R., et al. Which Polyphenolic Compounds Contribute to the Total Antioxidant Activities of Apple?. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* [interaktyvus]. 2005, 53, 4989-4995 [žiūrėta 2020-04-17]. Prieiga per doi: 10.1021/jf048289h.
44. RUE, E. A., D. RUSH, and R. BREEMEN. Procyanidins: a comprehensive review encompassing structure elucidation via mass spectrometry. *Phytochemistry Reviews* [interaktyvus]. 2018, 17, 1-16 [žiūrėta 2020-04-17]. Prieiga per doi: 10.1007/s11101-017-9507-3.
45. Y. LEE. Cancer Chemopreventive Potential of Procyanidin. *Toxicological Research* [interaktyvus]. 2017, 33 (4), 273-282 [žiūrėta 2020-04-17]. Prieiga per doi: 10.5487/TR.2017.33.4.273.
46. BERNATOVA, I. Biological activities of (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health. *Biotechnology Advances* [interaktyvus]. 2018, 36, 666-681 [žiūrėta 2020-04-17]. Prieiga per doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.01.009.
47. RABETAFIKA, H. N., et al. Fractionation of apple by-products as source of new ingredients: Current situation and perspectives. *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2014, 40, 99-114 [žiūrėta 2020-04-17]. Prieiga per doi: 10.1016/j.tifs.2014.08.004.
48. CETKOVIC, G. Assesment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2008, 109, 340-347 [žiūrėta 2020-04-17]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2007.12.046.
49. SIMOES, L., et al. Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Advances in Colloid and Interface Science* [interaktyvus]. 2017, 243, 23-45 [žiūrėta 2018-11-27]. Prieiga per doi: 10.1016/j.cis.2017.02.010.
50. MITROPOULOU, G. et al. Immobilization Technologies in Probiotic Food production. *Journal of Nutrition and Metabolism* [interaktyvus]. 2013, 1-15 [žiūrėta 2018-11-27]. Prieiga per doi: 10.1155/2013/716861.
51. LINARES, D. M., et al. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2017, 8 (846) [žiūrėta 2020-04-18]. Prieiga per doi: 10.3389/fmicb.2017.00846.
52. CREMON, C., et al. Pre- and probiotic overview. *Current Opinion in Pharmacology* [interaktyvus]. 2018, 43, 87-92. [žiūrėta 2018 - 11 - 27]. Prieiga per doi: 10.1016/j.coph.2018.08.010.
53. QUIGLEY, E., et al. Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2018-11-27]. Prieiga per doi: doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.028.
54. GODHIA, M. L., and N. PATEL. Colostrum – Its Composition, Benefits As A Nutraceutical: A Review. *Current Research in Nutrition and Food Science* [interaktyvus]. 2013, 1 (1), 37-47 [žiūrėta 2020-04-18]. Prieiga per doi: 10.12944/CRNFSJ.1.1.04.
55. MCGRATH, B. A., et al. Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Science & Technology* [interaktyvus]. 2016, 96, 133-158 [žiūrėta 2020-04-18]. Prieiga per doi: 10.1007/s13594-015-0258-x.

56. BAGWE, S., et al. Bovine colostrum: an emerging nutraceutical. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* [interaktyvus]. 2015, 12 (3), 175-185 [žiūrėta 2020-04-19]. Prieiga per doi: 10.1515/jcim-2014-0039.
57. PEREIRA, P. C., et al. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* [interaktyvus]. 2014, 30, 619-627 [žiūrėta 2020-04-19]. Prieiga per doi: 10.1016/j.nut.2013.10.011.
58. FLORIS, R., et al. Trends in infant formulas a dairy perspective. In: GRIFFITHS, Mansel W. *Improving the Safety and Quality of Milk* [interaktyvus]. Cambridge: Woodhead Publishing, 2010, pp.454-474 [žiūrėta 2020-04-20]. ISBN 978-1-84569-438-8. Prieiga per doi: 10.1533/9781845699437.3.454.
59. URUAKPA, F. O., M. A. H. ISMOND, and E. N. T. AKOBUNDU. Colostrum and its benefits: a review. *Nutrition Research* [interaktyvus]. 2002, 22, 755-767 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per doi: 10.1016/S0271-5317(02)00373-1.
60. HARVEY, E. I., and E. I. FILONZI. Determination of lactoferrin in bovine milk, colostrum and infant formulas by optical biosensor analysis. *International Dairy Journal* [interaktyvus]. 2005, 15, 429-438 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per doi: 10.1016/j.idairyj.2004.09.003.
61. PRZYBYLSKA, J., E. ALBERA, and M. KANKOFER. Antioxidants in Bovine Colostrum. *Reproductin in Domestic Animals* [interaktyvus]. 2007, 42, 402-409 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00799.x.
62. MURATA, M., et al. Identification of milk proteins enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2013, 96, 4891-4898 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per doi: 10.3168/jds.2013-6612.
63. TAGLIAZUCCHI, D., et al. Bovine milk antioxidant properties: effect of in vitro digestion and identification of antioxidant compounds. *Dairy Science and Technology* [interaktyvus]. 2016, 96, 657-676 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per doi: 10.1007/s13594-016-0294-1.
64. CHIANG, S., and C. CHANG. Antioxidant Properties of Caseins and Whey Proteins from Colostrums. *Journal of Food and Drug Analysis* [interaktyvus]. 2005, 13 (1), 57-63 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per: www.researchgate.net/publication/268375156_Antioxidant_Properties_of_Caseins_and_Whey_Proteins_from_Colostrums.
65. INAGAKI, M., et al. Bovine κ -casein inhibits human rotavirus (HRV) infection via direct binding of glycans to HRV. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2014, 97, 2653-2661 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per doi: 10.3168/jds.2013-7792.
66. DE VOS, P., et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* [interaktyvus]. 2010, 20, 292-302 [žiūrėta 2018-11-27]. Prieiga per doi: 10.1016/j.idairyj.2009.11.008
67. TIMILSENA, Y. P., et al. Complex coacervation: principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules* [interaktyvus]. 2019, 121, 1276-1286 [žiūrėta 2020-04-21]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144.
68. MADENE, A., et al. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2016, 41, 1-21 [žiūrėta 2020-04-21]. Prieiga per doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x.
69. DONSI, F., and G. FERRARI. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food, *Journal of Biotechnology* [interaktyvus]. 2016, 233, 106-120 [žiūrėta 2020-04-21]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.005.

70. DIMA, C., and S. DIMA. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science* [interaktyvus]. 2015, 5, 29-35 [žiūrėta 2020-04-22]. Prieiga per doi:10.1016/j.cofs.2015.07.003.
71. SHAH, B., M. DAVIDSON, and Q. ZHONG. Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against Escherichia coli O157: H7 and Listeria monocytogenes in bovine milk. *International Journal of Food Microbiology* [interaktyvus]. 2013, 161, 53-59 [žiūrėta 2020-04-22]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.020.
72. DONSI, F., et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2011, 44, 1908-1914 [žiūrėta 2020-04-22]. Prieiga per doi: 10.1016/j.lwt.2011.03.003.
73. OTON, C. G., et al. Edible Films from Methylcellulose and Nanoemulsions of Clove Bud (*Syzygium aromaticum*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils as Shelf Life Extenders for Sliced Bread. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* [interaktyvus]. 2014, 62, 5214–5219 [žiūrėta 2020-04-23]. Prieiga per doi: 10.1021/jf501055f.
74. LIU, L.S. et al. Hydrogels from Biopolymer Hybrid for Biomedical, Food, and Functional Food Applications. *Polymers* [interaktyvus]. 2012, 4, 997-1011 [žiūrėta 2018-10-20]. Prieiga per doi: 10.3390/polym4020997.
75. BUREY, P., et al. Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [interaktyvus]. 2008, 48 (5), 361-377. Prieiga per doi: 10.1080/10408390701347801.
76. SHARPE, L. A., et al. Therapeutic applications of hydrogels in oral drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* [interaktyvus]. 2014, 11 (6), 901-915 [žiūrėta 2020-04-23]. Prieiga per doi: 10.1517/17425247.2014.902047.
77. VERMONDEN, T., R. CENSI, and W. E. HENNINK. Hydrogels for Protein Delivery. *CHEMICALS REVIEWS* [interaktyvus]. 2012, 112, 2853-2888 [žiūrėta 2018-10-20]. Prieiga per doi: 10.1021/cr200157d.
78. GULREZ, S. K. H., et al. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. In: CARPI, Angelo. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications* [interaktyvus]. Rijeka: InTech, 2011, pp. 118-150 [žiūrėta 2020-04-23]. ISBN 978-953-307-268-5. Prieiga per doi: 10.5772/771.
79. LYU, F., et al. Apple Pomace as a Functional and Healthy Ingredient in Food Products: A Review. *Processes* [interaktyvus]. 2020, 8, 319 [žiūrėta 2020-04-23]. Prieiga per doi: doi:10.3390/pr8030319. .
80. ALONGI, M., S. MELCHIOR, and M. ANESE. Reducing the glycemic index of short dough biscuits by using apple pomace as a functional ingredient. *Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2019, 100, 300-305 [žiūrėta 2020-04-24]. Prieiga per doi: 10.1016/j.lwt.2018.10.068.
81. KTENIOUDAKI, A., N. OSHEA, and E. GALLAGHER. Rheological properties of wheat dough supplemented with functional by-products of food processing: Brewer's spent grain and apple pomace. *Journal of Food Engineering* [interaktyvus]. 2013, 116, 362-368 [žiūrėta 2020-04-23]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.12.005.
82. ROYER, G., et al. Preliminary study of the production of apple pomace and quince jelly. *LWT* [interaktyvus]. 2006, 39, 1022-1025 [žiūrėta 2020-04-24]. Prieiga per doi: 10.1016/j.lwt.2006.02.015.

83. WANG, X., E. KRISTO, and G. LAPOINTE. The effect of apple pomace on the texture, rheology and microstructure of set type yogurt. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2019, 91, 83-91 [žiūrėta 2020-04-24]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.01.004.
84. KASTNER, H., U. EINHORN-STOLL, and S. DRUSCH. Structure formation in sugar containing pectin gels – Influence of gel composition and cooling rate on the gelation of non-amidated and amidated low-methoxylated pectin. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2017, 73, 13-20 [žiūrėta 2020-04-24]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.06.023.
85. ZENTEK, J., et al. Reducing waste in fresh produce processing and households through use of waste as animal feed. In: HOORFAR, Jeffrey. *Global Safety of Fresh Produce A Handbook of Best Practice, Innovative Commercial Solutions and Case Studies* [interaktyvus]. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014, pp. 140-152 [žiūrėta 2020-04-24]. ISBN 978-1-78242-018-7. Prieiga per doi: 10.1533/9781782420279.2.140.
86. HARTEL, Richard W., Joachim H. Von ELBE, and Randy HOFBERGER. *Confectionery Science and Technology* [interaktyvus]. 1 ed. Cham: Springer, 2018 [žiūrėta 2020-03-20]. ISBN 978-3-319-61742-8. Prieiga per doi: 10.1007/978-3-319-61742-8_12.
87. MILANI, Jafar and Gisoo MALEKI. Hydrocolloids in Food Industry. In: VALDEZ, Benjamin. *Food Industrial Processes - Methods and Equipment* [interaktyvus]. London: IntechOpen, 2012, pp. 18-38 [žiūrėta 2020-04-26]
88. KWIECIEN, I., and M. KWIECIEN. Application of Polysaccharide-Based Hydrogels as Probiotic Delivery Systems. *Gels* [interaktyvus]. 2018, 4, 47 [žiūrėta 2020-04-26]. Prieiga per doi: 10.3390/gels4020047.
89. HANG, I. J., and K. I. DRAGET. Gelatin. In: PHILLIPS, G. O., and P. A. WILLIAMS. *Handbook of Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2nd ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2009, pp. 142-163 [žiūrėta 2020-04-26]. ISBN 978-1-84569-414-2. Prieiga per doi: 10.1533/9781845695873.142.
90. ALLWYN SUNDAR RAJ, A., et al. A Review on Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses. *Open Access Scientific Reports* [interaktyvus]. 2012, 1 (12), 1-4 [žiūrėta 2020-04-26] Prieiga per doi: 10.4172/scientificreports.550.
91. YULIARTI, O., et al. Influence of pH, pectin and Ca concentration on gelation properties of low-methoxyl pectin extracted from *Cyclea barbata* Miers. *Food Structure* [interaktyvus]. 2017, 11, 16-23 [žiūrėta 2020-04-26]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foostr.2016.10.005
92. CAI, L., et al. Confectionery gels: Effects of low calorie sweeteners on the rheological properties and microstructure of fish gelatin. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2017, 67, 157-165 [žiūrėta 2020-04-26]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.12.031.
93. AMJADI, S., et al. Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2018, 256, 156-162 [žiūrėta 2020-04-26] Prieiga per doi: /10.1016/j.foodchem.2018.02.114.
94. ALTAY, F., and S. GUNASEKARAN. Gelling properties of gelatin–xanthan gum systems with high levels of co-solutes. *Journal of Food Engineering* [interaktyvus]. 2013, 118, 289-295 [žiūrėta 2020-04-26]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.04.018.
95. KAMER, D. D. A., et al. Effect of confectionery solutes on the rheological properties of fish (*Oncorhynchus mykiss*) gelatin. *Food Science and Technology*[interaktyvus]. 2019, 101, 499-505 [žiūrėta 2020-04-26]. Prieiga per doi: /10.1016/j.lwt.2018.11.046.
96. BARTKIENE, E., et al. Development of antimicrobial gummy candies with addition of bovine colostrum, essential oils and probiotics. *International Journal of Food Science +*

- Technology* [interaktyvus]. 2018, 53, 1227-1235 [žiūrėta 2020-02-05]. Prieiga per doi: 10.1111/ijfs.13701.
97. STANKOVIC, M. S., et al. 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 Equipment* [interaktyvus]. 2011, 25 (1), 2222-2227 [žiūrėta 2019-10-25]. Prieiga per doi: 10.5504/bbeq.2011.0020.
 98. LAVELLI, V., and 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 2019-10-25]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2011.06.011.
 99. RE, R., et al. Antioxidant Activity Applying An Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine* [interaktyvus]. 1999, 26, 1231-1237 [žiūrėta 2019-10-25]. Prieiga per doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
 100. FU, Y., et al. Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination. *Phytotherapy Research* [interaktyvus]. 2007, 21, 989-994 [žiūrėta 2019-10-01]. Prieiga per doi: 10.1002/ptr.2179.
 101. BARTKIENE, E., et al. The impact of lactic acid bacteria with antimicrobial properties on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and biogenic amines in cold smoked pork sausages. *Food Control* [interaktyvus]. 2017, 71, 285-292 [žiūrėta 2019-10-01]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodcont.2016.07.010.
 102. VINAUSKIENĖ, Rimantė. *Mėsos mokslas ir technologija* [interaktyvus]. Kaunas: Technologija, 2019 [žiūrėta 2019-10-15]. ISBN 978-609-02-1658-3. Prieiga per: <https://www.ebooks.ktu.lt/einfo/1510/mesos-mokslas-ir-technologija-laboratoriniai-darbai/>.
 103. PALAUSKIENĖ, Aurelija. *MAISTO CHEMIJA: Laboratorinių darbų aprašas* [interaktyvus]. Kaunas: ASU Leidybos centras, 2012 [žiūrėta 2019-10-15]. Prieiga per: http://dspace.lzuu.lt/bitstream/1/2076/1/MAISTO%20CHEMIJA_lab..pdf.
 104. WALKER, John M. *The Protein Protocols Handbook*. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2002. ISBN 0-89603-940-4.
 105. BAGDONIENĖ, Lida, et. al. *BIOCHEMIJOS laboratoriniai darbai* [interaktyvus]. Vilnius: Vilniaus Universiteto leidykla, 2006 [žiūrėta 2019-09-10]. Prieiga per: <http://www.bmbk.gf.vu.lt/wp-content/uploads/2013/04/Biochemijos-laboratoriniai-darbai.pdf>.
 106. *Stable Micro Systems: How to measure Firmness, Softness, Hardness and Ripenes. How to Measure Cohesiveness* [interaktyvus]. 2020, [žiūrėta 2020-02-05]. Prieiga per: <https://www.stablemicrosystems.com/MeasureFirmness.html>.
 107. *Stable Micro Systems: How to measure Consistency* [interaktyvus]. 2020, [žiūrėta 2020-02-05]. Prieiga per: <https://www.stablemicrosystems.com/MeasureConsistency.html>.
 108. *Stable Micro Systems: How to Measure Cohesiveness* [interaktyvus]. 2020, [žiūrėta 2020-02-05]. Prieiga per <https://www.stablemicrosystems.com/MeasureCohesiveness.html>.
 109. CHAVARIZI, 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 2019-02-25]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022
 110. PLOVIC, N., et al. Acid-formed pectin gel delays major incomplete kiwi fruit allergen Act c 1 proteolysis in in vitro gasatrintestinal digestion . *Journal of the Science of Food and*

- Agriculture* [interaktyvus]. 2009, 89, 8-14 [žiūrėta 2019-02-25]. Prieiga per doi: 10.1002/jsfa.3404.
111. CETIN, B., et al. The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* [interaktyvus]. 2011, 35, 145-154 [žiūrėta 2020-02-20]. Prieiga per doi: 10.3906/tar-0906-162.
 112. SHAHZAD, K., et al. Evaluation Of Antibacterial, Antifungal And Antioxidant Activity Of Essential Oil Of *Citrus Reticulata* Fruit (Tangerine Fruit Peel). *Pharmacology online* [interaktyvus]. 2009, 3, 614-622 [žiūrėta 2020-02-20]. Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/283205348>.
 113. KADARIYA, J., et al. Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International* [interaktyvus]. 2014, 827965, 1-9 [žiūrėta 2020-02-21]. Prieiga per doi: 10.1155/2014/827965.
 114. CHAMBERS, H. F., and F. R. DELEO. Waves of Resistance: Staphylococcus aureus in the Antibiotic Era. *Nature Reviews Microbiology* [interaktyvus]. 2009, 7(9), 629-641 [žiūrėta 2020-02-20]. Prieiga per doi:10.1038/nrmicro2200.
 115. LIAUDANSKAS, M., et al. Application of an Optimized HPLC Method for the Detection of Variuos Phenolic Compounds in Apples from Lithuanian Cultivars. *Journal of Chemistry* [interaktyvus]. 2014, 542121, 1-11 [žiūrėta 2020-02-20]. Prieiga per doi: 10.1155/2014/542121.
 116. RAPHAELLI, C. O., et al. Antibacterial and antioxidant properties of phenolic – rich extracts from apple (*Malus domestica* cv Gala). *International Food Research Journal* [interaktyvus]. 2019, 25(4), 1133-1142 [žiūrėta 2020-01-15]. Prieiga per: [http://www.ifrj.upm.edu.my/26%20\(04\)%202019/3%20-%20IFRJ18943.R1-Final.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/26%20(04)%202019/3%20-%20IFRJ18943.R1-Final.pdf).
 117. BAI, X., H. ZHANG, and S. REN. Antioxidant activity and HPLC analysis of polyphenol – enriched extracts from industrial apple pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [interaktyvus]. 2013, 93, 2502-2506 [žiūrėta 2020-01-15]. Prieiga per doi: 10.1002/jsfa.6066.
 118. KAMIZAKE, N. K. K., et al. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between th Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis* [interaktyvus]. 2003, 16, 507-516 [žiūrėta 2020-02-15]. Prieiga per doi: 10.1016/S0889-1575(03)00004-8.
 119. ZAYAS, Joseph F. *Functionality of proteins in food* [interaktyvus]. Berlin: Springer, 1997 [žiūrėta 2020-02-17]. ISBN 978-3-642-59116-7. Prieiga per doi: 10.1007/978-3-642-59116-7.
 120. YADAV, R., et al. Antibacterial and Antiinflammatory Properties of Bovine Colostrum. *Recent Patents on Endocrine Metabolic & Immune Drug Discovery* [interaktyvus]. 2016, 10, 1-6 [žiūrėta 2019-10-12]. Prieiga per doi: 10.2174/1872214810666160219163118.
 121. HOOIJDONK, A. C. M., et al. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *British Journal of Nutrition* [interaktyvus]. 2000, 84 (1), 127-134 [žiūrėta 2019-10-12]. Prieiga per doi: 10.1017/S000711450000235X.
 122. JRAD, Z., et al. Effect of digestive enzymes on antimicrobial, radical scavenging and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of camel colostrum and milk proteins. *Dairy Science and Technology* [interaktyvus]. 2014, 94, 205-224 [žiūrėta 2019-10-13]. Prieiga per doi: 10.1007/s13594-013-0154-1.