



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Valgomojo sausmedžio (lot. *Lonicera caerulea*) sulčių ir išspaudų bioaktyvių sudėtinių dalių ir savybių įvertinimas, taikant aukšto slėgio ekstrakcijos ir mikroįkapsuliavimo metodus

Baigiamasis magistro projektas

Indrė Sokolovaitė

Projekto autorė

Lekt. Dr. Milda Pukalskienė

Vadovė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Valgomojo sausmedžio (lot. *Lonicera caerulea*) sulčių ir išspaudų bioaktyvių sudėtinių dalių ir savybių įvertinimas, taikant aukšto slėgio ekstrakcijos ir mikroįkapsuliavimo metodus

Baigiamasis magistro projektas
Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

Indrė Sokolovaitė

Projekto autorė

Lekt. Dr. Milda Pukalskienė

Vadovė

Lekt. Viktorija Eisinaitė

Recenzentė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Indrė Sokolovaitė

Valgomojo sausmedžio (lot. *Lonicera caerulea*) sulčių ir išspaudų bioaktyvių sudėtinių dalių ir savybių įvertinimas, taikant aukšto slėgio ekstrakcijos ir mikroįkapsuliavimo metodus

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Indrės Sokolovaitės, baigiamasis projektas tema „Valgomojo sausmedžio (lot. *Lonicera caerulea*) sulčių ir išspaudų bioaktyvių sudėtinių dalių ir savybių įvertinimas, taikant aukšto slėgio ekstrakcijos ir mikroįkapsuliavimo metodus“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Indrė Sokolovaitė. Valgomojo sausmedžio (lot. *Lonicera caerulea*) sulčių ir išspaudų bioaktyvių sudėtinių dalių ir savybių įvertinimas, taikant aukšto slėgio ekstrakcijos ir mikroįkapsuliavimo metodus. Magistro baigiamasis projektas vadovė lekt. dr. Milda Pukalskienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: sausmedžio išspaudos, fenoliniai junginiai, antioksidacinis aktyvumas, mikroįkapsuliavimas, antocianinai, ekstrakcija.

Kaunas, 2020. 77 p.

Santrauka

Perdirbant augalinės kilmės žaliavas maisto pramonėje ir gaminant įvairius maisto produktus, neretai susidaro šalutiniai produktai. Technologinio sulčių perdirbimo metu šalutiniai produktai panaudojami labai neefektyviai, kadangi dalis išspaudų tiesiog šiuo metu pašalinamos į atliekas, kompostuojamos trąšoms ar panaudojamos pašarams. Atsižvelgiant į mokslinius tyrimus, sausmedžio išspaudose gausu bioaktyvių junginių. Būtent todėl tiek ekologiniu, tiek ekonominiu požiūriu išspaudų išmetimas nėra tinkamas sprendimas, nes didelis kiekis susikoncentravusių atliekų mažoje teritorijoje gali sukelti taršos pavojų, kadangi irdamos atliekos į aplinką skleidžia dujinius teršalus (amoniaką, sieros vandenilį, lakius organinius junginius ir kt.), o taip pat šių atliekų laikymas nuostolingas, nes tam užimama teritorija ir jų priežiūra reikalauja papildomų išlaidų. Tuo tarpu sausmedžio išspaudos gali būti perdirbamos panaudojant efektyvias technologijas į puikius ir pridėtinės vertės produktus, kurie teigiamai veikia sveikatą.

Šio tyrimo tikslas buvo sukurti stabilią sausmedžio (lot. *Lonicera caerulea*) perdirbimo technologiją ir nustatyti sulčių, išspaudų ir ekstraktų antioksidacines savybes, fitocheminę sudėtį ir pritaikyti mikroįkapsuliavimo metodą.

Pirmiausia sausmedžio uogos buvo išspaudžiamos lėtaeige sulčiaspaude, kad atskirtume sultis nuo išspaudų; pastarosios buvo džiovinamos ir ekstrahuojamos superkritiniu anglies dioksidu (SKE-CO₂) ir ekstrahuotos šiuoaliniu suslėgto skysčio (EPS) metodu panaudojant heksaną, etanolį ir vandenį.

Tyrimo metu buvo nustatyta sausmedžio išspaudų cheminė sudėtis: drėgmės kiekis – 11,2 %, riebalų kiekis – 11,7 %, baltymų kiekis – 10,4 %, mineralinių medžiagų – 4,8 % ir skaidulinių medžiagų kiekis – 8,2 % išspaudose buvo tirtas oficialiais AOAC metodais.

Tyrimo metu buvo nustatytos išspaudų, jų liekanų po ekstrakcijų ir gautų ekstraktų antioksidacines savybės DPPH•, ABTS•+ katijono radikalo blukinimo metodai, o taip pat nustatyta deguonies radikalo surišimo geba ORAC metodais. Gauti rezultatai išreikšti mg Trolokso ekvivalentų. Gerai žinomas *Folin–Ciocalteu* metodas buvo taikomas nustatant bendrą fenolinių junginių kiekį, o rezultatai išreikšti mg Galo rūgšties ekvivalentų (GRE)/g.

Kokybinė ir kiekybinė riebalų rūgščių ir lakių junginių sudėtis ekstraktuose buvo tirta dujų chromatografija (DC). Triacilgliceroliai, askobro rūgštis ir antocianinai buvo tirti taikant ultra efektyviąją skysčių chromatografiją (UESC) kartu su kvadripoliniu skriejimo laiko masių detektoriumi (QTOF). Sausmedžio ekstraktų lakiųjų medžiagų sudėtis buvo analizuota DC-TOF/MS.

Atlikus kokybinę riebalų rūgščių analizę SK - CO₂ ekstraktuose buvo identifikuotos kelios pagrindinės rūgtštys, tokios kaip oleino, palmitino, linolo, kaprio, kaprilo, kaprino ir miristinės, o tuo tarpu pagrindiniai triacilgliceroliai buvo LLn, LLL, OLL, OOO, PLL, PLO, POO.

Taikant sausmedžio sulčių kokybinę analizę buvo identifikuoti šeši antocianai, tačiau vienas iš pagrindinių yra cianidin-3-gliukozidas. Sausmedžio ekstraktuose buvo nustatyta daugiau kaip 50 lakiųjų junginių, susidedančių iš alkanų, aldehydų, monokarboksirūgščių, esterių, alkoholių, terpenų, aromatinių ir kitų. Pagrindinis junginys sudarė 47,2 ir 42,3% visų lakiųjų medžiagų tik preliminariai buvo identifikuotas kaip n-alkano dotriacontane SK - CO₂ ekstrakto.

Taikant paviršiaus atsako eksperimentinę planavimo metodiką, buvo sudarytas mikroįkapsuliavimo planas, kuriuo remiantis buvo nustatomos optimalios mikroįkapsuliavimo sąlygos, nustatant didžiausią antocianinų įkapsuliavimo efektyvumą ir išėigas optimizuojant sudėtinių – komponentų maltodekstrino ir sojos baltymų izoliato kiekius.

Sokolovaitė Indrė. Evaluation of Bioactive Components and Properties of Honeysuckle (lot. *Lonicera caerulea*) Juice and Pomace by High Pressure Extraction and Microencapsulation Methods / supervisor lect. Dr. Milda Pukalskienė; Faculty of the Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: pomace of honeysuckle, phenolic compounds, antioxidant activity, microencapsulation, anthocyanins, extraction.

Kaunas, 2020. 77 p.

Summary

The processing of plant-based raw materials in the food industry and making various food products often results by-products. In the technological processing of juices, the by-product are used not efficiently, because some of pomace are simply disposed in waste, composted or used for animal feed. According to scientific researches, pomace of honeysuckle are rich of bioactive compounds. This is why, from both, an ecological and economical point of view, the waste of pomace is not the right solution, because large amounts of concentrated wastes in a small area can pose a risk of pollution (ammonia, hydrogen sulphide, volatile organic compound and etc. are released into air); also the storage of waste is loss-making, because it takes a lot of area to storage and its maintenance require additional cost. Meanwhile, pomace of honeysuckle can be recycle using efficient technologies into excellent and value product that have a positive effect on human health.

The aim of this Master's project was to develop sustainable honeysuckle (*Lonicera caerulea*) mikroencapsulation technology and to evaluate the antioxidant capacity, phytochemical composition of juices, pomace and extracts.

Firstly, honeysuckle berries were pressed to separate juice from the pomace; the latter were dried and consecutively extracted by supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) and pressurized liquid (PLE) extraction methods; the latter was applied to the whole pomace and to after SC-CO₂ residue consecutively using ethanol and water.

Proximate analysis showed that dried honeysuckle pomace contain: moisture 11,2 %, lipids 11,7 %, proteins 10,4 % ash 5,3 % and crude fibers – 8,2 % was determined by the official AOAC methods.

Antioxidant properties of the juice and extracts were evaluated by the DPPH[•], ABTS^{•+} scavenging and ORAC assays and the results are expressed in mg Trolox equivalents per gram, total phenolic content (TPC) was determined by Folin-Ciocalteu methods and the results are expressed in mg of gallic acid equivalent per gram. The extracts were subjected to the traditional procedure and to solid fraction – QUENCHER procedure.

The composition of fatty acids and volatile compounds in extracts was determined by gas chromatography, triacylglycerols, ascorbic acid, anthocyanins by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) coupled with time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF). The composition of volatiles of honeysuckle extracts was analyzed by GC-TOF/MS. Fatty acids in SC-CO₂ extract were oleic, palmitic, linoleic, caproic, caprylic, capric, and myristic acids, while the main identified triacylglycerols were LLLn, LLL, OLL, OOL, OOO, PLL, PLO, POO.

Six anthocyanins were identified in honeysuckle juice, cyanidin-3-glucoside being the main anthocyanin. More than 50 volatile compounds, consisting of alkanes, aldehydes, monocarboxylic

acids, esters, alcohols, terpenes, aromatics and others, were identified in honeysuckle extracts. The major compound constituted 47.2 and 42.3% of total volatiles was only tentatively identified as *n*-alkane dotriacontane in SC-CO₂ extract.

Using the experimental planning methodology of surface response was developed microencapsulation plan. On the basis of plan were determined optimal microencapsulation conditions by determining maximum efficiency and yields of anthocyanins by optimizing the amounts of maltodextrin and soy protein isolate.

TURINYS

LENTELIŲ SĄRAŠAS	10
PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	11
SANTRUMPŲ IR TERMINŲ SĄRAŠAS	12
ĮVADAS	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1. Mėlynojo sausmedžio (lot. <i>Lonicera caerulea</i>) paplitimas ir panaudojimas pramonėje	15
1.2. Sausmedžio biocheminė sudėtis.....	16
1.3. Antocianų bendra apžvalga, struktūra ir paplitimas augaliniame pasaulyje	19
1.4. Sausmedyje esančių veikliųjų medžiagų farmakologinis poveikis	20
1.4.1. Antioksidacinis poveikis	22
1.5. Veikliųjų medžiagų išskyrimo būdai.....	23
1.6. Mikroįkapsuliavimo technologija	25
1.6.1. Procesų optimizavimas.....	27
2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI	29
2.1. Tyrimo objektas.....	29
2.2. Cheminiai reagentai ir medžiagos	29
2.3. Tyrimo metodai	30
2.3.1 Padidinto slėgio skysčių ekstrakcija organiniais tirpikliais (EPS).....	31
2.3.2 Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE – CO ₂)	32
2.4 Bioaktyvių junginių analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UESC-Q-TOF)	33
2.4.1. Askorbo rūgšties nustatymas taikant aukšto slėgio efektyviosios skysčių chromatografijos su diodų masės matricos detektoriumi metodą.....	33
2.4.2. Ultra efektyvioji skysčių chromatografija – masių spektrometrija	33
2.5 Tirpių sausų medžiagų/sacharidų kiekybinis nustatymas	34
2.6 Ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas	34
2.6.1. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK)	34
2.6.2 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH [*]) radikalų sujungimo metodas	35
2.6.3 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties ABTS ^{•+} laisvųjų radikalų sujungimo metodas.....	35
2.6.4. Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas (ORAC).....	36
2.7 Kietosios frakcijos antioksidacinės gebos įvertinimas.....	36
2.8 Kietosios frakcijos cheminės sudėties nustatymas.....	37
2.8.1. Baltymų kiekio nustatymas	37
2.8.2 Riebalų kiekio nustatymas Soksleto metodu.....	37

2.8.3 Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas	37
2.8.4 Drėgmės kiekio nustatymas	37
2.8.5. Skaidulinių medžiagų nustatymas	38
2.9 Dujų chromatografija	38
2.9.1. Riebalų rūgščių (RR) sudėties nustatymas dujų chromatografijos (DJ – LJD) metodu	38
2.9.2 Lakiųjų junginių nustatymas	39
2.10 Antocianinų mikroįkapsuliavimo efektyvumo nustatymas naudojant džiovinimo šalčiu metoda.....	39
2.11 Antocianinų mikroįkapsuliavimo proceso optimizavimas	40
2.12 Rezultatų statistinė analizė	41
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	42
3.1. Sausmedžio išspaudų sudėtis	42
3.2. Sausmedžio sulčių, išėigos, vitamino C ir sausųjų tirpių medžiagų koncentracija.....	42
3.3. Ekstraktų išėigos	43
3.4. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas.....	44
3.5. Triacilglicerolių sudėties nustatymas lipofiliniuose ekstraktuose.....	46
3.6. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	47
3.7. Mikroįkapsuliavimo eksperimentinio modelio ir optimalių sąlygų įvertinimas	53
3.8. Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė.....	59
3.9. Lakiųjų junginių analizė	63
IŠVADOS	66
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	68
PRIEDAI.....	77

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Šviežių mėlynojo sausmedžio uogų analizė, atlikta AOAC metodu [11].....	17
2 lentelė. Mėlynojo sausmedžio uogų tyrimų modeliai atlikti in vivo ir in vitro sistemose [17].....	22
3 lentelė. Nepriklausomų kintamųjų užkodavimas optimizuojant mikroįkapsuliavimo procesą.....	40
4 lentelė. Išspaudų cheminės sudėtis	42
5 lentelė. Riebalų rūgščių (RR) sudėtis sausmedžio išspaudų SK–CO ₂ ekstrakte	45
6 lentelė. Triacilglicerolių sudėtis išspaudų EPS heksaniniame ir SK–CO ₂ ekstraktuose.....	46
7 lentelė. Sausmedžio sulčių mikroįkapsuliavimo optimizavimo modelis atliekant mikroįkapsuliavimą pagal centriškai kompozicinį planavimo modelį.....	53
8 lentelė. Centriškai kompozicinio modelio dispersinė analizė pagal kintamąsias vertes.....	54
9 lentelė. Centriškai kompozicinio modelio dispersinė analizė pagal kintamąsias vertes (atsakas mikroįkapsuliavimo efektyvumas).....	56
10 lentelė. Antocianinų regeneravimas.....	59
12 lentelė. Ekstraktuose identifikuoti antocianinai mg/100 g ekstrakto.....	62
11 lentelė. Sausmedžio išspaudų SK-CO ₂ ir EPS heksaniniame ekstrakte esantys lakieji junginiai mg/kg išspaudų arba %.	63

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Mėlynojo sausmedžio uogos [14]	15
2 pav. Dažniausiai mėlynojo sausmedžio uogose randamų antocianinų cheminės struktūros: a) cianidin-3-gliukozidas, b) cianidin-3-rutinozias, c) peonidin-3-gliukozidas, d) peonidin-3-rutinozidas, e) pelargonidi-3-gliukozidas, f) cianidin-3,5,-digliukozidas [18]	18
3 pav. Antocianidinų bendroji struktūrinė formulė [18].....	19
4 pav. Antocianinų cheminės formos, priklausančios nuo pH ir skilimo reakcijos antocianinams. Kur R1 = H arba sacharidas, R2 ir R3 = H arba metilas [33]	20
5 pav. Antocianidinų struktūra ir pakaitų išsidėstymas turintis įtakos antioksidaciniam poveikiui ..	23
6 pav. EPS proceso stadijos	24
7 pav. Skirtumai tarp mikrokapsulės ir mikrosferos [75]	26
8 pav. Maltodekstrino formulė.....	26
9 pav. Sausmedžio uogų paruošimo schema	29
10 pav. Vykdytų eksperimentų schema	31
11 pav. Padidinto slėgio skysčių ekstrakcijos organiniais tirpikliais principinė schema	32
12 pav. Identifikuotos riebalų rūgštys.....	45
13 pav. Trigliceridų smailės chromatogramoje SK–CO2 ekstrakto	47
14 pav. Superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginio sausmedžio išspaudose išėigų kreivė	43
15 pav. Skirtingų ekstrakcijų metu gautos išėigos.....	44
16 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis sausmedžio sultyse, liofilizuotose sultyse ir ekstraktuose	48
17 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH• metodu sausmedžio sultyse ir ekstraktuose	49
18 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS•+ metodu sausmedžio sultyse ir ekstraktuose	50
19 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ORAC metodu ekstraktuose	51
20 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis išspaudose ir po ekstrakcijų likusioje kietoje frakcijoje.	52
21 pav. Kietosios frakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH• metodu	52
22 pav. Mikroįkapsuliavimo atsako plotas 3D, parodantis išėigos priklausomybę nuo optimizuojamų parametrų (maltodekstrino ir sojų baltymu izoliato kiekio).....	55
23 pav. Mikroįkapsuliavimo atsako plotas 2D, parodantis išėigos priklausomybę nuo optimizuojamų parametrų (maltodekstrino ir sojų baltymu izoliato kiekio).....	55
24 pav. Matematinio modelio nuspėjamo ir faktinio mikroįkapsuliavimo efektyvumo palyginimas	57
25 pav. Mikroįkapsuliavimo atsako plotas 3D, parodantis mikroįkapsuliavimo efektyvumo priklausomybę nuo optimizuojamų parametrų.....	57
26 pav. Mikroįkapsuliavimo atsako plotas 2D, parodantis mikroįkapsuliavimo efektyvumo priklausomybę nuo optimizuojamų parametrų.....	58
27 pav. Sultyse identifikuoti antocianinai.....	60
28 pav. Trigliceridų smailės chromatogramoje EPS heksaniniame ekstrakto	77

SANTRUMPŲ IR TERMINŲ SĄRAŠAS

- AAPh – 2,2'-azobio (2-aminodinipropano) dihidrochloridas;
- ABTS^{•+} - 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties katijono laisvasis radikalas;
- BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis;
- DJ–LDJ – dujų chromatografija;
- DPPH[•] - 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas;
- EPS – ekstrakcija padidintame slėgyje;
- EPS EtOH – etanolinis ekstraktas, kuris gautas ekstrahuojant padidintame slėgyje;
- EPS H₂O – vandeninis ekstraktas, kuris gautas ekstrahuojant padidintame slėgyje;
- EPS hex – heksaninis ekstraktas, kuris gautas ekstrahuojant padidintame slėgyje;
- EtOH – po ekstrakcijos su etanolium gautas ekstraktas;
- GRE – galo rūgšties ekvivalentai;
- ORAC – deguonies radikalų absorbcijos geba;
- PBS – buferinis tirpalas antioksidaciniam aktyvumui nustatyti;
- SK–CO₂ – superkritinis anglies dvideginio ekstraktas;
- SK–CO₂ EtOH – po SKE–CO₂ likusios kietosios frakcijos padidintu slėgiu ekstrakcijos su etanolium gautas ekstraktas;
- SK–CO₂ H₂O – po SKE–CO₂ likusios kietosios frakcijos padidintu slėgiu ekstrakcijos su vandeniu gautas ekstraktas;
- SKE–CO₂ – superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu;
- SM – sausos medžiagos;
- UESC–MS – ultra efektyvioji skysčių chromatografija ir masių spektrometrija;
- SN – standartinis nuokrypis
- TE – trolokso ekvivalentai;
- UESC–Q–TOF – ultra efektyvioji skysčių chromatografija su kvadrupoliniu skriejimo laiko masių detektoriumi ;
- UESC – ultra efektyvioji skysčių chromatografija;
- UV – ultravioletiniai spinduliai.

IVADAS

Daugelio mokslinių tyrimų rezultatai patvirtina PSO rekomendacijas, jog derėtų didinti daržovių bei vaisių suvartojimą (PSO, 2013). PSO rekomenduoja suvartoti nemažiau nei 400g daržovių ir vaisių kiekvieną dieną, kadangi toks kiekis (5–7 porcijos per dieną) sumažina mirties riziką dėl įvairių priežasčių. Uogos pasižymi mažu kaloringumu ir dideliu kiekiu skaidulų. Jų sudėtyje gausu askorbo rūgšties, vitamų ir polifenolių [1]. Auganti vartotojų paklausa ir didėjanti konkurencija rinkoje paskatino poreikį ieškoti naujų ir maistingų uogų, o mėlynojo sausmedžio uogos susijusios su šiomis savybėmis. Sausmedžio uogų teigiamos savybės Rusijos, Japonijos ir Kinijos liaudies medicinoje jau žinomos kelis amžius [2]. Mėlynojo sausmedžio uogos tampa vis populiarsnės ne tik dėl savo išskirtinio skonio, tačiau ir dėl teigiamo poveikio sveikatai [3]. Dėl turtingo bioaktyvių junginių turinio šios uogos gali būti naudojamos kovojant su daugeliu ligų. Jos žymiai prisideda prie geresnio regėjimo funkcijų, mažina kraujospūdį, taip pat mažina širdies priepuolius ir aterosklerozės atvejus, turi antimikrobinį ir priešuždegiminį poveikį, yra naudojamos gydymui kovojant su mažakraujyste ir padeda valdyti diabetą. Vaisiuose gausu biologiškai aktyvių, sveikatai naudingų junginių grupių – antocianinai, rauginės medžiagos, organinės rūgštys, vitaminai (C, E, K), provitaminas A, B grupės vitaminai ir kt. Ypač didelę naudą žmogaus sveikatai turi antocianinai [4]. Antocianinai yra viena iš polifenolių grupių, kuri pastaraisiais dešimtmečiais susilaukia didelio mokslininkų susidomėjimo dėl teigiamų savybių sveikatai [5]. Kitos nustatytos cheminių junginių grupės, nustatytos šiose uogose, yra fenolio rūgštys, flavan-3-oliai, flavonai, flavanoliai [6], organinės rūgštys, taip pat jose gausu makroelementų.

Mėlynojo sausmedžio uogos yra tinkamos vartoti šviežios, o taip pat galima jas ir konservuoti, tačiau šių uogų galiojimo laikas yra gana trumpas, todėl turėtų būti perdirbamos kuo greičiau. Populiariausios šių uogų perdirbimo galimybės yra sultys, uogienės, džemai, gailieji gėrimai, vynai ar likerai. Dėl nepaprastų šių uogų sveikatai teigiamų savybių yra labai svarbu ieškoti kuo įvairesnių perdirbimo būdų, tačiau svarbu rasti tokią technologiją ir tinkamą perdirbimo būdą, kad būtų kuo mažesni nuostoliai gamybos proceso metu ir išliktų didžiausia mitybinė vertė [5]. Didžiausi nuostoliai patiriami spaudžiant sultis, kadangi susidaro gausus kiekis išspaudų, kurios šiomis dienomis yra išmetamos ar naudojamos pašarams ir kt. Vis dėlto, pastaraisiais metais yra nemažai susidomėjusių mokslininkų išspaudų panaudojimu, kadangi, kaip rodo tyrimai, jose gausu bioaktyvių junginių, kurie prisideda prie sveikatos gerovės. Perdirbimo atliekos šiandien laikomos pigiu vertingų komponentų šaltiniu, nes egzistuojančios technologijos leidžia panaudoti tikslinius junginius ir perdirbti juos kaip funkcinius priedus skirtinguose produktuose [7].

Šio darbo tikslas – nustatyti valgomojo sausmedžio (lot. *Lonicera caerulea*) sulčių ir po sulčių spaudimo gautų ekstraktų cheminę sudėtį, sukuriant optimalią sulčių mikroįkapsuliavimo technologiją ir įvertinti jos efektyvumą.

Uždaviniai:

1. nustatyti valgomojo sausmedžio (lot. *Lonicera caerulea*) sulčių išeią, vitamino C ir tirpių sausųjų medžiagų koncentracijas, bei po sulčių spaudimo gautų išspaudų cheminę sudėtį (sausųjų medžiagų, riebalų, baltymų, skaidulinių medžiagų ir mineralinių medžiagų kieki);
2. taikant paviršiaus atsako eksperimentinę planavimo metodiką, sudaryti mikroįkapsuliavimo planą, kuriuo būtų galima nustatyti optimalias mikroįkapsuliavimo sąlygas, nustatant didžiausią antocianinų įkapsuliavimo efektyvumą ir išeią optimizuojant sudėtinių – komponentų maltodekstrino ir sojos baltymų izoliato kiekius;
3. išskirti iš po sulčių spaudimo gautų sausmedžio išspaudų ekstraktus, taikant ekstrakcijos padidintam sėlgyje, superkritinės CO₂ ekstrakcijos metodus, įvertinant gautų ekstraktų išeią;
4. lipofiliniuose ekstraktuose nustatyti riebalų rūgščių ir triacilglicerolių sudėtį;
5. įvertinti antocianinų koncentraciją sausmedžio sultyse ir išspaudų ekstraktuose taikant ultra efektyviosios skysčių chromatografijos masių spektrometrijos metodą;
6. nustatyti SKE–CO₂ ir EPS heksaninio ekstraktų lakiųjų junginių sudėtį dujų chromatografijos–masių spektrometrijos metodu;
7. Įvertinti sausmedžio sulčių, išspaudų (kietosios frakcijos) bei gautų ekstraktų, po skirtingų ekstrakcijos būdų, antioksidacinį potencialą, taikant įvairius antioksidacinio *in vitro* metodus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Mėlynojo sausmedžio (lot. *Lonicera caerulea*) paplitimas ir panaudojimas pramonėje

Pirmą kartą mėlynasis sausmedis kaip botaninis augalas buvo paminėtas 1894 [8]. *Lonicera* gentis turi maždaug 200 rūšių [9] ir priklauso lot. *Caprifoliaceae* Juss. šeimai [10]. Šis augalas dar kitaip gali būti vadinamas valgomuoju sausmedžiu, saldžiųjų uogų sausmedžiu, „haskap“ [2]. Mėlynasis sausmedis gausiai auga Šiaurinėj Rusijoje [9], Kinijoje, Japonijoje [11] ir per pastaruosius kelerius metus išplito į kai kurias Europos šalis, tokias kaip Slovakija, Lenkija, Čekijos Respublika ar Slovėnija ir kt. Šis augalas nereikalauja didelės priežiūros, kadangi yra atsparus šalčiui, rūgščiam dirvožemiui, kenkėjams ar įvairioms ligoms. Jautrūs sausrai, nes reikalauja drėgmės [9] ir geriau auga pelkėtose vietose, prie upių ar miško kirtimo vietose [12]. Šis krūmas gali užaugti iki 2 m aukščio, lapai 4–10 cm ilgumo, gyvuoja 25–30 metų [10]. Sausmedžio uogos yra pailgės formos nei mėlynės, panašios į cilindrą. Šios uogos (žr. 1 pav.) yra tamsiai violetinės spalvos, padengtos tarytum vašku, sveria 0,3–2g, priklausomai nuo rūšies, skonis kartokas, rūgščiai saldus, primenantis mėlynės. Vaisiai visiškai subręsta sezono pradžioje, panašiai kaip braškės – nuo gegužės vidurio iki birželio pradžios [9], derlius nedidelis – iki 2 kg [10].



1 pav. Mėlynojo sausmedžio uogos [13]

Sausmedžio uogų gaminamos sultys, uogienės, džemai, vinas, saldainiai, įvairūs užkandžiai, likerai, užpilai ar glotnučiai, taip pat galima gaminti arbatą, konservuoti ar šaldyti bei valgyti šviežias [14], gali būti naudojami kaip natūralūs dažikliai ar medicinos pramonėje. Maždaug 80–85% uogų masės yra perdirbama į sultis, o 20–25% sudaro išspaudos, kurios keliauja į atliekas [15]. Pasak Maisto ir Žemės ūkio organizacijos, maždaug trečdalis žmonėms skirto maisto yra iššvaistomas. Tai sudaro apie 1,3 milijardo tonų per metus. Tačiau šiuolaikinė mokslo ir technologijų pažanga leidžia taikyti įvairias technologijas ir perdirbti išspaudas į aukštos pridėtinės vertės produktus, pavyzdžiui, fenoliai gali būti naudojami kaip natūralūs konservantai, kadangi jie prailgina produkto tinkamumo vartoti terminą, o skaidulos gali būti vartojamos žarnyno veiklos gerinimui [7]. Vis dėlto, labai svarbu parinkti tinkamą perdirbimo technologiją, kadangi perdirbimo metu gali kisti kai kurių bioaktyviųjų junginių kiekiai, ypač, kai yra naudojamas terminis apdorojimas, presavimas ar šaldymas [12].

1.2. Sausmedžio biocheminė sudėtis

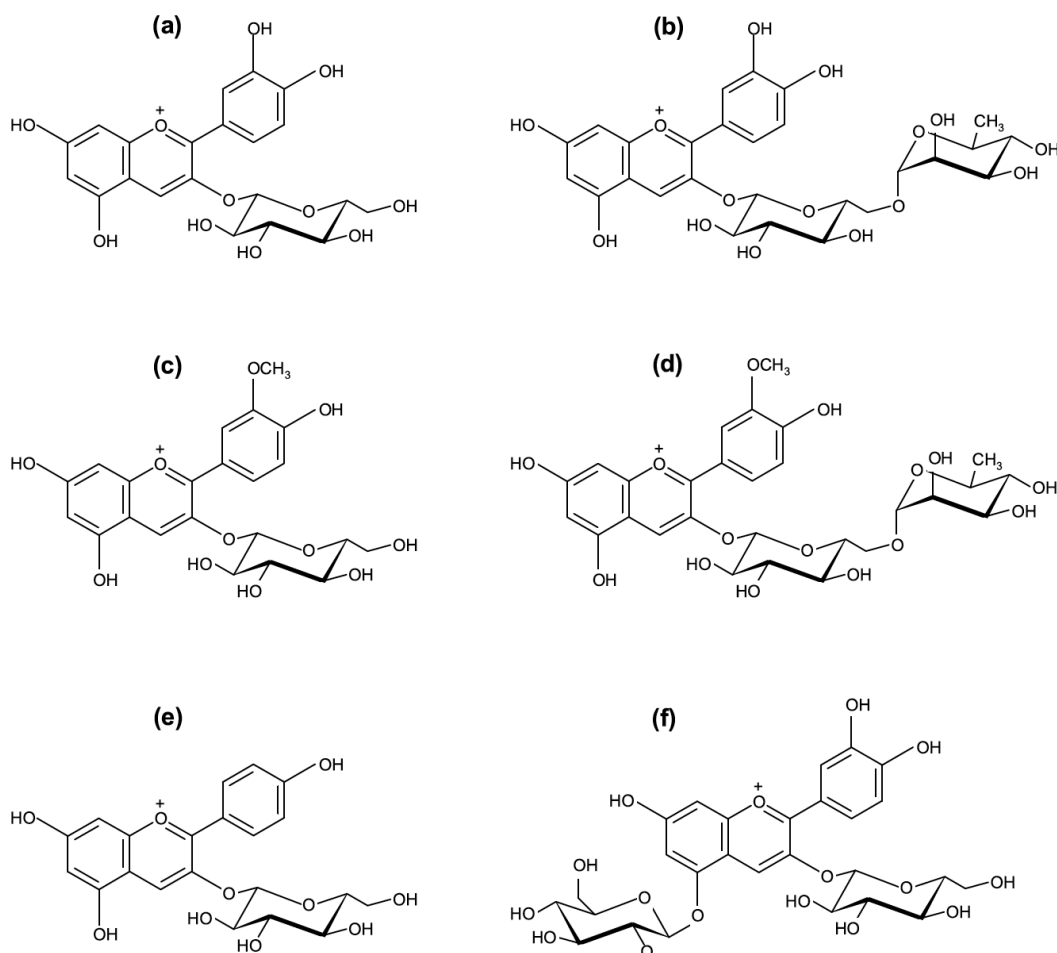
Tinkama mityba yra vienas iš pagrindinių veiksnių, lemiančių žmogaus sveikatos gerovę. Dėl savo sudėtyje esančio didelio kiekio polifenolių, kurie prisideda prie antioksidacinių savybių, mėlynojo sausmedžio uogos pradėtos vadinti „superuogomis“. Šis terminas yra kilęs iš JAV ir taip apibūdinamos uogos, kurių sudėtyje nemažas kiekis polifenolių ir kitų bioaktyvių junginių.

Mėlynojo sausmedžio uogos turtingos vitamino C kiekiu ir yra priskiriamos tai uogų grupei, kuri pasižymi ypač dideliu kiekiu askorbo rūgštimi. Taigi, šios uogos yra natūralus vitamino C šaltinis (29–187 mg/100 g, priklausomai nuo rūšies) ir šis kiekis daug didesnis nei braškėse, gervuogėse, avietėse ar mėlynėse [16]. Taip pat yra maži kiekiai B grupės vitaminų [13] ir makroelementų – kalio (324 mg/kg), fosforo, natrio (863 mg/kg), kalcio (1030 mg/kg), magnio (1020 mg/kg) bei mikroelementų – vario (124mg/kg), cinko (203 mg/kg), geležies (128 mg/kg) [14] silicio, boro, mangano ir jodo [17]. Be šių elementų uogose yra aminorūgščių, tarp kurių didžiausi kiekiai yra glutamo ir arginino rūgštys [11]. Išsamiau visos rūgštys pateiktos 1 lentelėje. Šiose uogose yra ir cukrų, kurių koncentracija kinta nuo 1557–2585 mg/100g, o tai yra gana mažas kiekis palyginus su kitomis uogomis, tokiomis kaip serbentai ar gervuogės. Dėl šios priežasties sausmedžio uogos labiau nei kitos yra tinkamos diabetu sergantiems žmonėms. Pagrindiniai cukrai – fruktozė, gliukozė, kurios sudaro 80 % visų cukrų, sacharozė. Uogų rūgštingumas yra vienas iš svarbiausių priimtumo rodiklių. Sausmedžio uogų pH 2,65, o titruojamas rūgštingumas – 3,6 citrinų rūgšties/100 g, tačiau jis gali būti ir didesnis, o tai priklauso nuo uogų brandumo [3]. Pagrindinės organinės rūgštys - citrinų, sudaro 60% visų rūgščių, obuolių, chinono, fumaro, shimiko ir vynuogių (kartu su askorbo rūgštimi randama 675–1104 g/100g). Pagrindiniai veiksniai, lemiantys organinių rūgščių kiekį yra veislė, auginimo sąlygos, šviesos intensyvumas ir cukrų kiekis. Zhengo (2013) nustatė organinių rūgščių kiekio priklausomybę nuo cukrų kiekio – kuo daugiau cukrų, tuo mažiau organinių rūgščių. Taip pat šio tyrimo metu buvo išsiaiškinta priklausomybė nuo šviesos – šešėlyje augantys krūmai turi daugiau organinių rūgščių ir flavonolių; saponinų (640mg/100g), taninų (30–130mg GAE/100g), kurie prisideda prie savito kartoko skonio.

1 lentelė. Šviežių mėlynojo sausmedžio uogų analizė, atlikta AOAC metodu [11]

Aminorūgštys	kiekis (mg/100g)	vitaminai	kiekis (mg/100g)
alaninas	47,52	pantoteno rūgštis	1,40
argininas	136,08	niacinas	0,47
aspartamo rūgštis	86,26	vitaminas B1	0,16
cisteinas	14,40	vitaminas B2	0,02
fenilalaninas	55,73	vitaminas B6	0,02
glicinas	55,44	folio rūgštis	0,02
histidinas	51,12	vitaminas B12	0,02
izoleucinas	49,68	vitaminas A	<80,0
glutamo rūgštis	161,21	tokoferolis α	0,42
leucinas	79,92	tokoferolis $\beta + \gamma$	0,40
metioninas	19,87	tokoferolis δ	0,28
lizinas	52,92	vitaminas K1	0,05
serinas	38,09	karotenas α	<0,05
treoninas	<35,86	karotenas β	0,72
tirozinas	29,66	ksantofilas	0,16
valinas	53,20	likopenas	<0,001
vitaminas C	12,10	kriptoksantinas	0,01
nikotinamidas	1,87	zeaksantinas	0,01

Taip pat sausmedžio uogos pasižymi dideliu kiekiu fenolinių junginių – apie 43 identifikuoti junginiai (173–268mg/100g [9] ir šis kiekis didesnis nei avietėse, gervuogėse, mėlynėse ar žemuogėse [18]). Antocianinai yra viena iš fenolinių grupių, kurie šiose uogose yra dominuojantys, o pagrindiniai antocianinai yra cianidin-3-gliukozidas, kuris sudaro 79–88 % visų antocianinų [19], cianidin-3-rutinozidas (1–11 %), peonidin-3-gliukozidas (2–6 %) ir pelargonidin-3-gliukozidas (0,2–1 %), o jų cheminės formulės pateiktos 2 paveiksle. Antocianinai kaupiasi uogos odelėje, o jų kiekis priklauso nuo veislės, ekstrakcijos metodo, laikymo ir auginimo sąlygų, todėl šis kiekis gali varijuoti nuo 400 – 1500 mg/100g. Didžiausias nustatytas antocianinų kiekis – 3490 mg/100g uogų lot. *Lonicera altaica*, tuo tarpu lot. *Lonicera caerulea* nustatytas kiekis yra 1470 mg/100g [20].



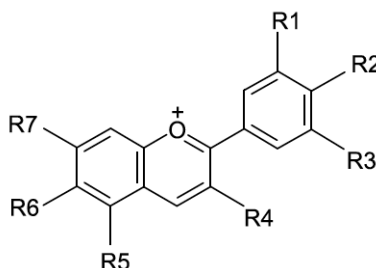
2 pav. Dažniausiai mėlynojo sausmedžio uogose randamų antocianinų cheminės struktūros: a) cianidin-3-gliukozidas, b) cianidin-3-rutinozias, c) peonidin-3-gliukozidas, d) peonidin-3-rutinozias, e) pelargonidi-3-gliukozidas, f) ciainidin-3,5,-digliukozidas [17]

Galima rasti ir kitų flavonoidų grupės junginių – proantocianidinų (700 mg/100g), katechinų (650 mg/100g) [21], rutino (100 mg/100g) ir mažesnis kiekis kvarcetino ir izokvarcetino (30 mg/100g). Fenolinės rūgštys dažnai sutinkamos augaluose ir su jomis yra atlikta nemažai cheminių, biologinių ir medicininių tyrimų [20]. Zadernowski ir kt. (2005) dujų chromatografu nustatė, kad šiose uogose fenolinių rūgščių yra 5,4 mg/100g SM, tarp kurių vyrauja hidroksicinaminės rūgštys ir jos dariniai (61 %), o ypač p-kumarino ir kumarino rūgštys [22]. Deineka ir kt. mokslininkai (2005) ištyrė, kad chlorogeniko (0,42 %), kofeino (0,14 %) ir ferulio (0,10 %) rūgštys yra dominuojančios [23]. Vis dėlto, svarbu paminėti, jog fenolinių rūgščių kiekis priklauso nuo auginimo vietos ir veislės [20]. Sausmedžio uogos yra iš tų uogų, kuriose gausu bioaktyviųjų junginių – monoterpenų. Šiose uogose buvo rasta 44 terpenai. Pagrindiniai monoterpenai yra – eukaliptolis (12,4–418,2 μg/L), linalolas (4,97–33,1 μg/L) [24]. Dar šiose uogose galima rasti ir iridoidų – tai junginių grupė priklausanti monoterpenams, kurie taip pat suteikia kartų skonį [3]. Nors yra atlikta mažai iridoidų tyrimų, tačiau iki šiol sausmedžio uogose yra nustatyti šie pagrindiniai – logano rūgštis (44 %), loganinas (41 %) ir du pagrindiniai sekoiridoidai – sverosidas ir sekologaninas (5 %). Taip pat yra pastebėta, jog nepriklausomai nuo to, su kokia žaliava buvo atlikti tyrimai – uogomis, išspaudomis ar sultimis, iridoidų kiekis išlieka panašus. Tai gali būti paaiškinama tuo, jog priešingai nei polifenoliai, kurie dominuoja uogos odelėje, iridoidai tolygiai pasiskirsto po visa uogą [3]. Energinė uogų vertė – 330 kcal/kg (1380 kJ/kg) [11].

Vis dėlto, yra gerai žinoma, jog bioaktyvių junginių kiekis priklauso nuo daugelio faktorių, tokių kaip genotipas, klimato sąlygos [1] dirvožemis, uogų surinkimo laikas [9], laikymo sąlygos [14].

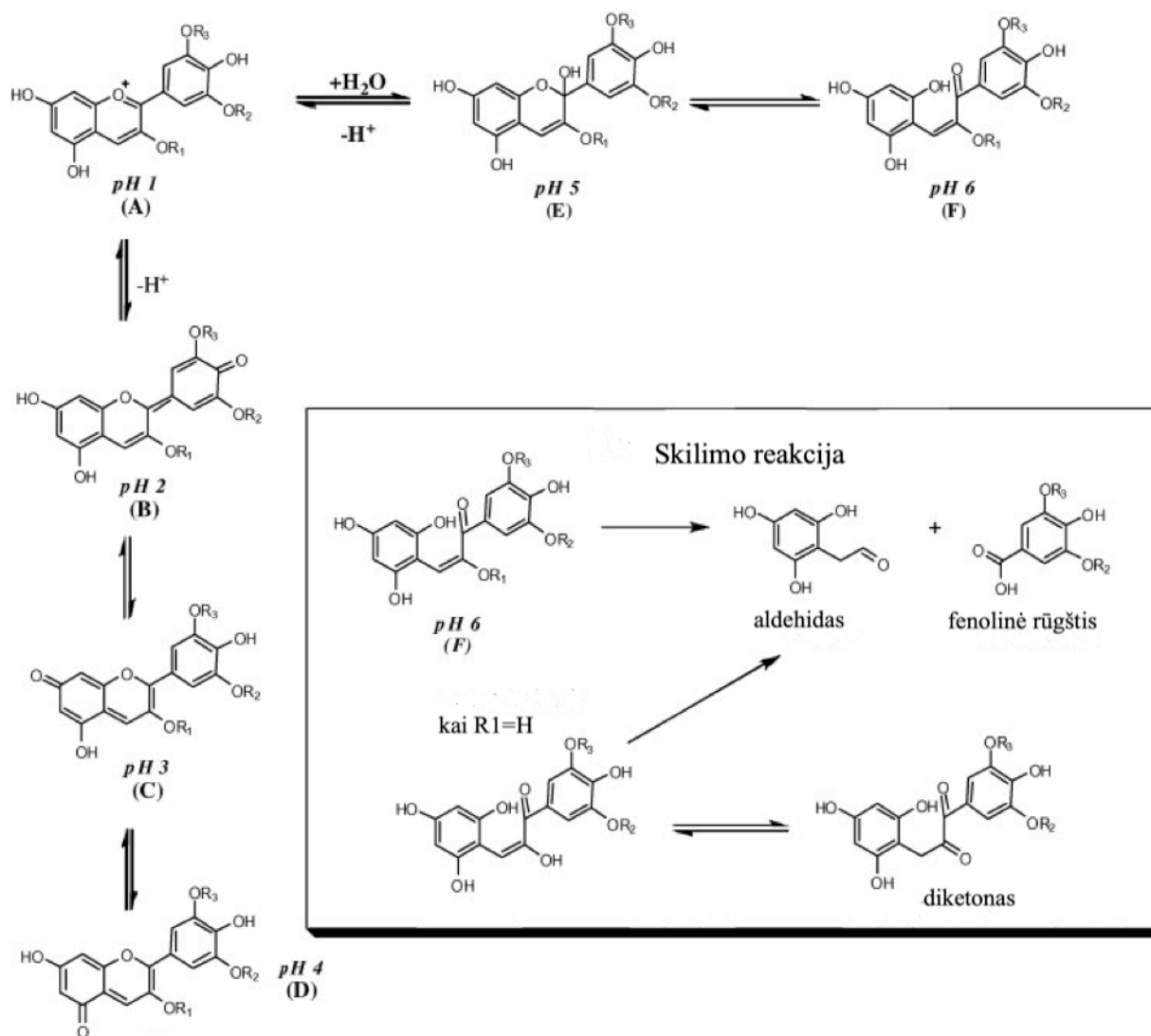
1.3. Antocianų bendra apžvalga, struktūra ir paplitimas augaliniame pasaulyje

Antocianinai (gr. „anthos“ – gėlė, „kyanos“ – mėlynas) [25] – yra augalų pasaulyje plačiai paplitę natūralūs pigmentai, priskiriami didžiausiai polifenolinių junginių grupei – flavonoidams, kurie yra augalų antriniai metabolitai [26] [27]. Jie yra nekenksmingi todėl kitaip tariant veikia kaip natūraliai vandenyje tirpūs dažikliai. Jie yra labai vertinami maisto pramonėje dėl jų spalvinių savybių, kurios gali suteikti maistui įvairių atspalvių: nuo raudonos iki violetinės spalvos [28]. Vaisiams, uogoms, daržovėms, žiedams ar lapams antocianinai suteikia gelsvai rausvą, raudoną, tamsiai mėlyną ar violetinę spalvą [29]. Dažniausiai antocianai kaupiasi į pigmentinius kūnelius, kurie vadinami antocianoplastais, tačiau kai kurie antocianai kaupiasi ląstelės sienelėje, o tai apsunkina jų ekstrakciją iš augalinės žaliavos [30]. Antocianinai gamtoje randami glikozidų (prisijungusių cukraus molekulę) ir aglikonų – antocianidinų pavidalu. Jie priskiriami flavonoidams ir pasižymi šiai junginių grupei būdinga $C_6C_3C_6$ struktūra [31]. Antocianinų molekulės pagrindą sudaro flavilo (2-fenilbenzopirilo) katijonas. Šis katijonas sudarytas iš benzeno žiedo, sujungto su deguonį turinčiu pirano heterociklu. Antocianinai tarpusavyje skiriasi A ir B žiede esančiomis hidroksi grupių skaičiumi, cukraus, prisijungusio prie molekulės kiekiu, kilme ir padėtimi ir skaičiumi, alifatinių arba aromatinių rūgščių, prisijungusių prie cukraus molekulėje [32]. Bendra antocianidinų struktūrinė formulė pateikta 3 paveiksle.



3 pav. Antocianidinų bendroji struktūrinė formulė [17]

pH yra faktorius, kuris labiausiai veikia antocianinų spalvą tirpale, dėl to būdinga šių junginių grįžtamosios ar negrįžtamos pusiausvyros struktūros [33]. Antocianinai gali būti įvairių cheminių formų, priklausančių nuo tirpalo pH (žr. 4 pav.). Esant pH 1, flavilio katijonas (raudona spalva) yra dominuojanti rūšis ir prisideda prie violetinės ir raudonos spalvos (4 A pav.). Kai pH yra nuo 2 iki 4, vyrauja mėlynos spalva (4 B-D pav.). Esant pH reikšmėms nuo 5 iki 6 – bespalvė forma (4 E pav.) Ir chalkoną (4 F pav.). Jei pH yra didesnis nei 7, antocianinai slyja priklausomai nuo jų funkcinių grupių (žr. 4 pav., Skilimo reakcija).



4 pav. Antocianinų cheminės formos, priklausančios nuo pH ir skilimo reakcijos antocianinams. Kur R₁ = H arba sacharidas, R₂ ir R₃ = H arba metilas [34]

1.4. Sausmedyje esančių veikliųjų medžiagų farmakologinis poveikis

Augalauose gausu bioaktyvių junginių, kai kurie iš jų turi mitybinę reikšmę, o kai kurie ir sveikatai naudingų savybių. Fitocheminės medžiagos yra augalų metabolitai, kurie ir pasižymi teigiamomis savybėmis [35]. Tyrimai rodo, jog kvarcetas, kuris priskiriamas flavonoliams, pasižymi priešvėžiniu, priešuždegiminiu, antivirusiniu poveikiu ir veikia kaip prevencija prie širdies ir kraujagyslių ligas. Fenolinės rūgštys veikia ne tik kaip antioksidantai, bet ir pasižymi antibakteriniu, antivirusiniu, priešuždegiminiu ir kraujagysles plečiančiu poveikiu [36]. Japonijoje sausmedžio uogos jau nuo seno naudojamos tradicinėje medicinoje stabdant senėjimo procesus, kaip prevencija prieš širdies ir kraujagyslių ligas ar žarnyno veiklai gerinti [1], Korėjoje plačiai naudojamos gydant viršutinių kvėpavimo takų ligas [37]. Reikia paminėti, kad kai kurie tyrimai *in vivo* ir *in vitro* parodė, jog šios uogos gali užkirsti kelią kepenų ligoms, pvz.: hepatitui [1]. Naujausi tyrimai rodo, jog sausmedžio uogos gerina UV spinduliuotės poveikį odos pažeidimams [14], taip pat polifenoliai prisideda prie rizikos mažinimo susirgti 2-ojo tipo diabetu [38]. Antocianinai, kurių gausu sausmedžio uogose, pasižymi dideliu biocheminiu ir farmakologiniu aktyvumu. Yra nustatyta, jog

jie slopina uždegiminius procesus, apsaugo nuo virusų ir mikrobu bei pasižymi antioksidaciniu poveikiu [39] [40]. 2015 metais atlikto tyrimo rezultatai parodė, jog antocianinai savo veiksmingumu prieš *E. coli* ir *S. typhi* bakterijas prilygsta antibiotikams [41]. Antocianinai lėtina mažo tankio lipoproteinų oksidaciją (MTL) [42], slopina trombocitų agregaciją [43]. Šie pigmentai mažina kraujagyslių sienelių paburkimą, mažina sklerozės riziką, jie gali būti vartojami širdies ir kraujagyslių ligų prevencijai [27]. Tyrimai su triušiais ir žiurkėmis *in vivo* ir klinikiniai tyrimai parodė, jog antocianinai prisideda prie gliukozės koncentracijos mažinimo kraujyje, ypač antrojo tipo cukrinio diabeto atveju. Jie gerina gliukozės toleranciją, mažina trigliceridų koncentraciją, apsaugo kasos β ląsteles nuo oksidacinio streso poveikio [44] [45]. Kolageno baltymai susijungia su gliukozės molekulėmis ir sudaro nebūdingus kolageno fragmentus kapiliarų sienelėse, apsaugodami nuo vienos dažniausių cukrinio diabeto komplikacijų – retinopatijos. Antocianinų vartojimas stabdo jos progresavimą ir padeda apsaugoti lignonius nuo regos praradimo [44]. O taip pat, kolageną stabilizuojantis antocianinų poveikis apsaugo smegenų kapiliarų sienelės nuo žalojančio vaistų ir kitų cheminių medžiagų veikimo ir tai leidžia juos vartoti depresijos, nerimo bei kitų neurodegeneracinių ligų profilaktikai ir gydymui [46] [47]. Moksliniais tyrimais nustatyta, kad antocianinai pasižymi priešopiniu poveikiu, [43] [48], nes didina apsauginių gleivių gamybą skrandyje [43] [49].

Prie visų sveikatai teigiamų savybių prisideda ne tik antocianai, tačiau ir kita junginių grupė – iridoidai, priklausanti monoterpenams. Priklausomai nuo struktūros, šie junginiai prisideda prie priešuždegiminio (logano rūgštis), neuroprotekcinio (harpagosidas), hipotenzinio (oleuropeinas), antibiotinio (aucubigeninas) ir raminamojo poveikio (valepotrilatai). Sekoiridoidai skatina apetitą, nes stimuliuoja virškinimo sistemą, be to, mažina medžiagų apykaitos ligų, tokių kaip diabetas ar nutukimas bei širdies ir kraujagyslių susirgimo riziką [3]. Monoterpenai ir jų oksiduoti analogai (terpenoidai) vaidina svarbų vaidmenį žmogaus organizme dėl jų antibakterinių, antivirusinių, atpalaiduojančių, skausmą mažinančių savybių. Be to, monoterpenai ir terpenoidai prisideda prie sveikatos gerovės suteikdami skonį ir kvapus. Linalolas, terpineolis, geraniolis suteikia citrusinį, gėlių ir saldų kvapą, o rožių kvapą – nerolis [24].

Nemažiau svarbi ir kita junginių grupė esanti sausmedžio uogose – saponinai. Saponinai – tai glikozidų grupė, kurių vandeniniai tirpalai sukelia putojimą. Yra nustatyta, jog jie pasižymi priešgrybeliniu, antimikrobiniu, antivirusiniu, priešuždegiminiu poveikiu ir nuo seno yra naudojami kinų tradicinėje medicinoje gydant įvairius negalavimus, tokius kaip įvairūs uždegimai, krūtinės skausmas ar astma. Svarbu paminėti, kad saponinai pasižymi ir toksikologiniu poveikiu, o ypač šaltakraujams gyvūnams, tačiau šiltakraujus veikia labai silpnai dėl mažos absorbcijos gebos [50].

Ntchapda ir kt. praneša, jog taninai pasižymi antitromboziniu, antimutageniniu, antidiabetiniu antikancerogeniniu, priešuždegiminiu, antivirusiniu ir antibakteriniu poveikiu [36].

Vitaminas C svarbus, kadangi gali padidinti plazmos atsparumą lipidų peroksidacijai, mažinti šlapimo rūgšties kiekį serume, dėl to sumažėja tikimybė susirgti podagra, žymiai sumažina insulto, lėtinių ir degeneracinių ligų riziką [36].

Mėlynojo sausmedžio uogų tyrimo modeliai apžvelgiami 2 lentelėje.

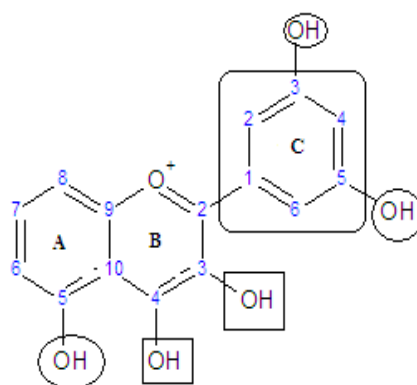
2 lentelė. Mėlynojo sausmedžio uogų tyrimų modeliai atlikti in vivo ir in vitro sistemose [17]

Aktyvumas	Eskperimentinis modelis
Priešuždegiminis	žiurkės pelių makrofagų ląstelės žmonių leukemijos monocitai
Priešuždegiminis ir antioksidacinis	žiurkės makrofagų ląstelės
Priešvėžinis	pelių epidermio ląstelės žiurkės
Antibakterinis	žiurkės pelių makrofagų ląstelės <i>Candida parapsilosis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus mutant</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Kocuria rhizophila</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> β -hemolytic <i>Streptococcus</i> A, B, G grupė <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Haemophilus influenza</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Prieš UVA spinduliuotę	Keratinocitai
Prieš UVB spinduliuotę	Keratinocitai

1.4.1. Antioksidacinis poveikis

Laisvieji radikalai sukelia nemažai patologijų, pavyzdžiui peroksido radikalai sustiprina uždegiminį procesą, skatina trombocitų agregaciją [51]. Oksidacinis stresas ir uždegimai yra glaudžiai susiję su kepenų pažeidimais. Oksidacinį stresą sukelia reaktyviosios deguonies rūšys, kurios gali pažeisti ląsteles ir sukelti tokias ligas kaip diabetas, širdies ir kraujagyslių negalavimai, vėžys ar kepenų ligos. Nors gydymo būdai yra nuolat tobulinami, reikėtų nepamiršti, kad uogos, kuriose gausu fitochemikalų, gali prisidėti prie sveikatos gerbūvio [52].

Vieni iš geriausiai žinomų antioksidantų yra flavonoidai, fenolio rūgštys, taninai, vitaminas C ir E [36]. Rupasinghe (2012 m.) aprašė, jog mėlynojo sausmedžio uogos pasižymi didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu tarp tirtų uogų, tokių kaip gervuogės, braškės, avietės ar mėlynės [53], be to, antocianinai turi didesnę antioksidacinę aktyvumą nei vitaminais C ir E. Šie junginiai sugeba užfiksuoti laisvuosius radikalus [34], nes veikia kaip radikalų surišėjai [54], slopina aktyviųjų deguonies formų susidarymo procesus [55] [48], apsaugo lipofilinius antioksidantus (tokoferolį ir kt.) nuo oksidacinio poveikio [56], skatina antioksidaciniu veikimu pasižyminčių fermentų išsiskyrimą [57]. Jie gali atiduoti vandenilio atomą, todėl pasižymi antioksidaciniu poveikiu, o taip pat gali prisijungti azoto oksido ir peroksido radikalus [58] [54] ir sumažinti H₂O₂ sukeltą citotoksiškumą. JAV mokslininkai W. Zheng ir S.Y. Wang (2003) tyrinėdami antocianinų molekules nustatė keletą dėsningumų. Nustatyta, kad glikozidai mažiau aktyvūs nei aglikonai ir jog didesnis laisvų hidroksigrupių skaičius molekulėje lemia antioksidacinio aktyvumo didėjimą (žr. 5 pav.), B žiede esanti OH grupė suteikia radikalui didesnę stabilumą, o A ir C žiede esančios OH grupės yra reikalingos maksimaliam radikalų surišimui [59]. Palyginus antocianinų antioksidacinį poveikį galima pastebėti, jog didžiausias aktyvumas būdingas tiems, kas turi B žiede laisvas hidroksigrupes. Antocianinai ne tik pasižymi laisvuosius radikalus surišančiu poveikiu, bet ir apsaugo organizmą nuo jų susidarymo. Pavyzdžiui, metalų jonai (geležies ar vario) dalyvauja Fentono tipo reakcijose, kur susidaro hidroksilo radikalai, o jie sukelia lipidų peroksidaciją. Taigi antocianinai su metalų jonais sudaro chelatinus junginius ir taip slopina radikalų susidarymą ir lipidų peroksidacijos reakcijas [55] [48]. Yra duomenų, jog antocianinai pasižymi priešvėžiniu poveikiu [60] [61] [62] [63] [64] [65], o šis poveikis yra siejamas su antocianinų antioksidacinėmis savybėmis. Antocianinai yra svarbūs biologiškai aktyvūs junginiai vėžio gydyme bei karcinogenezės ir mutagenozės prevencijoje. Jie suriša laisvuosius radikalus, aktyvina arba slopina fermentus, apsaugo baltymus, lipidus ir nukleino rūgštis. Antocianinai slopina vėžinių ląstelių augimą bei jų transformaciją, navikų augimą, skatina vėžinių ląstelių apoptozę [49] [66].



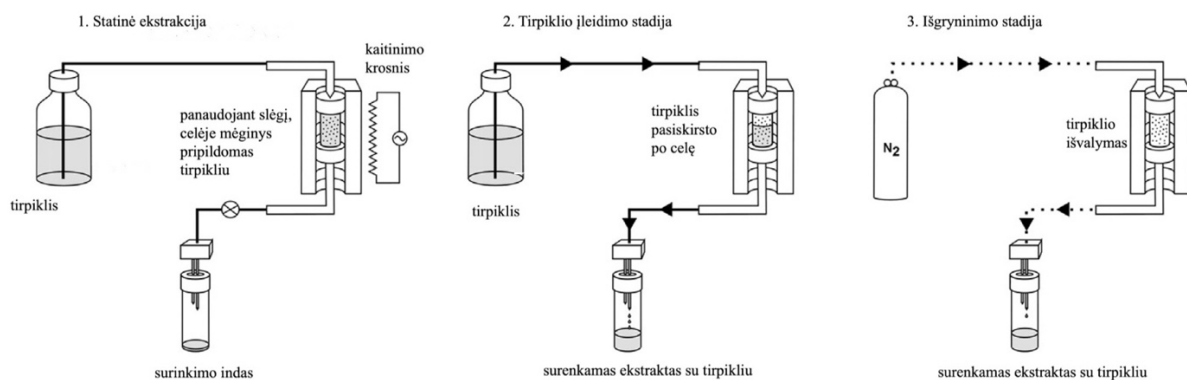
5 pav. Antocianidinų struktūra ir pakaitų išsidėstymas turintis įtakos antioksidaciniam poveikiui

1.5. Veikliųjų medžiagų išskyrimo būdai

Ekstrakcija tirpikliu labiausiai paplitęs metodas įvairių vaisių sudėtyje esančių junginių išgavimui [34]. Tirpiklis veikia kaip nešiklis, kurio pagalba junginiai pernešami į skirtingas fazes [7]. Antocianinai yra polinės molekulės, taigi dažniausiai naudojami tirpikliai ekstrakcijoms yra taip pat poliniai – vandeninio etanolio, metanolio ar acetono mišiniai. Tarp labiausiai paplitusių metodų yra tie, kurie kaip ekstrahentas naudojamas parūgštintas metanolis arba etanolis [36]. Iš šių metodų ekstrakcija su metanolium yra pati efektyviausia, iš tiesų buvo nustatyta, kad antocianino ekstrakcijose iš vynuogių minkštimo ekstrahavimas metanolium yra 20% efektyvesnis nei etanolyje ir

73% efektyvesnis negu vandenyje; vis dėlto maistui etanolis yra geresnis, kadangi metanolis netinka dėl savo toksiniu savybių [34]. Taip pat ekstrakcijos etanolis pliusas yra ne tik didelė išėiga, bet ir tas, jog šis tirpiklis yra gana pigus ir priskiriamas „GRAS“ (ang. generally recognized as safe) klasei [7], daugkartinio naudojimo ir netoksiškas. Vis dėlto, idealus tirpiklis turi atitikti ir daugiau reikalavimų: turi būti selektyvus – pasižymėti didele tirpinimo jėga tam tikrai junginių grupei ir tuo pačiu mažai tirpinti nepageidaujamą frakciją, chemiškai stabilus, jog nesureaguotų su komponentais, turėtų būti regeneruojamas ir mažo klampumo, kad nekiltų problemų tirpinant. Taip pat, ekstrakcijai svarbu parinkti ne tik tinkamą tirpiklį, bet ir parinkti tinkamus parametrus. Gerai žinoma, jog padidinus temperatūrą – padidėja ekstrakcija, kadangi difuzijos koeficientas taip pat padidėja [36].

Per pastarąjį dešimtmetį atsirado naujų ekstrakcijų metodų. Garcia-Mendoza išskiria vieną – padidinto slėgio skysčiais ekstrakciją (EPS) siekiant gauti didesnę antioksidacinę aktyvumą [67]. Šios ekstrakcijos būdu naudojama kietą frakciją ir skystas tirpiklis esant aukštesnėms nei tirpiklio virimo temperatūroms ir slėgiui. Principinė EPS schema pavaizduota 6 paveiksle. Pirma, vykdoma statinė stadija, kurios metu parenkama reikiama temperatūra ir slėgis ir laukiama, kol celėje pasiekiami šie parametrai. Statinės ekstrakcijos laikas gali trukti 1–99 min, tačiau dažniausiai ji trunka 10–15 min. Antra, tirpiklis praleidžiamas per visą celės tūrį, kad prasidėtų ekstrakcija ir vis papildoma šviežiu tirpikliu. Ir galiausiai, celė prapučiamą inertinėmis dujomis, pvz.: azotu, siekiant visiškai pašalinti tirpiklį iš sistemos. EPS metodika leidžia parinkti įvairių temperatūrų intervalą, kuris gali siekti nuo kambario iki 200 °C temperatūros, o slėgis gali būti nuo 35–200 bar. Taigi, EPS metodas turi daug pliusų, jis greitas ir efektyvus. Dėl to, kad naudojamas ribotas kiekis organinių tirpiklių, kurie vėliau pašalinami, ekstraktas tampa labiau ekologiškas ir sveikesnis bei pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu [68]. Pagrindiniai veiksniai, darantys įtaką šios ekstrakcijos efektyvumui yra ekstrahuojama matrica, tirpiklio pasirinkimas, ekstrakcijos laikas, temperatūra ir slėgis. Prieš pradėdant ekstrakciją svarbu žinoti apie matricą – kilmę, dalelių dydį, molekulinis ryšius, drėgmės kiekį, kadangi šie veiksniai turi įtakos fenolinių junginių ekstrakcijai. Renkantis tirpiklį svarbu atkreipti dėmesį į jo poliškumą, kad vyktų difuzija ir geresni masės mainai. Yra gerai žinoma, jog poliniai tirpikliai tirpina polinius junginius ir atvirksčiai. Tirpiklis taip pat turėtų būti saugus, netoksiškas, ekonomišką. Naudojant aukštą temperatūrą, gali padidėti ekstrahuojamų junginių tirpumas, ji didina difuziją ir mažina tirpiklio klampą ir įtampą, tokiu būdu didinant masės perdavimą ir ekstrakcijos išėigą. Aukštas slėgis padidina tirpiklio išsiskverbimą į kietą kūną ir leidžia tirpikliui išlikti skystame būvyje [69].



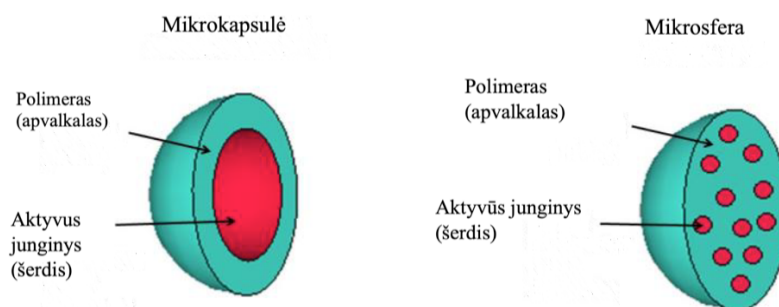
6 pav. EPS proceso stadijos

Atsižvelgiant į maisto ir farmacijos pramonės reikalavimus bei aplinkos ir ekonominį poveikį, didėja susidomėjimas „žaliais tirpikliais“, tokiais kaip etanolis, vanduo ir jų mišiniai (klasifikuojami kaip „GRAS“ – dažniausiai pripažįstami kaip saugūs tirpikliai), siekiant užtikrinti saugų ir ekologišką produktą. Dėl aukšto tirpiklio sunaudojimo ir jo pašalinimo atsiranda papildomų išlaidų ir pašalinių pavojų aplinkai. Be to, daugelis bioaktyvių junginių, tokių kaip antocianinai, yra termiškai nestabilūs ir ilgai ekstrahuojami aukštoje temperatūroje suskyla. Siekiant įveikti šiuos trūkumus, buvo iširtos naujos ekstrahavimo technologijos [70]. Viena iš jų – superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO₂). Šis tirpiklis tapo plačiai naudojamu dėl to, jog yra netoksiškas, nedegus, nesunkiai gaunamas už prieinamą kainą ir lengvai pašalinamas iš galutinio produkto [71]. Kiekvienas tirpiklis turi savo temperatūros ir slėgio kritinį tašką, kurį lemia temperatūra ir slėgis. Kai šie parametrai yra virš savo kritinių taškų, jie laikomi superkritiniais. CO₂ superkritinės sąlygos yra 31,1 °C temperatūra, kuri yra artima kambario temperatūrai, todėl nereikalauja didelių energijos sąnaudų ir 7,38 MPa, o tai leidžia šioms dujoms būti vienu iš idealiausių tirpiklių ekstrahuojant jautrius bioaktyvius junginius [72]. Tai technika, kurios metu naudojamos dujos, gali tapti skysčiu. Superkritinėmis sąlygomis padidėja dujų tankis, dėl šios priežasties padidėja ir tirpinimo galia, nes didėja difuzija ir masės mainai. Tipinį šios ekstrakcijos įrenginį sudaro pompa, kuri paduoda CO₂ dujas; kamera, kurioje laikomas mėginys; slėgio reguliatorius; surinkimo indas ir kaitinimo zona, kur sukuriama superkritinės sąlygos. Tada prasideda difuzija į mėginį, jog prasidėtų tirpinimas. Iš ekstrahavimo kameros ištirpusi medžiaga patenka į separatorių, kur išgauta medžiaga nusistovi, o dujos atvėsina ir perdirbamos arba išleidžiamos į atmosferą [73]. Be tirpiklio privalumų ši metodika pasižymi ir kitais plusais – aukštos kokybės ekstraktai, greitas ir efektyvus procesas. Svarbu paminėti, kad ekstrakcijos efektyvumas priklauso nuo įvairių veiksnių – galima keisti temperatūrą, slėgį, dalelių dydį ir tirpiklio tekėjimo greitį. Pavyzdžiui, padidinus tekėjimo greitį, padidės ir ekstrakcijos efektyvumas, o sumažinus dalelių dydį – sumažės masių mainai, tačiau dalelių sumažinimas gali sukelti ir problemų, todėl šį parametru reiktų pasirinkti labai atidžiai. Taip pat yra gerai žinoma, jog nepoliniai junginiai lengviau išsiekstrahuoja mažesniame slėgyje ir temperatūroje, o poliniai – atvirkščiai [74]. Pastaraisiais metais riebalų rūgščių analizė sulaukia vis didesnio susidomėjimo dėl rūgščių teigiamų savybių, pavyzdžiui, ω-3 rūgštis gerai žinoma kovojant su ateroskleroze, artritu ir kitomis širdies ir kraujagyslių ligomis, todėl CO₂ dujos yra geras nepolinis tirpiklis išgauti lipidinei frakcijai [72].

1.6. Mikroįkapsuliavimo technologija

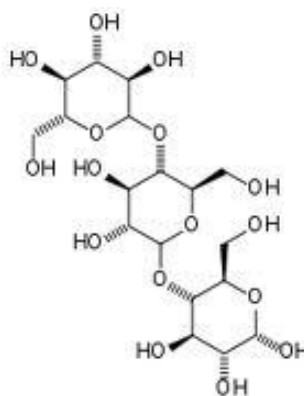
Daugelis maisto perdirbimo veiksnių ir laikymo sąlygos skatina bioaktyvių junginių skilimą, taip prarandama mitybinė vertė, pakeičiama produkto spalva, skonis, todėl buvo sukurta įkapsuliavimo technologija, kuri ne tik padeda išvengti šių problemų, bet ir prailgina vartojimo laiką nuo kelių mėnesių iki kelių metų. Pavyzdžiui, jog antocianinus būtų galima naudoti kaip maisto dažiklius, reikia įveikti nemažai kliūčių, kadangi jie yra nestabilūs, o ypač laikymo ir perdirbimo sąlygomis. Spalva ir stabilumas labai priklauso nuo pH, tirpiklio, temperatūros, deguonies, šviesos, fermentų ir kitų junginių, kurie gali sąveikauti su antocianiniais [75]. Šiuolaikinės technologijos leidžia įkapsuliuoti skonio stipriklis (citrinų, pipirmėčių, vanilės aliejus), saldiklius (aspartamą, sacharozę, ksilitolį), dažiklius (antocianinai, karotenai), vitaminus (A, D, E, C), probiotikus (*Bifidobacterium spp.*, *Bifidobacterium longum*). Įkapsuliavimas – procesas, kurio metu imobilizuojama medžiaga kitos medžiagos viduje, tokiu būdu sukuriama skirtingo dydžio mikrokapsulės ar mikrosferos (žr. 7 pav.), pavyzdžiui, nanodaleles (<1 mm), mikrodaleles (1–5000 nm) ar makrodaleles (>5000 nm).

Mikrokapsulės susideda iš dviejų pagrindinių dalių: šerdies, kurios viduje yra veiklioji medžiaga ir apvalkalo, dar gali būti vadinamu sienele ar matrica, kuris apsaugo šerdį nuo išorės poveikio [76].



7 pav. Skirtumai tarp mikrokapsulės ir mikrosferos [76]

Iš tikrųjų, nuo apvalko priklauso mikrodalelių stabilumas, proceso efektyvumas ir veikliosios medžiagos apsaugojimas [77]. Renkantis apvalkalą reiktų atkreipti dėmesį į šiuos dalykus – nereauogtų su šerdyje esančia medžiaga, gebėtų sandariai išlaikyti nepažeistą įkapsuliuotą aktyvų junginį, efektyviai apsaugotų šerdį nuo neigiamo aplinkos poveikio, neturėtų nemalonaus skonio ir būtų valgomas, netoksiškas ir ekonomiškai perspektyvus, lengvai virškinamas, tirpus vandenyje. Apvalkalo medžiagos gali būti pusiau sintetinės, sintetinės ir natūralios. Angliavandeniai, o ypač polisacharidai, yra vieni iš geriausių dangalų, atsižvelgiant į tai, jog geba formuoti didesnes poras, dažniausiai yra išgaunami iš natūralių maisto produktų, plačiai naudojami ir nesunkiai virškinamo žmogaus žarnyne [78]. Baltymai taip pat yra vieni iš geresnių apvalkalų, kadangi pasižymi geru biologiniu suderinamumu, lengvu virškinimu ir funkcinėmis savybėmis – geras tirpumas vandenyje, geros emulsinės ir putojimo savybės. Dažnai angliavandeniai maišomi su baltymais, tokiu būdu pagerinamos emulsifikavimo savybės, sudaroma geresnė šerdies apsauga, ypač nuo oksidacijos ir pagerinami džiovavimo parametrai [77]. Maltodekstrinas – kompleksinis angliavandenis, kurį galima gauti iš kukurūzų, kviečių ar bulvių. Jis yra lengvai virškinamas, nebrangus ir atlaiko aukštesnes temperatūras, dėl šių priežasčių jis puikiai tinka kaip apvalkalas [79]. Tuo tarpu sojų baltymų izoliatas – pagamintas iš sojos pupelių. Sojos baltymai yra lengviau virškinami, gerai tirpsta, pasižymi vandens ir riebalų absorbcija, putojimu, stabilizavimu ir gali sudaryti emulsijas. Šiais laikais vis didėja susidomėjimais augalinės kilmės natūraliais produktais, dėl šios priežasties sojų baltymų izoliatas tapo vienas iš populiariausių apvalkalų, be to, augalinės kilmės baltymai sukelia mažiau alergijų lyginant su gyvūlinės kilmės [77].



8 pav. Maltodekstrino formulė

Per kelis pastaruosius metus išpopuliarėjo kelios įkapsuliavimo technikos – purškiamasis džiovinimas ir džiovinimas šalčiu (liofilizavimas) [75].

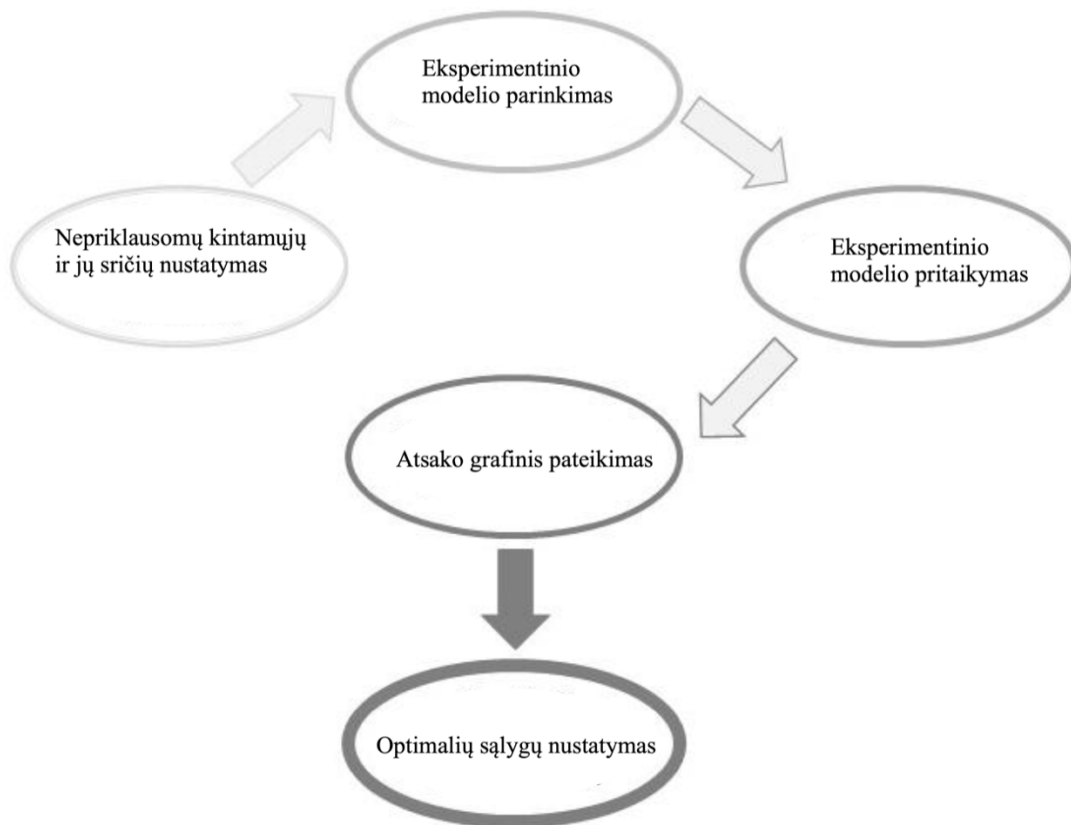
Džiovinimas šalčiu – tai seniausias džiovinimo metodas, susidedantis iš 2 žingsnių: pirmiausia užsaldoma žemoje temperatūroje (nuo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$), o vėliau seka vandens sublimacija. Šaldymo stadija yra svarbi tuo, jog jos metu susidarę ledo kristalai daro įtaką porų dydžiui – dideli kristalai sudaro didesnes poras ir atvirkščiai [80]. Sublimacija susideda iš pirminio ir antrinio džiovinimo. Pirminio džiovinimo metu vanduo išgarinamas iš produkto (ledo kristalai), o antrinio džiovinimo metu pašalinamas absorbuotas vanduo (neužšalęs vanduo). Liofilizavimo metu į sistemą gali būti pridėti ir krioprotektoriai – tai įvairūs cukrai, kurie apsaugo daleles nuo agregacijos ar destabilizacijos [81].

Purškiamasis džiovinimas – metodas, kurio metu išpurškiamas skystis į džiovinimo kamerą ir kontaktuodamas su karštu oru paverčiamas iškart į miltelius [82].

Vienas iš pagrindinių džiovinimo šalčiu minusų yra tas, jog šis metodas lyginant su purkštuviniu džiovinimu, brangesnis 4–7 kartus, todėl produkto kaina ne visiems prieinama, taip pat užima daugiau laiko – apie 2,5 ilgiau trunkantis procesas [83], dalelių dydis ir forma nėra tokios geros kaip purkštuvinio džiovinimo metu, o purkštuvinio džiovinimo metodas net 4–5 kartus ekonomiškesnis, kadangi sunaudojama mažiau elektros sąnaudų, taip pat gaunami milteliai yra stabilesni, kadangi juose mažiau drėgmės ir pasižymi geresniu tirpumu, todėl lengviau pritaikomi. Tačiau be visų plusų purkštuvinis džiovinimas turi ir minusų – naudojamos aukštos temperatūros (įeinančio oro gali būti nuo $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki $220\text{ }^{\circ}\text{C}$, o išeinančio oro nuo $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki $80\text{ }^{\circ}\text{C}$), kurios dažnai netinka bioaktyviems junginiams, ypač antocianams ir vitaminui C, nes skatina jų skilimą. Negana to, šis metodas nėra tinkamas toms uogoms, kurios pasižymi dideliu cukrų kiekiu, kadangi džiovinant pradeda lipti prie aparato sienelių ir sukelia džiovinimo sunkumų. Be to, kadangi karštas oras cirkuliuoja džiovinimo kameros dideliame tūryje, džiovinimo efektyvumas gana mažas, o lašelių dydžio kontrolė ribota, todėl gali pasiskirstyti netolygiai [82]. Dalelių dydis taip pat turi įtakos įkapsuliavimo kokybei. Mikro ar nanokapsulės lėčiau išsiskiria virškinamajame trakte [75].

1.6.1. Proceso optimizavimas

Tradiciskai bendras požiūris į analizę mikroįkapsuliavimo procese tiria vieną kintamąjį, o kiti veiksniai lieka pastovūs. Tačiau ši metodika turi trūkumų – lemia neoptimizuotus ir neefektyvius galutinius produktus ar procesus ir santykinai didelis eksperimentų skaičius, dėl šių priežasčių sunaudojama daug reagentų ir laiko. Siekiant išvengti šių trūkumų buvo sukurta paviršiaus atsako metodika eksperimentų optimizavimui, kuri susideda iš matematinės ir statistinės dalių, išreiškiančių ryšį tarp veiksnių ir atsako. Veiksniai, dar žinomi kaip nepriklausomi kintamieji, gali būti keičiami. Tuo tarpu atsakas, žinomas kaip priklausomas kintamasis, yra išmatuojama vertė, gauta eksperimento metu. Optimizavimo metu sudaromos minimalios ir maksimalios kintamųjų sritys, kuriomis remiantis atliekamas eksperimentas. Pagrindiniai paviršiaus atsako proceso etapai pavaizduoti 9 paveiksle.



9 pav. Pagrindiniai paviršiaus atsako proceso etapai [76]

Linijinis modelis leidžia nurodyti, kuria kryptimi dizainas turėtų būti iširtas, kad būtų sudarytos geriausios sąlygos. Paprasčiausias paviršiaus atsako metodo matematinis modelis gali būti išreiškiamas linijine priklausomybe ir išreiškiamas šia lygtimi (1):

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (1)$$

kur k – kintamųjų skaičius, β_0 – pastovi konstanta, β_i – linijiniai parametro koeficientai (regresijos koef.), x_i – nepriklausomi kintamieji, ε - eksperimentinės klaidos narys.

Norint nustatyti minimumo ar maksimumo vertes yra naudojama antrojo laipsnio lygtis (2):

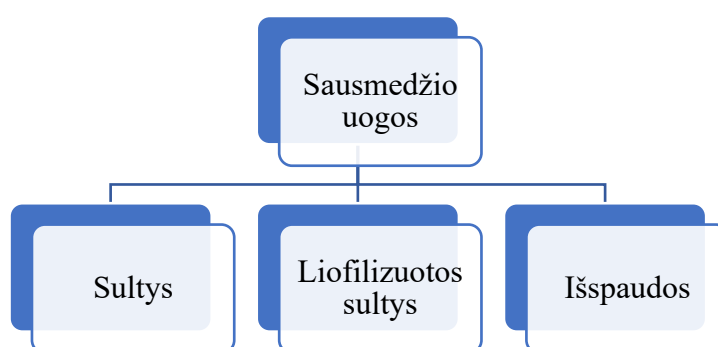
$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^2 x_i b_i + \sum_{1 \leq i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

Labiausiai žinomas paviršiaus atsako metodo būdas yra centriškai kompozinis eksperimentų planavimas [76].

2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Tyrimams pasirinktos valgomojo sausmedžio (lot. *Lonicera caerulea*) uogos, surinktos 2018 metais. Augalinės žaliavos paruošimas – analizei surinktos sunokusios uogos buvo spaudžiamos lėtaeige sulčiaspaude, kur buvo gaunamos sultys ir išspaudos. Sultys toliau buvo filtruojamos ir centrifuguojamos prie 20 °C laipsnių, 15 min, dalis gautų sulčių buvo liofilizuotos šalčiu. Tiek sultys, tiek išdžiovintos sultys buvo laikomos šaldiklyje -18 °C temperatūroje. Po sulčių susidariusios išspaudos buvo džiovinamos džiovyklėje, o vėliau smulkinamos cikloniniame malūne (Retsch, Haan, Vokietija) panaudojant 2 mm sietą ir laikomos tamsioje, vėsioje vietoje. Svarbu pabrėžti, jog vienalyčiai išspaudų mišiniai padidina bioaktyvių junginių ekstrahavimo našumą. Sausmedžio uogų paruošimo schema pavaizduota 10 paveiksle.



10 pav. Sausmedžio uogų paruošimo schema

2.2. Cheminiai reagentai ir medžiagos

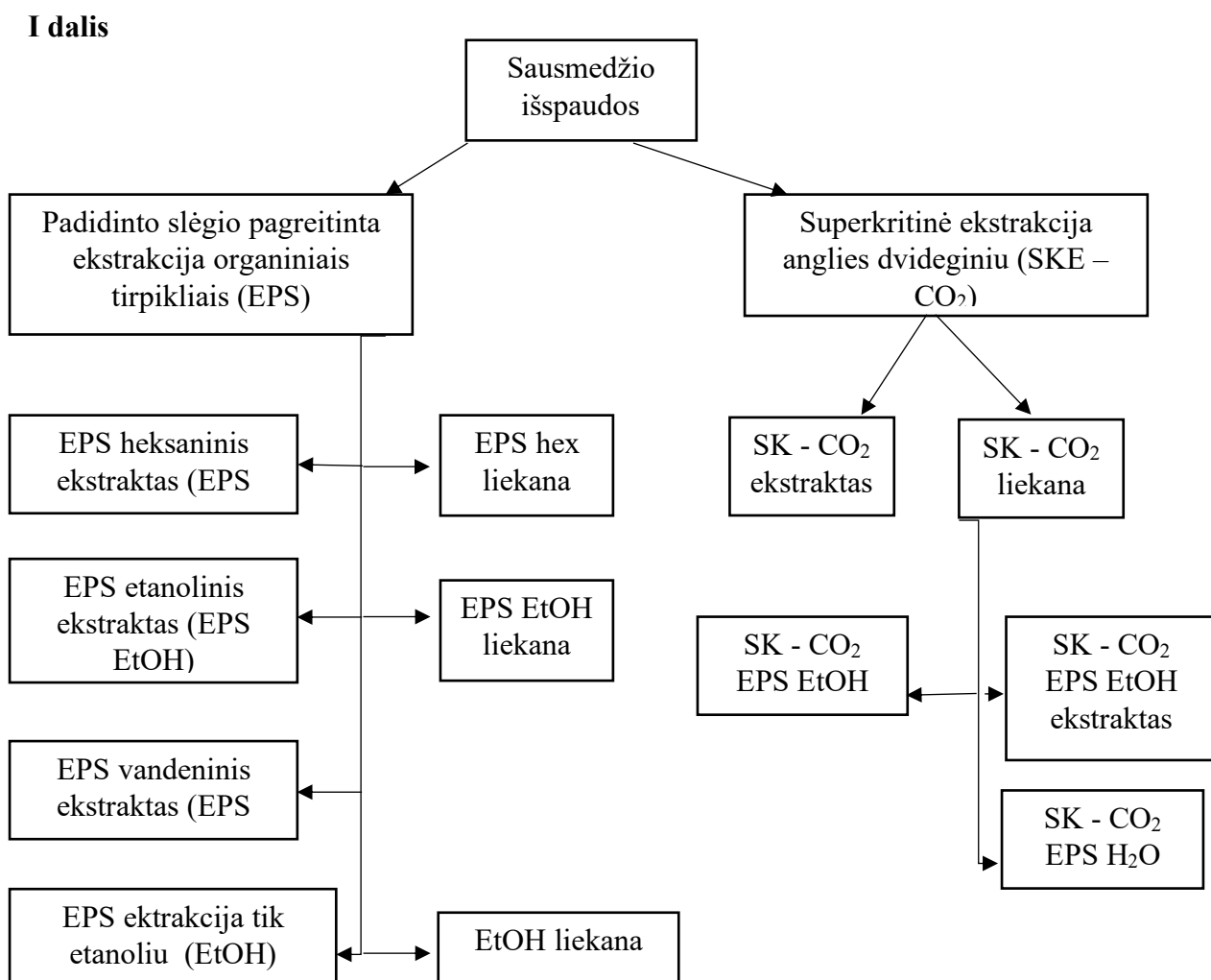
- *Ekstraktų paruošimui naudotos medžiagos ir reagentai* – analitinio švarumo metanolis (CH₃OH), etanolis (C₂H₅OH), heksanas (C₆H₁₄), kurie buvo gauti iš (Chempur, Lenkija), ultra švarus ir distiliuotas vanduo 0,054 μSi/cm, kurie buvo ruošti vandens gryninimo sistemoje (Milipore, Bedford MA, JAV), diatomitinė žemė gauta iš Sigma-Aldrich (Mousa, Set Luisas), CO₂ dujos 99,9%, Gaschema (Jonava, Lietuva).
- *Bendro fenolinių junginių kiekio nustatyme* – galo rūgštis (>99%, Fluka, Lenkija), *Folin – Ciocalteu* reagentas gautas iš Sigma-Aldrich (Bruchs, Šveicarija), natrio karbonatas (Na₂CO₃, 98%, bevandenis, CHEMPUR, Lenkija), metanolis ≥99,9%, Sigma-Aldrich (Vokietija).
- *Antioksidacinio aktyvumo nustatyme* – mikrokristalinė celiuliozė 20 μm, gauta iš Sigma-Aldrich (Mousa, Sent Luisas), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH• laisvasis radikalas, 95 %) ir 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis (troloksas, 97 %) gauti iš Sigma-Aldrich (Steinheim, Vokietija). 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS^{•+} laisvasis radikalas, 98%), 2,2'-azobio (2-amindinpropano) dihidrochloridas (AAPH) gauti iš Sigma-Aldrich (Steinheim, Vokietija), natrio chloridas (NaCl), kalio dihidrofosfatas (KH₂PO₄), vandeninis natrio hidrofosfatas (Na₂HPO₄ × 2H₂O), kalio perulsulfatas (K₂S₂O₈), kalio chlorias (KCl) buvo gauti iš StanLab (Liublinas, Lenkija),

3',6'-dihidroksipiro(izobenzeofuran-1(3H),9'-(9)ksanten-3-onas (fluoresceinas, Steingeim, Vokietija. Plastiko kiuvetės 10 × 10 × 45 mm (Fluka, Lenkija).

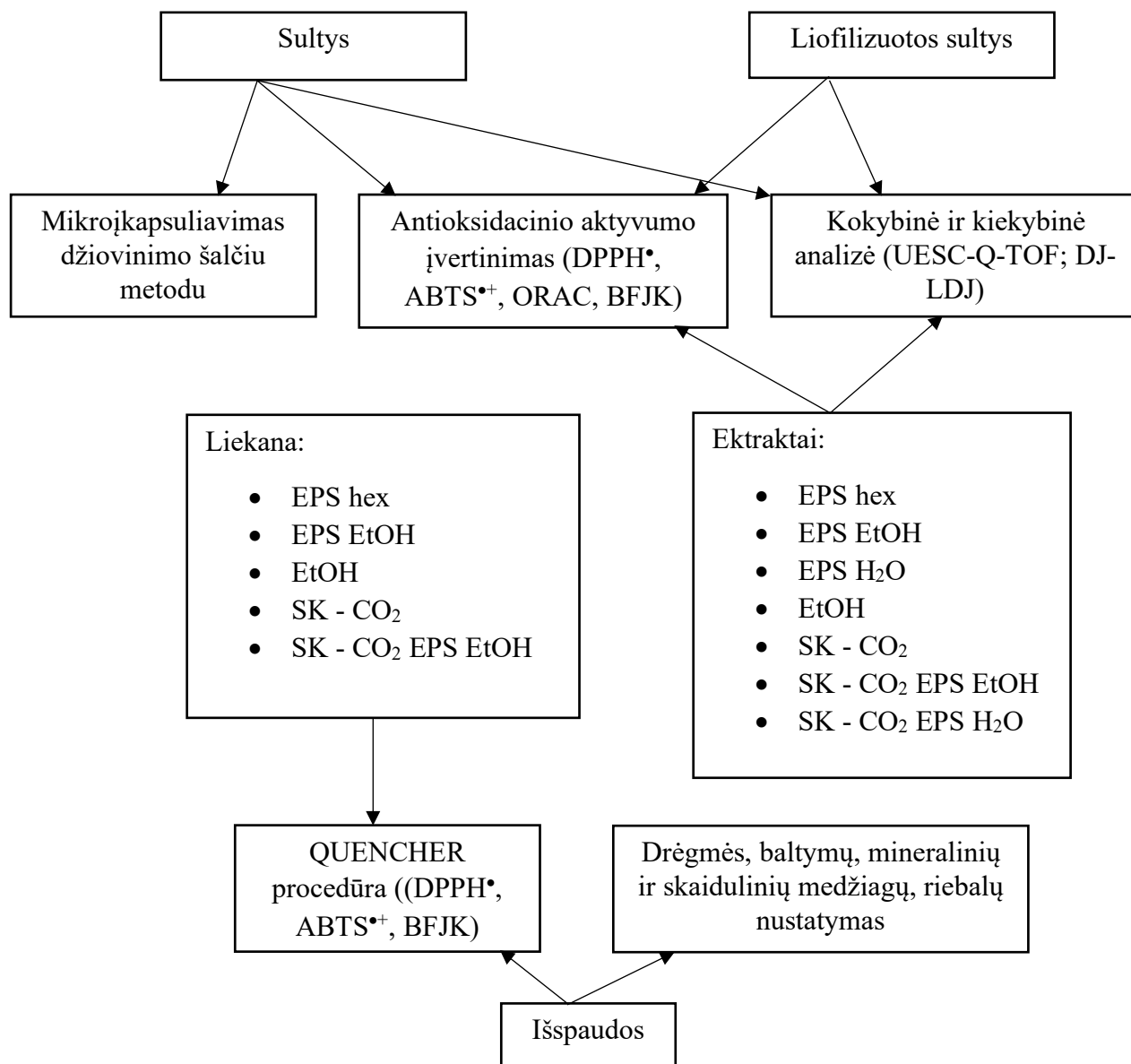
- *Įkapsuliavimo procese* – sojų baltymų izoliatas, maltodekstrinas iš www.myprotein.lt
- *Baltymų, riebalų, drėgmės ir mineralinių medžiagų nustatymui* – Sieros rūgštis_(konc.) H₂SO₄, natrio šarmas NaOH, fosforo rūgštis H₃PO₄, druskos rūgštis HCl gauti iš(Chempur, Piekary Slaskie, Lenkija), katalizatoriaus tabletė (3,5 g K₂SO₄; 290.4 g CuSO₄, Sigma-Aldrich), Taširo indikatorius,
- *Chromatografinėje analizėje* – buvo naudojami UESC analitinio švarumo tirpalai: acetonitrilas (C₂H₃N) metanolis (CH₃OH), skruzdžių rūgštis 98 % gauti iš Sigma-Aldrich (Steinheim, Vokietija), acto rūgštis 99,8 % (CH₃COOH) gauta iš Lach-Ner (Čekija), ultra švarus vanduo, kuris buvo ruoštas vandens gryninimo sistemoje (Bedford MA, JAV). Tyrimam atlikti buvo naudojamas šis standartai: cianidin-3-gliukozidas (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd., Kinija).

2.3. Tyrimo metodai

Norint iš sausmedžio išspaudų išgauti funkcionaliaisiais junginiais papildytus ekstraktus buvo taikomi šiuolaikiniai ekstrakcijos metodai – ekstrakcija padidintame slėgyje organiniais tirpikliais (EPS) ir superkritinę ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE – CO₂). Vykdytų eksperimentų schema pateikta 11 paveiklse.



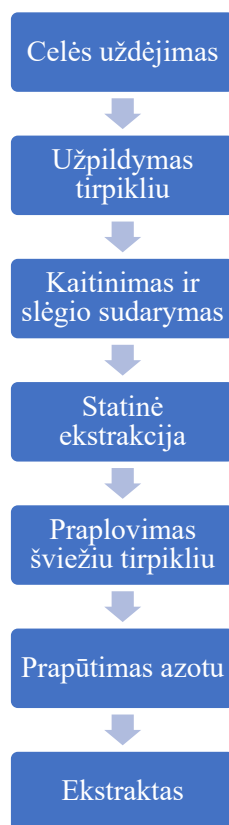
II dalis



11 pav. Vykdytų eksperimentų schema

2.3.1 Padidinto slėgio skysčių ekstrakcija organiniais tirpikliais (EPS)

Padidinto slėgio skysčių ekstrakcija organiniais tirpikliais buvo atlikta Dionex ASE 350 sistema (Dionex, Sunnyvale, JAV), kurios pagrindiniai žingsniai pavaizduoti 12 paveiksle.



12 pav. Padidinto slėgio skysčių ekstrakcijos organiniais tirpikliais principinė schema

Analitinėmis svarstyklėmis „KERN 770“ (Goti, Kern&Sohn GmbH., Alkstad, Vokietija) pasverta 4–5 g smulkintos 1 mm išspaudų frakcijos, kuri buvo sumaišyta su diatomitine žeme santykiu 1:1. Šis mišinys patalpintas į celę iš nerūdijančio plieno, o galuose ant nerūdijančio plieno fritų uždėti celiulioziniai filtrai, tai daroma norint išvengti frakcijos patekimo į surinkimo indą. Ekstrakcija atlikta naudojant šiuos tirpiklius – heksaną, etanolį bei vandenį. Ekstrakcija buvo vykdoma atliekant tris ciklus 15 min laikui, esant 1000 psi slėgiui ir skirtingoms temperatūroms, priklausomai nuo to, kuris tirpiklis buvo naudojamas (heksnui – 90 °C, etanolui – 70 °C, vandeniui – 120 °C). Organiniai tirpikliai iš ekstraktų buvo pašalinti rotaciniame garintuve („BUCHI Rotavapor R-210“, Kanada) esant 40 °C temperatūrai, o vanduo – liofilizatoriuje (MAXI DRY LYO, Danija). Gauti ekstraktai buvo saugomi tamsaus stiklo buteliukuose šaldiklyje esant -18 °C temperatūrai.

2.3.2 Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE – CO₂)

Ši ekstrakcija atlikta naudojant „Helix“ sistemą (Applied Separation, Allen-town, PA, USA) ir 99,9 % grynumo CO₂ dujas (Gaschema, Jonava, Lietuva).

17 g smulkintų sausmedžio išspaudų, patalpintos į 50 cm³ tūrio celę, o abiejuose jos galuose patalpinta absorbuojanti vata. Ekstrakcijos metu CO₂ dujų srautas išlieka pastovus – 2 l/min. Pradžioje vykdoma statinė ekstrakcija, kuri trunka 10 min, o jai pasibaigus prasideda dinaminė ekstrakcija. Ekstrakcijos buvo vykdoma 2–3 h, 65 °C temperatūroje, 400 bar slėgyje, kai kas 15 min analitinėmis svarstyklėmis („KERN 770“, Goti, Kern&Sohn GmbH., Alkstad, Vokietija) pasveriamas žinomo svorio surinkimo indas, kuriame renkamas ekstraktas. Gautas ekstraktas

surenkamas sandariame mėgintuvelyje ir toliau laikomas -18 °C temperatūroje iki tolimesnių eksperimentų.

Likusios išspaudos po SK–CO₂ ekstrakcijos buvo panaudojamos tolimesniems tyrimams, kadangi CO₂ yra nepolinis tirpiklis, kuris tirpina nepolinius ir mažai polinius lipofilinius junginius. Su šia kietąja frakcija toliau buvo vykdoma EPS ekstrakcija, kad būtų išekstrahuotos likusios polinės hidrofilinės medžiagos, panaudojant etanolį ir vandenį.

2.4 Bioaktyvių junginių analizė ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu (UESC-Q-TOF)

2.4.1. Askorbo rūgšties nustatymas taikant aukšto slėgio efektyviosios skysčių chromatografijos su diodų masės matricos detektoriumi metodą

Analizė buvo atlikta pagal modifikuotą Dodson, Young ir Soliman metodą, kuris buvo aprašytas 1992 metais [84]. Chromatografinė analizė atlikta Waters HPLC su Waters Reagent Manager siurbliu (Milford, MA, USA) ir Synejori 4u Polar-RP 80A, dydis – 250 × 4,60 mm analitine kolonėle. Bandiniai įleisti rankiniu injektoriumi Rheodyne 7125 (Rheodyne, RohnrtPark, Germany), kuris sujungtas su 20 µl injekcijos kilpa. Jame linijinis binaris gradientas buvo sudarytas 1 ml/min srautui naudojant 0,02 M NaH₂PO₄. 1 mg liofilizuotų sulčių buvo praskietos 1 ml vandeniui ir neskiestos sultys buvo leidžiamos į chromatografą. Analizei atlikti buvo daromi 3 pakartojimai, o rezultatai skaičiuojami pagal kalibracinę kreivę: $y = 17857,95x - 8160,86$; $R = 1$

2.4.2. Ultra efektyvioji skysčių chromatografija – masių spektrometrija

Siekiant nustatyti įvairių ekstraktų cheminės sudėties kokybinę ir kiekybinę sudėtį buvo naudojama ultra efektyvioji skysčių chromatografija – masių spektrometrinė (UESC – MS) analizė.

Kokybinei antocianų analizei atlikti buvo naudojama Waters Acquity Sistema su kvadrupoliniu skriejimo laiko masių detektoriumi. Analizių skirstymas atliktas atvirkščių fazių kolonėle Acquity UPLC® BEH C18 2,1x100 mm, sorbento dalelių dydis 1,7 µm (waters, Milford, JAV), kuria buvo palaikoma 40 °C temperatūra. Eliuentų sistema: A – 1 % skruzdžių rūgštis (v/v), B – 100 % acetonitrilas. Eliucijos trukmė – 17min, o detekcija atlikta esant 220 – 550 nm bangos ilgiui. Gradiento kitimas: 0 min – 1 % B; 7 min – 15 % B; 8 min – 100 % B; 10 min – 50 % B; 12 min – 1 % B. Detekcija atlikta esant 550 nm bangos ilgiui. Gradiento kitimas: 0 min. – 99 % A; 7 min. – 85 % A; 8 min. – 0 % A; 10 min. – 9,5 % A; 10 min. – 99 % A. Kvadrupolinis skriejimo laiko masių detektorius buvo nustatytas teigiamos elektrinės jonizacijos režimu. Masių spektrai užrašyti pilno skenavimo režime, intervale – m/z 100 – 800. Chromatografinių smailių identifikavimas buvo atliktas remiantis literatūros duomenimis bei MS/MS režimu gautų junginių fragmentais. Fragmentavimo įtampa celėje – 40 eV.

Naudojant Alam Zeb ir Michael Murikovic (Grazas, Austrija, 2010 m.) metodiką [85] buvo atlikta triacilglicerolių analizė. Išskirtymas atliktas taikant ultraefektyviosios skysčių chromatografijos chromatografą su kvadrupolinį skriejimo laiko masių detektoriumi. Šiam metodui pritaikyta Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm, 2.1 × 50 mm kolonėle (Waters, Milford, JAV), palaikant termostate 40 °C temperatūrą. Analizė atlikta izokratiškai. Naudota mobili fazė: 18 % izoprapanolio ir 82 % metanolio mišinys, kuriame buvo 0,1 % acto rūgšties ir 0,05 % amonio

acetato. Eliuento srauto greitis 0,4 ml/min, o analizės trukmės greitis 12 min. Masių spektrometras naudojamas ESI režimu, jonizacijai naudota – 5000 V įtampa, fragmentavimo celės įtampa 8 eV, džiovinančių dujų tėkmės greitis 8 l/min, o temperatūra 200 °C. ESI – MS spektrai buvo gauti m/z intervale nuo 100 iki 1500, kai skenavimo greitis buvo 1 Hz. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal molekulinės mases, MS/MS režimu gautus fragmentus bei lyginant juos su literatūros duomenimis, o santykinė triacilglicerolių sudėtis apskaičiuojama pagal ploto vienetus.

Kiekybinė analizė sultyse, ekstraktuose ir įkapsuliuotoje matricoje buvo atlikta UESC Waters UPLC Acquity H Class sistema su Xevo TQ-S masių detektoriumi. Tyrimo metu buvo naudojama Acquity BEH, C18 kolonėlė 1,7 μm, 2,1x100 mm. Eliuento sistema ir gradiento kitimas buvo pasirinkti tokie kaip kokybinės analizės (UESC-QTOF sistema). Judrios fazės tėkmės greitis – 0,4 ml/min., įleidžiamas tūris – 2 μl. Azoto dujos buvo naudojamas kaip džiovinančios (1000 l/h) ir išpurškiančios dujos (150 l/h), kur išpurškimo temperatūra 500 °C, o kapiliaro įtampa 1,5 kV. Kiekybinė analizė buvo atlikta naudojant išorinį standartą cianidin-3-gliukozidą. Kalibracinė kreivė $y = 2049,63x$; $R = 0,9993$. Junginių koncentracijos apskaičiuojamos pagal tiesinę plotų regresiją ir išreikštos mg/100g sausos masės (SM).

2.5 Tirpių sausų medžiagų/sacharidų kiekybinis nustatymas

Refraktometrinis metodas – pagrįstas šviesos lūžio rodiklio matavimu. Ant veidrodinio refraktometro paviršiaus ranka išspaudžiamas 1 lašas sulčių, matuojamos kambario temperatūros t.y. 20 °C laipsnių temperatūros sultys, taip kad mėginys vienodai padengtų stiklinį paviršių, kai prizmės yra viena prie kitos prispaustos. Atliekami 4 to paties mėginio matavimai, išvedamas vidurkis ir įvertinimas standartinis nuokrypis.

2.6 Ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimas

2.6.1. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK)

Šiam tyrimui tiek sultim, tiek išdžiovintom sultim, skiesti buvo naudojamas vanduo, o eksperimentui atlikti tinkama sulčių koncentracija buvo 0,01 ml/l, o išdžiovintų sulčių – 1mg/ml. Po ekstrakcijų gauti ekstraktai buvo tirpinami metanolyje, o skiedimam naudotas vanduo. Ekstraktų koncentracija, kuri buvo naudojama bandymuose – 0,5 mg/ml.

Bendras fenolinių junginių kiekis yra matuojamas pagal modifikuotą *Singleton, Orthofer ir Lamuela-Raventos* (1999) metodiką [86] ir išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentais (GRE, mg galo rūgšties/g bandinio). Taikant šį analizės būdą, 150 μl bandinio arba metanolio (kontrolinis bandinys) sumaišoma su 750 μl *Folin – Ciocalteu's* reagentu (2 M), prieš tai jį praskiedus distiliuotu vandeniu (1:9), o po 3min reakcijos įpilama 600 μl Na₂CO₃ tirpalo (75 g/l). Paruošti mėginiai laikomi tamsoje 120 min. Praėjus šiam laikui matuojama absorbcija esant 760 nm bangos ilgiui. Rezultatai apskaičiuojami pagal kalibracinę kreivės lygtį: $y = 10,339x + 0,0326$; $R = 0,9989$. Bendras fenolinių junginių kiekis išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentais mg/g GRE naudojant šią formulę (3):

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

kur C – polifenolių junginių kiekis (mg GRE/g);
 c – galo rūgšties koncentracija pagal kalibravimo kreivę (mg/ml);
 m – ekstrakcijai naudota mėginio masė (g).

2.6.2 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH•) radikalų sujungimo metodas

Šiam tyrimui sultims skiesti buvo naudojamas vanduo, o eksperimentui atlikti tinkama sulčių koncentracija buvo 0,05 ml/l. Po įvairių ekstrakcijų gauti ekstraktai buvo tirpinami metanolyje, o skiedimam naudotas vanduo. Eksperimentams naudojama koncentracija 0,1 mg/ml.

DPPH• laisvųjų radikalų sujungimo geba išmatuojama spektrofotometriškai pagal modifikuotą *Brand-Williams, Cuvelier ir Berset* (1995) metodiką [87] ir išreiškiama trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu ($TEAG_{DPPH\bullet}$, mg Trolokso/g bandinio). Taikant šią analizės metodiką, 500 μ l bandinio arba metanolio (kontrolinis bandinys) sumaišoma su 1000 μ l DPPH• radikalų ištirpintu metanolyje (esant bangos ilgiui 517 nm bangos ilgiui, absorbcija lygi $0,800 \pm 0,010$ A). Paruošti bandiniai laikomi tamsoje 120 min. Praėjus šiam laikui matuojama absorbcija esant 517nm bangos ilgiui. Rezultatai apskaičiuojami pagal kalibracinę kreivę: $y = 6,5426x + 4,4281$; $R = 0,9982$. Laisvųjų radikalų sujungimo geba (%) apskaičiuojama pagal šią formulę (4):

$$I = \frac{(AB-AA)}{AB} \times 100; \quad (4)$$

kur I – laisvųjų radikalų sujungimo aktyvumas %;
 AB – DPPH• sistemos optinis tankis;
 AA – sistemos su antioksidantu optinis tankis.

2.6.3 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties ABTS•+ laisvųjų radikalų sujungimo metodas

Šiam tyrimui tiek sultim, tiek išdžiovintom sultim skiesti buvo naudojamas vanduo, o eksperimentui atlikti tinkama sulčių koncentracija buvo 0,01 ml/l, o išdžiovintų sulčių – 0,1mg/ml. Po ekstrakcijų gauti ekstraktai buvo tirpinami metanolyje, o skiedimam naudotas vanduo. eksperimentam naudojama koncentracija 0,75 mg/ml.

ABTS•+ laisvųjų radikalų sujungimo geba išmatuojama spektrofotometriškai pagal modifikuotą *Re* ir kt. (1999) metodiką [88] ir išreiškiama trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu ($TEAG_{ABTS\bullet+}$, mg Trolokso/g bandinio). Stabilūs ABTS•+ radikalai gaunami sumaišius 50 ml ABTS•+ tirpalo (2 mmol/l fosfatinio PBS buferinio tirpalo, ruošiamo 1 l dist. H₂O ištirpinant 8,18 g NaCl; 0,27 g KH₂PO₄; 1,78 g Na₂HPO₄ × 2H₂O ir 0,15 g KCl (pH=7,4)) su 200 μ l K₂S₂O₈ tirpalo (70 mmol/l dist. H₂O) ir išlaikant gautą mišinį tamsoje 16–18val. Darbinis ABTS•+ tirpalas ruošiamas praskiedžiant koncentruotą mišinį su PBS buferiu iki $0,700 \pm 0,005$ A esant 734nm bangos ilgiui. Taikant šią analizės metodiką, 25 μ l bandinio arba metanolio (kontrolinis bandinys) sumaišoma su 1500 μ l darbinio ABTS•+ tirpalu. Paruošti bandiniai laikomi tamsoje 120min. Praėjus šiam laikui matuojama absorbcija esant 734nm bangos ilgiui. Rezultatai apskaičiuojami pagal kalibracinę kreivę: $y = 0,2087x - 1,013$; $R = 0,999$. Laisvųjų radikalų sujungimo geba (%) apskaičiuojama pagal 2 formulę.

2.6.4. Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas (ORAC)

ORAC bandymas buvo atliekamas pagal *Prior* ir kt. (2003) pasiūlytą metodą [89] su pakeitimais ir išreiškiama Trolokso ekvivalentų antioksidaciniu aktyvumu (TEA_{GORAC}, mg Trolokso ekv./g bandinio). Eksperimentas pagrįstas peroksido radikalų surišimu, kurį generuoja azobis (AAPH). Pirmiausiai yra ruošiami fluoresceino tirpalai: 1) ruošiamas S1 tirpalas. Į 100ml matavimo kolbą pasveriamas 0,045 g fluoresceino miltelių ir užpilama dalimi PBS tirpalo. Tirpinama ultragarso vonelėje, kol fluoresceino milteliai ištirpsta. Po tirpinimo fluoresceino tirpalas praskiedžiamas PBS tirpalu iki žymės; 2) tirpalo S2 ruošimui, paimama 0,5 ml S1 ir 100 ml matavimo kolboje praskiedžiamas tirpalu iki žymės; 3) S3 ruošiamas paimant 0,8 ml S2 tirpalo ir 50 ml matavimo kolbutėje praskiedžiant PBS tirpalu iki žymės.

Taikant šią analizės metodiką 25 µl bandinio arba PBS (tuščias bandinys) ir 150 µl fluoresceino supilama į juodą nepermatomą 96 šulinėlių lėkštelę. Inkubuojama 15 min, esant 37 °C temperatūrai. Po inkubacijos su daugiakanale pipete įpilama 25 µl AAPH. Fluorescencija matuojama 120 ciklų (ciklo trukmė 1,1 min) spektrofotometru (FLUORstar Omega reader BMG Labtech, Offenburg, Vokietija). Rezultatai apskaičiuojami pagal kalibracinę lygtį: $y = 0,5882x - 2,5238$; $R = 0,9776$. Po kalibracinės kreivės esantis plotas (AUC) kiekvienam bandiniui apskaičiuojamas integruojant santykinę fluoresceino kreivę. AUC apskaičiuojamas pagal formulę (5):

$$AUC = 1,1 + \sum_{i=1}^{120} \frac{f_i}{f_0}, \quad (5)$$

čia f_0 – pradinė fluoresceino vertė (0 min);

f_i – fluoresceino vertė tam tikrą laiką (i-tąją min).

AUC_{net} vertė apskaičiuojama: AUC_{mėginio} - AUC_{kontrolė} (atimant kontrolę iš kiekvieno mėginio).

2.7 Kietosios frakcijos antioksidacinės gebos įvertinimas

(QUENCHER metodika)

Tyrimui atlikti buvo pasirinkta paruošti skirtingų koncentracijų išspaudų ir mikrokristalinės celiuliozės mišiniai, kurių santykiai buvo – 1:400 (BFJK, DPPH• nustatyti ekstraktuose), 1:1000 (BFJK, DPPH• nustatyti išspaudose).

Antioksidacinis aktyvumas buvo tirtas BFJK, DPPH•, metodais įvairiems ekstraktams pritaikius QUENCHER procedūrą.

BFJK nustatyti į epindorfus dedama 10 mg mėginio arba mikrokristalinės celiuliozės (kontroliniam bandiniui) ir įpilama 150 µl dist. H₂O ir 750 µl *Folin – Ciocalteu's* tirpalo, po 3 min. 600 µl Na₂CO₃ tirpalo (75 g/l). Bandiniai purtomi purtyklėje („Platform Shaker Universal PSU 20“) 120 min., centrifuguojami 14000 aps./min., 5 min). Matuojama absorbcija esant 760 nm bangos ilgiui. Rezultatai apskaičiuojami pagal kalibracinę kreivę: $y = 28,228x - 0,0911$; $R = 0,9829$ ir 1 formulę.

DPPH• radikalų sujungimui nustatyti į epindorfus dedama 10 mg mėginio arba mikrokristalinės celiuliozės (kontroliniam bandiniui), įpilama 500 µl metanolio ir 1000 µl 897 µmol/l DPPH• metanoliniu. Bandiniai purtomi 120 min., centrifuguojami 14000 aps./min., 5 min). Matuojama absorbcija esant 517 nm bangos ilgiui. Rezultatai apskaičiuojami pagal kalibracinę kreivę: $y = 5,7634x - 0,4565$; $R = 0,9902$ ir 2 formulę.

ABTS^{•+} laisvųjų radikalų surišimo gebai įvertinti į epindorfus dedama 10mg mėginio arba mikrokristalinės celiuliozės (kontroliniam bandiniui), įpilama 25µl metanolio ir 1500µl darbinis ABTS^{•+}. Bandiniai purtomi 120min., centrifuguojami 14000 aps./min., 5min). Matuojama absorbcija esant 734nm bangos ilgiui. Rezultatai apskaičiuojami pagal kalibracinę kreivę: $y = 0,2155x - 0,3433$; $R = 0,9996$ ir 2 formulę.

2.8 Kietosios frakcijos cheminės sudėties nustatymas

Baltymų, riebalų, mineralinių medžiagų ir drėgmės kiekis nustatomas remiantis AOAC metodika (AOAC, 1995) [90].

2.8.1. Baltymų kiekio nustatymas

Eksperimentas atliekamas pagal Kjeldalio metodą naudojant automatinę Kjeltec įrangą. Kjeldalio metodas pagrįstas tiriamo objekto organinių junginių mineralizavimu, azoto kiekį nustatant pagal susidariusį NH₃ kiekį. Baltymų medžiagų kiekis apskaičiuojamas, padauginus azoto kiekį iš perskaičiavimo koeficiento 5,3

2.8.2 Riebalų kiekio nustatymas Soksleto metodu

Daugelis riebalų nustatymo metodų paremti bandinio riebalų ekstrahavimu organiniais tirpikliais ir riebalų kiekio ekstrakto ar ekstrahuojamame bandinyje nustatymu. Šiam tikslui naudojamos žemos virimo temperatūros, lengvai nuo riebalų atskiriami tirpikliai (chloroformas, etanolis ir kt.). Tyrimui atlikti taikoma Soksleto ekstrakcija naudojant automatinį ekstraktorių (Behr Labor – Technik, Düsseldorf, Vokietija). Analizė vykdoma 3 val.

2.8.3 Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas

Bendras mineralinių medžiagų (pelenų) kiekis gali būti nustatytas iš pelenų kiekio, gauto sudeginus bandinį 500–600 °C temperatūroje. Būtina atsižvelgti į tai, kad deginimo metu gali vykti įvairūs pašaliniai procesai. Deginant bandinį aukštesnėje nei 600 °C temperatūroje, neišvengiami bus sieros fosforo, chloro nuostoliai. Deginant produktus, kurių sudėtyje daug chloridų, gali susidaryti Fe, Pb, Al, Cu chloridai.

2.8.4 Drėgmės kiekio nustatymas

Drėgmės kiekį žaliavoje galima nustatyti įvairiais metodais: džiovinimo, distiliavimo ir kt. Laboratorinėmis sąlygomis drėgmė dažniausiai nustatoma džiovinimo metodu, apskaičiuojant jos kiekį pagal sausų medžiagų kiekį. Šiais metodais drėgmės kiekis produkte nustatomas, džiovinant bandinį džiovinimo krosnelėje. Gravimetrinė analizė vykdoma džiovinimo krosnelėje esant 105 °C temperatūrai.

2.8.5. Skaidulinių medžiagų nustatymas

Bendram skaidulinių medžiagų kiekiui nustatyti į filtravimo maišelį pasveriami apie 1 g sausmedžio išspaudų ir sandariai uždaroma. Prieš analizuojant skaidulinių medžiagų kiekį analizatoriumi ANKOM2000, mėginiai turi būti nuriebinami petrolio eteriu. Analizė sudaryta iš kelių etapų: 1) 40 min vykdoma rūgštinė hidrolizė su 1 M H₂SO₄; 2) 40 min vykdoma šarminė hidrolizė su 1 M NaOH; 3) atliekami du plovimai po 5 min su rūgštimi; 4) atliekami 3 plovimai po 5 min su šarmu. Po šių etapų analizės maišeliai plaunami acetone 3–5 min, nusausinami ir išdžiovinami 102 °C temperatūroje. Po to mėginiai džiovinami 2 val 600 °C temperatūroje, jog sumažėtų organinių junginių kiekis. Bendras organinių medžiagų kiekis apskaičiuojamas pagal formulę (6):

$$BSMK = 100 \times \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{W2}; \quad (6)$$

kur

- BSMK – bendras skaidulinių medžiagų kiekis %;
- W1 – maišelio svoris g;
- W2 – mėginio svoris g;
- W3 – organinių medžiagų kiekis;
- C1 – kontrolinio mėginio (tuščio maišelio) pelenų kiekis

2.9 Dujų chromatografija

2.9.1. Riebalų rūgščių (RR) sudėties nustatymas dujų chromatografijos (DJ – LJD) metodu

Pirmiausia atliekamas riebalų peresterinimas norint nustatyti riebalų rūgščių sudėtį dujų chromatografijos metodu. Paimama 0,5 g medžiagos ir sumaišoma mėgintuvėlyje su 4 ml 0,5 N metanoliniu NaOH. Gautas mišinys labai gerai supurtomas. Mėgintuvėlis pritvirtinamas prie grįžtamojo šaldytuvo taip, jog mėgintuvėlio dugnas siektų vandens vonelę. Verdama 5–10 min. ar daugiau, kol išnyksta riebalų fazė. Kai baigiama esterifikuoti riebalus, įpilama 5 ml borotrifluorido metanolinio komplekso ir dar verdama 2 min. Vėliau mėgintuvėlis atvėsinaamas iki kambario temperatūros ir praskiedžiamas 5 ml heksanu ir 5 ml NaCl sočiu tirpalu. Viskas labai gerai supurtoma ir paliekama stovėti, kol atsiskiria heksano sluoksnis. Pastero pipete nuimamas heksano sluoksnis, kuris centrifuguojamas 12000 aps./min 10 min ir iki tolimesnės analizės laikomas 4 °C temperatūroje. Galutiniam bandymui paimama 100 μl heksano fazės ir sumaišoma su 900 μl heksano. Chromatografinė analizė atliekama naudojant liepsną jonizuojančiu detektoriumi. Krosnies temperatūra užprogramuojama, jog 150 °C temperatūra būtų išlaikoma 5 min, vėliau didinama iki 230 °C temperatūros 6 °C/min greičiu, o nuo 230 °C iki 250 °C didinama 2 °C/min greičiu ir išlaikoma šioje temperatūroje 10 min. Detektoriaus temperatūra – 280 °C, o inžektoriaus 250 °C. Rūgščių metilo esteriai identifikuojami pagal sulaikymo laikus juos lyginant su žinomų riebalų rūgščių standartais, o procentinė riebalų rūgščių sudėtis apskaičiuojama pagal smailių plotus procentais. Riebalų rūgščių sudėtis nustatoma panaudojant dujų chromatografijos metodą LST EN ISO 12966-1:2015 [91]. Naudojant šį metodą nustatomi anglies atomus turinčių riebalų rūgščių metilo esteriai.

2.9.2 Lakiųjų junginių nustatymas

Sausmedžio SKE-CO₂ ir EPS heknasninio ekstraktų lakiųjų junginių sudėtis analizuota su išsamios dujų chromatografijos įranga GC×GC–TOF/MS LECO. Analizuojama ekstraktų mėginių koncentracija 10 mg/ml pentane su vidiniu standartu. GC×GC–TOF/MS LECO įrenginyje instaliuotos dvi kolonėlės, kurios turi skirtingą poliškumą – nepolinė BPX-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) ir polinė BPX-50 (1,8 m × 0,1 mm × 0,1 μm). Pirminėje kolonėlėje temperatūra keliama 5 °C/min greičiu nuo 50 °C (0,2 min) iki 280 °C (10 min); antroje atitinkamai palaikoma 15 °C aukštesnė temperatūra. Inžektoriaus temperatūra 280 °C, įleidžiama 1 μl bandinio be srauto paskirstymo, po 60 s atidaromas srauto paskirstymo ventilis santykiu 1: 20, jonų šaltinyje palaikoma 250 °C temperatūra, o detektoriuje 1550 V įtampa, 70 eV. Masių skenavimas vykdomas 10 spektrų/s greičiu 35–550 m/z intervale. Analizuojant ekstraktų mėginius naudotas 480 s tirpiklio smailės atmetimas. Kiekviena analizė buvo pakartota 3 kartus.

Junginių identifikavimas: ekstraktų lakiųjų junginių sudėtis analizuota su LECO programine įranga (ChromaTOF v.4.22). Junginiai buvo identifikuoti NIST ir 3 kitomis masių spektrų bibliotekomis (sutapimas ne mažiau 700) ir eksperimentiškai, pagal *n*-alkanų C₇-C₃₀ standartu nepolinėje kolonėlėje, gautus Kovačo sulaikymo indeksus (KI) lyginant su lakiųjų junginių sulaikymo laikais bei literatūroje rastais duomenimis. Lakiųjų junginių kiekis išreikštas % nuo bendro DC–TOF/MS chromatogramos smailių ploto.

2.10 Antocianinų mikrokapsuliavimo efektyvumo nustatymas naudojant džiovinimo šalčiu metoda

Mikrokapsuliavimui naudotos dvi skirtingos matricos (apvalkalo medžiagos):

- Maltodekstrinas
- Sojų baltymų izoliatas

Į plačiadugnę kolbą pasveriami skirtingi kiekiai matricų, priklausomai nuo to, kaip sumodeliuoja naudota programa (Design–Expert 7.0), 200 g distiliuoto vandens, 5 g sausmedžio sulčių ir skirtingi kiekiai matricų, priklausomai nuo to, kaip sumodeliuoja naudota programa (Design – Expert). Gautas mišinys 24 val maišomas magnetine maišykle. Tirpalas homogenizuojamas 7 min 21000 aps./min greičiu ir džiovinamas liofilizatorium.

Bendras antocianinų kiekio nustatymas mikrokapsulėse: 20 mg gautų miltelių ištirpinama 1 ml metanolio, acto rūgšties ir vandens tirpale, santykiu (50:8:42) ir vortkesuojama 1 min (“Bio vortex V1 Bioscan“, Ryga, Latvija). Atlikus šią procedūrą, supurtytas mišinys dedamas į ultragarso vonelę („Ultrasonics“, Astra-Son™, JAV), kurioje laikoma 20 min, o po to centrifuguojama 8 min 14000 aps./min greičiu. Po centrifugavimo mėginys filtruojamas (0,22 μm PTFE membraniniu filtru, VWR International), praskiedžiamas metanolio ir injektuojamas į ultra - efektyvios skysčių chromatografijos prietaisą.

Antocianinų kiekio, esančių paviršiuje, nustatymas: 20 mg gautų miltelių ištirpinama 1 ml metanolio, acto rūgšties tirpale, santykiu (99:1), vortkesuojama 1 min ir centrifuguojama 8 min 14000aps./min greičiu. Po centrifugavimo mėginys filtruojamas, praskiedžiamas metanolio ir injektuojamas į ultra - efektyvios skysčių chromatografijos prietaisą [92].

Antocianinų išeiga, regeneravimas ir įkapsuliavimo efektyvumas apskaičiuojamas taikant šias formules:

$$I\text{šeiga} = \frac{\text{miltelių masė (g)}}{\text{sausųjų medžiagų kiekis prieš išpurškimą (g)}} \times 100 \quad (7)$$

$$R\text{egeneravimas} = \frac{\text{antocianinų kiekis milteliuose (mg/g)}}{\text{antocianinų kiekis ekstrakto (mg/g)}} \times 100 \quad (8)$$

$$A\text{ntocianinų IE} = \frac{\text{bendras antocianinų kiekis}^i - \text{paviršiaus antocianinų kiekis}}{\text{bendras antocianinų kiekis}^i} \times 100 \quad (9)$$

ⁱ atitinka kiekvieną atskirą antocianiną

2.11 Antocianinų mikroįkapsuliavimo proceso optimizavimas

Mikroįkapsuliavimo optimalios sąlygos, siekiant gauti didžiausią įkapsuliavimo išeigą, nustatytos atlikus matematinį paviršiaus atsako planavimo metodą, pritaikant centriškai kompozicinį eksperimentinį modelį. Proceso optimizavimas sumodeliuotas naudojant statistinę programą Design–expert 7.0 (Stat-Ease Inc. Mineapolis, JAV). Optimizuojant mikroįkapsuliavimo procesą buvo keičiami du parametrai – maltodekstrino ir sojų baltymų izoliato kiekiai. Tyrimų duomenys išanalizuoti dispersinės ir koreliacinės – regresinės analizės metodais. Maltodekstrino (A) ir sojų baltymų izoliato (B) kiekiai užkoduoti dviem lygiais (-1, +1). Nepriklausomi kintamieji pavaizduoti 3 lentelėje.

3 lentelė. Nepriklausomų kintamųjų užkodavimas optimizuojant mikroįkapsuliavimo procesą

Simboliai	Nepriklausomi kintamieji	Užkoduoti lygiai	
		-1	+1
A	Maltodekstrinas, g	3	12
B	Sojų baltymų izoliatas, g	1	6

Mikroįkapsuliavimo išeiga (%) apskaičiuojagam pagal formulę (10):

$$b_0 = \sum_{i=1}^2 x_i b_i + \sum_{i=1}^2 b_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq 2} b_{ij} x_i x_j \quad (10)$$

kur b_0 – laisvasis statistinio modelio narys;

b_i – pagal eksperimento rezultatus apskaičiuoti pirmo laipsnio statistinio modelio rezultatai;

b_{ij} – lygties koeficientai įvertinantys porinės sąveikos efektus $i \neq j$.

Modelio patikimumas nustatytas įvertinant koeficientų reikšmingumą, regresijos koeficientą (R^2) ir Fišerio testo vertę (F), kurios yra gaunamos dispersinėje analizėje (ANOVA). Paviršiaus atsako metodas ir kontūrų plotas buvo sukurtas naudojant kvadratinį daugianarį. Atlikti du bandymų pakartojimai ir rezultatai pateikiami kaip vidurkio reikšmė.

2.12 Rezultatų statistinė analizė

Eksperimentų duomenys apdoroti naudojant statistinius duomenų analizės paketus Microsoft Office Excel (Microsoft, JAV) ir kompiuterinę programą Design – expert 7.0. Visi eksperimentai kartoti 2–4 kartus, o duomenys išreikšti vidurkais ir apskaičiuojant standartinį nuokrypį. Mikroįkapsuliavimo plano patikimumas įvertintas dispersine analize (ANOVA).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Sausmedžio išspaudų sudėtis

Atliktų tyrimų metu buvo nustatyti išspaudose esantys gyvybiškai svarbūs sveikos mitybos komponentai – baltymų, mineralinių medžiagų, riebalų ir drėgmės kiekiai, kurie apibūdina maistinę vertę. Tyrimams naudotos 0,2 mm frakcijos išspaudos, kuriose baltymų rasta 10,37 %, mineralinių medžiagų 4,82 %, riebalų 11,72 %, drėgmės 11,21 % (žr. 4 lent.). Giovanni Caprioli ir kt. (2016) mokslininkai atliko tyrimą šviežiose uogose ir nustatė baltymų kiekį – 2 %, mineralinių medžiagų kiekį – 0,45 %, riebalų kiekį – 0,01 %, drėgmės kiekį – 8,34 % ir šios vertės gerokai skiriasi nuo išspaudų. Skaidulinių medžiagų kiekis buvo rastas 8,2 %, tuo tarpu mokslinėje literatūroje galima rasti, jog skaidulinių medžiagų kiekis sausmedžio uogose yra 8,34 % [14]. Taigi, palyginus šiuos rezultatus galima teigti, jog bandymas buvo atliktas tiksliai, kadangi atitinka gautus šaltiniuose.

4 lentelė. Išspaudų cheminės sudėtis

Komponentai	Kiekis, %
Baltymai	10,37±1,14
Mineralinės medžiagos	4,82±3,66
Riebalai	11,72±0,96
Drėgmė	11,21±0,12
Skaidulinės medžiagos	8,2±0,07

3.2 Sausmedžio sulčių, išėigos, vitamino C ir sausųjų tirpių medžiagų koncentracija

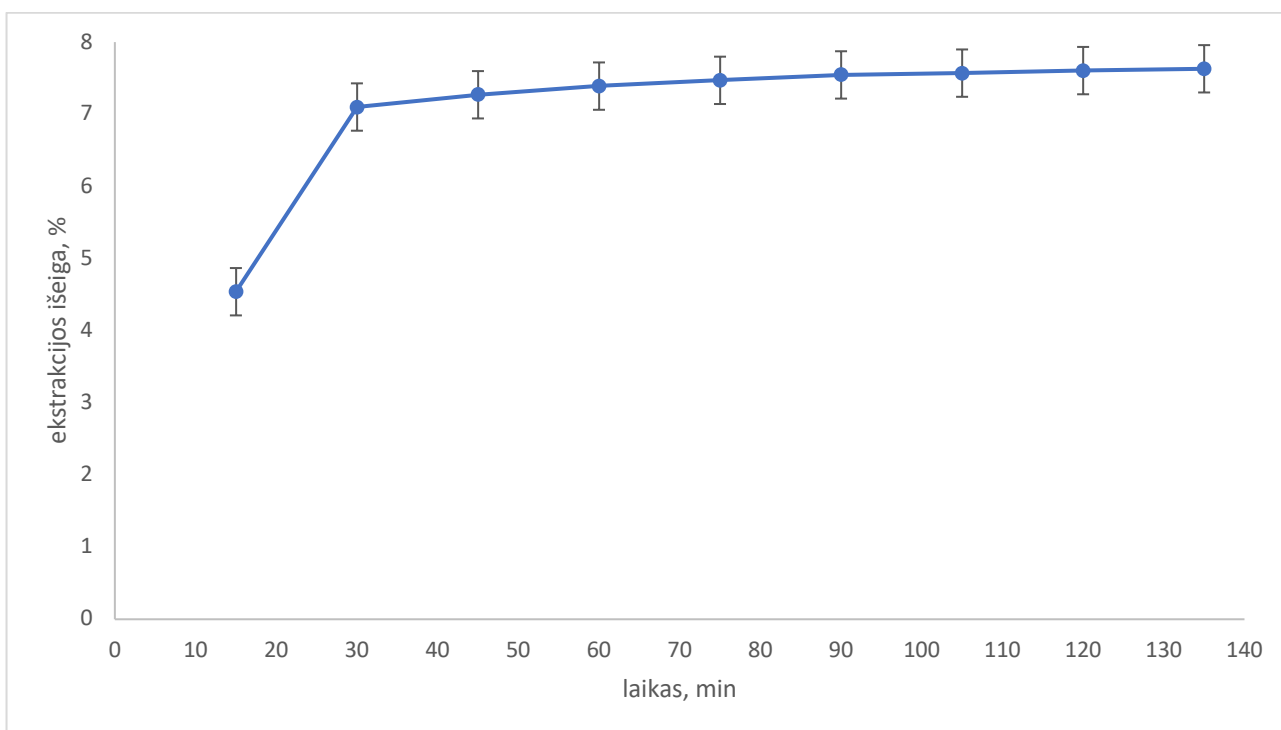
Tyrimo metu spaudžiant sultis, gauta jų išėiga – 82 %, o išspaudų – 18 %. Literatūroje galima rasti, jog spaudžiant sausmedžio sultis, sulčių išėiga gaunama 80–85 %, o išspaudų 15–20 % [3], todėl galima teigti, jog eksperimento metu gauti rezultatai yra tikslūs. Vitamino C kiekiui uogose didelę įtaką daro klimato sąlygos, genotipas, derliaus nuėmimo laikas. Askorbo rūgšties nustatymui buvo naudojamos sausmedžio sultys, kuriose vitamino C nustatyta – 3,28 mg/100 gr uogų. Mokslinėje literatūroje galima rasti įvairių vitamino C kiekio rezultatų, Mateja Senica ir kt. (2018) nustatė, tyrinėjo keturias veisles – *Aurora*, *Borealis*, *Honey Bee* ir *Tundra* ir nustatė, kad vitamino C koncentracija varijavo nuo 17,75 iki 25,77 mg/100 gr šviežių uogų [9], o Jurikova ir kt. (2012) savo tyrime nustatė, kad šis kiekis svyruoja nuo 4,86 iki 20,96 mg/100 gr uogų [93]. Taigi, lyginant darbe gautus rezultatus su moksline literatūra, galima pastebėti, kad šiame darbe nustatytas vitamino C kiekis yra šiek tiek mažesnis. Tuo tarpu liofilizuotose sultyse buvo nustatytas 77,08 mg/100 gr uogų (perskaičiuota per 100 gr šviežių uogų). Lyginant šiuos rezultatus tarpusavyje, galima pastebėti, kad vitamino C kiekis liofilizuotose sultyse daug didesnis. Taip yra todėl, kad džiovinant sultis šalčiu iš jų pašalinamas vanduo ir gaunama didesnė koncentracija.

Vertinant sausų tirpių medžiagų kiekį °Brix, nustatyta, jog sausmedžio sultyse buvo 13,2 °Brix sausų tirpių medžiagų. Noémie Auzanneau ir kt. mokslininkai tyrinėdami sausmedžio sultis nustatė,

kad ši vertė gali varijuoti nuo 9,8 °Brix iki 18,3 °Brix, Wojdylo ir kt. (2018) tyrė skirtingų veislių Lenkijoje užaugintų uogų sultis, autoriai nustatė, kad tirpių sausų medžiagų gali būti nuo 10,1 iki 15,8 °Brix. Tai priklauso nuo veislės, uogų brandos ir surinkimo laiko [1]. Taigi, lyginant rezultatus su moksline literatūra, eksperimento metu gauti duomenys yra panašūs.

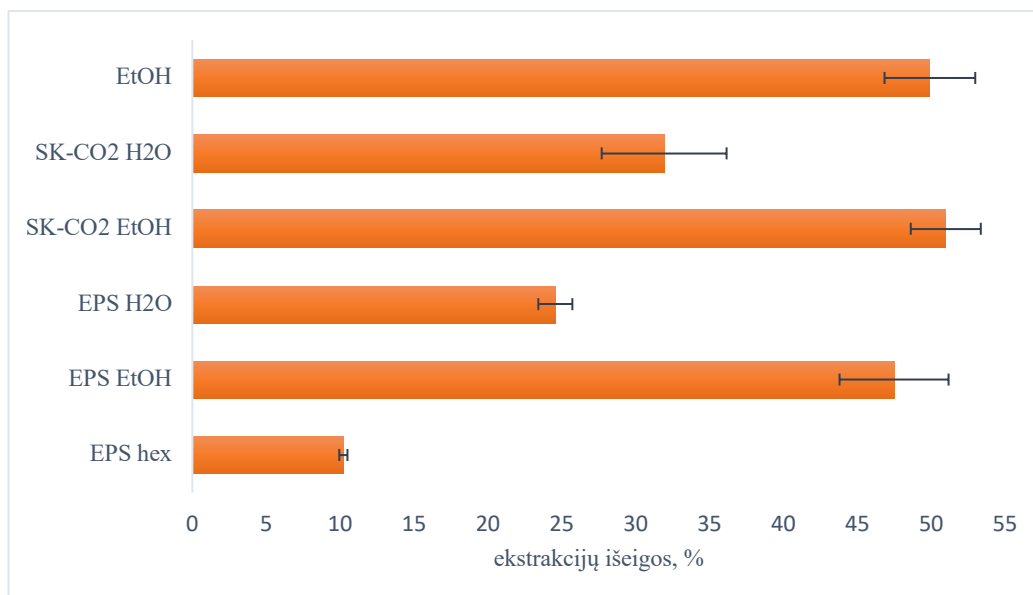
3.3 Ekstraktų išeigos

Sausmedžio uogų išspaudų ekstraktai buvo gauti, taikant SKE – CO₂ ekstrakciją, panaudojant nepolinį tirpiklį – CO₂ dujas. Likusios išspaudos po superkritinės CO₂ ekstrakcijos buvo ekstrahuotos poliniais tirpikliais etanoliu ir vandeniu taikant ekstrakciją skysčiais padidintame slėgyje. Papildomai buvo vertinama ekstraktų išeigos priklausomybė nuo tyrimu buvo vertinama ekstrakcijos išeigos priklausomybė nuo ekstrakcijos laiko. Superkritinė ekstrakcija buvo atlikta taikant – 400 bar slėgį, 65 °C temperatūrą, o CO₂ dujų srautas – 2 l/min ekstrakcijos laikas - 135 min. Iš pateikto grafiko (žr. 13 pav.) galima matyti, kad efektyviausiai ekstrakcija vyko ir didžiausia išeiga gauta pirmąjį pusvalandį, kai išeiga pasiekė 7 %, o vėliau ekstrakcijų išeigos žymiai nesiskyrė. Ekstrakto išeiga po 135 min – 7,63 %. Kadangi duomenų literatūroje yra nedaug, todėl sunku vertinti rezultatus su mokslinėmis publikacijomis. Tačiau yra duomenų apie sausmedžio žiedus. Hsia-Fen Hsu ir kt. (2016) taikydami superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginio ekstrakcijos metodą, tyrė japoniškojo sausmedžio lot. *Lonicera japonica* žiedus, taikant šiuos parametrus – 45 °C temperatūra, 120 min ir skirtingi slėgiai – 150, 250 ir 350 bar. Iš gautų rezultatų mokslininkai pastebėjo, kad ekstrakcijos išeigos tarpusavyje ženkliai nesiskyrė ir siekė apie 10 % [94].



13 pav. Superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginio sausmedžio išspaudose išeigų kreivė

Išspaudoms ir po SKE–CO₂ ekstrakcijos pašalinus lipofilinę frakciją likusios išspaudos ekstrahuotos EPS metodu, panaudojant polinius ir nepolinius tirpiklius – heksaną, etanolį ir vandenį. Ekstrakcijų išeigos pateiktos 14 paveiksle.



14 pav. Sausmežio uogų išspaudų gautų ekstraktų išėigos, proc.

Didžiausios ekstraktų išėigos gautos ekstrahuojant etanoliu – 47,48 %, ir etanoliu po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu likusią frakciją – 50,98 %. Iš šių rezultatų matome, jog tarpusavyje išėigos skiriasi labai nežymiai. Ekstrahuojant heksanu ekstraktų išėiga buvo – 10,22 %, gauta ekstrakto išėiga panaši į SKE – CO₂ abu ekstraktai gauti nepoliniais tirpiklais. Vandeniniai ekstraktai taip pat tarpusavyje skiriasi nežymiai: po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu likusios frakcijos išėiga siekia 31,92 %, o EPS ekstrakcijos metu gauta išėiga siekia 24,56 %. Lyginant etanolinius ekstraktus su vandeniais, galime pastebėti, kad išėigos skiriasi kelis kartus. Taip yra todėl, kad etanolis yra vienas iš efektyviausių tirpiklių [34], o taip pat po kiekvienos ekstrakcijos pakopos mažėjo tirpių komponentų kiekis. Lei Zhao ir kt. mokslininkai (2015) taip pat nustatinėjo ekstraktų išėigas naudodami heksaną, metanolį ir vandenį kaip efektyvius ekstrakcijos tirpiklius. Jų tyrimų rezultatai parodė, jog mažiausia išėiga gauta ekstrahuojant heksanu – 3,1 %, vandeniu – 14,53 % ir didžiausia išėiga gauta naudojant metanolį – 54,63 %. Taigi, lyginant gautus rezultatus su moksline publikacija galima pastebėti, jog tendencija yra tokia pati – geriausias tirpiklis metanolis, kuris savo tirpinimo savybėmis panašus į etanolį, o prasčiausias heksanas, be to, ekstraktų išėigos taip pat gana panašios [53].

Skirtingi faktoriai, tokie kaip – dalelių dydis (0,4–0,8 mm dydžio, o kuo dalelės mažesnės, tuo geriau vyksta masės mainai, tačiau, jei dalelės per mažos, gali užkimšti filtrus), porėtumas, drėgmė, temperatūra, slėgis (kuo didesnis slėgis, tuo geriau tirpina, todėl reikia mažiau tirpiklio) ir dujų tekėjimo greitis turi įtakos ekstrakcijos išėigai [95].

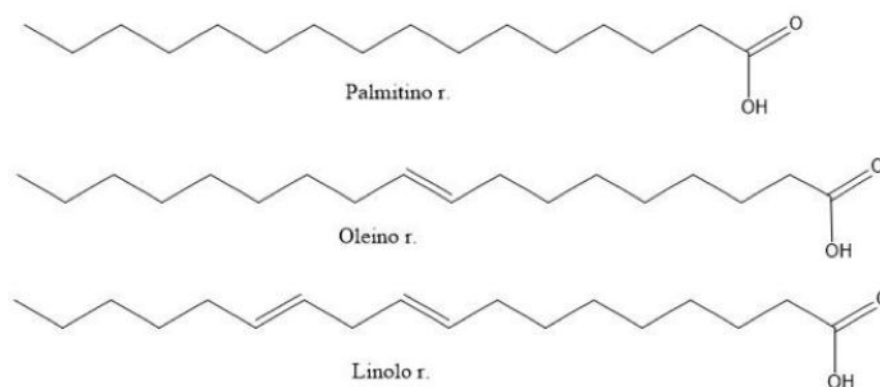
3.4 Riebalų rūgščių sudėties nustatymas

Šiame eksperimente buvo analizuoti superkritinės CO₂ ekstrakcijos metodu gautas SK–CO₂ lipofilinis ir EPS heksaninis ekstraktas, tyrimas atliktas taikant dujų chromatografijos su liepsnos jonizacijos detektoriumi metodą. Gauti rezultatai pateikti 5 lentelėje.

5 lentelė. Riebalų rūgščių (RR) sudėtis sausmedžio išspaudų SK–CO₂ ekstrakto

Nr.	Junginys	Sulaikymo laikas, min	Junginio kiekis, %
1.	Kaprono rūgštis (C6:0)	16.64	13,22
2.	Kaprilo rūgštis (C8:0)	22.15	14,07
3.	Kaprio rūgštis(C10:0)	27.54	9,85
4.	Lauro rūgštis (C12:0)	32.41	6,16
5.	Miristinė rūgštis(C14:0)	36.68	3,2
6.	Palmitino rūgštis (C16:0)	40.09	0,99
7.	Stearino rūgštis (C18:0)	43.77	0,23
8.	Oleino rūgštis (C18:1)	44.92	6,1
9.	Linolo rūgštis (C18:2)	46.69	15,71
10.	Dokosadieno rūgštis (C22:2)	54.41	27,46
11.	Lignocerino rūgštis (C24:0)	55.49	2,99

Iš gautų duomenų matyti, kad sausmedžio išspaudų SK–CO₂ ekstrakto rasta 11 riebalų rūgščių, iš kurių nemažai nesočiųjų riebalų rūgščių. Didžiausia koncentracija riebalų rūgščių nustatyta dokosadieno (27,46 %), linolo (15,71 %), kaprilo (14,07 %) ir kaprono (13,22 %), tarp kurių linolo (omega 6) ir oleino (omega 9) riebalų rūgštys yra nepakeičiamos, kurios žmogaus organizmui yra gyvybiškai svarbios, nes organizmas negali sintetinti pats, ir būtina gauti su maistu. Taip pat yra ir sočiųjų rūgščių, tačiau nustatyta mažesnės koncentracijos – palmitino (0,99 %), stearino (0,23 %). Mokslinėje literatūroje galima rasti duomenų, kad mėlynojo sausmedžio uogų ekstraktuose dominuoja nesočiosios riebalų rūgštys, iš kurių daugiausiai yra linolo, oleino ir palmitino rūgščių [14]. Taigi, palyginus jį darbe gautus rezultatus su mokslininkų atliktais tyrimais, galima teigti, jog darbe gauti rezultatai yra panašūs, pavyzdžiui F. Sahena ir kt. mokslininkai (2009) nustatė, kad padidinus slėgį 34,5–48,3 MPa ir pakėlus temperatūrą iki 80 °C temperatūros, galima sumažinti C8–14 riebalų rūgščių ir padidinti C16–C18:2 riebalų rūgščių koncentraciją [72].



15 pav. Sausmedžio uogų išspaudose identifikuotų riebalų rūgščių cheminės formulės.

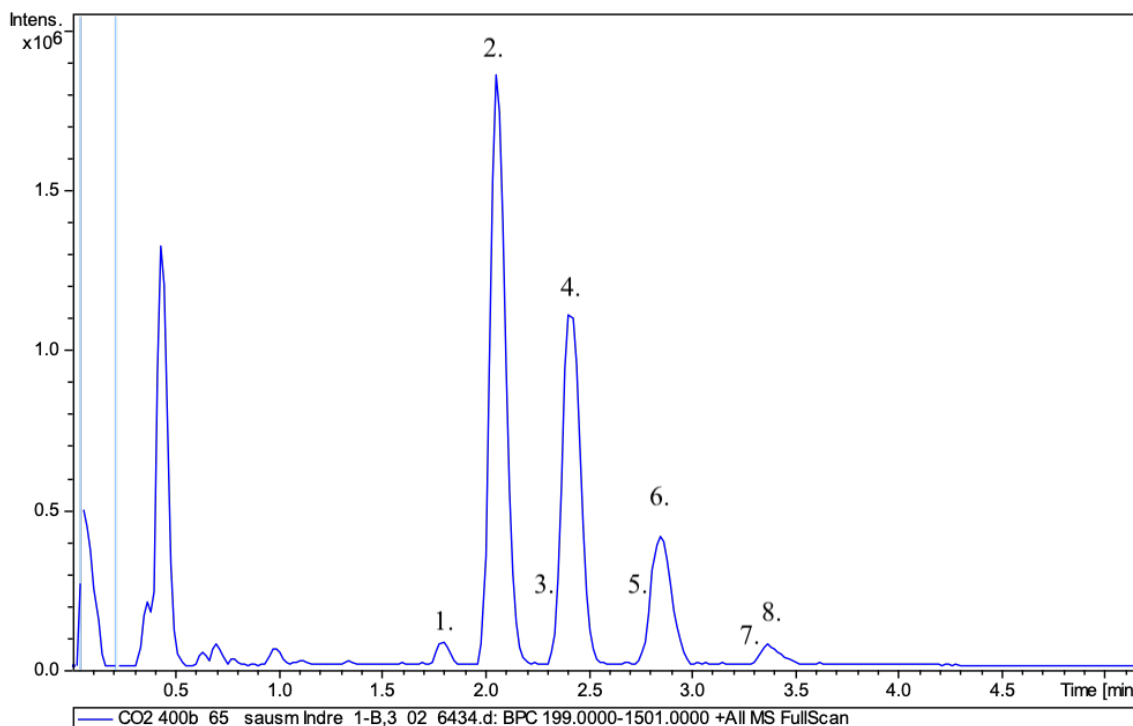
3.5 Triacilglicerolių sudėties nustatymas lipofiliniuose ekstraktuose

6 lentelė. Triacilglicerolių sudėtis išspaudų EPS heksaniniame ir SK–CO₂ ekstraktuose

Nr.	TAG Triacilglicerolis	Jono masė [M+NH ₄] ⁺	MS/MS fragmentai			Sulaikymo laikas, min	EPS heksaninio ekstrakto sąlyginiai ploto vnt.	SK–CO ₂ ekstrakto sąlyginiai ploto vnt.
1.	LLLn	894	LL559	LLn597	-	1,85	-	460823
2.	LLL	896	LL599	-	-	2,01	3425155	1093720
3.	PLL	872	LL559	PL575	-	2,30	411315	1184702
4.	OLL	898	LL559	LO601	-	2,45	2344231	7133436
5.	PLO	874	LO601	PL575	PO577	2,8	222003	658791
6.	OOL	900	OL601	OO603	-	2,85	1065006	3215982
7.	POO	876	PO677	OO603	-	3,31	-	176855
8.	OOO	902	OO603	-	-	3,42	-	702657

Pastaba: L – linolo rūgštis, Ln – linoleno rūgštis, O – oleino rūgštis, P – palmitino rūgštis

Taikant ultra efektyviają skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodą buvo nustatyta triacilglicerolių sudėtis. Šiame tyrime buvo analizuojami po superkritinės CO₂ ekstrakcijos gautas lipofilinis ekstraktas ir EPS heksaninis ekstraktas. Tirtuose ekstraktuose nustatyti 8 triacilgliceroliai, šie skirtingi triacilgliceroliai nustatyti remiantis pagal DC-LJD metodu identifikuotas riebalų rūgštis, lyginant darbe gautų molekulinį jonų mases su MS/MS fragmentavimo būdų gautais molekulinį jonų fragmentais su moksline literatūra [96]. Triacilglicerolių sudėtyje dominavo palmitino (P), linolo (L), linoleno (Ln) ir oleino (O) rūgštys. Iš gautų duomenų galima pastebėti, kad pagal gautus pikų plotus triacilglicerolių didesnė koncentracija nustatyta SK–CO₂ lipofiliniame ekstrakte. Gauti rezultatai pateikti 6 lentelėje, o chromatogramos pateiktos 16 paveiksle ir 28 paveiksle (žr. priedus).

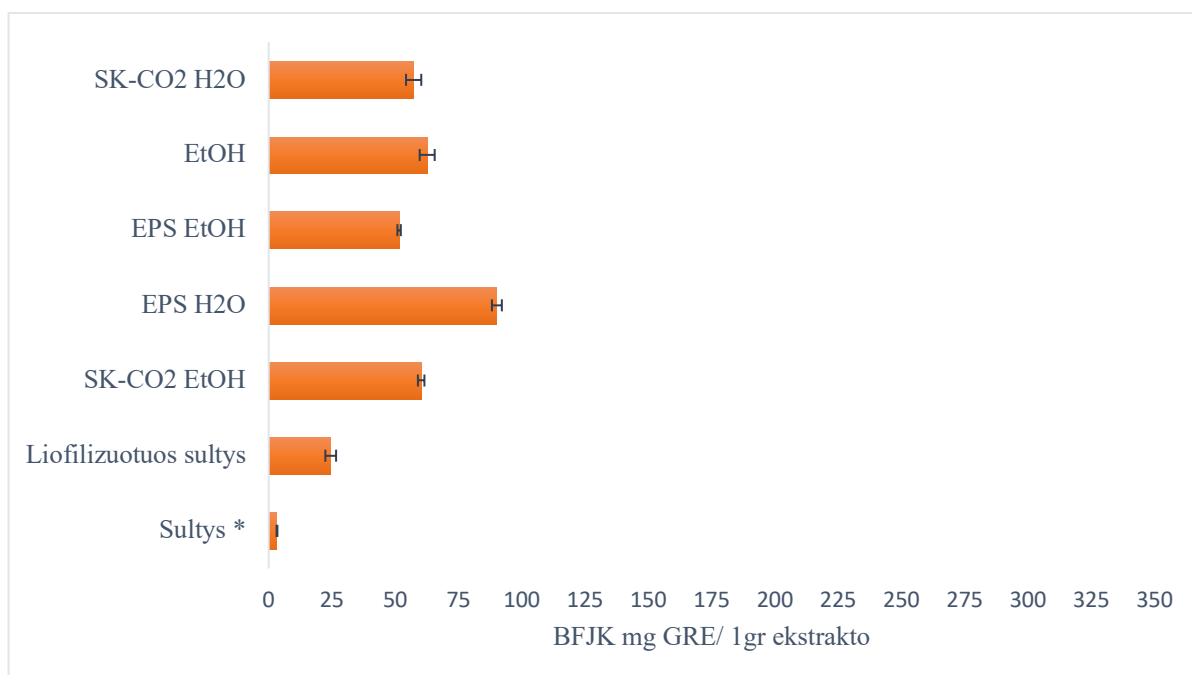


16 pav. Triacilglicerolių smailės chromatogramoje SK–CO₂ ekstrakto

3.6 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Antioksidacinio aktyvumo geba sultyse, liofilizuotose sultyse ir ekstraktuose buvo tirta naudojant laisvųjų radikalų DPPH• ir laisvųjų radikalų – katijonų sujungimo ABTS^{•+} bei deguonies radikalo surišimo ORAC metodus, o bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) nustatytas naudojant *Folin – Ciocalteu* metodą.

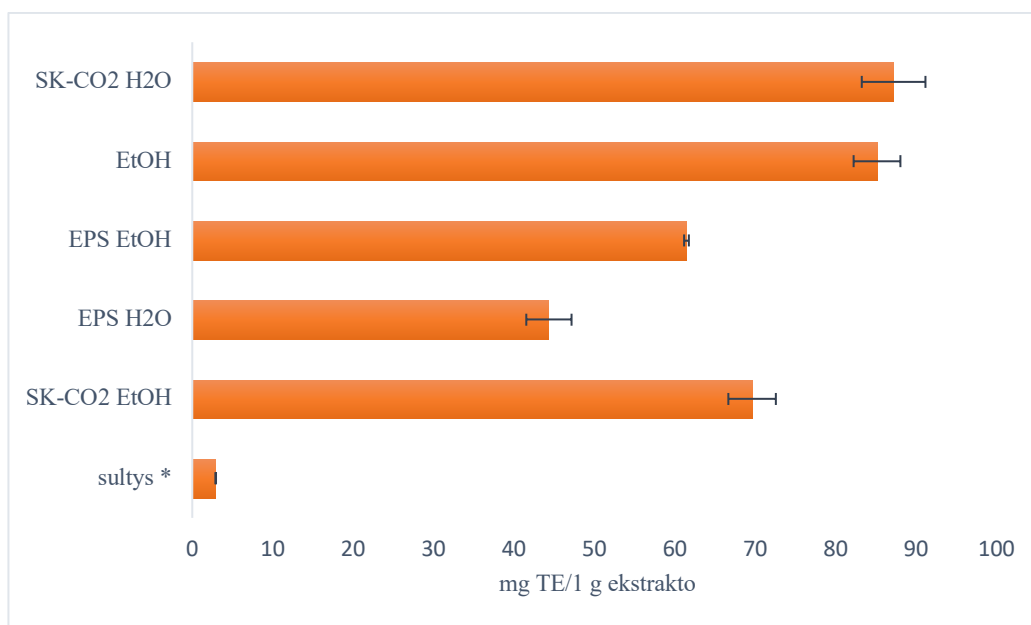
Fenoliniai junginiai svarbūs tuo, kad veikia kaip antioksidantai, kurie neutralizuoja laisvuosius radikalus ir reaktyvų deguonį [17]. Fenolinių junginių kiekiai pateikti 17 paveiksle. Nustatytas BFJK 3,28–90,16 mg GRE/ g ekstrakto (ar 1 ml sulčių). Mažiausias BFJK nustatytas sultyse – 3,28 mg GRE/1 ml sulčių. Lyginant ekstraktus tarpusavyje, galima pastebėti, jog didžiausias fenolinių junginių kiekis yra EPS vandeniniame ekstrakto – 90,16 mg GRE/g ekstrakto, o mažiausias EPS etanoliniame ekstrakto 51,53 mg GRE/g ekstrakto. Kiti ekstraktų rezultatai skiriasi nežymiai. Taip pat matyti, kad EPS ekstrakcijos būdu gautuose ekstraktuose yra šiek tiek daugiau fenolinių junginių nei SKE–CO₂ ekstrakto. Įvairiuose šaltiniuose galima rasti daug skirtingų duomenų. Mateja Senica ir kt (2018). mokslininkai nustatė bendrą fenolinių junginių kiekį – nuo 362,2 iki 471 mg GRE/100 g uogų ir šios vertės mažesnės nei juoduose serbentuose (400–952 mg GRE/100g uogų), raudonuose serbentuose (547 mg GRE/100g uogų), avietėse (108–690 mg GRE/100g uogų) ar mėlynėse (500-1500 mg GRE/100 g uogų). Svarbu paminėti, jog fenolinių junginių kiekis uogose priklauso nuo tokių faktorių kaip klimato sąlygos, derliaus nuėmimo laiko, kadangi bręstant uogoms, didėja šių junginių kiekis, laikymo sąlygų ir apdirbimo, o ypač nuo veislės [17].



* – BFJK mg GRE/1ml sulčių

17 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis sausmedžio sultyse, liofilizuotose sultyse ir ekstraktuose

Antioksidacinio aktyvumo geba naudojant DPPH• metodą sausmedžio sultyse ir gautuose ekstraktuose kito nuo 2,99 iki 87,12 mg TE/g ekstrakto (ar 1 ml sulčių). Mažiausiu aktyvumu pasižymėjo sultys, kuriose ši vertė siekia 2,99 mg TE/ml sulčių, o didžiausia geba pasižymi SK–CO₂ vandeninis ekstraktas – 87,12 mg TE/g ekstrakto. Iš gautų rezultatų (žr. 18 pav.) matome, kad didesniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymi ekstraktai, gauti po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu ekstrahuojant etanoliu ir vandeniu, bei ekstraktas ekstrahuotas taip pat etanoliu (EPS). Lei Zhao ir kt. mokslininkai (2015) vertino sausmedžio uogų (lot. *L. caerulea*) penkių skirtingų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą DPPH• metodu. Šių autorių tyrimo rezultatai parodė, kad didžiausiu aktyvumu pasižymėjo metanolinis ekstraktas 193,1 μmol TE/g, o mažiausiu vandeninis 10,93 μmol TE/g [53]. Raudsepp ir kt. (2013) nustatė, jog sausmedžio uogų ekstraktai sumažino iki 85 % DPPH radikalų, o tai yra daugiau nei pomidorai (lot. *Lycopersicon esculentum* Mill.), kurie sumažino iki 43 % ar standartinė askorbo rūgštis (51 %) [97]. Yra nuomonių, kad tiriant antioksidacinį aktyvumą DPPH• metodu, galimos rezultatų paklaidos, o tai priklauso nuo naudojamos įrangos ar ekstrakto paruošimo [35].

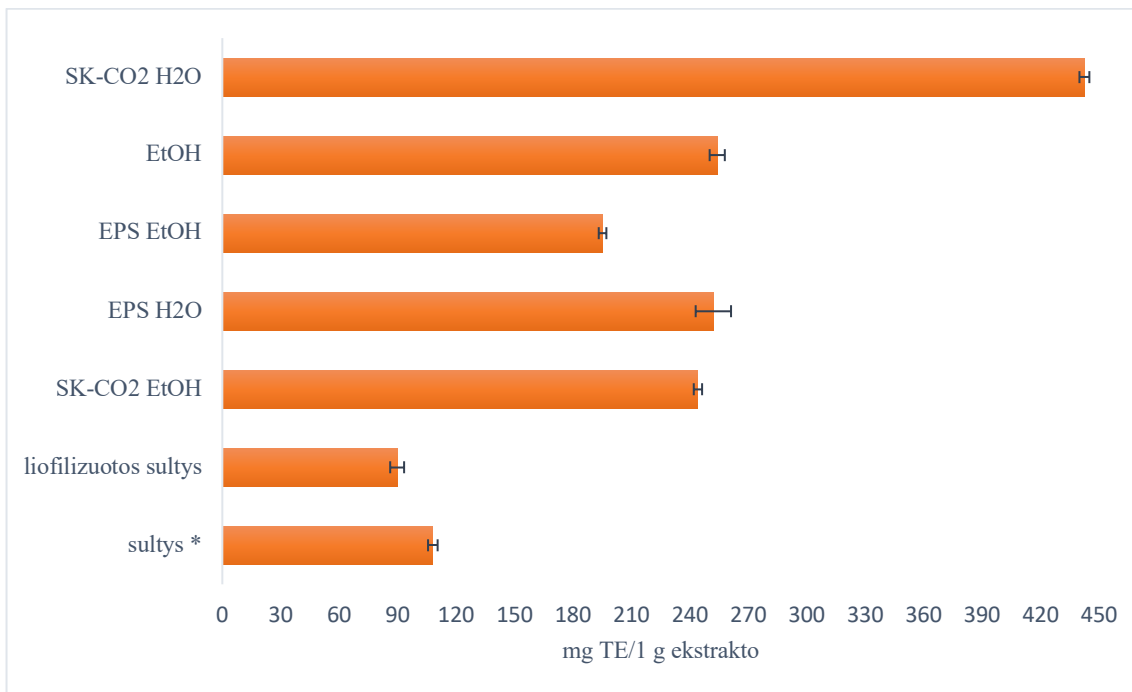


* – mg GRE/1ml sulčių

18 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH• metodu sausmedžio sultyse ir ekstraktuose

Antioksidacinio aktyvumo geba naudojant ABTS^{•+} metodą sausmedžio sultyse ir gautuose ekstraktuose kito nuo 89,72 iki 442,46 mg TE/g ekstrakto (žr. 19 pav.). Mažiausiu antioksidacine geba pasižymi sultys ir liofilizuotos sultys, kurių vertės siekia 108,04 mg TE/ml sulčių ir 89,72 mg TE/g ekstrakto atitinkamai, o didžiausia geba pasižymi SK–CO₂ vandeninis ekstraktas – 442,46 mg TE/g ekstrakto. Etanoliniai ekstraktai tarpusavyje žymiai nesiskiria, o jų reikšmės kito nuo 192 iki 254 mg TE/g ekstrakto. Barbara K. ir kt. mokslininkai (2012) nustatinėjo sausmedžio uogų skirtingų veislių antioksidacinį aktyvumą – ABTS^{•+}, DPPH• metodais. Mokslininkai nustatė, jog didžiausias antioksidacinis aktyvumas gaunamas taikant ABTS^{•+} metodą 170–417 μmol TE/g SM, tuo tarpu taikant DPPH metodą, antioksidacinė geba sumažėja net kelis kartus [98]. Jan Oszmianski ir kt. mokslininkai (2016) nustatinėjo antioksidacinį aktyvumą sausmedžio uogose ir išspaudose ABTS^{•+} metodu ir nustatė, jog šviežiose uogose ši vertė siekia 0,3 μmol TE/g SM, o sausose išspaudose padidėjo net iki 5,47 μmol TE/g SM [15]. Margarita Corrales ir kt. (2009) tyrė slėgio, laiko, temperatūros ir etanolio koncentracijos įtaką antioksidaciniam aktyvumui taikant ABTS^{•+} metodą. Mokslininkai vykdė ekstrakciją 20 °C temperatūroje, 30 min, ir keturiuose skirtinguose slėgiuose – 0,1 MPa (kontrolė), 200 MPa, 400 MPa ir 600 MPa. Iš gautų rezultatų tyrėjai nustatė, kad padidinus slėgį, antioksidacinis aktyvumas padidėjo net tris kartus. Tirdami ekstrakcijos laiko įtaką, jie sudarė šias sąlygas – 600 MPa slėgis, 70 °C temperatūra ir trys skirtingi laikai: 30 min, 60 min ir 90 min. Atlikdami tokį eksperimentą nustatė, jog antioksidacinis aktyvumas padidėjo nuo 286 iki 716 μmol TE/ g SM ir padarė išvadą, jog ilgesnis kontaktas su tirpikliu, padidina difuziją. Norėdami nustatyti temperatūros įtaką, ekstrakciją atliko prie 600 MPa slėgio, 30 min ir temperatūrą didino nuo 20 °C iki 90 °C temperatūros. Iš gautų rezultatų nustatė, jog didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo vykdant ekstrakciją prie 70 °C temperatūros, kai lyginant su kontrole, aktyvumas padidėjo du kartus. Taigi, matoma, jog temperatūra vaidina svarbų vaidmenį, kadangi didesnė temperatūra padidina fenolių tirpumą ir difuzijos koeficientą, o tai sumažina ekstrakcijos laiką. Vis dėlto, atliktas tyrimas parodė, kad vykdant ekstrakciją 90 °C temperatūroje, antioksidacinis aktyvumas buvo mažesnis nei 70 °C temperatūroje. Taip galėjo įvykti dėl to, jog bioaktyvūs junginiai jautrūs temperatūrai ir skilo. Be to, žinoma, jog fenoliniai junginiai aukštoje temperatūroje pasižymi polimerizacijos reakcija ir taip sumažinamas hidroksi grupių aktyvumas

surišant radikalus. Kadangi nustatė, jog efektyviausiai ekstrakcija vyksta 70 °C temperatūroje ir 600 MPa slėgyje, 30 min, todėl šios sąlygos buvo parinktos tirti etanolio koncentracijos įtaką antioksidaciniam aktyvumui, kai etanolio koncentraciją keitė nuo 20 iki 100 %. Taigi, atlikę tokią ekstrakciją, mokslininkai nustatė, jog didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo, kai etanolio koncentracija buvo 50 ir 80 % ir jis siekė 286 ir 306 $\mu\text{mol TE/ g SM}$ atitinkamai [99].

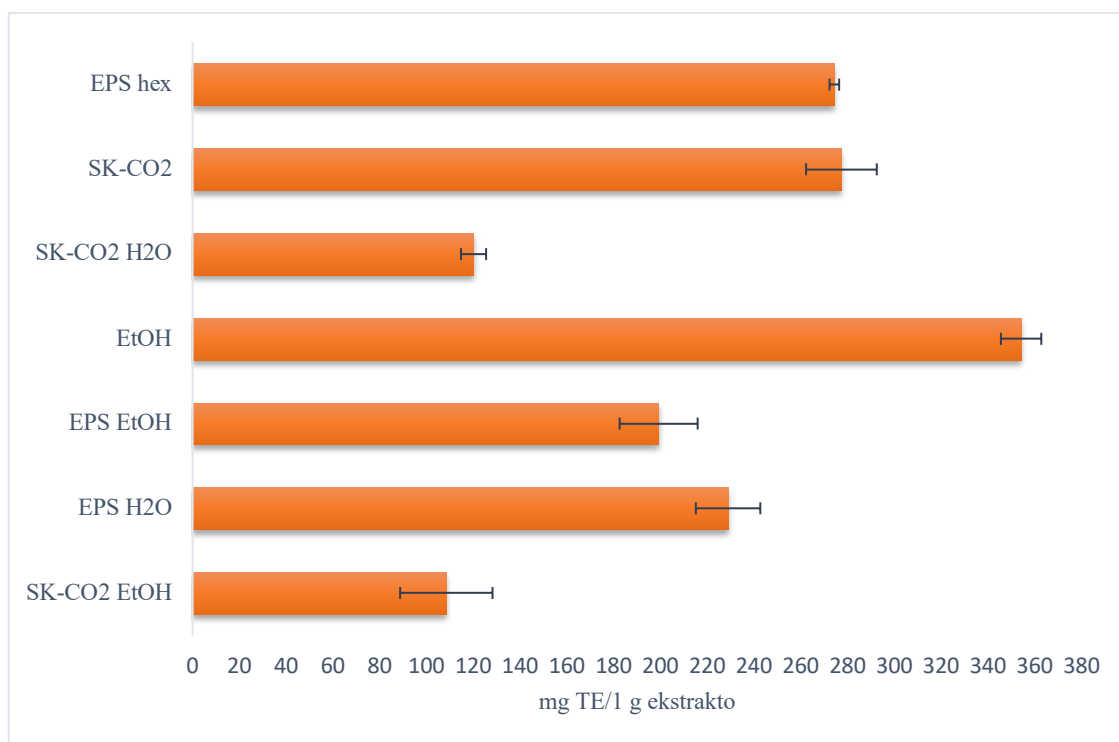


* – mg GRE/1ml sulčių

19 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS^{•+} metodu sausmedžio sultyse ir ekstraktuose

Vertinant ekstraktų deguonies radikalų sujungimo gebą ORAC metodu iš gautų rezultatų (žr. 20 pav.) galima matyti, kad vertės kinta nuo 108,46 iki 354,15 mg TE/g ekstrakto. Mažiausia geba pasižymi SK–CO₂ EtOH ekstraktas, o didžiausia po ekstrakcijos etanoliu gauto ekstrakto – 354,15 mg TE/g ekstrakto. Literatūroje galima rasti duomenų, kad ORAC vertės kinta nuo 18 iki 264,4 $\mu\text{mol TE/g}$ šviežių uogų [35] ir šios vertės didesnės nei mėlynėse (160 $\mu\text{mol TE/g}$ šviežių uogų), gervuogėse (105 $\mu\text{mol TE/g}$ šviežių uogų), braškėse (61 $\mu\text{mol TE/g}$ šviežių uogų) ar avietėse (61 $\mu\text{mol TE/g}$ šviežių uogų) [100].

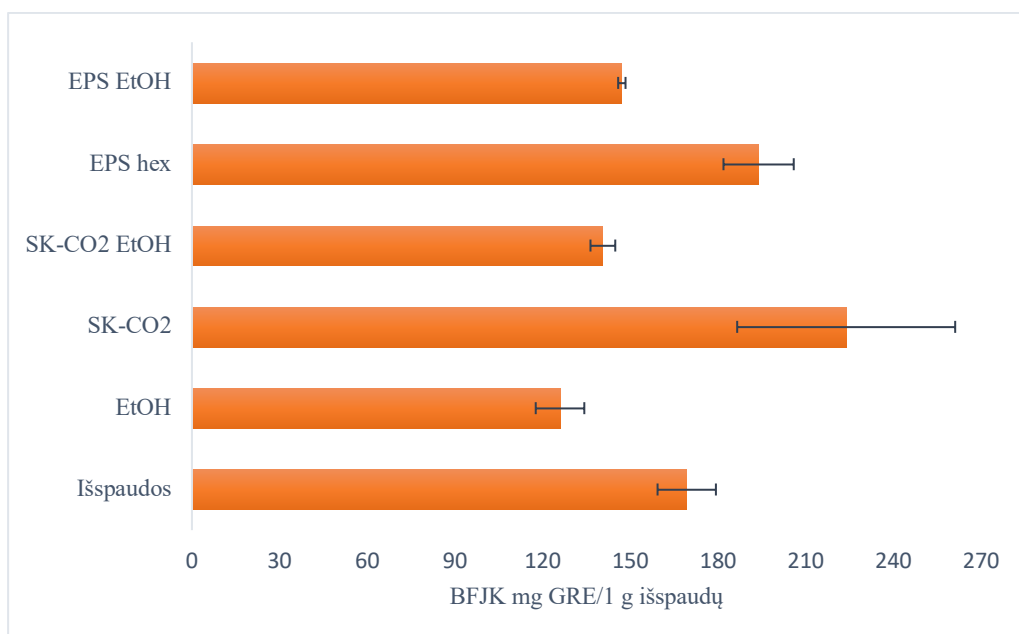
Taigi, atlikus tris skirtingus metodus radikalų surišimui sultyse ir ekstraktuose, galima pastebėti, kad etanoliniai ekstraktai pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu, tai reiškia, jog ekstrahuojant etanoliu išgaunama daugiau junginių, pasižyminčių antioksidacinėmis savybėmis. Mažiausia radikalų sujungimo geba gauta pritaikius DPPH[•] metodą, kuris net apie 5 kartus mažesnis už ABTS^{•+} ir apie 4 kartus mažesnis už ORAC metodu įvertintus ekstraktus.



20 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ORAC metodu ekstraktuose

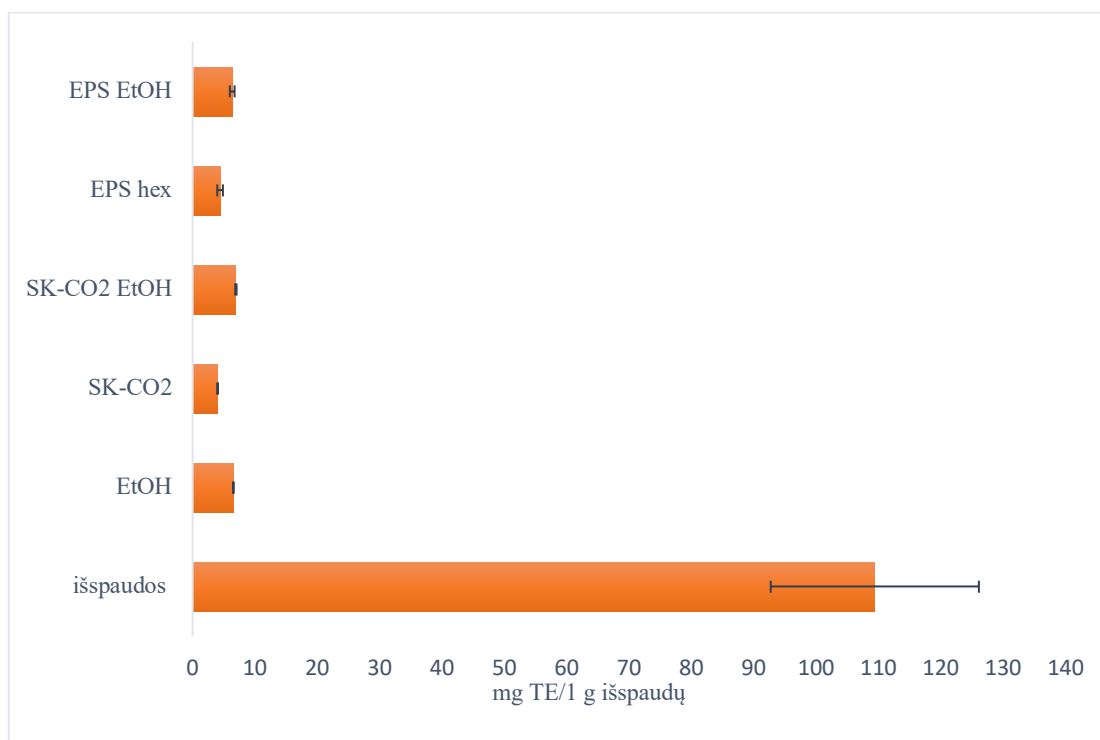
Žinoma, jog išspaudose po kiekvienos ekstrakcijos gali likti dalis junginių, kurie sujungti stipriais ryšiais su netirpiais junginiais, todėl tokiais atvejais taikoma QUENCHER procedūra, kuri paremta oksidacijos – redukcijos reakcija. Panaudojant Quencher metodiką galima įvertinti sausmedžio išspaudų antioksidacines savybes. Taigi, šiam tyrimui buvo naudojamos grynos išspaudos ir po skirtingų ekstrakcijų likusi kietoji frakcija (išspaudos), pritaikyti BFJK ir DPPH• metodai.

Prieš ekstrakcijas išspaudose BFJK nustatytas 169,27 GRE mg/g išspaudų (žr. 21 pav.). Lyginant rezultatus tarpusavyje, matome, kad po įvairių ekstrakcijų, didžiausias fenolinių junginių kiekis ištirtas SK–CO₂ išspaudų ekstraktoje 223,82 GRE mg/g išspaudų ir šis kiekis netgi didesnis nei prieš ekstrakciją, o mažiausias po ekstrakcijos tik etanolio – 125,92 GRE mg/ išspaudų. Taip pat, matyti, kad mažiausi kiekiai gauti ekstrahuojant poliniu tirpikliu etanolio, kurie tarpusavyje skiriasi nežymiai, o didžiausi kiekiai nepoliniais tirpikliais – CO₂ ir heksanu. Iš gautų rezultatų (žr. 17 ir 21 pav.) matyti, jog ekstraktuose gautas fenolinių junginių kiekis yra apie 2,5 kartus mažesnis nei po ekstrakcijų likusiose kietosiose frakcijose.



21 pav. Bendras fenolinių junginių kiekis išspaudose ir po ekstraktų likusioje kietoje frakcijoje

Prieš ekstraktus grynosiose išspaudose DPPH• sistemoje antioksidacinis aktyvumas nustatytas 109,41 mg TE/g išspaudų. Iš tyrimo metu gautų rezultatų, (žr. 21 pav.) galima matyti, jog po įvairių ekstraktų išspaudos pasižymi apie 11 kartų mažesniu antioksidaciniu aktyvumu nei pačios išspaudos. Tačiau lyginant ekstraktus ir po ekstraktų likusią kietąją frakciją (žr. 18 ir 22 pav.), galima pastebėti, kad net apie 8,5 kartų didesnė radikalų surišimo geba nustatyta ekstraktuose.



22 pav. Kietosios frakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH• metodu

Svarbu paminėti, jog antioksidantų kiekis priklauso nuo uogų veislės, sezono, auginimo sąlygų, uogų surinkimo laiko, laikymo ir taikomo metodo [98].

3.7 Mikroįkapsuliavimo eksperimentinio modelio ir optimalių sąlygų įvertinimas

Optimalioms sąlygoms nustatyti taikytas matematinis paviršiaus atsako metodas, pritaikant centriškai kompozicinį planavimo modelį. Kadangi tiriamieji atsakai (išeiga ir mikroįkapsuliavimo efektyvumas) priklauso nuo kintamųjų parametru (maltodekstrino (A) ir sojų baltymų izoliato (B)), buvo pasirinktas paviršiaus atsako metodas. Atlikto tyrimo tikslas optimizuoti kintamuosius parametrus (A ir B), siekiant gauti didžiausias tiriamųjų atsakų (išeigos ir mikroįkapsuliavimo) vertes.

Naudojant centriškai kompozicinį planavimo modelį sausmedžio sulčių mikroįkapsuliavimas sudarytas iš 2-jų kintamųjų parametru (A ir B) 13-os ciklu planas, kurį sudarė 5 centriniai ir 8 faktoriai taškai. Pagal sudaryto centriškai kompozicinio modelio planą atlikti eksperimento rezultatai pateikti 7 lentelėje.

7 lentelė. Sausmedžio sulčių mikroįkapsuliavimo optimizavimo modelis atliekant mikroįkapsuliavimą pagal centriškai kompozicinį planavimo modelį

Nr.	Mikroįkapsuliavimo sąlygos		Atsakomieji parametrai	
	Maltodekstrino kiekis, g	Sojų baltymų izoliato kiekis, g	Išeiga, %	Mikroįkapsuliavimo efektyvumas, %
1.	3	1	60,73±0,59	60,78±0,55
2.	12	1	80,82±0,44	66,58 ±0,43
3.	3	6	66,26±0,44	68,05 ±1,4
4.	12	6	77,80±1,72	71,92±2,9
5.	3	3,5	68,69±2,31	55,95±0,67
6.	12	3,5	84,58±0,04	65,08±0,07
7.	7,5	1	81,18±0,26	90,09±-0,16
8.	7,5	6	79,65±0,04	63,28±0,21
9.	7,5	3,5	73,64±1,17	57,13±0,89
10.	7,5	3,5	73,64±1,17	57,13±89
11.	7,5	3,5	73,64±1,17	57,13±89
12.	7,3	3,5	73,64±1,17	57,13±89
13.	7,5	3,5	73,64±1,17	57,13±89

Optimizavimo proceso kiekvienas atsakas buvo analizuojamas atskirai, pirmiausiai buvo tiriama kintamųjų parametru įtaka išeigai. Modelio, gauto pagal centriškai kompozicinį planą, analizė (ANOVA) pateikia 8 lentelėje. Analizė parodė, kad modelis yra reikšmingas pagal Stjudento kriterijų ($p = 0,01$), apskaičiuotą Fišerio kriterijų (F vertė) (35,74), klaidos tikimybė ($p = 0,052$) ir

modelis gali būti naudojamas visoje planavimo erdvėje. Gauti rezultatai parodė, kad yra tik 1 reikšmingas veiksnys, kuris turi įtakos išeigai: A (maltodekstrino kiekis). Atlikus kvadratinio modelio regresinių lygčių analizę nustatyta, kad matematinis modelis, sudarytas, pagal gautas išeigas, atitinka gautus rezultatus, nes nustatytas determinacijos koeficientas $R^2 = 0,952$. Teorinis determinacijos koeficientas $R^2 = 0,986$. Apskaičiuota adekvatumo preciziškumo santykinė reikšmė 27,8 (ji turėtų būti didesnė už 4), kuri parodo prognozuojamų verčių palyginimą su vidutinėmis prognozuojamomis paklaidomis eksperimento taškuose. Taigi, apskaičiuota vertė rodo, jog signalas yra tinkamas ir šis modelis gali būti naudojamas modeliuojant plano erdvę.

8 lentelė. Centriškai kompozicinio modelio dispersinė analizė pagal kintamąsias vertes

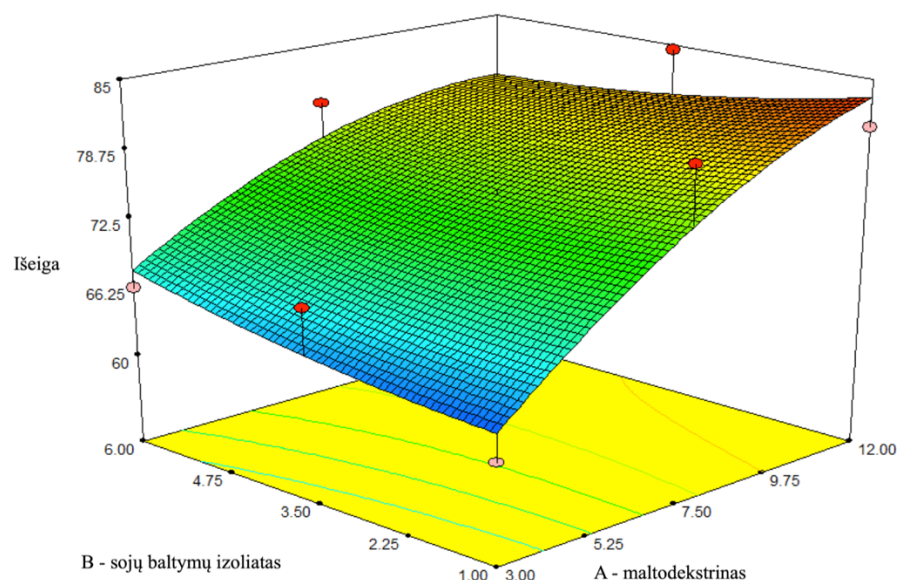
Kintamieji	Kvadratų suma	Kvadratų vidurkis	F–kriterijus	p–reikšmė
Modelis	43,5	25,29	35,74	0,01 reikšmingas
A – maltodekstrinas	125,6	125,6	25,74	0,001
B – sojų baltymų izoliatas	18,2	18,20	12,55	0,087
AB	7,12	7,12	8,34	0,0018
A ²	1,54	1,54	6,61	0,025
B ²	0,73	0,73	0,13	0,073
Liekana (<i>ang. residual</i>)			-	-
Klaidos tikimybė	0,53	0,24	0,87	0,0523 nereikšmingas

F – fišerio kriterijus; p – reikšmės <0,05 (tada kintamasis yra statistiškai reikšmingas).

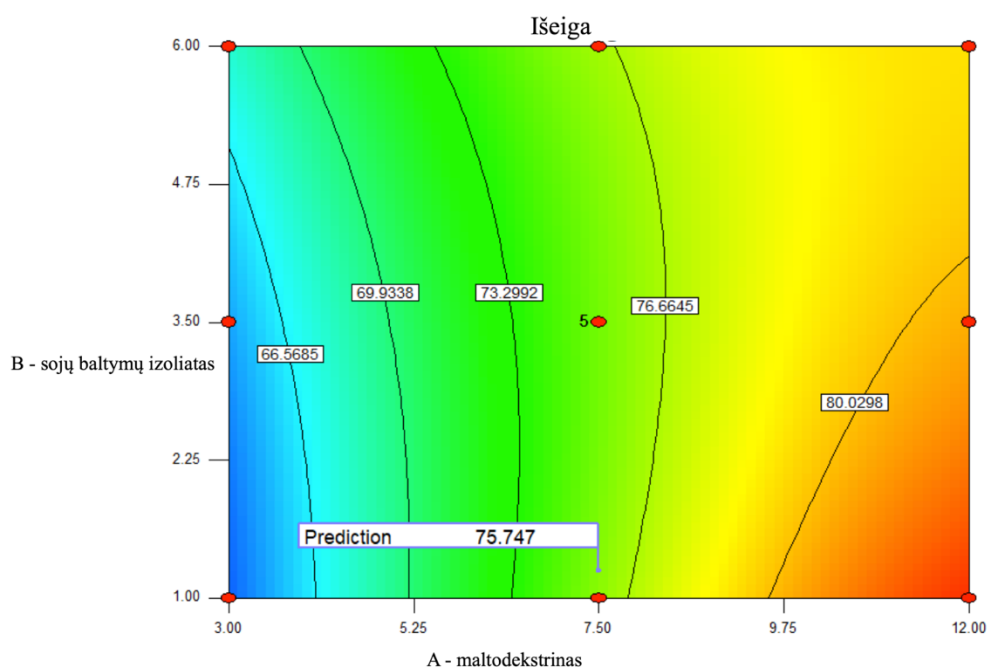
Pagal regresijos koeficientus sudarytas polinominis modelis, kuris užrašoma 11 lygtimi ir nustato optimalias kintamųjų vertes, kurioms esant būtų gaunama didžiausia įkapsuliavimo išeiga.

$$I\text{šeiga (\%)} = 8,68 + 0,46 \times A - 0,015 \times B - 0,133 \times A \times B - 0,17 \times A^2 + 0,048 \times B^2 \quad (11)$$

Erdvinis grafikas 3D ir 2D (žr. 23 ir 24 pav.) rodo kintamųjų parametrų (maltodekstrino ir sojos baltymų izoliato kiekio) įtaką mikroįkapsuliavimo išeigai. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad maltodekstrino kiekis turi šiek tiek didesnę įtaką išeigos pokyčiui nei sojų baltymų izoliatas, nors abu šie parametrai yra reikšmingi ir lemiantys mikroįkapsuliavimo išeigą. Iš gautų rezultatų galima pastebėti, jog padidinus maltodekstrino kiekį nuo 7,5 iki 9,75 g, išeiga padidėjo 3,33 %, būtent šiuo metu ir pastebėta didžiausia mikrokapsulių išeiga.



23 pav. Mikroįkapsuliavimo atsako plotas 3D, parodantis išėigos priklausomybę nuo optimizuojamų parametrų (maltodekstrino ir sojų baltymų izoliato kiekio)



24 pav. Mikroįkapsuliavimo atsako plotas 2D, parodantis išėigos priklausomybę nuo optimizuojamų parametrų (maltodekstrino ir sojų baltymų izoliato kiekio)

Toliau analizuojant kintamųjų parametrų (maltodekstrino (A) ir sojų baltymų izoliato (B)) įtaką antrajam atsakui – mikroįkapsuliavimo efektyvumui (IE) (žr. 7 lent.). Modelio, gauto pagal centriškai kompozicinį planą, analizė (ANOVA) pateikia 9 lentelėje. Analizė parodė, kad modelis yra reikšmingas pagal Stjudento kriterijų ($p = 0,01$), apskaičiuotą F vertę (17,1). Gauti rezultatai parodė, jog yra tik 1 reikšmingas veiksnys, kuris turi įtakos išėigai: B^2 . Atlikus kvadratinio modelio regresinių lygčių analizę nustatyta, kad matematinis modelis, sudarytas pagal gautas išėigas, atitinka gautus rezultatus, nes nustatytas determinacijos koeficientas $R^2 = 0,875$, teorinis determinacijos koeficientas $R^2 = 0,905$. Apskaičiuota adekvatumo preciziškumo santykinė reikšmė 3,9 (ji turėtų būti didesnė už 4), kuri parodo prognozuojamų verčių palyginimą su vidutinėmis prognozuojamomis paklaidomis eksperimento taškuose.

9 lentelė. Centriškai kompozicinio modelio dispersinė analizė pagal kintamąsias vertes (atsakas mikroįkapsuliavimo efektyvumas)

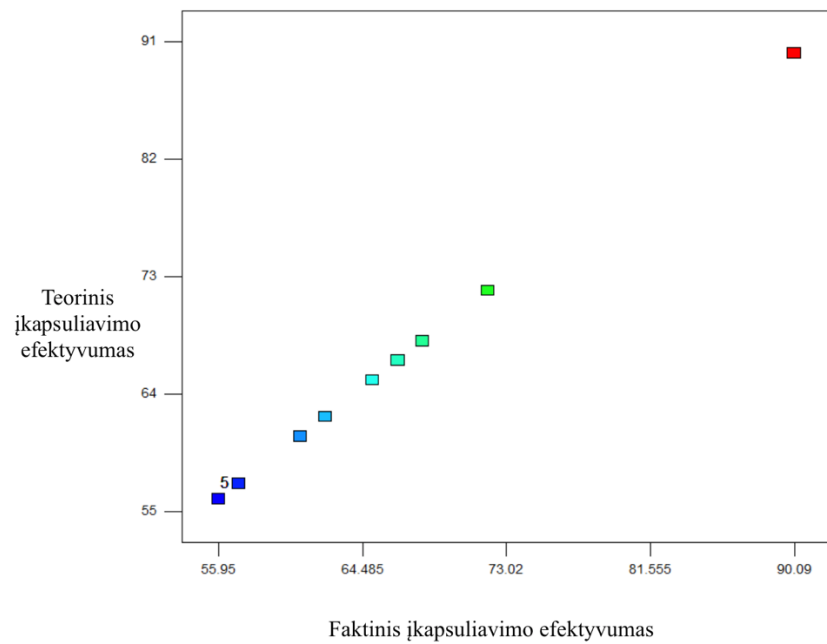
Kintamieji	Kvadratų suma	Kvadratų vidurkis	F–kriterijus	p–reikšmė
Modelis	21,8	12,4	17,1	0,01 reikšmingas
A – maltodekstrinas	10,3	10,3	3,5	0,06
B – sojų baltymų izoliatas	9,11	9,11	2,6	0,052
AB	7,12	7,12	1,8	0,089
A ²	6,05	6,05	1,2	0,065
B ²	1,67	1,67	6,82	0,0348
Liekana (<i>ang. residual</i>)	1,72	0,25	-	-
Klaidos tikimybė	0,81	0,45	0,58	0,0842 nereikšmingas

F – fišerio kriterijus; p – reikšmės <0,05 (tada kintamasis yra statistiškai reikšmingas).

Paviršiaus atsako metodas buvo naudojamas nustatyti optimalias kintamųjų vertes, kurios esant būtų gaunama didžiausias įkapsuliavimo efektyvumas. Pagal regresijos koeficientus sudaromas polinominis modelis, kuris užrašomas 12 lygtimi ir apibūdina santykį tarp priklausomų ir nepriklausomų (A ir B) kintamųjų.

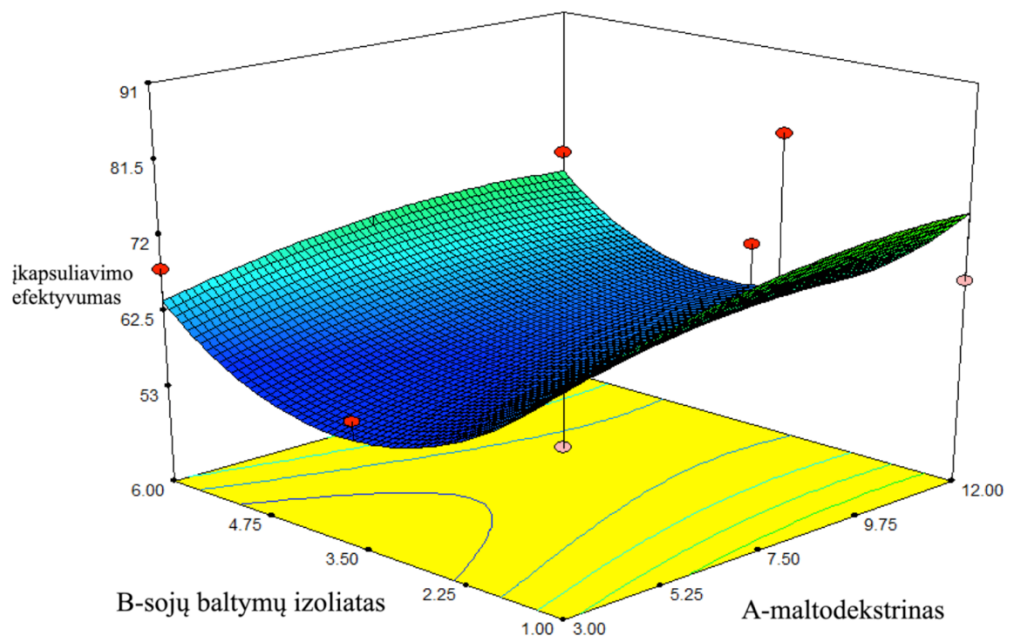
$$\text{Mikroįkapsuliavimo efektyvumas (\%)} = 7,66 + 0,2 \times A - 0,14 \times B - 0,033 \times A \times B - 0,14 \times A^2 + 0,78 \times B^2 \quad (12)$$

Teorinės (prognozuojamos) mikroįkapsuliavimo efektyvumo vertės buvo apskaičiuojamos pagal polinominę lygtį ir palygintos su eksperimento metu gautais rezultatais (žr. 25 pav.). Taigi, pagal sudarytą modelį matyti, kad gauto atsako teorinis įkapsuliavimo efektyvumas yra labai panašus į faktinį efektyvumą.

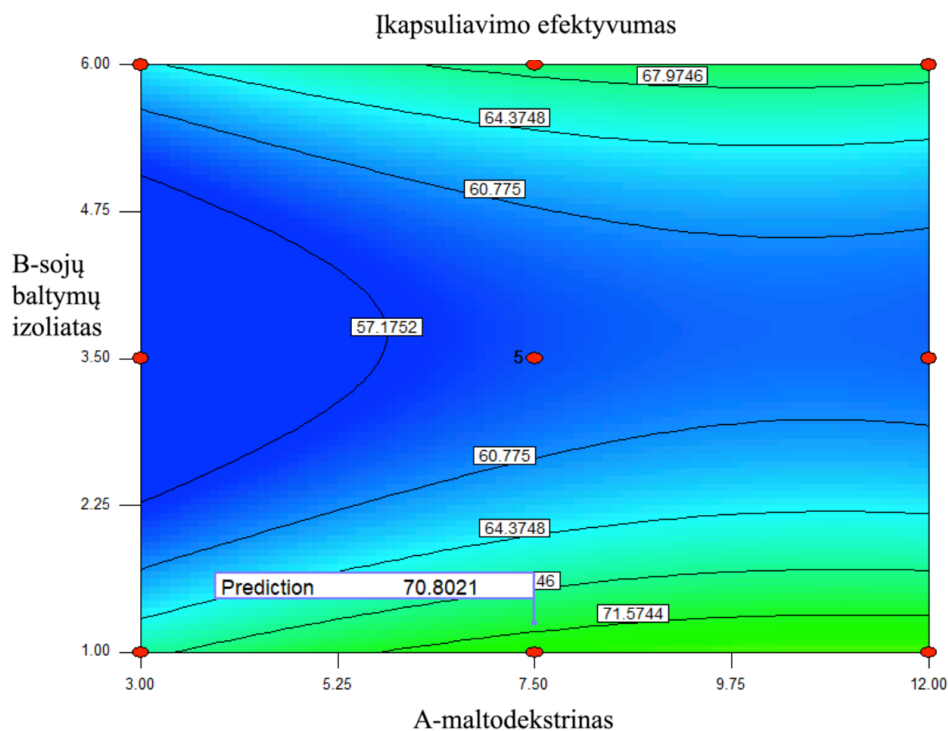


25 pav. Matematinio modelio nuspėjamo ir faktinio mikroįkapsuliavimo efektyvumo palyginimas

Erdvinis grafikas 3D ir 2D (žr. 26 ir 27 pav.) rodo kintamųjų parametų (maltodekstrino ir sojos baltymų izoliato kiekio) įtaką mikroįkapsuliavimo efektyvumui. Iš pateiktų rezultatų matyti, jog maltodekstrinas turėjo šiek tiek didesnę įtaką mikroįkapsuliavimo efektyvumui nei sojų baltymų izoliato kiekis. Padidinus maltodekstrino kiekį nuo 7,5 iki 9,75 g, mikroįkapsuliavimas padidėjo nuo 60,7 iki 71,57 %.



26 pav. Mikroįkapsuliavimo atsako plotas 3D, parodantis mikroįkapsuliavimo efektyvumo priklausomybę nuo optimizuojamų parametų



27 pav. Mikroįkapsuliavimo atsako plotas 2D, parodantis mikroįkapsuliavimo efektyvumo priklausomybę nuo optimizuojamų parametru

Mikroįkapsuliavimo metu naudotos sausmedžio sultys, įkapsuliavimas vertinamas pagal bioaktyvius/veikliuosius junginius t.y antocianinus, kurie apgaubiami apvalkalu, kuris saugo nuo išorės žalingo poveikio. Mikroįkapsuliavimas buvo atliktas taikant džiovavimo šalčiu metodą, kurio metu buvo gautos mikrokapsulės su sausmedžio sultimis ir nustatytas antocianinų įkapsuliavimo efektyvumas ir išeiga. Efektyvus įkapsuliavimas laikomas tada, kai veikliosios medžiagos minimalus kiekis yra paviršiuje, o maksimalus šerdies viduje, nes tai reiškia, jog kapsulės apvalkalas gerai apsaugo įkapsuliuotą medžiagą. Naudojant apvalkalo medžiagas tokias kaip – angliavandenių ir baltymų mišinį, jos kartu sudaro makromolekulinių barjerą, suteikiantį mažesnę klampą, pasižymi geromis emulguojančiomis savybėmis ir užtikrina bioaktyvių junginių sulaikymą džiovavimo metu, kas yra labai svarbu [101]. Tyrimo metu buvo įkapsuliuojamos sausmedžio sultys naudojant įvairius kiekius maltodekstrino ir sojų baltymų izoliato. Naudojant Stat Design programą ir paviršiaus atsako modelio metodą, buvo pasiūlyta maksimali teorinė išeiga – 75,75 %, tačiau eksperimento metu didžiausia išeiga gauta – 84,58 %. Atlikus analizę, paaiškėjo, kad geriausiu efektyvumu, net 90,1 % pasižymėjo, nors programos maksimalus teorinis įkapsuliavimo efektyvumas yra siūlomas 70,81 %. Taip pat buvo paskaičiuotas mikroįkapsuliavimo regeneravimas (atgavimas proc.) įvertinant antocianinų kiekį kapsulės paviršiuje ir kapsulės viduje. Gauti duomenys pateikti 10 lentelėje. Taigi, iš analizės metu gautų duomenų matome, kad didžiausias regeneravimas gautas kapsulės viduje 115,4 %, o kapsulės išorėje 11,4%. Visi šie rezultatai gauti, kai mikroįkapsuliavimui buvo naudojama 7,5 g maltodekstrino ir 1 g sojų baltymų izoliato.

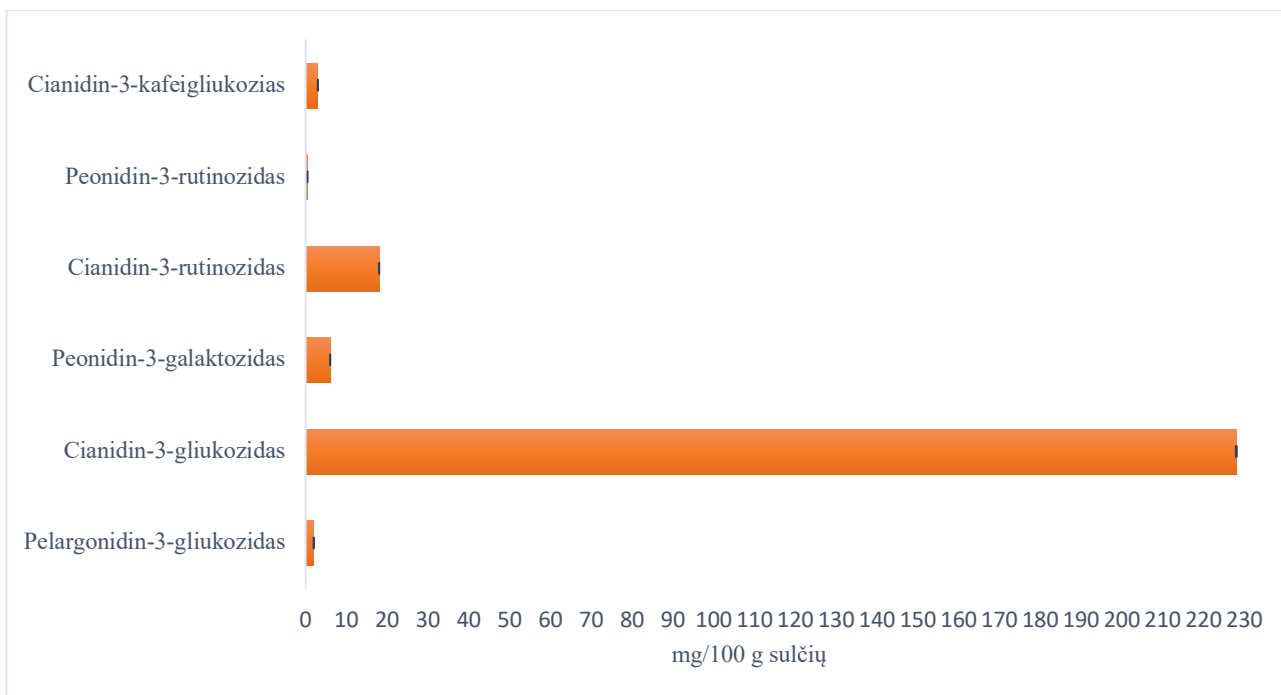
10 lentelė. Antocianinų regeneravimas

Nr.	Mikroįkapsuliavimo sąlygos		Antocianinų kiekis mg/1 g įkapsuliuotų miltelių		Regeneravimas, %	
	Maltodekstrino kiekis, g	Sojų baltymų izoliato kiekis, g	Kapsuės viduje	Kapsulės išorėje	Kapsuės viduje	Kapsulės išorėje
1.	3	1	8,2±0,01	3,2±0,04	63,9±0,1	25,1±0,05
2.	12	1	8,6±0,3	2,8±0,2	67,1±0,13	22,4±0,19
3.	3	6	4,8±0,2	1,5±0,2	37,6±0,15	12,01±0,18
4.	12	6	5,3±0,13	1,5±0,15	41,5±0,09	11,6±0,14
5.	3	3,5	5,3±0,09	2,3±0,13	41,4±0,12	18,2±0,12
6.	12	3,5	10,7±0,08	3,7±0,09	83,5±0,08	29,2±0,1
7.	7,5	1	14,8±0,1	1,5±0,05	115,4±0,12	11,4±0,06
8.	7,5	6	2,3±0,05	3,8±0,1	18,1±0,02	29,5±0,09
9.	7,5	3,5	3,2±0,04	1,4±0,09	25,2±0,09	10,8±0,08
10.	7,5	3,5	3,2±0,04	1,4±0,09	25,2±0,09	10,8±0,08
11.	7,5	3,5	3,2±0,04	1,4±0,09	25,2±0,09	10,8±0,08
12.	7,5	3,5	3,2±0,04	1,4±0,09	25,2±0,09	10,8±0,08
13.	7,5	3,5	3,2±0,04	1,4±0,09	25,2±0,09	10,8±0,08

3.8 Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė

Antocianinų kokybinė ir kiekybinė analizė buvo atlikta sausmedžio sultyse ir gautuose ekstraktuose, identifikuotų antocianinų koncentracija išreikšta komercinį antocianinų standartą cianidin-3-gliukozidą (mg/100 gr sulčių). Naudojant ultra efektyviosios skysčių chromatografijos–masių spektrometrijos metodą (UESC-Q-TOF) sultyse buvo idenfitikuoti 6 pagrindiniai antocianinai – pelargonidin-3-gliukozidas, cianidin-3-gliukozidas, peonidin-3-galaktozidas, cianidin-3-rutinozidas, peonidin-3-rutinozidas ir cianidin-3-kafeigliukozidas, kurių kiekiai kito nuo 0,4 iki 228 mg/100 g sulčių, o bendras nustatytų antocianinų kiekis yra 257,4 mg/100 g sulčių . Iš chromatografinės analizės gautų duomenų (žr. 28 pav.) matyti, jog dominuojantis antocianinas yra – cianidin-3-gliukozidas, kurio buvo rasta 228 mg/100 g sulčių, o tai sudaro 88,5 % visų nustatytų antocianinų, tuo tarpu kitų antocianinų kiekiai kur kas maženi. Yuehua Wang ir kt. (2016) tyrė sausmedžio uogas, kuriose nustatinėjo antocianinus ir identifiko net 16 antocianinų, tarp kurių taip pat buvo pelargonidin-3-gliukozidas, cianidin-3-gliukozidas, cianidin-3-rutinozidas, peonidin-3-rutinozidas,

o dominuojantis antocianinas yra taip pat cianidin-3-gliukozidas, sudarantis 89,7 % visų antocianinų [102]. Atlikus literatūrinę apžvalgą, galima pastebėti, jog bendras antocianinų kiekis kinta, priklausomai nuo veislės, o svarbiausia, nuo uogų surinkimo laiko ir gali siekti 173–268 mg/100 g ekstrakto [9]. Taigi, palyginus gautus rezultatus su literatūra, galima pasakyti, jog tyrimo metu gauti rezultatai yra panašūs.



28 pav. Sultyse identifikuoti antocianinai mg/100 g sulčių

Atlikus ekstraktų chromatografinę analizę buvo identifikuoti taip pat 6 pagrindiniai antocianinai – pelargonidin-3-gliukozidas, cianidin-3-gliukozidas, peonidin-3-galaktozidas, cianidin-3-rutinozidas, peonidin-3-rutinozidas ir cianidin-3-kafeigliukozidas (žr. 11 lent.), kur daugiausiai randama cianidin-3-gliukozido 16,05–1544,02 mg/100 g ekstrakto, o mažiausiai peonidin-3-rutinozido – 0,01–0,99 mg/100 g ekstrakto. Lyginant antocianinų kiekį sultyse ir ekstraktuose, matyti, jog ekstraktuose antocianinų kiekis kur kas didesnis, pvz., lyginant cianidin-3-gliukozido kiekį, SK–CO₂ EtOH ekstrakto, jis didesnis net 6,7 kartų. Analizuojant ekstraktus tarpusavyje, matyti, jog didžiausiu antocianinų kiekiu pasižymi SK–CO₂ EtOH ir EtOH ekstraktai, kurie tarpusavyje skiriasi nežymiai. Tuo tarpu mažiausi kiekiai antocianinų buvo rasti vandeniniame ekstrakto, gautame po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu. Iš šių rezultatų matome, jog etanolis yra geriausias tirpiklis išgauti antocianinams, o geriausias ekstrakcijos būdas – arba superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu pritaikius daugiapakopę ekstrakciją, arba tiesiog ekstrakcija papildintame slėgyje organiniais tirpikliais. Margarita Corrales ir kt. (2009) tyrė slėgio, laiko, temperatūros ir etanolio koncentracijos įtaką antocianinų išėigai. Mokslininkai vykdė ekstrakciją 30 min, ir keturiuose skirtinguose slėgiuose – 0,1 MPa (kontrolė), 200 MPa, 400 MPa ir 600 MPa. Iš gautų rezultatų tyrėjai nustatė, kad didžiausią įtaką monoglikozidams turėjo 200 MPa slėgis turėjo. Tirdami ekstrakcijos laiko įtaką, jie sudarė šias sąlygas – 600 MPa slėgis, 70 °C temperatūra ir trys skirtingi laikai: 30 min, 60 min ir 90 min. Atlikdami tokį eksperimentą nustatė, jog ekstrakcijos laikas neturėjo didelės reikšmės. Norėdami nustatyti temperatūros įtaką, ekstrakciją atliko 30 min, esant 600 MPa slėgiui ir temperatūrą didino nuo 20 °C iki 90 °C temperatūros. Iš gautų rezultatų nustatė, kad optimaliausios sąlygos yra 50 °C ir 70 °C temperatūros. 90 °C temperatūra sumažino antocianinų išėigą. Taip galėjo atsitikti dėl to, kadangi antocianinai yra

jautrūs aukštai temperatūrai ir skyla. Kadangi nustatė, jog efektyviausiai ekstrakcija vyksta 70 °C temperatūroje ir 600 MPa slėgyje, 30 min, todėl šios sąlygos buvo parinktos tirti etanolio įtaką, kai jo koncentraciją keitė nuo 20 iki 100 %. Taigi, atlikę tokią ekstrakciją, mokslininkai nustatė, jog kuo didesnė etanolio koncentracija, tuo didesnė antocianinų išeiga. Esant 100 % etanoliumi, antocianinų išeiga siekė 32,8 mg cy-3-gl ekv./g SM [99].

11 lentelė. Ekstraktuose identifikuoti antocianinai mg/100 g ekstrakto

Nr.	Junginys	Sulaikymo laikas, min	Masė [M ⁺]	Kiekis, mg/100 g ekstrakto				
				SK-CO ₂ EtOH	EPS H ₂ O	EPS EtOH	EtOH	SK-CO ₂ H ₂ O
1.	Pelargonidin-3-gliukozidas	3,95	433,13	7,35±0,003	0,31±0,001	3,29±0,001	7,21±0,003	0,09±0,001
2.	Cianidin-3-gliukozidas	3,55	449,11	1544,02±1,027	67,15±0,037	784,98±0,177	1480,89±1,228	16,05±0,013
3.	Peonidin-3-galaktozidas	4,18	463,13	31,16±0,626	1,36±0,054	14,53±0,304	28,67±0,01	0,44±0,009
4.	Cianidin-3-rutinozidas	3,7	595,17	61,77±0,102	2,69±0,0136	28,12±0,016	52,05±0,019	0,69±0,001
5.	Peonidin-3-rutinozidas	4,27	609,18	0,99±0,001	0,04±0,001	0,49±0,001	0,96±0,001	0,01±0,001
6.	Cianidin-3-kafeigliukozias	2,81	611,16	4,63±0,001	0,25±0,001	2,44±0,007	4,64±0,001	0,11±0,001

3.9 Lakiųjų junginių analizė

SK–CO₂ ir EPS heksaniniame ekstrakte iš viso buvo identifikuoti 57 lakūs junginiai, susidedantys iš alkanų, aldehydų, monokarboksirūgščių, esterių, alkoholių, terpenų, aromatinių ir kitų junginių. Išsamiau lakieji junginiai pateikti 11 lentelėje. Iš gautų rezultatų matyti, kad EPS heksaniniame ekstrakte aptikta daugiau ir šiek tiek didesniais kiekiais junginių nei SK–CO₂. Ekstraktuose rasta aldehydų: (2E)-heptenalis (1,94 % EPS hex ekstrakte), (2E)-okten-1-alis (0,18 % EPS hex ekstrakte), 2-fenil propanalis (0,12 % EPS hex ekstrakte), (2E)-dekenalis (0,42 % EPS hex ekstrakte) ir kt., amidų: (Z)-9-oktadekenamidas (0,88 % EPS hex ekstrakte), Heksadekanamidas (0,38 % EPS hex ekstrakte), riebalų rūgščių ir jų darinių: α-linolo rūgšties (0,09 % SK–CO₂ ekstrakte), Oleino rūgšties (0,03 % SK–CO₂ ekstrakte), Linolo rūgštis (0,58 % SK–CO₂ ekstrakte), Metil linoleato (0,24 % SK–CO₂ ekstrakte), o jos aptartos 3.4 skyriuje. Taip pat buvo aptiktas nedidelis kiekis α-tokoferolio: 0,14 % arba 5,95 mg/kg išspaudų (SK–CO₂ ekstrakte). α-tokoferolis, dar žinomas kaip vitaminas E, yra vienas iš labiausiai žinomų lipofilinių antioksidantų [103], kurios sausmedžio uogose (lot. *Lonicera caerulea*) mokslininkai nustatė, kad yra 0,42 mg/100 g uogų [11]. Tytymo metu buvo identifikuotas ir skvelenas – 0,2 % arba 9,16 mg/kg išspaudų, kuris priklauso natūralus lipidas, priklausantis terpenoidų klasei ir gerai žinomas dėl savo dietinės naudos, biologinio suderinamumo ir plataus panaudojimo farmacijos preparatuose, skirtuose ligos valdymui ar gydymui. Be to, buvo įrodyta, jog skvelenas sumažina chemoterapijos sukeltą šalutinį poveikį [104]. Zadernowski ir kt. (2005) dujų chromatografu nustatė, kad šiose uogose kurių vyrauja hidroksicinaminės rūgštys ir jos dariniai (61 %), o ypač p-kumarino ir kumarino rūgštys [22]. Deineka ir kt. mokslininkai (2005) ištyrė, kad chlorogeniko (0,42 %), kofeino (0,14 %) ir ferulio (0,10 %) rūgštys yra dominuojančios [23]. Nubuo Ikeda ir kt. mokslininkai (1994) tyrė sausmedžio (lot. *Lonicera japonica*) žiedų lakius junginius ir nustatė, jog pagrindiniai lakieji junginiai yra šie – heptakozanas (2,91 %), nonakozanas (18,27 %), metil tetrakozanoatas (13,9 %). Iš viso jie identifiko 150 junginių, iš kurių 36 yra hidrokarbonatai, 28 alkoholiai, 21 aldehidas, 12 ketonų, 38 esteriai ir 15 kiti junginiai [105].

12 lentelė. Sausmedžio išspaudų SK-CO₂ ir EPS heksaniniame ekstrakte esantys lakieji junginiai mg/kg išspaudų arba %.

Nr.	Pavadinimas	KI Eksp .	KI Lit.	SK–CO ₂ (%)	SK–CO ₂ (mg/kg)	EPS hex (%)	EPS hex (mg/kg)
1.	Heptanalis	908	902			0.03±0.00	0.48±0.07
2.	Kumenas	938	930	0.21±0.01	8.91±0.76	0.37±0.07	5.55±0.29
3.	propil-benzenas	957	950	0.12±0.01	5.32±0.35	0.15±0.03	2.26±0.10
4.	(2E)-heptenalis	968	954	1.27±0.06	55.19±6.18	1.94±0.30	29.33±0.41
5.	3-metil-nonanas	977	972	0.05±0.01	2.37±0.08	0.02±0.00	0.34±0.01
6.	1-okten-3-olis	993	977	0.04±0.00	1.69±0.08	0.05±0.01	0.73±0.02
7.	1-okten-3-onas	993	979	0.12±0.01	5.38±0.26	0.15±0.03	2.33±0.06
8.	Mesitilenas	1001	995	0.19±0.01	8.46±0.59	0.31±0.05	4.64±0.21

11 lentelės tęsinys kitame puslapyje

9.	<i>p</i> -kimenas	1035	1024	0.04±0.00	1.72±0.16	0.06±0.01	0.94±0.05
10.	1,2,4-trimetil benzenas	1036	1025	0.39±0.02	17.08±1.05	0.57±0.10	8.64±0.38
11.	Limonenas	1040	1029	0.03±0.00	1.21±0.21	0.02±0.00	0.34±0.05
12.	1,3-dietilbenzenas	1064	1047	0.04±0.00	1.53±0.22	0.06±0.01	0.84±0.04
13.	butil-benzenas	1075	1050	0.42±0.06	18.24±1.94	0.38±0.07	5.71±0.17
14.	(2 <i>E</i>)-okten-1-alis	1077	1054	0.12±0.01	5.01±0.37	0.18±0.02	2.75±0.17
15.	(2 <i>E</i>)-Okten-1-olis	1080	1066			0.09±0.00	1.31±0.18
16.	2-fenil propanalis	1085	1096	0.06±0.01	2.54±0.19	0.12±0.02	1.80±0.11
17.	(4 <i>E</i>)-nonenalis	1111	1102	0.10±0.01	4.50±0.31		
18.	Nonanalis	1118	1100			0.03±0.00	0.59±0.04
19.	(2 <i>E</i>)-nonen-1-alis	1164	1161	0.05±0.01	2.12±0.43	0.10±0.01	1.48±0.17
20.	pentil-benzenas	1176	1167	0.05±0.01	2.27±0.37	0.04±0.01	0.66±0.01
21.	<i>n</i> -dodekanas	1201	1200	1.05±0.05	45.51±2.83	1.41±0.23	21.28±0.14
22.	(2 <i>E</i>)-dekenalis	1280	1263	0.22±0.02	9.60±1.26	0.42±0.05	6.34±0.29
23.	Tridekanas	1301	1300	0.04±0.00	1.56±0.13	0.05±0.01	0.77±0.01
24.	(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i>)-dekadienalis	1316	1293	2.05±0.11	89.39±7.43	3.60±0.45	54.49±2.06
25.	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-dekadienalis	1342	1316	3.32±0.14	144.72±16.89	6.34±0.79	96.05±3.77
26.	(2 <i>E</i>)-undekenalis	1384	1360	0.08±0.00	3.57±0.47	0.07±0.01	1.10±0.08
27.	1-tetradekanas	1395	1389	0.03±0.00	1.35±0.27	0.04±0.01	0.61±0.01
28.	Tetradekanas	1400	1400	2.21±0.08	95.83±6.57	3.37±0.49	50.98±0.75
29.	4,5-epoksi-(<i>E</i>)-2-dekenalis	1408	1390	0.13±0.00	5.54±0.60	0.09±0.02	1.32±0.05
30.	<i>n</i> -pentadekanas	1500	1500			0.05±0.01	0.74±0.15
31.	1-Heksadekenas 1589	1596	1589	0.02±0.00	0.97±0.06	0.03±0.00	0.52±0.03
32.	<i>n</i> -heksadekanas	1600	1600	1.80±0.16	79.66±2.96	1.73±0.22	26.19±1.14
33.	<i>n</i> -oktadekanas	1800	1800	1.17±0.14	51.54±3.84	1.22±0.07	16.84±1.01
34.	Metil heksadekanoatas	1935	1921	0.23±0.01	10.12±0.64	0.23±0.03	3.42±0.21
35.	<i>n</i> -eikosanas	2000	2000	0.50±0.06	22.63±1.38	0.89±0.15	13.26±1.82
36.	Metil linoleatas	2109	2085	0.24±0.02	10.55±0.34	0.14±0.01	2.15±0.35

11 lentelės tęsinys kitame puslapyje

37.	Metil oleatas	2114	2103	0.02±0.00	1.07±0.07	0.02±0.00	0.26±0.06
38.	Metil linolenatas	2117	2108	0.03±0.00	1.18±0.12	0.03±0.00	0.43±0.03
39.	Linolo rūgštis	2145	2133	0.58±0.02	25.01±2.16	0.03±0.00	0.43±0.14
40.	Oleino rūgštis	2166	2142	0.03±0.00	1.27±0.15	0.03±0.00	0.40±0.03
41.	9-oktadekano rūgštis	2179	2159			0.47±0.06	7.09±0.41
42.	α-linolo rūgštis	2183	2184	0.09±0.01	3.90±0.29	0.07±0.01	1.09±0.07
43.	Heksadekanamidas	2193	2186	0.35±0.02	15.30±1.25	0.38±0.05	5.78±0.36
44.	<i>n</i> -dokošanas	2200	2200	0.41±0.03	17.35±0.47	0.40±0.05	6.11±0.47
45.	4,8,12,16-tetrametilheptadekan-4-olidas	2377	2364	0.03±0.00	1.49±0.08	0.03±0.00	0.38±0.03
46.	(<i>Z</i>)-9-oktadekenamidas	2399	2397	1.10±0.19	48.63±1.72	0.88±0.09	13.71±3.84
47.	<i>n</i> -tetrakozanas	2400	2400	0.32±0.01	13.75±1.06	0.24±0.02	3.71±0.32
48.	<i>n</i> -heksakozanas	2601	2600	0.11±0.03	4.95±0.22	0.16±0.04	2.55±0.13
49.	<i>n</i> -heptakozanas	2700	2700	0.10±0.00	4.59±0.16	0.09±0.02	1.34±0.14
50.	<i>n</i> -oktakozanas	2800	2800	0.14±0.02	6.15±0.25	0.11±0.01	1.62±0.12
51.	Skvalenas	2826	2836	0.20±0.01	9.16±0.69	0.06±0.03	0.87±0.08
52.	<i>n</i> -nonakozanas	2900	2900	15.93±0.52	692.23±53.29	10.17±1.52	153.62±1.68
53.	<i>n</i> -triakontanaa	3000	3000	0.31±0.01	13.55±1.20	0.24±0.03	3.72±0.26
54.	β-tokoferolis	3089	3076	0.04±0.00	1.57±0.05		
55.	<i>n</i> -untriakontanas	3100	3100	8.10±0.23	352.09±42.89	1.37±0.23	18.90±3.16
56.	Neatpažintas junginys	3148		47.08±0.60	2047.39±176.22	38.12±5.41	576.46±11.31
57.	Vitaminas E (D-α-tokoferolis)	3154	3149	0.14±0.01	5.95±1.05	0.04±0.01	0.64±0.09
58.	<i>n</i> -dotriakontanas	3200	3200	0.03±0.00	1.21±0.03	0.04±0.01	0.68±0.14

Pastaba: KI Eksp. – Kovačo sulaikymo indeksas tyrimo metu
 KI Lit. – Kovačo sulaikymo indeksas nurodytas literatūroje.

IŠVADOS

1. Spaudžiant sultis, buvo nustatyta sulčių išeiga – 82 % ir išspaudų išeiga – 18 %. Įvertinus sausmedžio išspaudų cheminę sudėtį, nustatyta, kad baltymų kiekis išspaudose – 10,37 %, mineralinių medžiagų – 4,82 %, riebalų – 11,72 %, drėgmės – 11,21 %, o skaidulinių medžiagų – 8,2 %. Askorbo rūgšties nustatymui buvo naudojamos sausmedžio sultys, kuriose vitamino C nustatyta – 3,28 mg/100 gr uogų, o liofilizuotose sultyse – 77,08 mg/100 g uogų (perskaičiuota per 100 gr šviežių uogų). Taip pat buvo įvertintas tirpių sausųjų medžiagų koncentracija sultyse – 13,2 °Brix.
2. Taikant paviršiaus atsako eksperimentinę planavimo metodiką buvo sudarytas mikroįkapsuliavimo planas, kuriuo buvo nustatytos optimalios mikroįkapsuliavimo sąlygos, nustatant didžiausią antocianinų įkapsuliavimo efektyvumą ir išeigą optimizuojant sudėtinių komponentų – maltodekstrino ir sojų baltymų izoliato kiekius. Naudojant Stat Design programą buvo pasiūlyta maksimali teorinė išeiga – 75,75 %, tačiau eksperimento metu didžiausia išeiga gauta – 84,58 %. Atlikus analizę, paaiškėjo, kad geriausiu efektyvumu, net 90,1 % pasižymėjo, nors programos maksimalus teorinis įkapsuliavimo efektyvumas yra siūlomas 70,81 %, kai mikroįkapsuliavimui buvo naudojama 7,5 g maltodekstrino ir 1 g sojų baltymų izoliato.
3. Nustatytos sausmedžio išspaudų ekstraktų išeigos, didžiausia išeiga nustatyta etanolinių ekstraktų, gautų ekstrahuojant SK–CO₂ likusią kietąją frakciją, kai išeiga siekė 50,98 %. Taip pat didelė ekstrakcijos išeiga gauta ekstrahuojant tik etanolu – 49,91 %. Palyginus ekstrakcijų išeigas tarpusavyje, nustatyta, jog efektyviausias tirpiklis yra etanolis, o prasčiausias heksanas, kai ekstrakcijos išeiga gauta net kelis kartus mažesnė – 10,22 %. Ekstrakcijų išeigoms didelę įtaką daro tirpiklio poliškumo savybės ir junginių tirpumas.
4. Sausmedžio išspaudų SK–CO₂ ekstrakto rasta 11 riebalų rūgščių, iš kurių nemažai nesočiųjų riebalų rūgščių. Didžiausia koncentracija riebalų rūgščių nustatyta dokosadieno (27,46 %), linolo (15,71 %), kaprilo (14,07 %) ir kaprono (13,22 %), tarp kurių linolo (omega 6) ir oleino (omega 9) riebalų rūgštys yra nepakeičiamos. Taip pat yra ir sočiųjų rūgščių, tačiau nustatyta mažesnėmis koncentracijomis – palmitino (0,99 %), stearino (0,23 %). Taikant ultra efektyviąją skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodą buvo nustatyta triacilglicerolių sudėtis. Tirtuose ekstraktuose (SK–CO₂ ir EPS heksaniniame) nustatyti 8 triacilgliceroliai. Triacilglicerolių sudėtyje dominavo palmitino (P), linolo (L), linoleno (Ln) ir oleino (O) rūgštys. Iš gautų duomenų galima pastebėti, kad pagal gautus pikų plotus triacilglicerolių didesnė koncentracija nustatyta SK–CO₂ lipofiliniame ekstrakto.
5. Naudojant ultra efektyviosios skysčių chromatografijos–masių spektrometrijos metodą (UESC-Q-TOF) sultyse buvo identifikuoti 6 pagrindiniai antocianinai – pelargonidin-3-gliukozidas, cianidin-3-gliukozidas, peonidin-3-galaktozidas, cianidin-3-rutinozidas, peonidin-3-rutinozidas ir cianidin-3-kafeigliukozidas, kurių kiekiai kito nuo 0,4 iki 228 mg/100 g sulčių, o bendras nustatytų antocianinų kiekis yra 257,4 mg/100 g sulčių. Dominuojantis antocianinas yra – cianidin-3-gliukozidas, kurio buvo rasta 228 mg/100 g sulčių, tai sudaro 88,5 % visų nustatytų antocianinų, tuo tarpu kitų antocianinų kiekiai kur kas maženi. Gautuose išspaudų ekstraktuose taip pat dominavo 6 pagrindiniai antocianinai – pelargonidin-3-gliukozidas, cianidin-3-gliukozidas, peonidin-3-galaktozidas, cianidin-3-rutinozidas, peonidin-3-rutinozidas ir cianidin-3-kafeigliukozidas. Daugiausiai buvo rasta cianidin-3-gliukozido 16,05–1544,02 mg/100 g ekstrakto, o mažiausiai peonidin-3-rutinozido – 0,01–0,99 mg/100 g ekstrakto. Analizuojant ekstraktus tarpusavyje, pastebėta, kad didžiausiu antocianinų kiekiu pasižymi SK–CO₂ EtOH ir EtOH ekstraktai, kurie

tarpusavyje skiriasi nežymiai. Tuo tarpu mažiausi kiekiai antocianinų buvo rasti ekstrakto, gautame po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu gautą liekaną ekstrahuojant vandeniu.

6. SK-CO₂ ir EPS heksaniniame ekstrakto iš viso buvo identifikuoti 57 lakūs junginiai, susidedantys iš alkanų, aldehydų, monokarboksirūgščių, esterių, alkoholių, terpenų, aromatinių ir kitų junginių. Nustatyta, kad EPS heksaniniame ekstrakto aptikta daugiau ir šiek tiek didesniais kiekiais junginių nei SK-CO₂.
7. Buvo atlikti trys skirtingi antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodai – ABTS^{•+}, DPPH[•] ir ORAC. Geriausia radikalų surišimo geba pasižymėjo etanoliniai ekstraktai, kur vertės varijavo nuo 61,47 iki 354,15 mg TE/g ekstrakto. Mažiausia radikalų sujungimo geba gauta pritaikius DPPH[•] metodą, kuris net apie 5 kartus mažesnis už ABTS^{•+} ir apie 4 kartus mažesnis už ORAC metodu įvertintus ekstraktus. Lyginant ekstraktus ir po ekstrakcijų likusią kietąją frakciją DPPH[•] sistemoje, galima pastebėti, kad net apie 8,5 kartų didesnė radikalų surišimo geba nustatyta ekstraktuose. Nustatytas mažiausias BFJK sultyse – 3,28 mg GRE/1 ml sulčių ir didžiausias kiekis EPS vandeniniame ekstrakto – 90,16 mg GRE/g ekstrakto. Taip pat matyti, kad EPS ekstrakcijos būdu gautuose ekstraktuose yra šiek tiek daugiau fenolinių junginių nei SKE-CO₂ ekstrakto.

Įvertinus Quencher metodiką rieš ekstrakcijas išspaudose BFJK nustatytas 169,27 GRE mg/g išspaudų. Tirtos ir po įvairių ekstrakcijų gautos liekanos, didžiausias fenolinių junginių kiekis ištirtas SK-CO₂ išspaudų ekstrakto 223,82 GRE mg/g išspaudų, o mažiausias po ekstrakcijos tik etanoliu – 125,92 GRE mg/g išspaudų. Mažiausi kiekiai gauti ekstrahuojant poliniu tirpikliu etanoliu, o didžiausi kiekiai nepoliniais tirpikliais – CO₂ ir heksanu. Iš gautų rezultatų nustatyta, jog ekstraktuose gautas fenolinių junginių kiekis yra apie 2,5 kartus mažesnis nei po ekstrakcijų likusiose kietosiose frakcijose.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Noeme Auzanneau ir kt., „Bioactive compounds and antioxidant capacity of *Lonicera caerulea* berries: Comparison of seven cultivars over three harvesting years,“ *Journal of Food Composition and Analysis*, nr. 66, p. 81–89, 2018, ISSN 08891575.
2. Ireneusz Ochmian ir kt., „Chemical Composition and Physical Characteristics of Fruits of Two Cultivars of Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) in Relation to their Degree of Maturity and Harvest Date,“ *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, nr. 40(1), pp. 155-162, 2012, ISSN 0255965X
3. Jan Oszmiański, Alicja Z. Kucharska, „Effect of pre-treatment of blue honeysuckle berries on bioactive iridoid content,“ *Food Chemistry*, nr. 240, p. 1087–1091, 2018, ISSN 03088146.
4. Boivin D ir kt., „Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFκB by edible berry juice,“ *Anticancer Research*, nr. 27, pp. 937-948, 2007, ISSN 0250-7005.
5. Anna Grobelna, Stanisław Kalisz ir Marek Kieliszek, „Effect of Processing Methods and Storage Time on the Content of Bioactive Compounds in Blue Honeysuckle Berry Purees,“ *Agronomy*, nr. 9, p. 860, 2019, ISSN 0619-409X.
6. Vesna Tumbas Saponjac ir kt., „Anthocyanin profiles and biological properties of caneberry (*Rubus* spp.) press residues,“ *Journal of the Science of Food and Agriculture*, nr. 94, p. 2393–2400, 2014, ISSN 00225142.
7. Charis M Galanakis, „Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications,“ *Trends in Food Science & Technology*, nr. 16, pp. 68-87, 2012, ISSN 09242244.
8. Katarzyna Skupien, Ireneusz Ochmian ir Jozef Grajkowski, „Influence of ripening time on fruit chemical composition of two blue honeysuckle cultivars,“ *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, nr. 17(1), pp. 101-111, 2009, ISSN 1231-0948.
9. Mateja Senica, Franci Stampar, Maja Mikulic-Petkovsek, „Blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. subs. *edulis*) berry; A rich source of some nutrients and their differences among four different cultivars,“ *Scientia Horticulturae*, nr. 238, p. 215–221, 2018, ISSN 03044238.
10. G. Jurkevičienė, 35 03 2004, [žiūrėta 2010-04-17]. Prieiga per: <https://www.botanikos-sodas.vu.lt/puslapiai/augalų-gentys/sausmedis>.
11. Irena Palikova, „Constituents and Antimicrobial Properties of Blue Honeysuckle: A Novel Source for Phenolic Antioxidants,“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, nr. 56, pp. 11883-11889, 2008, ISSN 0021-8561.
12. Mateja Senica, Franci Stampar, Maja Mikulic-Petkovsek, „Different extraction processes affect the metabolites in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. subsp. *edulis*) food products,“ *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, nr. 43, pp. 576-585, 2019, ISSN 1300-011X.

13. Anna Grobelna, Stanisław Kalisz i Marek Kieliszek „The Effect of the Addition of Blue Honeysuckle Berry Juice to Apple Juice on the Selected Quality Characteristics, Anthocyanin Stability, and Antioxidant Properties,” *Biomolecules*, nr. 744, pp. 1-14, 17 November 2019, ISSN 22180273X.
14. Giovanni Caprioli i kt., „Blue honeysuckle fruit (*Lonicera caerulea* L.) from eastern Russia: phenolic composition, nutritional value and biological activities of its polar extracts,” *Food & Function*, nr. 7, pp. 1892-1903, 2016, ISSN 2042-6496.
15. Jan Oszmianski, Aneta Wojdyło. i Sabina Lachowicz, „Effect of dried powder preparation process on polyphenolic content and antioxidant activity of blue honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica*),” *Food Science and Technology*, nr. 67, pp. 214-222, 2016, ISSN 0101-2061.
16. Suwen Liu i kt., „Effects of high hydrostatic pressure on physicochemical properties, enzymes activity, and antioxidant capacities of anthocyanins extracts of wild *Lonicera caerulea* berry,” *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, nr. 36, p. 48–58, 2016, ISSN 14668564.
17. Rafał Becker, Anna Szakiel, „Phytochemical characteristics and potential therapeutic properties of blue honeysuckle *Lonicera caerulea* L. (Caprifoliaceae),” *Journal of Herbal Medicine*, nr. 16, 2019, ISSN 22108041.
18. Suwen Liu i kt., „Polyphenol-rich extract from wild *Lonicera caerulea* berry reduces cholesterol accumulation by mediating the expression of hepatic miR-33 and miR-122, HMGCR, and CYP7A1 in rats,” *Journal of Functional Foods*, nr. 40, pp. 648-658, 2018, ISSN 17564646.
19. Liang Chen i kt., „Isolation of cyanidin 3-glucoside from blue honeysuckle fruits by high-speed counter-current chromatography,” *Food Chemistry*, nr. 152, p. 386–390, 2014, ISSN 03088146.
20. Tunde Jurikova i kt., „Phenolic Profile of Edible Honeysuckle Berries (Genus *Lonicera*) and Their Biological Effects,” *Molecules*, nr. 17, pp. 61-79, 2012, ISSN 1420-3049.
21. Jiri Sochor i kt., „Evaluation of Antioxidant Activity, Polyphenolic Compounds, Amino Acids and Mineral Elements of Representative Genotypes of *Lonicera edulis*,” *Molecules*, nr. 19, pp. 6504-6523, 2014, ISSN 1420-3049.
22. Ryszard Zadernowski, Marian Naczek, Jarosław Nesterowicz, „Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries,” *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, nr. 53, pp. 2118-2124, 2005, ISSN 0021-8561.
23. V.I. Deineka, „Anthocyanins from fruit of some plants of the caprifoliaceae family,” *Chemistry of Natural Compounds*, nr. 41(2), pp. 162-164, 2005, ISSN 15738388.
24. Magdalena Kupska i kt., „Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpenes profile of blue honeysuckle berries,” *Food Chemistry*, nr. 152, pp. 88-93, 2014, ISSN 03088146.

25. J. Bruneton, *Pharmacognosy phytochemistry Medical plants*, 2nd edition, Technique & documentation, 2003.
26. J. M. Andersen ØM, „Anthocyanins—food applications. Presented at Proc. 5th Int. Congr.,“ *Pigments Foods: For Quality and Health*, Helsinki, Finl, 2008.
27. Jian He, M. Monica Giusti, „High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables— A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography,“ *Journal of Chromatography A*, nr. 1218, pp. 7914-7922, 2011, ISSN 0021-9673.
28. André Sinela ir kt., „Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products,“ *Food chemistry*, nr. 214 , p. 234–241 , 2017, ISSN 03088146.
29. Konczak I., Zhang W., „Anthocyanins – more than nature's colours,“ *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, nr. 5, pp. 239-240, 2004, ISSN 1110-7243.
30. Andersen O.M., K.R. Markham., „Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications,“ New York, CRC Press, 2006, pp. 472-522.
31. B. Halliwell, „Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease,“ *The American Journal of Medicine*, 91(3), pp. 14-22, 1991, ISSN 00029343.
32. Wu X ir kt., „Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption,“ *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, nr. 54, pp. 4069-4075, 2006, ISSN 0021-8561.
33. Alessandra Cristina Pedro, Daniel Granato, Neiva Deliberali Rosso, „Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability,“ *Food Chemistry* , nr. 191, p. 12–20, 2016, ISSN 03088146.
34. Araceli Castañeda-Ovando ir kt., „Chemical studies of anthocyanins: A review,“ *Food chemistry*, nr. 113, p. 859–871, 2009, ISSN 03088146.
35. Giovana Bonat Celli, Amyl Ghanem, Marianne Su Ling Brooks, „Haskap Berries (*Lonicera caerulea* L.)—a Critical Review of Antioxidant Capacity and Health-Related Studies for Potential Value-Added Products,“ *Food Bioprocess Technology*, nr. 7, p. 1541–1554, 2014.
36. Mircea Oroian, Isabel Escriche, „Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis,“ *Food Research International*, nr. 74, pp. 10-36, 2015, ISSN 09639969.
37. Elżbieta Kaczmarska ir kt., „Genetic diversity and chemical characterization of selected Polish and Russian cultivars and clones of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea*),“ *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, nr. 39, pp. 394-402, 2015, ISSN 1300-011X.
38. Jiangtao Zhanga ir kt., „Chemical compositions and α -glucosidase inhibitory effects of anthocyanidins from blueberry, blackcurrant and blue honeysuckle fruits,“ *Food Chemistry*,

nr. 299, 2019, ISSN 03088146.

39. Lafay S., Gill-Izquierdo, „Bioavailability of phenolic compounds,“ *Phytochemistry Reviews*, nr. 7, pp. 301-311, 2008, ISSN 15687767.

40. Feng R. ir kt., „Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress,“ *Journal of Biological Chemistry*, nr. 282, pp. 13468-13476, 2007, ISSN 00219258.

41. Junqueira-Gonçalves MP ir kt., „Isolation and Characterization of Phenolic Compounds and Anthocyanins from Murta (*Ugni molinae* Turcz.) Fruits. Assessment of Antioxidant and Antibacterial Activity,“ *Molecules*, nr. 20, pp. 5698-5713, 2015, ISSN 1420-3049.

42. Jian He, M. Monica Giusti, „Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties,“ *Annual Review of Food Science and Technology*, nr. 1, pp. 163-187, 2010, ISSN 1941-1421.

43. Antal D.-S, Gârban G, Gârban Z., „The anthocyanins: biologically – active substances of food and pharmaceutical interest,“ *The Annals of University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI – Food Technology*, pp. 106-115, 2003, ISSN 1843-5157.

44. K. Ghosh D, „Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function,“ *Asia Pasific Journal of Clinical Nutrition*, 16(2), pp. 200-208, 2007, ISSN 09647058.

45. Florian C Stintzing, Reinhold Carle, „Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition,“ *Trends in Food Science & Technology*, nr. 15, pp. 19-38, 2004, ISSN 09242244.

46. Edwards A. M. ir kt., „Food Supplements in the Treatment of Primary Fibromyalgia: A Double-blind, Crossover Trial of Anthocyanidins and Placebo,“ *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, 10(3), pp. 189-199, 2000, ISSN 13646907.

47. Joseph J. A. ir kt., „Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation,“ *Journal of Neuroscience*, 19(18), pp. 8114-81121, 1999, ISSN 1097-4547.

48. Kong J-M., Chia L-S., Goh N-K., Chia T-F., Brouillard R, „Analysis and biological activities of anthocyanins,“ *Phytochemistry*, 64(5), pp. 923-933, 2003, ISSN 00319422.

49. Navindra P Seeram, „Berry Fruits for Cancer Prevention: Current Status and Future Prospects,“ *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(3), pp. 630-635, 2008, ISSN 0021-8561.

50. S.G. Sparg, M.E. Light, J. van Staden, „Biological activities and distribution of plant saponins,“ *Journal of Ethnopharmacology*, nr. 94, pp. 219-243, 2004, ISSN 03788741.

51. S.M.Argon, B.Basabe, J.M.Benedi, A.M.Villar, „Antioxidant Action of *Vaccinium myrtillus* L,“ *Phytotherapy Research*, nr. 12, p. 104, 1998, ISSN 1009-1573.

52. You-Suk Lee ir kt., „Evaluation of in vitro anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Korean and Chinese *Lonicera caerulea*,“ *Nutrition Research and Practice*, nr. 12(6), pp. 486-493, 2018, ISSN 19761467.
53. Lei Zhao ir kt., „Antioxidant activities and major bioactive components of consecutive extracs from blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* l.) cultivated in China,“ *Journal of Food Biochemistry*, nr. 39, pp. 653-662, 2015, ISSN 01458884.
54. S.Y. Wang ir H. Jiao, „Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen,“ *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, t. 48, nr. 11, pp. 5677-5684, 2000.
55. Jonathan E. Brown, Mary F. Kelly, „Inhibition of lipid peroxidation by anthocyanins, anthocyanidins and their phenolic degradation products,“ *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(1), pp. 66-71, 2007, ISSN 1438-7697.
56. Graversen H. B, Becker E. M, Skibsted L. H. Andersen M. L., „Antioxidant synergism between fruit juice and a-tocopherol. A comparison between high phenolic black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and high ascorbic blackcurrant (*Ribes nigrum*),“ *European Food Research and Technology*, nr. 226, pp. 737-743, 2008, ISSN 1438-2377.
57. Shih P-H, Yeh C-T, Yen G-C., „Anthocyanins Induce the Activation of Phase II Enzymes through the Antioxidant Response Element Pathway against Oxidative Stress-Induced Apoptosis,“ *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(23), pp. 9427-9235, 2007, ISSN 0021-8561.
58. Kalt W, McDonald J. E, Donner H., „Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products,“ *Journal of Food Science*, 65(3), pp. 390-393, 2000, ISSN 00221147.
59. Zheng W, Wang S. Y., „Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries,“ *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51(2), pp. 502-509, 2003, ISSN 0021-8561.
60. Dai J, Mumper RJ, „Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties,“ *Molecules*, nr. 15, pp. 7313-7352, 2010. ISSN 1420-0349.
61. Susan J Duthie, „Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process,“ *Journal of Molecular Nutrition and Food Research*, nr. 51, pp. 665-674, 2007. ISSN 16134125.
62. Pu Jing ir kt., „Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth.,“ *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, nr. 56, pp. 9391-9398, 2008, ISSN 0021-8561.
63. Greeta Lala ir kt., „Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats,“ *Journal of Nutrition and Cancer*, nr. 54, pp. 84-89, 2006, ISSN 06135581.
64. Marcella Renis ir kt., „Response of cell cycle/stress-related protein expression and DNA damage upon treatment of CaCo2 cells with anthocyanins,“ *British Journal of Nutrition*, nr.

100, pp. 27-35, 2008, ISSN 0007-1145.

65. Ingrid Elisia, David D kits,, „Anthocyanins inhibit peroxy radical-induced apoptosis in Caco-2 cells,“ *Journal of Molecular and Cellular Biochemistry*, nr. 312, pp. 139-145, 2008, ISSN 15734919.

66. Shirley Zafra-Stone ir kt., „Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention,“ *Journal of Molecular Nutrition and Food Research*, 51(6), pp. 675-683, 2007, ISSN 16134125.

67. Paulina Ongkowijoyoa ir kt., „Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update,“ *Food Chemistry*, nr. 250, p. 113–126, 2018 ISSN 03088146.

68. Dorota Wianowska, Marta Gil, „Critical approach to PLE technique application in the analysis of secondary metabolites in plants,“ *Trends in Analytical Chemistry*, nr. 114, pp. 314-325, 2019., ISSN 01659936.

69. Kashif Ameer, Hafiz Muhammad Shahbaz, Joong-HO Kwon, „Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review,“ *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, nr. 16, pp. 295-315, 2017, ISSN 15414337.

70. Ana Paula Da Fonseca Machadoa ir kt., „Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination,“ *Food chemistry*, nr. 231, pp. 1-10, 2017, ISSN 03088146.

71. Guangling Jiao, Azadeh Kermanshahi pour „Extraction of anthocyanins from haskap berry pulp using supercritical carbon dioxide: Influence of co-solvent composition and pretreatment,“ *Food Science and Technology*, nr. 98, p. 237–244, 2018, ISSN 0101-2061.

72. F. Sahena ir kt., „Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review,“ *Journal of Food Engineering*, nr. 85, pp. 240-253, 2009, ISSN 02608774.

73. Kamal Gandhi, Sumit Arora ir Anil Kumar „Industrial applications of supercritical fluid extraction: A review,“ *International Journal of Chemical Studies*, 5(3), pp. 336-340, 2017, ISSN 0972768X.

74. Erik Scott Dasso, Yao Olive Li, „Mechanisms and effects of ultrasound-assisted supercritical CO₂ extraction,“ *Trends in Food Science & Technology*, nr. 86, pp. 492-501, 2019, ISSN 09242244.

75. Adriana Gadioli Tarone, Cinthia Bau Betim Cazarin, Mario Roberto Marostica Junior, „Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation,“ *Food Research International*, t. 133, 2020.

76. Filipa Paulo, Lucia Santos, „Design of experiments for microencapsulation applications: A review,“ *Materials Science and Engineering: C*, nr. 77, pp. 1327-1340, 2017, ISSN 09284931.

77. Alla Nesterenko, Isabelle Alric, Françoise Silvestre, Vanessa Durrieu, „Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness,“ *Industrial*

Crops and Products, nr. 42, pp. 469-479, 2013, ISSN 09266690.

78. J. H. Shabana Praveen Dhakal, „Microencapsulation of Vitamins in Food Applications to Prevent Losses in Processing and Storage: A Review,“ *Food Research International*, 2020, ISSN 096399969.

79. A. Marisa Ribeiro, Mohammad Shahgol, Berta N. Esevinho, Fernando Rocha, „Microencapsulation of Vitamin A by spray-drying, using binary and ternary blends of gum arabic, starch and maltodextrin,“ *Food Hydrocolloids*, 2020, ISSN 0268005X.

80. Getachew Assegehegn, Edmundo Brito-de la Fuente, Jose M. FRanco, Crispulo Gallegos, „The Importance of Understanding the Freezing Step and Its Impact on Freeze-Drying Process Performance,“ *Journal of Pharmaceutical Sciences*, nr. 108, pp. 1378-1395, 2019, ISSN 00223549.

81. Wassim Abdelwahed, Ghania Degobert, Serge Stainmesse, Hatem Fessi, „Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations,“ *Advanced Drug Delivery Reviews*, nr. 58, pp. 1688-1713, 2006, ISSN 0169-409X.

82. W. C. Mohammad Rezaul Islam Shishir, „Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices,“ *Trends in Food Science & Technology*, nr. 65, pp. 49-67, 2017, ISSN 09242244.

83. D.A. Vishali, J. Monisha, S.K. Sivakamasundari, J.A. Moses, C. Anandharamakrishnan, „Spray freeze drying: Emerging applications in drug delivery,“ *Journal of Controlled Release*, nr. 300, pp. 93-101, 2019, ISSN 01683659.

84. Karen Y. Dondson, Edna R. Young, Abdel-Gawad M. Soliman, „Determination of total vitamin C in various food matrices by liquid chromatography and fluorescence detection,“ *Journal of AOAC International*, pp. 887-891, 1992.

85. Alam Zeb, Michael Murkovic, „Analysis of triacylglycerols in refined edible oils by isocratic HPLC-ESI-MS,“ *European Journal of Lipid Science and Technology*, 12(8), pp. 844-851, 2010, ISSN 1438-7697.

86. Vernon L. Singleton, Rudolf Orthofer, Rosa M. Lamuela-Raventós, „[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent,“ *Methods in Enzymology*, nr. 299, pp. 152-178, 1999, ISSN 00766879.

87. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier ir C. Berset, „Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity,“ *LWT Food Science and Technology*, t. 28, nr. 1, pp. 25-30, 1995.

88. Roberta Re ir kt., „Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay,“ *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 1231-1237, 1999, ISSN 08915849.

89. Ronald L. Prior ir kt., „Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples,“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), pp. 3273-3279, 2005, ISSN

0021-8561.

90. AOAC, Official methods of analysis (18th ed.), Gaithersburgs: Official Method 2005, 2005.

91. L. E. I. 12996-1:2015, Gyvūniniai ir augaliniai riebalai ir aliejus. Riebalų rūgščių metilesterių nustatymas. 4 dalis. Nustatymas naudojant kapiliarinę dujų chromatografiją (ISO 12966-4:2105), Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2015.

92. Carolina Fredes, Camila Becerra, Javier Parada ir Paz Robert, „The Microencapsulation of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) Juice by Spray-Drying and Freeze-Drying Produces Powders with Similar Anthocyanin Stability and Bioaccessibility,“ *Molecules*, nr. 23, p. 1227, 2018.

93. Tunde Jurikova ir kt., „Evaluation of Polyphenolic Profile and Nutritional Value of Non-Traditional Fruit Species in the Czech Republic — A Comparative Study,“ *Molecules*, t. 17, pp. 8968-8981, 2012, ISSN 1420-3049.

94. Hsia-Fen Hsua ir kt., „Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Lonicera japonica* Thunb. var. *sempervillosa* Hayata flower bud extracts prepared by water, ethanol and supercritical fluid extraction techniques,“ *Industrial Crops and Products*, nr. 89, pp. 543-549, 2016, ISSN 09266690.

95. Marina Cvjetko Bubalo ir kt., „New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents,“ *Food of Bioproducts Processing*, nr. 109, pp. 52-73, 2018, ISSN 0960-3085.

96. Alam Zeb, Michael Murkovic, „Analysis of triacylglycerols in refined edible oils by isocratic HPLC-ESI-MS,“ *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(8), pp. 844-851, 2010, ISSN 1438-7697.

97. Piret Raudsepp ir kt., „The antioxidative and antimicrobial properties of the blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.), Siberian rhubarb (*Rheum rhaponticum* L.) and some other plants, compared to ascorbic acid and sodium nitrite,“ *Food Control*, nr. 31, pp. 129-135, 2013, ISSN 0956-7135.

98. Barbara Kusznierevicz ir kt., „Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Polish Blue-Berried Honeysuckle Genotypes by HPLC-DAD-MS, HPLC Postcolumn Derivatization with ABTS or FC, and TLC with DPPH Visualization,“ *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, nr. 60, pp. 1755-1763, 2012, ISSN 0972768X.

99. Margarita Corrales, Avelina Fernandez-Garcia, Peter Butz, Bernhard Tauscher, „Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure,“ *Journal of Food Engineering*, nr. 90, pp. 415-421, 2009, ISSN 02608774.

100. H. P. Vasantha Rupasinghe ir kt., „Short Communication: Haskap (*Lonicera caerulea*): A new berry crop with high antioxidant capacity,“ *Canadian Journal of Plant Science*, 92(7), pp. 1311-1317, 2012, ISSN 00084220.

101. Regiane Victória de Barros Fernandes ir kt., „Microencapsulation of Rosemary Essential

Oil: Characterization of Particles," *Drying Technology: An International Journal*, 31(11), pp. 1245-1254, 2013, ISSN 15322300.

102. Yuehua Wang ir kt., „Comparison of polyphenol, anthocyanin and antioxidant capacity in four varieties of *Lonicera caerulea* berry extracts," *Food Chemistry*, nr. 197, pp. 522-529, 2016, ISSN 03088146.

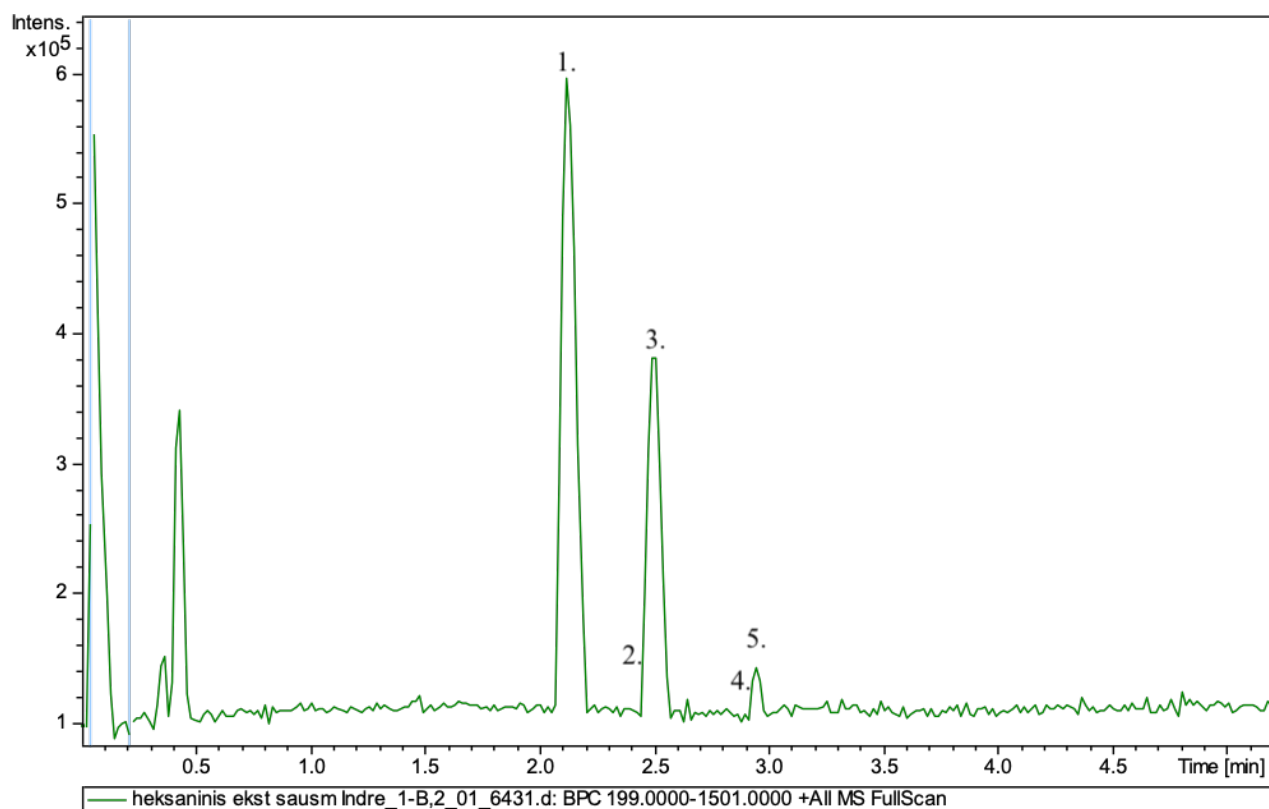
103. Paula Muñoz, Sergi Munne-Bosch, „Vitamin E in Plants: Biosynthesis, Transport, and Function," *Trends in Plant Science*, 24(11), pp. 1040-1051, 2019, ISSN1360-1385.

104. L. Harivardhan Reddy, Patrick Couvreur, "Squalene: Anatural triterpene for use in didease management and therapy", *Advanced Drug Delivery Review*, 61(15), pp 1412-1426, 2009, ISSN 0169409X.

105. Nubuo Ikeda ir kt., „Votalite Components of Honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) Flowers", *Flavour and Fragrance Journal*, nr. 9, pp 325-331, 1994, ISSN 10991026.

PRIEDAI

1 priedas



29 pav. Trigliceridų smailės chromatogramoje EPS heksnaniniame ekstrakte