

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

IEVA RAČKAUSKIENĖ

BUROKĖLIŲ (*BETA VULGARIS*) IR BRUKNIŲ (*VACCINIUM VITIS-IDAEA L.*) LAPŲ PREPARATŲ ANTIOKSIDACINĖS SAVYBĖS IR ĮTAKA TOKSINIŲ MEJARO REAKCIJOS PRODUKTŲ SUSIDARYMUI MAISTO MODELINĖSE SISTEMOSE

Daktaro disertacijos santrauka
Gamtos mokslai, chemija (N 003)

2020, Kaunas

Disertacija rengta 2011–2019 m. Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakultete, Maisto mokslo ir technologijos katedroje. Mokslinius tyrimus rėmė Valstybinis studijų fondas ir Lietuvos mokslo taryba. Dalis tyrimų atlikta Neapolio Frederiko II universitete.

Mokslinis vadovas:

Doc. dr. Audrius PUKALSKAS (Kauno technologijos universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003).

Redagavo: Aurelija Gražina Rukšaitė (Leidykla „Technologija“)

Chemijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:

Prof. dr. Daiva LESKAUSKAITĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005) – **Tarybos pirmininkė;**

Prof. dr. Vytas MARTYNAITIS (Kauno technologijos universitetas, gamtos mokslai, chemija – N 003);

Prof. habil. dr. Vytautas MICKEVIČIUS (Kauno technologijos universitetas, gamtos mokslai, chemija – N 003);

Doc. dr. Vilma KAŠKONIENĖ (Vytauto Didžiojo universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, – T 005);

Dr. Dalija SEGLINA (Latvijos gyvybės mokslų ir technologijos universitetas, Sodininkystės institutas, gamtos mokslai, chemija, – N 003).

Disertacija bus ginama viešame chemijos mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2020 m. birželio 12 d. 11 val. Kauno technologijos universiteto disertacijų gynimo salėje.

Adresas: K. Donelaičio g. 73-403, 44249 Kaunas, Lietuva.

Tel. (370) 37 30 00 42; faks. (370) 37 32 41 44; el. paštas doktorantura@ktu.lt.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2020 m. gegužės 12 d.

Su disertacija galima susipažinti internetinėje svetainėje <http://ktu.edu> ir Kauno technologijos universiteto bibliotekoje (K. Donelaičio g. 20, 44239 Kaunas).

Simboliai ir santrumpos

ABTS⁺ – 2,2'-azinobis(-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties katijono laisvasis radikalas
BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis
BLAE – bruknių lapų acetono ekstraktas
BLME – bruknių lapų metanolio ekstraktas
BLVE – bruknių lapų vandens ekstraktas
BM – burokėlių milteliai
BnF – betanino frakcija
BSM – burokėlių sulčių milteliai
BtF – betalainų frakcija
BtFI – rožinė betalainų frakcija
BtFII – raudona betalainų frakcija
BtFIII – šviesiai ruda betalainų frakcija
CML – N^ε-karboksimetil-lizinas
DBLAE – dezodoruotų bruknių lapų acetono ekstraktas
DBLME – Dezodoruotų bruknių lapų metanolio ekstraktas
DPPH[•] – 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas
EK₅₀ – efektyvioji koncentracija
ESCh – efektyvioji skysčių chromatografija
Furozinas – N^ε-2-furoilmetil-lizinas
GRE – Galo rūgšties ekvivalentai
IARC – Tarptautinė vėžinių tyrimų agentūra
LOD – minimali aptikimo riba
LOQ – minimali kiekybinio nustatymo riba
m/z – molekulinės masės ir krūvio santykis
MeIQ – 2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]chinolonas
MeIQx – 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]chinoksalinas
MS/MS – tandeminis masių spektrometras
ORAC – deguonies radikalo surišimo geba
PGGP – progresavusios glikacijos galutiniai produktai
PhIP – 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridinas
PMS – pieno modelinė sistema
Q-TOF – kvadrupolinis skriejimo laiko analizatorius
SE – sauso ekstrakto
SM – sausos medžiagos
ST – sulaikymo trukmė
TE – trolokso ekvivalentas
Trp-P-1 – 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indolas
UESCh – ultra efektyvioji skysčių chromatografija
VxF – vulgaksantino I frakcija

1. ĮVADAS

Temos aktualumas

Terminis apdorojimas yra neišvengiamas maisto produktų gamybos etapas, kuris taikomas siekiant užtikrinti produktų mikrobiologinį stabilumą, pailginti produkto vartojimo terminą ir suteikti juslines ir technologines savybes. Tačiau jo metu tarp maisto komponentų vyksta cheminiai kitimai ir gali susidaryti junginių, pasižyminčių toksiniu poveikiu. Daugiausia šie pakitimai yra susiję su Mejero reakcija, kuri vyksta tarp laisvas amino grupes turinčių junginių (aminorūgštys, baltymai, peptidai) ir laisvas karbonilgrupes turinčių junginių (sacharidai, lipidų oksidacijos produktai ir kt.). Tokie Mejero reakcijos produktai, kaip galutiniai progresavusios glikacijos produktai (PGGP), heterocikliniai aminai (HA), policikliniai aromatiniai angliavandeniliai, akrilamidas ir furano ir furfurolio dariniai, kelia didelį susirūpinimą dėl toksinio poveikio žmogaus sveikatai. 2015 m. IARC priskyrė raudoną mėsą 2A grupei, kaip „galimai karcinogenišką žmonėms“, o apdorotą mėsą – 1 grupei, kaip „karcinogenišką žmonėms“. Todėl, keičiantis gyvenimo būdai ir didėjant perdirbto maisto suvartojimui, tampa svarbu kontroliuoti maiste vykstančius cheminius pakitimus, siekiant sumažinti junginių, pasižyminčių toksiniu poveikiu, susidarymą maiste. Viena iš plačiai tyrinėjamų sričių yra Mejero reakcijos ir fenolinių junginių sąveikos. Yra žinoma, jog fenoliniai junginiai gali reaguoti su karboniliniais junginiais ir aminorūgštimis / proteinais ir taip pakreipti Mejero reakcijos eigą. Tačiau trūksta duomenų apie natūralių ekstraktų poveikį Mejero reakcijos produktų susidarymui maisto sistemose. Taip pat nėra žinoma apie betalainų, kurie yra gana plačiai vartojami maisto pramonėje, įtaką Mejero reakcijai. Todėl tyrimai, aiškinantis natūralių ekstraktų ir betalainų poveikį toksinių Mejero reakcijos produktų susidarymui maisto sistemose, yra aktualūs.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Pagrindinis šio darbo tikslas – nustatyti betalainų, išgautų iš burokėlių (*Beta Vulgaris*), ir ekstraktų, išgautų iš bruknių (*Vaccinium vitis-idaea* L.) lapų, įtaką toksinių Mejero reakcijos produktų susidarymui maisto modelinėse sistemose. Darbo tikslui pasiekti reikėjo įvykdyti šiuos uždavinius:

1. Išgryninti betaniną ir vulgaksantiną I iš burokėlių, taikant gelio chromatografijos ir preparatinės efektyviosios skysčių chromatografijos metodus, ir nustatyti įvairių burokėlių preparatų antioksidacines savybes bei cheminę sudėtį.
2. Paruošti skirtingo poliškumo bruknių lapų ekstraktus iš dezodoruotos ir nedeodoruotos žaliavos ir nustatyti jų išėigas, antioksidacines savybes ir fenolinių junginių sudėtį.
3. Įvertinti skirtingų burokėlių preparatų įtaką Mejero reakcijos produktų susidarymui pieno ir mėsos modelinėse sistemose.

4. Įvertinti skirtingų bruknių lapų ekstraktų įtaką Mejaro reakcijos produktų susidarymui pieno ir mėsos modelinėse sistemose.
5. Įvertinti skirtingų burokėlių preparatų ir bruknių ekstraktų įtaką Mejaro reakcijos intensyvumui fenilalanino modelinėje sistemoje.

Mokslinio darbo naujumas

1. Pirmą kartą nustatytas betalainų, gautų iš burokėlių, poveikis toksinių Mejaro reakcijos produktų susidarymui pieno ir mėsos modelinėse sistemose.
2. Pirmą kartą nustatytas bruknių lapų ekstraktų poveikis toksinių Mejaro reakcijos produktų susidarymui maisto modelinėse sistemose.
3. Nustatyta, jog skirtingo poliškumo bruknių lapų ekstraktai skirtingai veikia Mejaro reakcijos produktų susidarymą.
4. Pirmą kartą atliktas sistemingas skirtingo poliškumo bruknių lapų ekstraktų antioksidacinių savybių ir fenolinių junginių sudėties tyrimas.

Praktinė darbo vertė

Nustatyta, jog betanino antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo jo grynumo ir yra didesnis už burokėlių sulčių ir vulgaksantiną I, atitinkamai apie 21 ir 300 karto. Nustatyta, jog burokėlių ir bruknių priedai slopina Mejaro reakcijos produktų susidarymą pieno modelinėje sistemoje. Chino rūgštis ir katechinas gali būti vieni iš junginių, susiję su slopinamuoju poveikiu Mejaro reakcijos produktų susidarymui bruknių lapų ekstraktuose. Nustatyta, jog burokėlių ir bruknių priedai gali slopinti ir intensyvinti heterociklinių aminų susidarymą mėsos modelinėse sistemose, priklausomai nuo jų koncentracijos. Įvairių burokėlių preparatų slopinamasis poveikis heterociklinių aminų susidarymui buvo didesnis taikant mažesnes jų koncentracijas, o didesnės koncentracijos intensyvino jų susidarymą ir Mejaro reakcijos intensyvumą. Bruknių lapų ekstraktų slopinamasis poveikis heterociklinių aminų susidarymui ir bendram Mejaro reakcijos intensyvumui buvo žymesnis taikant didesnes jų koncentracijas (10 mg/ml). Mažesnės vandens ekstrakto koncentracijos intensyvino heterociklinių aminų susidarymą, o acetono ekstraktas – neturėjo įtakos. Bruknių lapų ekstraktų, išgautų skirtingais poliškumo tirpikliais, įtaka heterociklinių aminų susidarymui buvo skirtinga dėl fenolinių junginių sudėties. Rezultatai rodo, jog hidroksicinamono rūgštys gali skatinti tam tikrų heterociklinių aminų susidarymą, o katechinas ir arbutino dariniai veikti slopinamai. Šio darbo rezultatai gali būti panaudoti kuriant funkcinius ingredientus, skirtus perdirbtiems maisto produktams, siekiant kontroliuoti Mejaro reakciją, ypač dėl toksinių Mejaro reakcijos produktų susidarymo, ir taip gaminti geresnės kokybės maistą.

Taip pat sistemingų bruknių lapų antioksidantų savybių ir fenolinių junginių sudėties tyrimų rezultatai gali būti panaudoti ruošiant veiksmingus natūralius funkcinius komponentus maisto, farmacijos, mitybos ir kosmetikos pramonėms.

Disertacijos struktūra

Disertacija yra parašyta anglų kalba. Ją sudaro santrumpų sąrašas, įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų objektai ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados,

naudotos literatūros sąrašas (263), disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas. Pagrindinė disertacijos medžiaga išdėstyta 114 puslapiuose, pateikta 15 lentelių ir 51 paveikslų. Disertacijos santrauka pateikta lietuvių kalba.

Darbo rezultatų publikavimas

Disertacijos tema paskelbti 2 straipsniai Mokslinės informacijos instituto (ISI) pagrindinio sąrašo leidiniuose. Pagrindiniai disertacijos rezultatai pristatyti 5 tarptautinėse konferencijose.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Betaninai gali slopinti ir skatinti toksinių Mejaro reakcijos produktų susidarymą, priklausomai nuo jų koncentracijos.
2. Bruknių lapų ekstraktai slopina Mejaro reakciją ir taip slopina furozino, CML ir heterociklinių aminų susidarymą. Ekstraktų įtaka priklauso nuo jų koncentracijos ir fenolinių junginių sudėties.

2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

2.1. Tyrimų objektai

Tyrimams naudoti bruknių lapai (*Vaccinium vitis-idaea* L.), surinkti Telšių apskrities miškuose, nuo birželio iki rugsėjo vidurio, 2010 metais. Burokėliai (*Beta Vulgaris*) užauginti Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Sodininkystės ir daržininkystės institute.

2.2. Tyrimų metodai

Tyrimams naudoti įvairūs burokėlių preparatai: burokėlių sulčių milteliai (BSM), gauti liofilizavus šviežias burokėlių sultis po baltyminių ir pektininių medžiagų nusodinimo šaltame acetone; burokėlių milteliai (BM), gauti liofilizavus šviežius burokėlius; liofilizuotų burokėlių betalainų frakcijų (BtF) milteliai, gauti išskirsčius pagal spalvas (rožinė (BtFI), raudona (BtFII), šviesiai ruda (BtFIII)), gelfiltravimo metodu (su sefadeksu); betanino frakcija (BnF) ir vulgaksantino I frakcija (VxF), gautos išskirsčius BSM, taikant preparatinį efektyviosios skysčių chromatografijos metodą (ESCh). Dezodoruoti bruknių lapai, gauti po džiovintų bruknių lapų hidrodistiliacijos, kietą fazę išdžiovinus 40 °C temperatūroje. Dezodoruoti ir nedezodoruoti bruknių lapai ekstrahuoti pagreitintos ekstrakcijos metodu, naudojant skirtingo poliškumo tirpiklius: metanolį ir acetoną. Taip gauti keturi ekstraktai: dezodoruotų bruknių lapų metanolio ekstraktas (DBLME), dezodoruotų bruknių lapų acetono ekstraktas (DBLAE), nedezodoruotų bruknių lapų metanolio ekstraktas (BLME) ir nedezodoruotų bruknių lapų acetono ekstraktas (BLAE). Liofilizuota skysta fazė po hidrodistiliacijos laikoma bruknių lapų vandens ekstraktu (BLVE). Betalainų skirstymas pagal spalvas iš BM buvo atliktas gelio chromatografijos metodu, naudojant Sephadex-LH20 užpildą (stiklinė kolonėlė, 40 × 3,0 cm) ir dejonizuotą vandenį kaip eliuentą. Preparatinė Shimadzu efektyvioji skysčių chromatografija

(ESCh) sistema su SPD-20AV detektoriumi ir FRC-10A frakcijų kolektoriumi buvo naudota BnF ir VxF gryninti iš BSM. Betalainai ir fenoliniai junginiai buvo identifikuoti naudojant Waters Acquity ultra efektyviosios skysčių chromatografijos (UESCh) sistemą su Acquity BEH C18 ($50 \times 2,1$ mM i.d., $1,7 \mu\text{m}$) kolonėle ir Brüker maXis kvadrupoliniu – skriejimo laiko analizatoriumi (Q-TOF).

Burokėlių preparatų ir bruknių lapų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas įvertintas pagal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalo (DPPH[•]), 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties katijono laisvojo radikalo (ABTS^{•+}) ir deguonies radikalo (ORAC) sujungimo gebą. Gauti rezultatai išreikšti μmol Trolokso ekvivalentų (TE) ar mmol TE / g SM (sausos medžiagos) ar g SE (sausos ekstrakto), ar SP (sausos preparato). Taip pat, DPPH[•] ir ABTS^{•+} sujungimo gebos išreikštos efektyviaja koncentracija (EK₅₀), kuri sujungia 50 % radikalo. Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) nustatytas Folin-Ciocalteu metodu ir išreikštas mg galo rūgšties ekvivalentais (GRE)/g SM ar SE, ar SP. Bruknių lapų ekstraktų antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys junginiai nustatyti taikant kombinuotą ESCh-DPPH[•] metodą. Burokėlių preparatų betalainų sudėtis ir bruknių lapų ekstraktų fenolinių junginių sudėtis nustatytos taikant UESCh tandeminės masių spektrometrijos (MS/MS) metodą.

Pieno modelinė sistema buvo sudaryta iš 1,2 % nugriebtų pieno miltelių, 2,5 % išrūgų baltymų, 5 % laktozės, 3,3 % palmių aliejaus, 0,1 % sojų lecitino ir 87,9 % vandens, ji buvo kaitinta 140°C temperatūroje 0, 30 ir 45 sekundes. Pieno modelinėje sistemoje BM įtaka furozino (N^ε-2-furoilmetil-l-lizinas) ir CML (N^ε-karboksimetil-l-lizinas) susidarymui tirta pridėjus 0,1 ir 0,3 mg/ml koncentracijas, o BLVE, chino rūgšties ir katechino įtaka tirta pridėjus 0,05, 0,1 ir 0,3 mg/mL šių medžiagų koncentracijas. Kiekybinė furozino ir CML analizė atlikta naudojant Applied Biosystems, API 2000 ESCh su Mediterranea Sea18 C18 kolonėle ($2,1 \times 150$ mM, $5 \mu\text{m}$) ir trigubo kvadrupolio masių spektrometru (ESCh/MS/MS). Minimali aptikimo riba (LOD) ir minimali kiekybinio nustatymo riba (LOQ) atitinkamai buvo furozino 1 ir 5 ng/ml, o CML – 5 ng/ml. Ekstrakcijos išgava buvo 89–110 %.

Fenilalanino modelinė sistema susidėjo iš 0,4 mM fenilalanino, 0,4 mM kreatinino, 0,2 mM gliukozės ir 3 ml dietileno glikolio (14 % vandens). Kaitinta 128°C temperatūroje 120 min. Burokėlių preparatų ir bruknių lapų ekstraktų įtaka 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridino (PhIP) susidarymui tirta pridėjus į fenilalanino modelinę sistemą tokias jų koncentracijas: BSM – 5, 15 ir 35 mg/ml (burokėlių priedas E162 – 15 mg/ml); betalainų frakcijos (BtFI, BtFII ir BtFIII) – 30 mg/ml; BnF – 0,55, 2,5 ir 5,5 mg/ml; VxF – 5, 15 ir 50 mg/ml; BLVE ir BLAE – 0,1, 1, 5 ir 10 mg/ml. PhIP kiekis nustatytas Waters Acquity UESCh su Waters BEH C18 kolonėle ($2,1 \times 50$ mM, $1,7 \mu\text{m}$). LOD ir LOQ reikšmės atitinkamai buvo 1 ir 3 ng/ml. PhIP ekstrakcijos išgava buvo apie 61 %.

Mėsos modelinė sistema buvo paruošta kaitinant 0,1 g liofilizuotos jautienos

miltelius, suspendavus 1 ml dietileno glikolio (14 % vandens) tirpale 180 °C temperatūroje, 30 min. Į sistemą BnF buvo įdėta 0,5, 2,5, 5 mg/ml, o VxF – 5, 15, 50 mg/ml. O BLVE ir BLAE tirta esant 0,1, 1 ir 10 mg/ml koncentracijoms. HA kiekis nustatytas Waters UESCh su BEH C18 kolonėle (2,1 × 50 mM, 1,7μm) ir Waters Xevo TQ–S trigubo kvadrupolio masių spektrometru (UESCh/MS/MS). LOD ir LOQ reikšmės atitinkamai buvo 1 ir 2 ng/ml PhIP, 2 ir 5 ng/ml 2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]chinolonui (MeIQ), 2 ir 5 ng/ml 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]chinoksalinui (MeIQx) ir 2 ir 6 ng/ml 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indolui (Trp-P-1). HA ekstrakcijos išgava buvo 67–86 %.

PhIP modelinės sistemos su burokėlių preparatais (BnF ir VxF) ir bruknių lapų ekstraktais (BLVE ir BLAE) tam tikri rodikliai vertinti atskirai: antioksidacinis aktyvumas – DPPH' sujungimo geba (%); rudos spalvos intensyvumas – ultravioletinės – matomos šviesos spektrofotometrijos analize esant 420 nm bangos ilgiui; fenilalanino ir 2-feniletilnamino likutinis kiekis (%) – UESCh/MS/MS metodu.

Dauguma eksperimentų buvo kartoti po 3 kartus, vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai apskaičiuoti Microsoft Office Excel 2010 programa, statistinis rezultatų apdorojimas atliktas naudojant Statgraphics centurion 18 programą.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Burokėlių preparatų išeigos, bendras fenolinių junginių kiekis, antioksidacinis aktyvumas ir cheminė sudėtis

Iš 100 g šviežių burokėlių buvo gauta 50 g burokėlių sulčių, o BSM gauta 6,43 g. Burokėlių preparatų išeigos ir sacharidų kiekiai pateikti 1 lent.

1 lentelė. Burokėlių preparatų išeiga ir identifikuotų sacharidų kiekis

Burokėlių preparatas	Išeiga, %	Sacharidų kiekis, mg/g SM			
		Fruktozė	Gliukozė	Sacharozė	Bendras
BSM	6,43±0,40	83,83±0,33 ^b	35,01±1,55 ^b	34,96±0,90 ^c	153,80±2,12 ^f
BnF	0,08±0,01	– ^{n.p}	– ^{n.p}	0,74±0,20 ^a	0,74±0,20 ^a
VxF	5,63±0,42	13,14±0,62 ^a	11,50±2,82 ^a	21,57±0,47 ^b	45,65±4,41 ^e
BtFI	0,02±0,01	– ^p	– ^p	1,41±0,06 ^b	1,41±0,06 ^b
BtFII	0,44±0,02	– ^{n.p}	– ^{n.p}	22,74±0,07 ^b	22,74±0,07 ^d
BtFIII	0,15±0,01	– ^{n.p}	– ^{n.p}	12,31±0,16 ^c	12,31±0,16 ^c

–^{n.p}: neaptikta; –^p: pėdsakai; ^{a–f} raidės prie skaičių toje pačioje eilutėje nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių (p<0,05).

Vertinant sacharidų kiekį burokėlių preparatuose, didžiausias kiekis buvo nustatytas BSM, o mažiausias BnF. Burokėlių preparatų *BFJK* ir radikalų sujungimo geba, kuri vertinta ABTS ir ORAC metodais, pateikta 2 lent. Didžiausia *BFJK* vertė buvo nustatyta BtFI, mažiausia BnF, o visuose kituose preparatuose

buvo apylygiai. Vertinant radikalų sujungimo gebą, stipriausiu aktyvumu pasižymėjo gryninta BnF, mažiausiu VxF. Išgryninta BnF pasižymėjo 21 kartą didesne radikalų sujungimo geba, o VxF radikalų sujungimo geba buvo 13 kartų mažesnė nei jos pradinė medžiaga BSM.

2 lentelė. Burokėlių preparatų *BFJK* ir antioksidacinis aktyvumas

Burokėlių preparatas	<i>BFJK</i> , mg GRE/g SP	<i>ABTS</i> <i>EK</i> ₅₀ , mg/ml	<i>ABTS</i> , μM TE/g SP	<i>ORAC</i> , μM TE/g SP
BSM	12,46±0,17 ^c	11,56±1,06 ^c	67,44±5,99 ^d	132,74±23,33 ^b
BnF	4,01±0,43 ^a	0,55±0,01 ^a	1408,30±27,07 ^f	– ^{n.t}
VxF	7,12±0,66 ^b	151,45±7,09 ^f	5,13±0,25 ^a	– ^{n.t}
BM	11,49±0,55 ^d	18,35±0,51 ^e	42,29±1,15 ^b	70,31±16,95 ^a
BtFI	20,26±0,16 ^f	5,03±0,16 ^b	154,19±4,92 ^e	177,05±18,43 ^c
BtFII	10,17±0,05 ^c	15,34±0,70 ^d	50,63±2,37 ^c	87,50±12,96 ^a
BtFIII	10,21±0,03 ^c	19,52±1,05 ^e	39,81±2,12 ^b	97,49±9,74 ^a

BKJK išreikštas mg GRE/g SP. *EK*₅₀ – išreikšta mg/ml ekstrakto koncentracija, kuri sujungia 50 % *ABTS*⁺. –^{n.t}: netirta; ^{a–f} raidės prie skaičių toje pačioje eilutėje nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių ($p < 0,05$).

Gelio chromatografijos metodu išgryninta BtFI frakcija turėjo 1,7 karto didesnę *BFJK* vertę ir 3,6 karto radikalų sujungimo gebą nei jos pradinė medžiaga BM. Betalainai burokėlių preparatuose identifikuoti lyginant bandinių sulaukymo trukmę (*ST*), masių spektrų duomenis su literatūroje esančiais duomenimis ir METLIN bei PHYTOHUB duomenų bazėmis. Identifikuoti betalainai ir jų pasiskirstymas burokėlių preparatuose pateikti atitinkamai 3 lent. ir 4 lent.

3 lentelė. Burokėlių preparatuose identifikuoti betalainai UESCh/MS/MS metodu

Nr.	Junginys	<i>ST</i> (min)	[M+H] ⁺ <i>m/z</i>	Molekulinio jono formulė	MS/MS fragmentai
1.	Vulgaksantinas I	1,56	340,1140	C ₁₄ H ₁₆ N ₃ O ₇	323, 277, 249, 231, 130
2.	Nežinomas jun.	1,76	307,0869	C ₂₁ H ₁₁ N ₂ O	291, 257, 231, 177, 130
3.	Vulgaksantinas II	2,41	341,0980	C ₁₄ H ₁₅ N ₂ O ₈	295, 249, 231, 148, 132
4.	Nežinomas jun.	2,84	345,1100	C ₁₈ H ₁₃ N ₆ O ₂	164, 102
5.	Prolino-izobetaksantinas	3,32	309,1008	C ₁₄ H ₁₅ N ₂ O ₆	291, 263, 217, 177, 150
6.	Betaninas	3,40	551,1508	C ₂₄ H ₂₅ N ₂ O ₁₃	389
7.	Izobetaninas	3,80	551,1508	C ₂₄ H ₂₅ N ₂ O ₁₃	389
8.	Prolino-betaksantinas	4,01	309,1010	C ₁₄ H ₁₅ N ₂ O ₆	291, 263, 217, 177, 150
9.	Betanidinas	4,33	389,0986	C ₁₈ H ₁₅ N ₂ O ₈	343, 297, 246, 194, 150
10.	Neobetaninas	4,65	549, 1356	C ₂₄ H ₂₃ N ₂ O ₁₃	387, 341
11.	Dekarboksi-neobetaninas	4,71	505,1456	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₁₁	343, 297, 255
12.	Valino-betaksantinas	4,9	311,1260	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₆	265, 219, 193, 175, 150
13.	Dekarboksi-didehidro- neobetaninas	6,5	503,1302	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₁₁	341, 295, 277, 251

4 lentelė. Betalainų pasiskirstymas burokėlių preparatuose

Nr.	Junginys	Betalainų kiekis, AU × 10 ⁻⁵ /mg SP						
		BSM	BM	BtFI	BtFII	BtFIII	BnF	VxF
1.	Vulgaksantinas I	659,81±23,19 ^a	631,66±28,28 ^a	1535±84,85 ^c	1040±56,57 ^b	— ^{n,p}	— ^{n,p}	1419±13,58 ^c
2.	Nežinomas jun. (C ₂₁ H ₁₁ N ₂ O)	84,00±2,83 ^b	69,60±5,66 ^a	84,24±8,49 ^b	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}
3.	Vulgaksantinas II	31,10±2,95 ^a	36,99±2,83 ^a	430,24±28,28 ^c	49,08±8,49 ^b	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}
4.	Nežinomas jun. (C ₁₈ H ₁₃ N ₆ O ₂)	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}	246,10±9,25	— ^{n,p}	— ^{n,p}
5.	Prolino-izobetaksantinas	— ^{n,p}	— ^{n,p}	89,89±5,16 ^b	75,34±3,23 ^a	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}
6.	Betaninas	1239±33,55 ^b	1530,94±6,67 ^c	1782±14,14 ^d	1984±141,42 ^e	31,47±1,41 ^a	4975±282 ^f	— ^{n,p}
7.	Izobetaninas	193,54±5,66 ^b	158,37±5,66 ^a	649,37±67,88 ^d	247,08±42,43 ^c	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}
8.	Prolino-betaksantinas	— ^{n,p}	— ^{n,p}	71,63±8,49	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}
9.	Betanidinas	— ^{n,p}	— ^p	187,81±11,31	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}
10.	Neobetaninas	— ^{n,p}	161,74±2,83 ^c	55,70±7,98 ^a	59,56±2,12 ^a	96,10±4,24 ^b	— ^{n,p}	— ^{n,p}
11.	2-dekarboksineobetaninas	— ^{n,p}	— ^p	106,45±4,24	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}
12.	Valino-betaksantinas	168,49±11,31 ^c	93,54±7,07 ^a	112,02±11,31 ^b	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}
13.	2-dekarboksi-2,3-dehidroneobetaninas	— ^{n,p}	— ^{n,p}	— ^{n,p}	147,72±7,07 ^a	221,64±14,14 ^b	— ^{n,p}	— ^{n,p}
Bendras kiekis		2376,55	2683,84	5105,25	3603,94	595,32	4975,04	1419,56

Kiekis išreikštas smailės ploto vienetais mg sauso preparato masės (AU × 10⁻⁵ mg/). —^{n,p}: neaptikta; —^p: pėdsakai. ^{a-f} raidės priė skaičių toje pačioje eilutėje nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių (p<0,05)

Po BM frakcionavimo Sephadex-LH20 kolonėlėje betalainų pasiskirstymas frakcijose buvo skirtingas. Frakcijose BtFI ir BnFII bendras betalainų kiekis padidėjo atitinkamai 2 ir 1,4 karto. BtFI buvo surinkta didesnė gausa betalainų nei BtFII ir BtFIII frakcijose. Didžiausias vulgaksantino I ir II bei izobetanino kiekis buvo surinktas BtFI. Didžiausias betanino kiekis buvo sukoncentruotas BtFII. O BtFIII daugiausia buvo nustatyta betalainų dehidro- ir dekarboksi- skilimo produktų. Nustatyta, kad gelio chromatografijos metodu betacianinai neatsiskiria nuo betaksantinų, tačiau galima jų kiekius perskirstyti ir sukoncentruoti. Taip pat nustatyta, kad betanino skilimo produktai užsilaiko kolonėlėje ilgiau, todėl juos dalinai galima atskirti nuo pagrindinių betalainų.

Apibendrinant gautus rezultatus galima daryti prielaidą, kad betacianinai pasižymi didesne radikalų surišimo geba nei betaksantinai, kadangi BnF pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu, o VxF – labai silpnu. Taip pat gauti rezultatai rodo, kad betanino skilimo produktai pasižymi antioksidaciniu aktyvumu, kadangi BtFIII rodo ne mažesnę nei BM radikalų surišimo gebą. Toliau burokėlių preparatų įtaka Mejaro reakcijos produktų susidarymui buvo tiriama pridėjus jų į modelines sistemas.

3.2. *Vaccinium vitis-idaea* L. ekstrakcija, bendras fenolinių junginių kiekis, antioksidacinis aktyvumas ir cheminės sudėties nustatymas

Skirtingo poliškumo tirpikliai buvo naudojami bruknių lapų ekstrakcijai. Dezodoruoti ir nedezodoruoti bruknių lapai buvo ekstrahuojami metanolio ir acetonu, naudojant pagreintą aukšto slėgio ekstrakcijos aparatūrą. Vandens ekstraktas gautas liofilizavus skystą fazę, po lakiųjų junginių atskyrimo (hidrodistiliacijos) iš džiovintų bruknių lapų Klevendžerio tipo aparate (200 g džiovintų bruknių lapų, 1,5 l vandens, 3 val.). Bruknių lapų ekstraktų išeiga mažėjo taip: BLME > BLVE > BLAE > DBLME > DBLAE (5 lent.). Skirtumas tarp ekstraktų, išgautų iš nedezodoruotos žaliavos metanolio ir vandeniu, buvo labai nedidelis. Abu tirpikliai yra poliniai, todėl matyti, kad bruknių lapų sudėtyje yra daugiau polinių junginių, lengvai išgaunamų tiek su vandeniu, tiek ir su metanolio. Didžiausia išeiga gauta metanolio ekstrakto, o mažiausia – acetono, kai lyginami ekstraktai iš nedezodoruotos žaliavos. Acetonas yra nepolinis tirpiklis, todėl acetoninių ekstraktų išeigos buvo daug mažesnės. O dezodoruotų ekstraktų išeiga buvo dvigubai mažesnė, kadangi dalis polinių junginių buvo ekstrahuoti su vandeniu hidrodistiliacijos metu. Tačiau matyti, kad po ekstrakcijos vandeniu, metanolio ir acetonu dar galima išgauti atitinkamai 14,09 ir 9,57 % ekstrakto.

BFJK ir antioksidacinio aktyvumo rezultatai pateikti 5 lent. Kai *BFJK* išreikštas mg GRE 1 g SM, vertė mažėjo tokia pačia seka, kaip ir išeiga. Dvigubai mažesnės *BFJK* vertės buvo ekstraktų iš dezodoruotos žaliavos.

Bruknių lapų ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui įvertinti taikyti skirtingi antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodai. DPPH radikalo sujungimo geba

didžiausia buvo BLME, toliau mažėjimo seka buvo tokia: BLVE > BLAE > DBLME > DBLAE. Ndezodoruotų ekstraktų EK₅₀, kuri sujungė 50 % DPPH radikalo (60 μmol), buvo ~2,4 mg/ml. Antioksidacinis aktyvumas, nustatytas ABTS^{•+} ir ORAC metodais, tarp skirtingų ekstraktų išsidėstė tokia mažėjimo seka: BLVE > BLME > BLAE > DBLME > DBLAE. Nustatytas stiprus koreliacinis ryšys tarp *BFJK* (mg GRE/g SM) ir ekstraktų antioksidacinio aktyvumo verčių (μmol TE/g SM): *BFJK* ir DPPH[•], $R^2 = 0,70$, *BFJK* ir ABTS^{•+}, $R^2 = 0,87$ bei *BFJK* ir ORAC, $R^2 = 0,95$.

Atskirų junginių skirtinguose ekstraktuose antioksidaciniam aktyvumui nustatyti buvo panaudotas DPPH-ESCh metodas. Nustatyta, kad bruknių lapuose buvo 8 aktyvieji junginiai, kurie pasižymėjo itin stipriu DPPH radikalo surišimo aktyvumu. Šie junginiai yra katechinas, epikatechinas, kafeoilacetilarbutinas, kvercetino pentozidas 1, kvercetino pentozidas 2, kvercetino-deoksiheksozidas, kvercetin-3-*O*-(3-hidroksi-3-metilglutaroil)ramnozidas ir kampferol-3-*O*-(3-hidroksi-3-metilglutaroil)ramnozidas. Stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu pagal neigiamą smailės plotą BLVE pasižymėjo katechinas ir epikatechinas, o BLME ir BLAE – katechinas ir kafeoilacetilarbutinas.

Iš viso bruknių lapuose buvo identifikuota 20 junginių (6 lent.), taikant UESCh-MS/MS. Pagrindinės fenolinių junginių klasės BLVE buvo hidroksicinamono rūgštys ir flavonoliai, o BLME ir BLAE – arbutino dariniai ir flavan-3-oliai. Dominuojantys flavonoliai visuose bruknių ekstraktuose buvo kvercetino pentozidai ir heksozidai. Kavos rūgštis, *p*-kumarino rūgštis ir kvercetino pentozidas 1 buvo aptikti tik BLVE, DBLME ir DBLAE, kas leidžia manyti, kad šie junginiai susidarė hidrodistiliacijos metu. Citrinos rūgštis, chlorogeno rūgštis, B-tipo proantocianidinas ir rutinas buvo nustatyti tik BLVE, kas rodo šių junginių didesnę poliškumą. Bendras identifikuotų junginių kiekis buvo nuo 58,24 iki 304,58 AU × 10⁻⁷/mg SE ir mažėjo tokia tvarka: BLVE > BLME > BLAE > DBLME > DBLAE. Bendras identifikuotų fenolinių junginių kiekis BLME ir BLAE buvo mažesnis už BLVE atitinkamai 37 ir 51 %. Dezodoruotuose ekstraktuose bendras identifikuotų fenolinių junginių kiekis buvo daug mažesnis, tai vėlgi rodo, kad didelė dalis polinių junginių perėjo į vandens fazę. Šios vertės buvo mažesnės atitinkamai DBLME ir DBLAE 53 ir 81 %. Bendras identifikuotų junginių kiekis gerai koreliuoja su šių ekstraktų *BFJK* ir antioksidacinės gebos rezultatais.

Apibendrinant rezultatus matyti, kad bruknių lapuose yra antioksidantų, kurie gali sujungti laisvuosius radikalus, o jų antioksidacinis aktyvumas priklauso nuo juose esančių aktyvių junginių kiekio. Poliškesniais tirpikliais išgautų ekstraktų išiegos buvo didesnės, taip pat ir antioksidacinis aktyvumas bei *BFJK* vertės.

5 lentelė. Bruknių lapų ekstraktų išeiga, *BFJK* ir antioksidacinės savybės

Ekstraktas	Išeiga, %	<i>BFJK</i> ,	<i>BFJK</i> ,	<i>DPPH</i>	<i>DPPH</i> ,	<i>ABTS</i>	<i>ABTS</i> ,	<i>ORAC</i> ,	<i>ORAC</i> ,
		mg GRE/g SE	mg GRE/g SM	<i>EC</i> ₅₀ ,	μmol TE/g SM	<i>EC</i> ₅₀ ,	mmol TE/g SM	mmol TE/g SE	mmol TE/g SM
BLVE	32,96±1,90 ^d	252,22±4,40 ^c	83,12±1,45 ^d	2,40±0,01 ^a	61,81±0,30 ^d	0,23±0,01 ^a	2,02±0,11 ^c	10,63±0,88 ^c	3,50±0,29 ^c
BLME	36,38±2,51 ^e	250,56±3,62 ^c	91,15±1,31 ^c	2,36±0,00 ^a	69,20±0,07 ^c	0,32±0,01 ^b	1,63±0,05 ^d	7,44±1,05 ^d	2,71±0,38 ^d
BLAE	23,69±2,60 ^c	242,42±5,05 ^c	57,42±1,19 ^c	2,54±0,00 ^a	42,29±0,08 ^c	0,47±0,01 ^c	0,72±0,02 ^c	4,43±0,23 ^b	1,44±0,10 ^c
DBLME	14,09±0,60 ^b	141,80±3,91 ^b	19,98±0,55 ^b	2,52±0,01 ^a	24,93±0,05 ^b	0,62±0,01 ^d	0,32±0,00 ^b	6,08±0,42 ^c	0,62±0,03 ^b
DBLAE	9,57±0,50 ^a	96,52±8,53 ^a	9,24±0,82 ^a	5,11±0,58 ^b	8,47±0,96 ^a	1,74±0,02 ^c	0,08±0,00 ^a	1,62±0,09 ^a	0,16±0,00 ^a

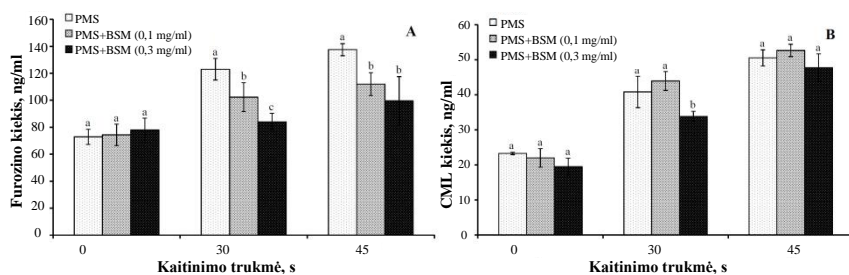
^{a-e} raidės prie skaičių toje pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų ekstraktų ($p < 0,05$). SE: sauso ekstrakto. SM: sausos medžiagos.

Palyginus vandeninį ir metanolinį ekstraktus, skirtumai tarp išėigų, antioksidacinio aktyvumo ir fenolinių junginių kiekio buvo labai nedideli. Todėl galima manyti, kad ekologiškas ir pigus tirpiklis vanduo gali būti naudojamas pramoniniams tikslams, norint išgauti polifenolius iš bruknių lapų. Bruknių lapuose katechinas, epikatechinas ir kafeoilacetylbutinas nustatyti kaip stipriausi antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys junginiai. Šių aktyviųjų junginių didesni kiekiai išgauti iš bruknių lapų tiek poliniais, tiek ir nepoliniu tirpikliu.

Siekiant nustatyti bruknių lapų fenolių įtaką toksinių Mejaro reakcijos produktų susidarymui, tolimesniems eksperimentams buvo pasirinkti BLVE ir BLAE.

3.3. Burokėlių preparatų ir bruknių lapų ekstraktų įtaka Mejaro reakcijos produktams pieno modelinėje sistemoje

Burokėlių preparatų ir bruknių lapų ekstraktų antiglikeminiis aktyvumas buvo vertinamas nustatant furozino ir CML kiekio pokyčius pieno modelinėje sistemoje. Furozinas yra ankstyvosios Mejaro reakcijos produktas, susidarantis po Amadori produkto rūgštinės hidrolizės, kuris rodo pieno produktų terminio proceso intensyvumą ir laikymo sąlygas. CML yra galutinis glikozilavimo produktas, susidarantis paskutiniame Mejaro reakcijos etape, reaktiviems dikarboniliniams junginiams sužadinant glikooksidacijos procesą. Pridėjus BSM į pieno modelinę sistemą, matyti, kad bandiniuose su BSM furozino susidarymas visuose terminio apdoravimo etapuose buvo mažesnis (1 pav.).



1 pav. BSM įtaka furozino (A) ir CML (B) kiekio susidarymui pieno modelinėje sistemoje (PMS). Skirtingos raidės virš stulpelių, esant tai pačiai kaitinimo trukmei, nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių ($p < 0,05$)

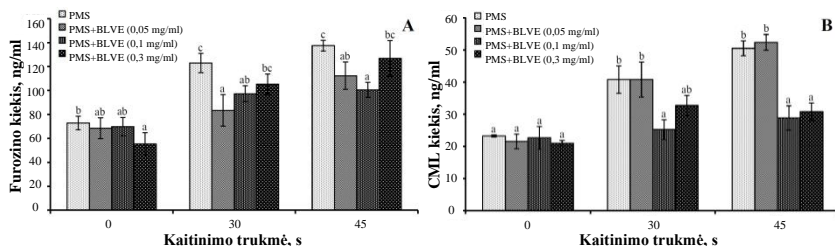
Furozino kiekio sumažėjimas buvo apie 30 % pridėjus 0,3 mg/ml koncentraciją. CML kiekis buvo sumažintas iki 17 %, kaitinimo trukmei esant iki 30 s. Mažesnė BSM koncentracija neparodė reikšmingos įtakos. Taigi, matyti, kad BSM labiau slopino furozino susidarymą (ankstyva Mejaro reakcija) nei CML (galutinė Mejaro reakcija). Burokėlių sulčių aktyviųjų junginių antiglikozilavimo aktyvumas priklausė nuo sistemos kaitinimo laiko ir naudotos jų koncentracijos.

6 lentelė. *Vaccinium vitis-idaea* L. ekstraktuose identifikuoti fenoliniai junginiai ir jų kiekiai (AU × 10⁻⁷/mg SE)

Nr. Junginys	ST (min)	[M-H] ⁺ (m/z)	Molekulinio jono formulė	MS/MS fragmentai	Ekstraktai		
					BLVE	BLME	BLAE
14. Katechinas ¹	1,28	289,0719	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	245,0826(100), 179,0306(25)	31,85±0,23 ^c	32,18±0,56 ^c	36,48±0,31 ^d
15. Epikatechinas ¹	1,55	289,0716	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	245,0825(60), 179,0306(19)	14,62±0,35 ^a	32,18±0,57 ^b	14,33±0,16 ^a
Flavan-3-oliai					46,47	64,36	50,81
16. Chino rūgštis ¹	0,35	191,0564	C ₇ H ₁₁ O ₆	–	42,81±2,52 ^c	25,46±0,56 ^b	2,00±0,02 ^a
17. Citrinos rūgštis ¹	0,43	191,0201	C ₆ H ₇ O ₇	111,0083(20)	46,48±0,32	– ^{n,p}	– ^{n,p}
18. Kafeoilšikiminė rūgštis ²	1,08	335,0775	C ₂₀ H ₁₅ O ₅	179,0340(55), 161,0237(100)	2,85±0,02 ^e	2,22±0,10 ^d	1,96±0,02 ^c
19. Chlorogeno rūgštis ¹	1,33	353,0874	C ₁₆ H ₇ O ₉	–	3,44±0,05 ^a	– ^p	– ^p
20. Kavos rūgštis ¹	1,47	179,0353	C ₉ H ₇ O ₄	–	2,62±0,04 ^b	ND	ND
21. <i>p</i> -kumarino rūgštis ¹	1,87	163,0402	C ₉ H ₇ O ₃	–	1,56±0,16 ^b	ND	ND
Hidroksicinamono rūgštys					99,76	27,68	3,96
22. Arbutinas ²	0,49	271,0824	C ₁₂ H ₁₅ O ₇	108,0218(100), 109,0275(8)	33,18±0,03 ^d	31,78±0,67 ^d	23,00±0,43 ^c
23. 2- <i>O</i> -kafeoilarbutinas ^{2,3}	1,70	433,1147	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	323,0778 (5), 179,0350 (30)	24,11±1,01 ^c	29,85±0,35 ^d	34,34±0,24 ^e
24. Kafeoilacetilarbutinas ³	2,56	475,1242	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₁	179,0347(15), 161,0244(100)	8,51±0,14 ^b	8,82±0,00 ^b	10,97±0,22 ^c
Arbutino dariniai					65,8	70,45	68,31
25. B-tipo proantocianidinas ²	1,34	577,1336	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	407,0757(68), 289,0709(100)	8,35±0,35 ^a	– ^p	– ^p
26. A-tipo proantocianidinas ^{2,3}	1,95	575,1195	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	539,0998(65), 407,0791(48)	3,67±0,03 ^c	0,66±0,03 ^b	0,66±0,19 ^b
Proantocianidinai					12,02	0,66	0,66
27. Rutinas ¹	1,84	609,1459	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	300,0267(100), 301,0332(30)	1,53±0,03 ^a	– ^p	– ^p
28. Kvercetin-3- <i>O</i> -gliukozidas ¹	1,95	463,0881	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	301,0339(66), 300,0272(100)	3,33±0,05 ^b	3,31±0,05 ^b	3,15±0,20 ^b
29. Kvercetino pentozidas ^{1,2,3}	2,10	433,0773	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	301,0337(56), 300,0266(100)	20,43±0,07 ^c	– ^{n,p}	– ^{n,p}
30. Kvercetino pentozidas ^{2,3}	2,25	433,0769	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	301,0345(58), 300,0274(100)	7,71±0,28 ^b	7,44±0,11 ^b	7,68±0,16 ^b
31. Kvercetino-deoksiheksozidas ^{2,3}	2,28	447,0931	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	301,0338(23), 300,0252(100)	15,95±0,08 ^e	15,24±0,18 ^d	12,38±0,14 ^c
32. Kvercetin-3- <i>O</i> -(HMG)ramnozidas ³	2,67	591,1355	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₅	529,1334(27), 489,1028(100)	29,80±0,10 ^d	0,41±0,03 ^b	0,61±0,02 ^c
33. Kampferol-3- <i>O</i> -(HMG)ramnozidas ³	2,95	575,1392	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₄	515,1377(15), 473,1075(40)	1,78±0,02 ^d	1,07±0,02 ^b	1,46±0,08 ^c
Flavonoliai					80,53	27,47	25,28
Bendras kiekis					304,58	190,62	149,02

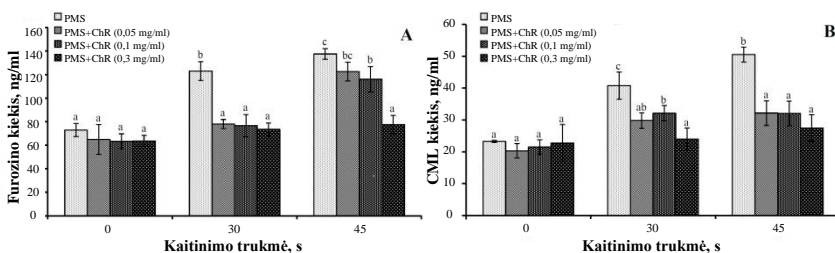
–^{n,p}: neaptikta; –^p: pėdsakai. HMG: 3-hidroksi-3-metilglutarolio. ^{a–e} raidės prie skaičių toje pačioje eilutėje nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų ekstraktų (p<0,05). ¹ junginiai, identifikuoti naudojant standartą. ² junginiai, identifikuoti palyginus molekulinę formulę ir MS/MS fragmentus su junginiais METLIN ir/ar HMDB duomenų bazėse. ³ junginiai, identifikuoti palyginus molekulinę formulę ir MS/MS fragmentus su duomenimis, rastais literatūros šaltiniuose.

Broknių lapų ekstrakto antiglikozilinimo aktyvumas pasirodė didesnis (2 pav.). Furozino kiekis buvo sumažintas 32, 21 ir 17 % po 30 s kaitinimo ir 18, 27, 10 % po 45 s kaitinimo, atitinkamai esant BLVE 0,05, 0,1 ir 0,3 mg/ml koncentracijai. CML kiekis bandiniuose su 0,1 ir 0,3 mg/ml BLVE buvo mažesnis atitinkamai 38 ir 19 % po 30 s kaitinimo bei 42 ir 38 % po 45 s. Rezultatai rodo, kad BLVE labiau slopino CML nei furozino susidarymą. Taip pat pastebėta, kad furozino susidarymą labiau slopino mažesnės BLVE koncentracijos, o CML susidarymą – didesnės BLVE koncentracijos.



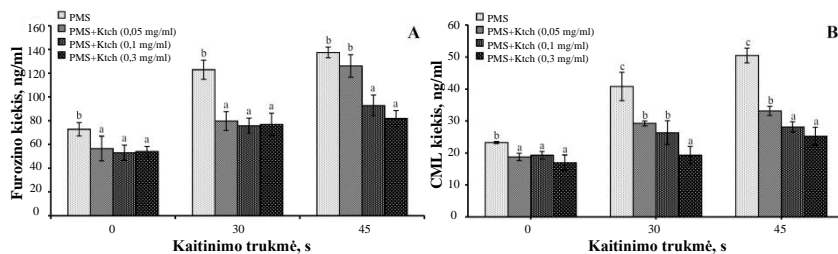
2 pav. BLVE įtaka furozino (A) ir CML (B) kiekio susidarymui pieno modelinėje sistemoje (PMS). Skirtingos raidės virš stulpelių, esant tai pačiai kaitinimo trukmei, nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių ($p < 0,05$)

Vis dėlto efektyviausiai furozino ir CML susidarymą kaitinimo metu slopino chino rūgštis (3 pav.) ir katechinas (4 pav.). Rezultatai rodo, jog bandiniuose su chino rūgštimi furozino kiekis sumažėjo apie 40 % po 30 s kaitinimo. O po 45 s kaitinimo furozino kiekis kito priklausomai nuo pridėtos rūgšties koncentracijos: mažiausia koncentracija (0,05 mg/ml) sumažino apie 10 %, o didžiausia koncentracija (0,3 mg/ml) – apie 46 % furozino kiekio. CML kiekis po 30 s ir 45 s kaitinimo buvo mažesnis atitinkamai apytiksliai apie 31, 29 ir 43 % bandiniuose su 0,05, 0,1 ir 0,3 mg/ml chino rūgštimi. Taigi, CML kiekis buvo efektyviau sumažintas nei furozino.



3 pav. Chino rūgšties (ChR) įtaka furozino (A) ir CML (B) kiekio susidarymui pieno modelinėje sistemoje (PMS). Skirtingos raidės virš stulpelių, esant tai pačiai kaitinimo trukmei, nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių ($p < 0,05$)

Furozino ir CML kitimo tendencija buvo labai panaši ir bandiniuose su katechinu (4 pav.). Furozino sumažėjimas buvo apie 37 % po 30 s kaitinimo visuose bandiniuose su katechino priedu, o po 45 s kaitinimo bandiniuose su 0,05 mg/ml – apie 10 %, o su 0,3 mg/ml koncentracija apie 40 %. CML susidarymas buvo efektyviai sumažintas po abiejų kaitinimo laikų. CML kiekis mažėjo didėjant priedo koncentracijai, ir didžiausios koncentracijos (0,3 mg/ml) poveikis buvo geriausias – sumažėjimas buvo apie 51 %. Bandiniuose su katechinu, kaip ir su chino rūgštimi, CML susidarymas buvo efektyviau slopintas nei furozino. Katechino slopinamasis poveikis gali būti paaiškintas 2 bendrais fenoliniams junginiams būdingais mechanizmais: pirma, B žiedo oksidacija (chinono formos susidarymas) ir aminorūgšties prisijungimas, susidarant benzochinono iminui ar aminochinono produktui, ir, antra, dikarbonilinių junginių prijungimu prie aktyvaus A žiedo po elektrofilinės aromatinės pakaitų reakcijos. Chino rūgšties slopinamasis poveikis tirtų Mejero reakcijos produktų susidarymui buvo nustatytas pirmą kartą. Jo veikimo mechanizmas galėtų būti panašus, kaip katechino: chinono ar kitos aktyvios formos susidarymu ir reakcijos su aminorūgštimi.



4 pav. Katechino (Ktch) įtaka furozino (A) ir CML (B) kiekiui susidarymui pieno modelinėje sistemoje (PMS). Skirtingos raidės virš stulpelių, esant tai pačiai kaitinimo trukmei, nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių ($p < 0,05$)

Apibendrinant rezultatus matyti, kad chino rūgštis ir katechinas efektyviau nei bruknių ekstraktas slopino abiejų Mejero reakcijos produktų susidarymą. Remiantis tuo, kad jų kiekiai BLVE buvo dideli, tikėtina, jog šie junginiai galimai galėjo būti vieni iš BLVE aktyvių junginių, kurie slopino furozino ir CML susidarymą.

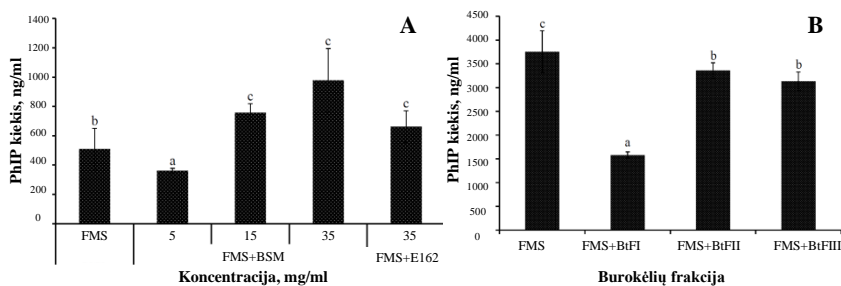
3.4. Burokėlių preparatų ir bruknių lapų ekstraktų įtaka PhIP susidarymui fenilalanino modelinėje sistemoje

Burokėlių preparatų ir bruknių lapų ekstraktų įtaka heterociklinių aminų susidarymui buvo įvertinta dviejose modelinėse sistemose. Pirmoje, fenilalanino modelinėje sistemoje (FMS), mėsos matricos komponentų (lipidų, baltymų, vandens) įtaka buvo eliminuota, naudojant tik medžiagas, reikalingas PhIP

susidarymui. Antroje sistemoje, kuri labiau panaši į realią mėsos matricą, buvo eliminuotas vanduo.

3.4.1. Įvairių burokėlių preparatų įtaka PhIP susidarymui

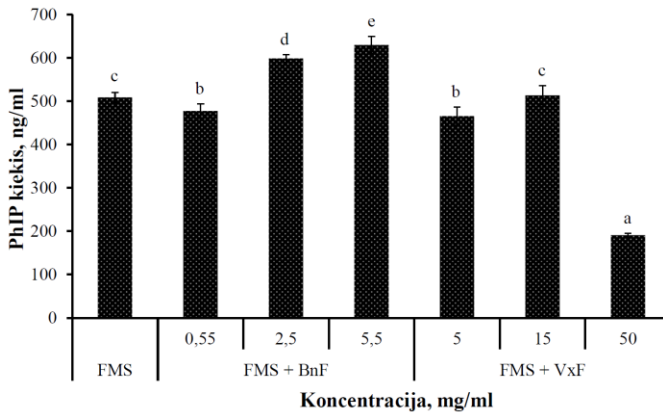
Pirmame šio eksperimento etape buvo nustatoma BSM įtaka PhIP susidarymui. Palyginimo tikslu komercinis burokėlių raudonasis, betaninas (E-162) buvo taip pat testuojamas. Rezultatai rodo, kad PhIP kiekis kito priklausomai nuo BSM koncentracijos (5 pav.). Su mažiausia BSM koncentracija (5 mg/ml) PhIP kiekis sumažėjo apie 30 %, o, didėjant koncentracijai nuo 15 iki 35 %, PhIP kiekis padidėjo atitinkamai nuo 48 iki 91%. Esant tiek BSM, tiek E-162 15 mg/ml koncentracijai, PhIP kiekio padidėjimas buvo apie 45 %.



5 pav. BSM, E-162 (A) ir burokėlių frakcijų (BtFI, BtFII ir BtFIII) (B) įtaka PhIP susidarymui fenilalanino modelinėje sistemoje (FMS). Skirtingos raidės virš stulpelių, esant tai pačiai kaitinimo trukmei, nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių ($p < 0,05$)

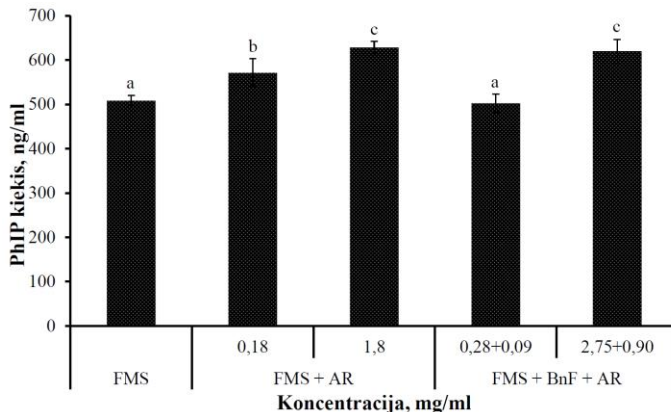
Didesnės BSM koncentracijos (nuo 15–35 mg/ml) labai padidino PhIP susidarymą, o betalainų frakcijos (BtFI–BtFIII), esant panašiai koncentracijai (30 mg/ml), sumažino PhIP kiekį apie 15 %. Yra žinoma, jog heterociklinių aminų susidarymas priklauso nuo cukrų kiekio, didėjant jų koncentracijai iki tam tikro lygio, heterociklinių aminų kiekis didėja. Remiantis 1 lent. duomenimis, galima daryti prielaidą, jog BSM dėl sudėtyje esančių cukrų galėjo padidinti PhIP formavimąsi. BSM bendras cukrų ir redukuojančių monosacharidų kiekis buvo didžiausias, o BtF redukuojančių sacharidų nebuvo aptikta.

Kitame eksperimento etape buvo pasirinktas efektyvesnis junginių gryninimo metodas – preparatinės skysčių chromatografijos sistema, norint gauti kuo grynesnį betaniną ir vulgaksantiną I. Gautos BnF ir VxF frakcijos buvo pridėtos į PhIP modelinę sistemą, atitinkamai nuo 0,55 iki 5,5 ir nuo 5 iki 50 mg/ml koncentracijos. Rezultatai rodo, kad BnF poveikis PhIP susidarymui buvo panašus, kaip ir BSM (6 pav.).



6 pav. BnF ir VxP įtaka PhIP susidarymui fenilalanino modelinėje sistemoje (FMS). Skirtingos raidės virš stulpelių, esant tai pačiai kaitinimo trukmei, nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių ($p < 0,05$)

Reikšmingas PhIP kiekio sumažėjimas buvo nustatytas esant minimaliausiai BnF koncentracijai, kuriai didėjant, PhIP kiekis didėjo: pridėjus 2,5 ir 5,5 mg/ml, PhIP kiekis padidėjo atitinkamai 18 ir 24 %. Bandiniuose su 5 ir 15 mg/ml VxP, PhIP kiekis nepakito, o su 50 mg/ml PhIP kiekis buvo sumažėjęs apie 62 %. Kadangi komercinis betaninas visada turi askobo rūgšties, kuri padidina jo stabilumą, buvo nustatytas ir askorbo rūgšties poveikis PhIP susidarymui (7 pav.).

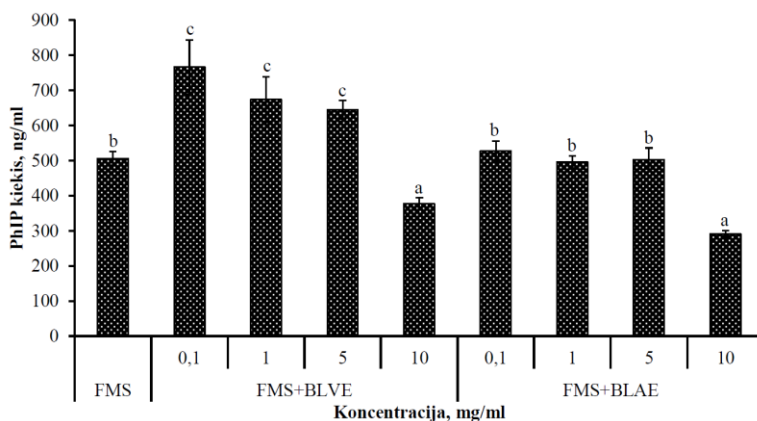


7 pav. BnF ir askorbo rūgšties (AR) įtaka PhIP susidarymui fenilalanino modelinėje sistemoje (FMS). Skirtingos raidės virš stulpelių, esant tai pačiai kaitinimo trukmei, nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių ($p < 0,05$)

Nustatyta, jog askorbo rūgšties priedas reikšmingai padidino PhIP kiekį bandiniuose. Tačiau bandiniuose, kuriuose askorbo rūgštis buvo kompozicijoje kartu su BnF, PhIP kiekio padidėjimas nebuvo didesnis nei bandinių tik su BnF priedu.

3.4.2. Bruknių ekstraktų įtaka PhIP susidarymui

Rezultatai rodo, kad BLVE ir BLAE ekstraktų poveikis buvo skirtingas (8 pav.). PhIP kiekis reikšmingai padidėjo, kai BLVE buvo įdėtas į sistemą nuo 0,5 iki 5 mg/ml koncentracijos. PhIP kiekis sumažėjo 20 % bandiniuose su 10 mg/ml BLVE. O bandiniuose nuo 0,1 iki 5 mg/ml BLAE koncentracijaos PhIP kiekis nekito, esant 10 mg/ml priedui, sumažėjimas – 40 %. Remiantis rezultatais galima daryti prielaidą, jog skirtingas ekstraktų poveikis buvo dėl skirtingos jų fenolinių junginių sudėties. Hidroksicinamono rūgšties, proantocianidinų ir flavonolių BLVE buvo daugiau nei BLAE. BLAE buvo ypač mažas kiekis hidroksicinamono rūgščių, kurių indukuojamasis poveikis heterociklinių aminių susidarymui buvo nustatytas kitų autorių darbuose.

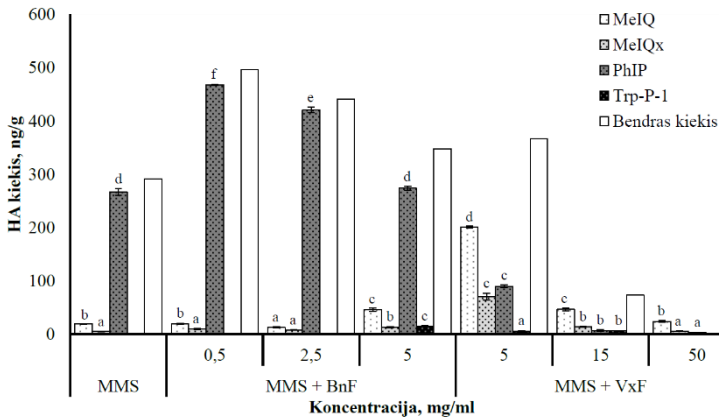


8 pav. BLVE ir BLAE įtaka PhIP susidarymui fenilalanino modelinėje sistemoje (FMS). Skirtingos raidės virš stulpelių, esant tai pačiai kaitinimo trukmei, nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių ($p < 0,05$)

BLAE buvo daugiau nei BLVE katechino ir arbutino darinių. Daugumoje literatūros šaltinių pateikiama, kad žaliosios arbatos katechinai efektyviai slopina heterociklinių aminių susidarymą.

3.5. Burokėlių preparatų ir bruknių lapų ekstraktų įtaka heterociklinių aminių susidarymui mėsos modelinėje sistemoje

Toliau tyrimai buvo tęsiami mėsos modelinėje sistemoje, kuri labiau panaši į realią mėsos matricą. Buvo nustatyti keturi heterocikliniai aminai: PhIP, MeIQ, MeIQx ir Trp-P-1. Rezultatai rodo, jog PhIP kiekis padidėjo bandiniuose su BnF (0,5–5 mg/ml), o bandiniuose su VxF (5–50 mg/ml) PhIP kiekis buvo daug mažesnis (9 pav.). Bandiniuose su mažiausia BnF koncentracija (0,5 mg/ml) PhIP kiekis buvo didžiausias (75 %). Taip pat matyti, jog, didėjant BnF koncentracijai, didėja kitų heterociklinių aminių susidarymas. Didėjant VxF koncentracijai, PhIP kiekio sumažėjimas buvo iki 99 % (50 mg/ml). Tačiau, esant 5 mg/ml VxF priedui, PhIP kiekis sumažėjo 66 %, o MeIQ ir MeIQx kiekių padidėjimas buvo pats didžiausias. Vertinant bendrą heterociklinių aminių kiekį, bandiniuose su 5 mg/ml VxF padidėjimas buvo 20 %, o bandiniuose su 15 ir 50 mg/ml VxF sumažėjimas buvo atitinkamai 75 ir 89 %.

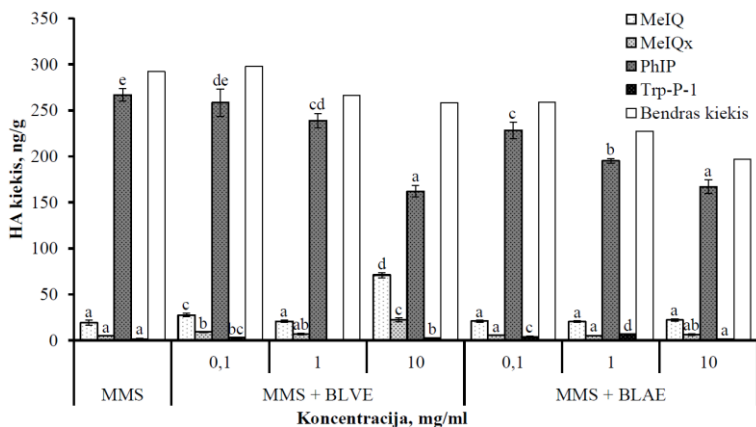


9 pav. BLVE ir BLAE įtaka heterociklinių aminių (HA) susidarymui mėsos modelinėje sistemoje (MMS). Skirtingos raidės virš stulpelių, esant tai pačiai kaitinimo trukmei, nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių ($p < 0,05$)

Bandiniuose su bruknių lapų ekstraktais PhIP kiekis mažėjo didėjant ekstraktų koncentracijai (10 pav.). Bandiniuose su 10 mg/ml BLVE ir BLAE PhIP kiekis buvo atitinkamai 39 ir 37 % mažesnis. Matyti, kad ekstraktai padidino MeIQ, MeIQx ir Trp-P-1 susidarymą, o bandiniuose su BLVE šių heterociklinių aminių padidėjimas buvo didesnis. Tai greičiausiai lėmė skirtingas šių heterociklinių aminių susidarymo mechanizmas: pvz., MeIQ priklauso imidazochinolino, o MeIQx imidazochinoksalinio klasei. Piridino ir pirazino laisvieji radikalai yra atitinkamai MeIQ ir MeIQx prekursoriai. Buvo nustatyta, kad tam tikri fenoliniai junginiai (pvz., katechinai), esant skirtingoms jų koncentracijoms, gali slopinti ar

indukuoti šiuos radikalus. Todėl daroma prielaida, kad ekstraktai padidino piridino ir pirazino laisvųjų radikalų atsiradimą. PhIP yra imidazopiridinas, ir jo susidarymo mechanizmas yra skirtingas – susidaro kondensuojantis fenilacetaldehidui ir kreatininui, o PhIP kiekio sumažėjimas galimas dėl fenolinių junginių reakcijos su fenilacetaldehido karbonilo grupe.

Matyti, jog BLVE ir VxF priedas, esant didesnei jų koncentracijai, labiau slopino PhIP susidarymą, tačiau smarkiai padidino MeIQ ir MeIQx. BLAE tokio poveikio neturėjo. Todėl galima paryti prielaidą, kad galimai tai galėtų būti susiję su juose esančių cukrų kiekiu. VxF turėjo didelį cukrų kiekį, o BLVE nebuvo nustatyta, tačiau yra tikėtina – dėl poliškumo.



10 pav. BLVE ir BLAE įaka heterociklinių aminų (HA) susidarymui aminorūgšties modelinėje sistemoje (ARMS). Skirtingos raidės virš stulpelių, esant tai pačiai kaitinimo trukmei, nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingų bandinių ($p < 0,05$)

Apibendrinant rezultatus matyti, kad ekstraktų antioksidacinės savybės ir bendras fenolinių junginių kiekis nėra rodikliai, kurie būtų tiesiogiai susiję su PhIP slopinančiu poveikiu, kadangi BLVE turėjo didesnę nei BLAE ir *BFJK* antioksidacinę aktyvumą, o slopino mažiau ir netgi padidino labiau nei BLAE PhIP susidarymą. Todėl matyti, jog PhIP kiekio sumažėjimas yra labiau susijęs su fenolinių junginių sudėtimi, kuri gali būti keičiama naudojant skirtingo poliškumo tirpiklius ir ekstrakcijos metodus. Daroma prielaida, kad hidroksicinamono rūgštys gali padidinti PhIP susidarymą, o katechninas ir arbutino dariniai – slopinti. Taip pat nustatyta, jog tiek bruknių ekstraktai, tiek ir burokėlių preparatai gali slopinti vieną ir didinti kitų heterociklinių aminų susidarymą. Tai gali nulemti juose esantys cukrūs ir būti susiję su skirtingu heterociklinių aminų formavimosi mechanizmu.

3.6. Burokėlių preparatų ir bruknių lapų ekstraktų įtaka bendram Mejaro reakcijos intensyvumui PhIP modelinėje sistemoje

Bendras Mejaro reakcijos intensyvumas vertintas matuojant PhIP modelinės sistemos DPPH' sujungimo gebą (%), rudos spalvos intensyvumą $A_{420\text{nm}}$, likutinių fenilalanino ir 2-feniletilenamino kieki (%). Nustatyta, kad įvairūs burokėlių preparatai padidino Mejaro reakcijos intensyvumą, kuris matuotas visais 5 parametrais. Daroma prielaida, kad tai gali būti dėl juose esančių cukrų ar aminorūgščių. Tuo tarpu bruknių lapų ekstraktų poveikis buvo skirtingas. Mejaro reakcijos intensyvumas koreliavo su PhIP kiekiu. BLVE iki 5 mg/ml padidino MR intensyvumą, kai, esant 10 mg/ml priedui, buvo sumažintas. MR intensyvumas sumažėjo visuose bandiniuose su BLAE. Daroma prielaida, jog PhIP kiekio sumažėjimas bandiniuose su bruknių lapų ekstraktais buvo dėl pačios Mejaro reakcijos slopinimo. Skirtingas burokėlių preparatų ir bruknių lapų ekstraktų poveikis Mejaro reakcijos intensyvumui rodo skirtingą jų veikimą mechanizmą. Burokėlių preparatai slopino PhIP susidarymą, tačiau intensyvino Mejaro reakciją, todėl PhIP kiekio slopinimas galėjo būti dėl karbonilinių junginių padidėjimo. Bruknių lapų ekstraktai mažino PhIP formavimąsi ir Mejaro reakcijos intensyvumą, todėl slopinamasis poveikis galėjo būti dėl dikarbonilinių junginių ir aminorūgščių surišimo.

4. IŠVADOS

1. Gelio chromatografijos metodu bendras betacianinų kiekis buvo sukonzentruotas iki 34 % (BtFII). Preparatinės efektyviosios skysčių chromatografijos metodu gautų betanino (BnF) ir vulgaksantino I (VxF) frakcijų grynumas atitinkamai buvo 78 % ir 100 %. Burokėlių preparatų antioksidacinis aktyvumas nekoreliavo su *BFJK*, bendro betalainų kiekio ir betalainų santykio vertėmis. Betanino gryninimas padidino jo radikalų sujungimo gebą. Betanino frakcijos antioksidacinis aktyvumas (EC_{50} , 0,55 mg/ml) buvo 21 didesnis už BSM (EC_{50} , 11,56 mg/ml) ir 300 kartų didesnis už vulgaksantino I frakcijos (EC_{50} , 151,45). Nustatyta, jog betacianinų radikalų sujungimo geba yra didesnė nei betaksantinų, o betanino skilimo produktai taip pat pasižymi antioksidaciniu aktyvumu.
2. Didžiausia bruknių lapų ekstraktų išeiga, antioksidacinis aktyvumas ir *BFJK* vertės buvo vandens ir metanolio ekstrakto, o mažiausia – acetonio. Ekstraktų antioksidacinis aktyvumas koreliavo su fenolinių junginių kiekiu. Pagrindinės fenolinių junginių klasės BLVE buvo hidroksicinamono rūgštys ir flavonoliai, o BLME ir BLAE – arbutino dariniai ir flavan-3-oliai. BLVE stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo katechinas ir epikatechinas, o BLME ir BLAE – katechinas ir kafeoilacetilarbutinas.
3. Burokėlių priedų poveikis toksinių Mejero reakcijos produktų susidarymui priklausė nuo jų koncentracijos ir pačios modelinės sistemos. Pieno modelinėje sistemoje burokėlių sulčių miltelių priedas sumažino furozino ir CML susidarymą; didžiausias sumažėjimas atitinkamai apie 30 ir 17 % buvo su 0,3 mg/ml priedu. Fenilalanino modelinėje sistemoje BnF ir BSM, esant mažiausioms jų koncentracijoms, slopino PhIP susidarymą, tačiau, didėjant jų koncentracijoms, PhIP kiekis didėjo. Mėsos modelinėje sistemoje BnF priedas intensyviai padidino PhIP kiekį bandiniuose. VxF abiejuose HA modelinėse sistemose efektyviai slopino PhIP susidarymą. Tačiau, esant tam tikroms koncentracijoms, tiek VxF (5-15 mg/ml), tiek BnF (5 mg/ml) priedams, padidėjo heterociklinių aminų, kurių prekursorai yra piridino ir pirazino laisvieji radikalai.
4. Bruknių lapų ekstraktų poveikis toksinių Mejero reakcijos produktų susidarymui priklausė nuo jų koncentracijos ir pačios modelinės sistemos. Pieno modelinėje sistemoje BLVE priedas slopino furozino ir CML susidarymą; didžiausias sumažėjimas, atitinkamai 17 ir 30 %, buvo su 0,1 mg/ml BLVE priedu. Chino rūgštis ir katechinas nustatyti kaip vieni iš aktyvių junginių, kurie pasižymėjo slopinamuoju poveikiu BLVE. HA modelinėse sistemose nustatyta, jog bruknių lapų ekstraktų poveikis HA susidarymui priklausė ir nuo jų fenolinių junginių sudėties. Fenilalanino modelinėje sistemoje BLVE, turintis didesnę kiekį hidroksicinamono rūgščių,

buvo mažiau efektyvus nei ekstraktas, turintis daugiau katechino ir arbutino darinų, ir iki 5 mg/ml koncentracijos bandiniuose skatino PhIP susidarymą. Bandiniuose su 10 mg/ml koncentracija BLVE ir BLAE sumažėjimas atitinkamai buvo apie 20 ir 40 %. Mėsos modelinėje sistemoje, didėjant BLVE ir BLAE koncentracijoms, PhIP kiekis mažėjo: iki 40 % PhIP kiekio sumažėjimas buvo bandiniuose su 10 mg/ml ekstraktais. Nustatyta, jog, esant šiai BLVE koncentracijai, reikšmingai padidėjo MeIQx ir MeIQ kiekiai.

5. Fenilalanino sistemoje bendras MR intensyvumas padidėjo su įvairiais burokėlių preparatais. Mejaro reakcijos intensyvumas didėjo, didėjant PhIP kiekiui bandiniuose su betanino ir BSM priedais ir mažėjant PhIP kiekiui bandiniuose su VxF priedu. Mejaro reakcijos intensyvumas bandiniuose su bruknių lapų ekstraktais mažėjo ir koreliavo su PhIP kiekiu. Skirtingas burokėlių preparatų ir bruknių lapų ekstraktų poveikis Mejaro reakcijos intensyvumui rodo skirtingą jų veikimą mechanizmą. Burokėlių preparatai slopino PhIP susidarymą, tačiau intensyvino Mejaro reakciją, todėl PhIP kiekio slopinimas galėjo būti dėl karbonilinių junginių padidėjimo. Bruknių lapų ekstraktai mažino PhIP formavimąsi ir Mejaro reakcijos intensyvumą, todėl slopinamasis poveikis galėjo būti dėl dikarbonilinių junginių ir aminorūgščių surišimo.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS STRAIPSNIAI

Mokslinės informacijos instituto (ISI) pagrindinio sąrašo leidiniuose

1. Ieva Račkauskienė; Audrius Pukalskas; Petras Rimantas Venskutonis; Alberto Fiore; Antonio Dario Troise; Vincenzo Fogliano. Effects of beetroot (*Beta vulgaris*) preparations on the Maillard reaction products in milk and meat-protein model systems // Food Research International. ISSN: 0963-9969. 2015, Vol. 70, p. 31-39 (I.F. 4,437).
2. Ieva Račkauskienė; Audrius Pukalskas; Alberto Fiore; Antonio Dario Troise; Petras Rimantas Venskutonis. Phytochemical-rich antioxidant extracts of *Vaccinium vitis-idaea* L. leaves inhibit the formation of toxic Maillard reaction products in food models // Journal of Food Science. ISSN: 0022-1147. 2019, Vol. 84, no 12, p. 3494-3503 (I.F. 2,081).

Konferencijų pranešimų medžiagoje

1. Audrius Pukalskas; Ieva Račkauskienė, Petras Rimantas Venskutonis. Antioxidative capacity of beta vulgaris extracts and their effect on the formation of heterocyclic amines in A model system // Chemical Reactions in Foods VII, November 14-16, 2012, Prague, Czech Republic : international conference on new knowledge on chemical reactions during food processing and storage : book of abstracts. Prague : Institute of Chemical Technology, 2013. ISBN: 9788070808368. p. 10.
2. Ieva Račkauskienė; Renata Baranauskienė; Petras Rimantas Venskutonis; Audrius Pukalskas. Essential oil composition and antioxidant properties of extracts from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaves // FOODBALT-2013: 8th Baltic conference on food science and technology "Food, health and well-being", May 23-24, 2013, Tallinn, Estonia : conference programm and abstracts / Tallinn University of Technology. Tallinn: Tallinn University of Technology, 2013. ISBN: 9789949430635. p. 57.
3. Ieva Raudoniūtė; Petras Rimantas Venskutonis; Audrius Pukalskas; Vincenzo Fogliano. Fitocheminių junginių ir augalinių ekstraktų poveikis Mejero reakcijos produktų susidarymui modelinėje sistemoje // Doktorantų stažuotės užsienio mokslo centruose 2012-2013: konferencijos pranešimų santrauka. Vilnius: Lietuvos mokslo taryba, 2013. ISBN: 9789955613640. p. 56-58.
4. Ieva Raudoniūtė; Audrius Pukalskas; Petras Rimantas Venskutonis; Vincenzo Fogliano. The effect of phytochemical compounds and plant extracts on the formation of maillard reaction products in model system // FOODBALT-2014: 9th Baltic conference on food science and technology "Food for consumer well-being", May 8-9, 2014, Jelgava, Latvia : conference programm and

- abstract / Latvia University of Agriculture. Jelgava: Latvia University of Agriculture. 2014. ISSN: 2255-9809. p. 130.
5. Ieva Račkauskienė; Audrius Pukalskas; Petras Rimantas Venskutonis. The effect of beetroot (*Beta Vulgaris*) on the formation of heterocyclic amines in meat-protein and meat model systems // *FOODBALT-2015: 10th Baltic Conference on Food Science and Technology*. “Future Food: Innovations, Science and Technology”, May 21-22, 2015, conference program and abstracts / Kaunas University of Technology. Kaunas: department of Food Science and Technology, 2015. e-ISBN 978-609-02-1138-0. p. 44.
 6. Ieva Račkauskienė, Audrius Pukalskas, Alberto Fiore, Antonio Dario Troise, Petras Rimantas Venskutonis. Effects of antioxidant extracts isolated from *Vaccinium vitis-idaea* L. leaves on the formation of Maillard reaction products in food models // *NEEFOOD 2017: 4th North And East European Congress On Food*, September 10-13, 2017, abstract book / Kaunas, Lithuania. ISBN 978-609-02-1373-5. p. 43.

Trumpa informacija apie autorių

Ieva Račkauskienė gimė 1984 m. gruodžio 27 d. Šilalėje.

2004 m. baigė Šilalės Simono Gaudėšiaus gimnaziją.

2004–2008 m. studijavo Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakultete, baigė maisto technologijos ir inžinerijos studijų programą ir įgijo chemijos inžinerijos bakalauro laipsnį.

2009 m. vasario mėn. – 2009 m. rugsėjo mėn. stažavosi Burgos universitete (Burgos, Ispanija) pagal ERASMUS programą.

2008–2010 m. studijavo Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakultete, baigė maisto mokslo studijų programą ir įgijo chemijos inžinerijos magistro laipsnį.

2011–2020 m. studijavo Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakultete, chemijos krypties doktorantūroje.

2013 m. vasario mėn. – 2013 m. gegužės mėn. stažavosi Neapolio Frederiko II universitete.

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovui doc. dr. Audriui Pukalskui ir prof. dr. Petrui Rimantui Venskutoniui už disertacijos temos idėją, vertingas mokslines konsultacijas ir diskusijas, pagalbą rengiant mokslines publikacijas, pasitikėjimą ir palaikymą visų doktorantūros studijų laikotarpiu. Dėkoju prof. dr. Vincenzo'ui Fogliano'ui už suteiktas galimybes stažuotis jo mokslinėje grupėje, kūrybines idėjas ir vertingas mokslines diskusijas, Alberto'ui Fiore ir Antonio'ui Dario'ui Troise už vispusišką pagalbą atliekant mokslinius tyrimus Neapolio Frederiko II universitete bei rengiant mokslines publikacijas. Nuoširdžiai dėkoju Kauno technologijos universiteto Maisto mokslo ir technologijos katedros kolegoms už gerą darbinę atmosferą, konsultacijas ir pagalbą atliekant tyrimus. Esu dėkinga savo vyrui Justinui, sūnui Izidoriui ir tėvams už kantrybę, palaikymą ir meilę.

Dėkoju visiems, kurie prisidėjo prie sėkmingo šio darbo įgyvendinimo!

Ieva Račkauskienė

BEETROOT (*BETA VULGARIS*) AND LINGONBERRY (*VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.) LEAVES PREPARATIONS ANTIOXIDATIVE CHARACTERISTICS AND IMPACT ON THE FORMATION OF TOXIC MAILLARD REACTION PRODUCTS IN FOOD MODEL SYSTEMS

ABSTRACT

Relevance of the research

Thermal processing of foods is an essential and highly beneficial step which inactivates foodborne pathogens, extends the shelf life and forms the desired sensorial (e.g., color, texture, aroma, and taste) and technological (protein solubility and emulsifying ability) properties. On the other hand, chemical reactions take place between food components, and consequences in the formation of toxic molecules may be manifested. The majority of those reactions are linked to the Maillard reaction (MR) occurring between the carbonyl groups of reducing sugars and the free amino groups of amino acids. In addition, other molecules, such as lipids, antioxidants, vitamins, and creatinine, may also interact and contribute to Maillard chemistry. Dietary MRPs (Maillard reaction products), such as advanced glycation end products (AGEs), heterocyclic amines (HAs), polycyclic aromatic hydrocarbons, acrylamide, furan and furfural products, are an emerging concern due to the evidence of the negative impact on human health. Most of them stem from proteinous foods. For example, IARC in 2015 assigned red meat to the status of “probably carcinogenic to humans” (Group 2A), while processed meat was assigned to “carcinogenic to humans” (Group 1). Nowadays, there is available evidence that consumption of thermally treated foods has been increasing, therefore, there is emerging demand for tools to control MR, especially in order to reduce the formation of potentially toxic MRPs. One of the tools is the interaction between MR and phenolic compounds. It is known that phenolic compounds can react with sugar fragmentation products and amino acids/proteins to form adduct reaction products. However, there is lack of information on the impact of natural substances or the effects of phenolic compounds on toxic MRPs formation. Phenolic compounds have been demonstrated to possess the ability to moderate MR in foods and in model systems. Several studies revealed that green tea catechins are effective inhibitors of the formation of MRPs. As leaves of *Vaccinium vitis-idaea* L. were proved to be a rich source of flavonoids including catechins, they are a natural source with promising properties. Also, so far, no research has been made on how betalains from *Beta vulgaris* can influence MRP formation, while betalains under E162 food additive number are broadly used in many foods for coloring purposes. One of expectations to inhibit MRP formation of betalains is the competition of amino acids in the case of the action of betaxanthins; the other case is quinone methide formation and trapping of

dicarbonyls and amino acids in the case of the action of betacyanins or phenolic compounds. Thus, the study of the influence of bioactive phytochemicals on the toxic MRP formation remains an essential prerequisite. Therefore, the main goal of this thesis is to provide potential application of some natural ingredients extracted from plants as possible inhibitors for the formation of toxic MRPs in order to enhance the quality of processed foods.

Aim and tasks of this research

The main aim of this work was to investigate the effect of betalains isolated from beetroot (*Beta vulgaris*) and phenolic compounds isolated from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaves on toxic Maillard reaction products formation in food model systems. To achieve this aim, the following objectives were outlined for this research work:

1. to purify betanin and vulgaxanthin I from beetroot by using gel chromatography and preparative high-performance liquid chromatography methods and to determine the antioxidative properties and chemical composition of various betalains preparations.
2. to prepare various polarity extracts from deodorized and non-deodorized lingonberry leaves and to determine their antioxidative properties and the composition of phenolic compounds.
3. to evaluate the effects of beetroot preparations on the formation of toxic MRPs in milk and meat model systems.
4. to evaluate the effect of various extracts of lingonberry leaves on the formation of toxic MRPs in milk and meat model systems.
5. to evaluate the effects of beetroot preparations and lingonberry leaves extracts on MR intensity parameters in the phenylalanine model system.

Scientific novelty of the research

The scientific novelty of the performed research may be summarized by the following main points:

1. The effects of betalains from beetroot on the formation of toxic Maillard reaction products in food models have been evaluated for the first time.
2. The effects of lingonberry leaves extracts on the formation of toxic Maillard reaction products in food models have been evaluated for the first time.
3. Systematic evaluation of the antioxidant properties and the content of phenolic compounds of various polarity extracts from lingonberry leaves has been performed for the first time.
4. This is the first study showing that various polarity extracts from the same material can exert the Maillard reaction in different ways.

Practical significance of the research

The research results showed that the antioxidant activity of betanin depends on its purity and is 21 and 300 times higher than the values of BJP and VnF, respectively. It was observed that beetroot and lingonberry leaves preparations

could suppress MRP formation in the milk model system. Quinic acid and catechin were attributed to be the compounds responsible for the inhibition action in WE. It was determined that beetroot and lingonberry leaves preparations could inhibit and promote HAs formation depending on their concentration in meat model systems. The inhibitory effect of various beetroot preparations on HAs formation was more pronounced at lower concentrations, whereas higher concentrations intensified their formation and increased the intensity of MR. The inhibitory effect of lingonberry extracts on HAs formation and the total MR intensity was more pronounced at higher concentrations, whereas the lower concentrations of water extract enhanced their formation, and acetone extract did not exert any effect. The obtained results indicate that the different action of lingonberry leaves extracts on HAs formation was due to the different composition of phenolic compounds. Hydroxycinnamic acids were attributed to be the promoters of HAs formation, whereas catechin and arbutin derivatives were assigned to be inhibitors. The results of this work can be used to develop functional ingredients for processed foods in order to control the MR due to the potentially toxic MRPs formation; they thus provide an opportunity to make better quality food.

Systematic evaluation of antioxidant properties and the composition of phenolic compounds of various polarity extracts from lingonberry leaves was performed for the first time. From this point of view, the results might be useful for preparing efficient natural functional ingredients for food, pharmaceutical, nutraceutical and cosmetics industries.

Structure and outline of this dissertation

This dissertation is divided into the following parts: a list of abbreviations, an introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, conclusions, a summary, a list of 263 references, and a list of publications on the dissertation topic. The literature survey and results of the research are presented in 114 pages, including 15 tables and 51 figures.

Publication of the research results

The results of this research have been presented in 2 publications included in the list of the *Institute of Science Information* (ISI) database and have been presented at 5 international conferences.

Statments presented for the defence

1. Betalains can inhibit or promote the formation of toxic MRPs depending on their concentration.
2. Lingonberry leaves extracts mitigate MR and thus inhibit the formation of furosine, CML and heterocyclic amines. The action of lingonberry leaves extracts depends on their concentration and the composition of phenolic compounds.

CONCLUSIONS

1. The total betalains content increased up to 34% (BtFII) by gel chromatography. The purity of betanin and vulgaxanthin I fractions by preparative HPLC was 78% and 100%, respectively. The antioxidant activity of beetroot preparations did not depend on the total phenolic content, the total betalains content, and the betalains ratio. Purification of betanin increases its radical scavenging properties. Betanin fraction (EC_{50} , 0.55 mg/ml) showed 21 times higher radical scavenging activity than BJP (EC_{50} , 11.56 mg/ml) and 300 times higher than Vulgaxanthin I fraction (EC_{50} , 151.45). Betacyanins possess stronger radical scavenging properties than betaxanthins, while the degradation products of betanin were shown to manifest antioxidant activity.
2. The highest yields, antioxidant capacity and TPC of lingonberry leaves extracts were those of water and methanol extract, while the lowest yields were of acetone extract. The antioxidant activity of extracts well correlated with the content of phenolic compounds. The most abundant constituents in the water extract were hydroxycinnamic acids and flavonols, while in the methanol and acetone extracts these were arbutin derivatives and flavan-3-ols. Catechin and epicatechin were the main contributors to the antioxidant activity in the water extract, while catechin and caffeoyl-hexose hydroxyphenol were the main contributors in the methanol and acetone extracts.
3. The effect of beetroot preparations on the formation of Maillard reaction products depended on their concentration and the model system. BJP reduced furosine and CML formation in the milk model system: the highest reduction around 30% and 17% was with 0.3 mg/mL of addition, respectively. In the phenylalanine model system, BJP and BnF at a low concentration reduced PhIP formation, while, with the increasing concentrations, the amount of PhIP increased. In the meat model system, BnF showed a strong promoting effect on HAs formation. The addition of VxF in both model systems showed a reducing effect on HAs formation. It was observed that, at certain concentrations, VxF (5–15 mg/ml) and BnF (5 mg/mL) increased in amounts of these HAs whose precursors are pyridine and pyrazide radicals.
4. The effect of lingonberry leaves extracts on the formation of Maillard reaction products depended on their concentrations and the model system. WE addition reduced furosine and CML formation in the milk model system. The highest reduction of furosine and CML by 27% and 42% was with the concentration of 0.1 mg/mL. Quinic acid and catechin were attributed to be the compounds responsible for the inhibition action in WE. In the HAs model systems, it was determined that their effect on HAs formation also depended on the composition of their phenolic compounds. In the phenylalanine model system, the WE which contained a higher amount of hydroxycinnamic acids was less

effective than AE which contained higher amounts of catechin and arbutin derivatives, and promoted PhIP formation in the samples up to 5 mg/ml of its concentration. The highest reductions by 20% and 40% were with 10 mg/mL of WE and AE, respectively. In the meat system, with the increasing WE and AE concentrations, the PhIP amount decreased. The highest reduction of the PhIP content by 40% was in samples with 10 mg/mL of extract additions. The significant increase in MeIQ_x and MeIQ contents in the samples with WE additions at that concentration were observed.

5. In the phenylalanine model system, the overall MR intensity increased in the samples with beetroot preparations. MR intensity increased with the increasing PhIP amount in the samples with BnF or BJP addition and when the amount of PhIP was decreasing in the samples with VxF addition. MR intensity (A_{420} and antioxidant activity) in the samples with LL extracts was lowered; it correlated well with the reducing amount of PhIP. The different action of beetroot preparations and LL extract on the MR intensity shows their different action mechanism(s). When beetroot preparations inhibited PhIP formation, the overall MR intensity was increased, therefore, the reductive action might be through the reactive oxygen species generation at certain concentrations. LL extracts reduced the PhIP formation and the overall MR intensity, therefore, the reduction action might be through the trapping of reactive oxygen species and amino acids.

CURRICULUM VITAE

Ieva Račkauskienė was born on the 27th of December, 1984 in Šilalė, Lithuania.

2004: graduation from Šilalės Simonas Gaudėšius Gymnasium.

2004 – 2008: Bachelor's degree studies at Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology, Bachelor of Chemical Engineering.

2009/02 – 2009/09: ERASMUS program at Burgos University (Burgos, Spain).

2008 – 2010 Master's degree studies at Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology, Master of Chemical Engineering.

2011 – 2020 doctoral degree studies at Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology.

2013/02– 2013/05 scientific mission at University of Naples Federico II, Department of Agricultural Science.

Acknowledgements

I wish to express my gratitude to my scientific supervisor assoc. prof. dr. Audrius Pukalskas and prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis for the idea and subject of this doctoral dissertation, valuable scientific consultations and discussions as well as help in preparing publications, encouragement and support during the doctoral studies at Kaunas University of Technology. I am highly thankful to Prof. dr. Vincenzo Fogliano for the possibility to perform internship at University of Naples Federico II, scientific ideas and consultations and to my dear colleagues from University of Naples Federico II Alberto Fiore and Antonio Dario Troise for technical help during the experiments and help in preparing publications. I am grateful to all of my colleagues from the Department of Food Science and Technology at Kaunas University of Technology for technical help during lab experiments for the friendly and creative environment. My special gratitude goes to my husband Justinas, my son Izidorius, parents and friends for their patience, encouragement and support.

Thanks to everyone who contributed to the success of this work!

Ieva Račkauskienė

UDK - 663/664(043.3)

SL344. 2020-04-16, 2,25 leidyb. apsk. I. Tiražas 50 egz.

Išleido Kauno technologijos universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44249 Kaunas
Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas